

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio en Ciencias Agropecuarias
Doctorado en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

***“Mycobacterium smegmatis, UN MODELO PARA LA
EXPRESIÓN GENÉTICA Y PROTEICA DE LAS
MICOBACTERIAS COMO RESPUESTA AL AMBIENTE.”***

**Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Agropecuarias**

PRESENTA:

HÉCTOR MANUEL LÓPEZ PÉREZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

CO-DIRECTORA DE TESIS:

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

ASESORES:

DRA. SYLVIA PAZ DÍAZ CAMACHO

DR. SIXTO VELARDE FÉLIX

DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO

Culiacán, Sinaloa, México; a 31 de agosto de 2015

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **HÉCTOR MANUEL LÓPEZ PÉREZ**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA **DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO**

CO-DIRECTORA **DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO**

ASESORA **DRA. SYLVIA PAZ DÍAZ CAMACHO**

ASESOR **DR. SIXTO VELARDE FÉLIX**

ASESOR **DR. EFRÉN DÍAZ APARICIO**

CULIACÁN, SINALOA, AGOSTO DE 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
REPOSITORIO INSTITUCIONAL

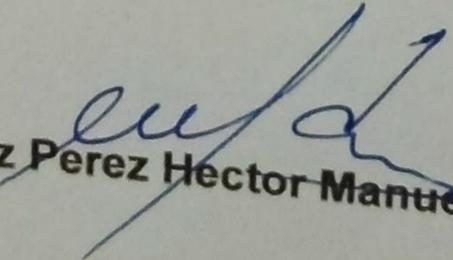
CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán el día 23 del mes agosto del año 2021, el que suscribe alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias con número de cuenta 8024261, de la Unidad Académica Colegio de Ciencias Agropecuarias, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho y de acuerdo al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor, cede los derechos del trabajo intitulado "EXPRESIÓN DEL GEN *esat-6* EN *Mycobacterium smegmatis* POR EFECTO DEL AGOTAMIENTO DE FÓSFORO INORGÁNICO.", a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su publicación, difusión, edición, reedición, traducción, compilación, distribución y explotación en medios impresos y digitales, con fines académicos y de investigación, la que será titular del mismo, en forma conjunta o separada con el autor.

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de ésta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando a los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

En apego al Art. 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor Cedo el derecho de publicación, difusión, edición, reedición, traducción, compilación, distribución y explotación en medios impresos y digitales, con fines académicos y de investigación a la Universidad Autónoma de Sinaloa.


López Pérez Héctor Manuel

PRÓLOGO

El ser que busca la libertad lucha constantemente para mantener su mente crítica, pero es arduo el entrenamiento, porque son mayores las tentaciones para permanecer en la ilusión que impide la experimentación como herramienta fundamental de la crítica. Porque a todas luces, experimentar es a lo que venimos a este mundo; independientemente de cualquier actividad que tengamos que desarrollar. La mente crítica implica el desarrollo de pensamientos divergentes como las propuestas heurísticas para resolver problemas. Es decir, el pensamiento crítico se consigue mediante el entendimiento heurístico, porque los problemas que se plantean en la ciencia son complejos, por lo que es difícil ubicar el rumbo cuando se tienen ideas inconclusas que se modifican al ir avanzando en la construcción del nuevo conocimiento. De esta manera el esquema mental generado una y otra vez, se va modificando al razonar a la inversa. Una propuesta desconcertante, porque razonar a la inversa es cuando no tienes la solución y haces como si ya la tuvieras. Cuando se hace esto, buscas respuestas en la información existente para deducir qué es lo que pasa cuando tu solución propuesta no tiene sustento, pero tampoco la entiendes. Lo que sucede entonces, es que la respuesta se fortalece al encontrar la información que te dice que esa idea ya la habían pensado análogamente otros. Aunado a esta acción heurística, cuando se elabora un esquema mental, se invierte el razonamiento de los conceptos menos inclusivos a los más incluyentes, por lo que puede cambiar el orden jerárquico de 'cuál incluye a cuál'. Lo anterior conduce al siguiente principio heurístico para la resolución de problemas que es "la paradoja del inventor" y se refiere al acercamiento de un problema particular a la solución de problemas generales y ambiciosos. Lo maravilloso de esto es que la orientación de la ciencia es: proponer la generalidad a partir de las particularidades.

La idea inicial que originó este trabajo, era comprobar que las micobacterias saprófitas, poseen capacidades metabólicas similares a las que tienen las micobacterias patógenas. Esta idea tiene su origen en que ambas poseen un 'sistema de secreción único de las micobacterias'. Por lo que para poder entender esta hipótesis, los autores que han trabajado en torno a este objeto de estudio se

han abocado a la Región de Diferencia 1 formado por 7 genes que generan las proteínas correspondientes para apoyar la secreción final el dipéptido ESAT-6/CFP-10. Porque algunas investigaciones anteriores habían demostrado que bajo determinadas condiciones de estrés tanto *in vivo* como *in vitro*, se puede provocar o no la secreción de estas proteínas. Es decir, las condiciones estresantes en las que se desarrollan las micobacterias desencadenan mecanismos mediante los cuales perciben el ambiente lo que origina una respuesta molecular para protegerse. Para comprobar esta acción, se tomó en cuenta la ruta de señalización que inicia con la transducción a nivel del sistema de dos componentes que se fosforilan y desfosforilan para conducir la señal molecular y activar los genes correspondientes. En la ruta posterior, a este proceso se comprometen algunos factores que están involucrados en el funcionamiento de la ARN polimerasa, tales como los factores sigma y la alarmona guanosina tetrafosfato, que induce la expresión de genes relacionados con el estrés en los organismos procariontes. Por lo que se planteó restringir las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo del medio mínimo Hartman de Bond, en el que se cultivó *M. smegmatis* y probar en cuál de los medios se presentaba la expresión del gen *esat-6*.

Los resultados obtenidos por quienes antecedieron con sus estudios al que aquí se presenta, permitían discutir y proponer el desarrollo de más investigación en torno al tema ya iniciado en esta tesis y por las publicaciones de otros autores. Pero todo tiene sus límites y como todo proyecto, llega el momento que debe tomar un cauce que a veces suena inesperado, para cumplir con las exigencias de los recursos escasos y la premura para resolver. Por tal motivo, se tuvieron que retomar una serie de investigaciones realizadas de otras líneas de investigación aparentemente distintas y encausar la hipótesis planteada sobre la expresión bajo condiciones de estrés, la homología de las proteínas expresadas y su relación con la antigenicidad cruzada que se puede dar por la acción de las micobacterias tuberculosas o por las apatógenas como lo es el caso de *M. smegmatis*, usada como modelo para apuntalar la tesis doctoral que aquí se propone. Por lo que se planteó que el metabolismo de las micobacterias no nada más es un asunto aislado, sino que son parte de las

reacciones de las micobacterias *In vivo* que afecta el comportamiento inmunológico del hospedero.

Por el curso natural que toma *Mycobacterium tuberculosis* para invadir el hospedero y la invasión accidental que un momento dado pueden efectuar las micobacterias saprófitas si las condiciones las favorecen para permanecer en él como en cualquier otro ambiente. De acuerdo con esto, la hipótesis se amplió para abarcar los aspectos relacionar al comportamiento metabólico de las micobacterias, la variación de la producción de proteínas/antígeno homólogas bajo condiciones de estrés y su inmunogenicidad.

Sobre la métrica de los contenidos de esta tesis, se puede decir que el capítulo de la introducción y la revisión de literatura, sostienen las evidencias relacionadas con el manejo de la información. Para escribir la revisión, se tomaron en cuenta los conceptos básicos que se mencionaban en los artículos originales que trataban el problema concreto relacionado con el objeto de estudio de esta tesis. Por lo que el capítulo “Introducción y Revisión de Literatura”, abarca la mayor parte de las 673 referencias que aparecen en el capítulo de literatura citada. A su vez estos documentos equivale al 9.3% de la información que conforma la base de datos personal, que contiene 7280 documentos que se encuentran almacenados en una base de datos construida con el apoyo del administrador de información científica EndNote[®], de estos artículos los que corresponden a revisiones de literatura profesionales son 925.

El capítulo “Introducción y Revisión de Literatura” contiene la información para entender el problema desde las diferentes perspectivas. Tal como se abordan los temas en los artículos de revisión en las revistas especializadas para este tipo de publicación, en los cuales se observó que el número promedio de referencias es de 218 por publicación, con un rango que va de 385 el máximo y 47 el mínimo, en los cuales quedan representados la revisión que abarcan problemas desde diferentes perspectivas y los que manejan cuestiones concretas.

Los glosarios que me ayudaron en mi formación intelectual y técnica fueron:

1. Comprensión de la tesis con 725 términos.
2. De abreviaciones con 1172.
3. Coloquios y socializaciones con 60.
4. Manejo de información en la Web con 118 términos
5. Biología en general con 320 términos.

La experimentación desarrollada para esta tesis fue posible debido a las donaciones de las cepas *M. smegmatis* mc² 155 y 19420 por la Dra. Clara Espitia Pinzón, Directora del Comité de Bioseguridad del Instituto Biomédicas de la UNAM. Para el entrenamiento de las técnicas de laboratorio se llevaron estancias en diversos laboratorios, entre los cuales se destaca el Laboratorio de Alta Tecnología de Orizaba, Veracruz; el Laboratorio del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias del Valle de Culiacán, Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad Académica de Medicina de la Universidad Autónoma de Nayarit, Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nayarit, Lab #5 Louis Pasteur de la Facultad de Ciencias Químico biológicas de la UAS y el Laboratorio de Biología Molecular de la FMVZ-UAS. Los recursos materiales fueron otorgados vía PROFAPI-UAS, mediante el concurso de dos proyectos de investigación presentados para su apoyo.

Mi formación doctoral inicial fue realizada en el Posgrado en Ciencias Pecuarias de la Universidad Autónoma Antonio Narro, bajo el 'Método Arenas' propuesto por el Centro de Innovación y Desarrollo Educativo. Posteriormente reinicié mis estudios en la FMVZ-UAS en el Posgrado en Ciencias Agropecuarias, en el cual se me revalidaron las materias coincidentes hasta el tercer semestre y se me otorgó beca CONACyT (CVU 251953).

La mayor parte de mi formación intelectual fue realizada por socialización entre pares, con los que tuve la oportunidad de compartir mi experiencia en las comunidades que asistí: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Centro de Estudios Justo Sierra de Surutato, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Universidad Autónoma de Nayarit y Universidad Autónoma de Sinaloa. En ello resalto el agradecimiento para los Doctores asesores: Miguel Arenas Vargas, Judith

Licea de Arenas, Alejandro Moreno Reséndez, Carlos Morán Rodríguez, Fausto Sánchez y García Figueroa, Jesús Antonio Malacón Díaz, Jesús H. del Río Martínez, Joel López Pérez, Juan Manuel Miramontes Carrillo, Martha Mendoza Velasco, Martha Vergara Santana, Rafael Rodríguez Martínez, Raúl Villegas Vizcaino. Gracias a ellos por mostrar el camino de la libertad a través de la moderación de la discusión y el respeto a la decisión de las personas, que permitían la equidad como forma para contrarrestar la verticalidad autoritaria.

Hablar de lo sublime es entender que existen las tríadas y como tal, no generan conflictos. Para eso está el tiempo con sus momentos en que resuelves tu vida, te dejan un recuerdo imborrable cuando aparecen personas que dicen que todo el tiempo que se te presente algún problema lo vas a poder resolver si sigues las recomendaciones que te hacen. Esos momentos se relacionan con alguien que apareció justo delante de ti y te atreviste a enfrentarlo, de esta manera surgió el Dr. Miguel Arenas Vargas.

Los candados que la sociedad pone para no ser libre comienzan desde la familia con la frase “obedece a tu hermano mayor”. En mi familia no fue así, aquí hubo acuerdos y consensos para seguir un camino y quien me estuvo invitando constantemente a seguir un camino fue el último de la familia. Gracias Joel.

Agradezco a la Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho por su apoyo, porque a través de su forma de pensar y conducir conocí al Dr. Sixto Velarde Félix, Dra. Idalia Enríquez Verdugo, Dra. Sylvia Paz Díaz Camacho y Dr. Efrén Díaz Aparicio que siempre estuvieron dispuestos ayudarme en la resolución de los problemas que se me presentaron.

Gracias a mis pares Ana Felicia Sandoval Cisneros, Carlos Landeros, Dora Alicia Longares Méndez, Lourdes Castillo Granada, Marcos Buccio Pacheco, María del Carmen Reza Vargas, María Nora Fernández Jaramillo, Maricela Ramírez Rangel, Miguel Ángel Aguilera Contreras, Nancy Herrera Moreno, Norma Domínguez Ávila, Olivia Carrillo Macías, Ramiro Álvarez Valenzuela, Rosa del Carmen Xicohténcatl Palacios, Maricela del Rocío González Martínez, Félix Susana Juárez López, Víctor

Manuel Salomón Soto, Víctor Wilson Corral, por haber contribuido al cambio de mis hábitos al leer mis escritos, hacer observaciones, corregir mi pensar al discutir mis ideas que moldearon mi discurso, mis acciones y mi carácter.

RESUMEN

***Mycobacterium smegmatis*, un modelo para la expresión genética y proteica de las micobacterias como respuesta al ambiente.**

Tesis que presenta: Héctor Manuel López Pérez

Las respuestas de la expresión de los genes proveen información sobre los estados metabólicos de las bacterias, cuando se manipulan los factores ambientales. *M. smegmatis* es la micobacteria saprófita usada con mayor frecuencia para entender metabolismo del complejo *M. tuberculosis*. En el metabolismo del fósforo algunas de las proteínas son parte de las respuestas de adaptación. En particular, ESAT-6 es una proteína que aumenta la virulencia de *M. tuberculosis*, al facilitar el escape de los macrófagos por lisis del epitelio alveolar y membranas de macrófagos. *In vitro* ESAT-6 en *M. smegmatis* no se secreta en el medio de cultivo 7H9 pero si en el medio Sauton. De la misma manera pueden existir otras proteínas que se expresen bajo estas condiciones. Para corroborar lo anterior, se probó el medio de cultivo Hartmans de Bond (HdB) en el que se limitó carbono (HdB<C), nitrógeno (HdB<N) y fósforo (HdB<Pi) para observar bajo qué condiciones de estrés se presentaba la expresión de *esat-6* de *M. smegmatis*. Además se planteó determinar el efecto del estrés por limitación de fósforo en la expresión de las proteínas de *M. smegmatis*, para observar su antigenicidad mediante sueros de bovinos positivos a tuberculosis. *M. smegmatis* detiene su crecimiento de acuerdo con el agotamiento de nutrientes para adaptarse en los cultivos HdB mínimo, HdB<C, HdB<N y recupera el crecimiento al cambiarlo a medio fresco, excepto en el medio HdB<Pi en el que su crecimiento es continuo, similar a HdB mínimo ($P < 0.05$). *esat-6* se expresó en HdB<Pi igual que en los medios usados como control (7H9 y Sauton). Cuando se limita el carbono y el nitrógeno, la adaptación está relacionada con la alarmona ppGpp que inhibe el crecimiento. En el medio HdB<Pi, no se inhibe el crecimiento por lo que la respuesta estricta probablemente falle. La ruta propuesta para regular la síntesis de ppGpp en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* es a través del control de la transcripción de *relA* vía *mprAB-sigE-relA*. Aunque se han propuesto otros sistemas para regular la secreción de ESAT-6 relacionados con el agotamiento del fósforo. Al respecto, algunos estudios, enfocados a la restricción de Pi, demuestran que no se expresa *esat-6* en *M. tuberculosis*, aunque no restringieron el Pi en medio 7H9 con L-glutamato como fuente de nitrógeno orgánico, mientras que en el presente estudio, se limita el Pi y la fuente de nitrógeno es inorgánica. En conclusión, el estado metabólico que presenta *M. smegmatis* en los medios de cultivo probados es diferente para HdB<Pi. Por lo que puede tener distintas rutas para su adaptación. Por otra parte, la adaptación en todos los medios excepto para HdB<Pi y su relación con la expresión del gen *esat-6*, conduce a proponer investigaciones sobre el comportamiento de los patrones de proteínas antigénicas de *M. smegmatis* expresadas en HdB<Pi, que son ortólogas a las de *M. tuberculosis* y probablemente cause reactividad cruzada.

Palabras clave: expresión genética, expresión proteica, agotamiento de nutrientes, *Mycobacterium smegmatis*, *esat-6*, antigenicidad.

ABSTRACT

The responses of the expression of genes provide information about the metabolic state of the bacteria, when environmental factors are manipulated. *M. smegmatis* is saprophyte mycobacteria used more frequently for understand metabolism of *M. tuberculosis* complex. In phosphorus metabolism some proteins they are part of adaptive responses. In particular, ESAT-6 is a protein that increases the virulence of *M. tuberculosis*, to facilitate escape lysis of macrophages and alveolar epithelial macrophage membranes. ESAT-6 in vitro in *M. smegmatis* not secreted into the 7H9 culture medium but if Sauton culture medium. Similarly there may be other proteins which are expressed under these conditions. To corroborate this, the culture medium was tested Hartmans de Bond (HdB) in which carbon (HdB<C), nitrogen (HdB<N) and phosphorus (HdB<Pi) simply to observe under what stress conditions showed expression of *esat-6* from *M. smegmatis*. It was further raised to determine the effect of stress phosphorus limitation in expressing the proteins of *M. smegmatis*, to observe its antigenicity by sera positive for bovine tuberculosis. Stops growing *M. smegmatis* according to nutrient depletion to fit in the minimum HdB crops HdB<C, HdB<N and growth recovers to change to fresh media, except in the culture media HdB<Pi where growth is continuous, like minimum HdB (P <0.05). *esat-6* was expressed in HdB<Pi as in the media used as control (7H9 and Sauton). When carbon and nitrogen limited, adaptation is related ppGpp alarmona that inhibits growth. In the culture media HdB<Pi is not inhibited growth, so probably fail strict response. The proposed route to regulate the synthesis of ppGpp in *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* is through control of transcription via *mprAB-sigE rela*. Although other systems have been proposed to regulate the secretion of ESAT-6 linked to the depletion of phosphorus. In this regard, some studies focused on restricting Pi, show that not expressed *esat-6* in *M. tuberculosis*, but not restricted Pi in 7H9 medium with L-glutamate as organic nitrogen source, whereas in the present study is limited Pi and the nitrogen source is inorganic. In conclusion, the metabolic condition with *M. smegmatis* tested in mass culture is different for HdB <Pi. So the routes may be different for adaptation. Moreover, adaptation in all media except for HdB<Pi and its relationship to the expression of *esat-6* gene, leading to propose investigation of the performance patterns of antigenic proteins expressed in *M. smegmatis* HdB<Pi, which they are orthologous to *M. tuberculosis* and likely to cause cross-reactivity

Key Word: gene expression, protein expression, nutrient depletion, *Mycobacterium smegmatis*, *esat-6*, antigenicity.

CONTENIDO

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA.	12
1.1 INTRODUCCIÓN.....	12
1.2.1. <i>Tuberculosis, un problema reemergente de salud mundial.....</i>	<i>15</i>
1.2.2. Activación de las micobacterias y los macrófagos.	19
1.2.2.1. Variación antigénica de las micobacterias.	25
1.2.3. Estimulación inmunológica a la que se enfocan las vacunas futuras.	30
1.2.3.1. Interferencia de las micobacterias ambientales en la vacunación.....	33
1.2.4. Reactividad cruzada y diagnóstico de tuberculosis.....	34
1.2.5. Capacidad de los bacilos tuberculosos para inactivar las defensas del hospedero.....	41
1.2.6. Adaptación de los bacilos tuberculosos para persistir en el hospedero.....	49
1.2.7. El metabolismo de los nutrientes principales en las micobacterias	51
1.2.7.1 Metabolismo del nitrógeno, su toxicidad y disponibilidad	53
1.2.7.2. Metabolismo del carbono	58
1.2.7.2.1 Metabolismo de los ácidos grasos	61
1.2.7.3. Metabolismo del fósforo.....	66
1.2.8 Aletargamiento y activación de los bacilos: estados que influyen en la variación antigénica.	69
1.2.8.1 Regulación de los genes ante el estado aletargado y activo de los bacilos tuberculosos	73
1.2.9. Expresión genética durante la reactivación de las micobacterias.....	83
1.2.9.1 Atenuación de las cepas BCG y la región de diferencia 1.....	87
1.2.9.2 Participación del operón de la región de diferencia 1 en la expresión del gen <i>esat-6</i>	90
1.2.10. Productos de los genes <i>esat-6</i> y sus homólogos.....	92
1.2.11. Sistemas de secreción, sus mecanismos y productos.....	101
1.2.11.1. Mecanismos relacionados con la exportación de proteínas	103
1.2.11.2. Modificación de las proteínas durante y después de la translación	105
1.2.11.3. Translocación	113
1.2.11.4. Ruta general de secreción Sec.....	117
1.2.11.5. El sistema de secreción Sec en las micobacterias	123
1.2.11.6. Sistema de secreción independiente Tat	125
1.2.11.7. El sistema Tat en las micobacterias.....	127
1.2.11.8. Relaciones evolutivas de los siete sistemas de secreción	128
1.2.11.9. Sistema de secreción único para las micobacterias (<i>T7SS</i>)	129
CAPITULO 2. ADAPTACIÓN DE <i>MYCOBACTERIUM SMEGMATIS</i> ANTE EL AGOTAMIENTO DE NUTRIENTES Y SU EFECTO EN LA EXPRESIÓN DE <i>ESAT-6</i>.	132
2.1. INTRODUCCIÓN.....	132
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	133
2.3. RESULTADOS.....	136
2.4. DISCUSIÓN	138
CAPITULO 3. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE <i>MYCOBACTERIUM SMEGMATIS</i> Y SU ANTIGENICIDAD CON SUEROS DE TUBERCULOSIS BOVINA.	141
3.1. INTRODUCCIÓN.....	141
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	142
3.3. RESULTADOS.....	145
3.4. DISCUSIÓN	147
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES	150
CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA.....	152

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA.

1.1 INTRODUCCIÓN

El aletargamiento y la reactivación son estados de las micobacterias impuestos por los factores ambientales. *Mycobacterium tuberculosis* en su estado aletargado, puede pasar desapercibido en el hospedero por décadas, antes de resurgir para causar una enfermedad aguda. La reactivación es una de las principales rutas por las cuales la bacteria altera las defensas del hospedero. Durante estos momentos, la micobacteria incrementa la secreción de las proteínas que le confieren su virulencia. Para la secreción, las bacterias han desarrollado mecanismos de transporte de moléculas del citosol hacia el exterior de la misma, cuya única función es lograr su supervivencia dentro del hospedero y a menudo se sincronizan cuidadosamente para impactar en el sitio y el momento exacto (Ize y Palmer, 2006).

Las funciones como respuestas de los genes en los microorganismos, pueden proveer información sobre los estados metabólicos de las bacterias. Por lo que la idea es explorar simultáneamente la expresión de los genes en presencia y ausencia de determinados factores ambientales (Wilson *et al.*, 1998). La expresión de los genes a nivel de los ARNm y de las proteínas, facilitan la obtención de diversos datos de rutas metabólicas específicas, con las cuales se puede predecir el comportamiento celular (Ideker *et al.*, 2001).

Durante las manipulaciones genéticas y ambientales implicadas en el metabolismo del fósforo, algunas de las proteínas se las conoce por ser parte de las respuestas de

adaptación cuando se limita el fósforo, pero no por la eliminación de otros nutrientes (ej. carbono, nitrógeno y sulfato) (Groat *et al.*, 1986; Siegele y Kolter, 1992); esto sugiere que algunos aspectos de la patogenicidad y/o las respuestas de supervivencia por carencia de fósforo, pueden ser similares cuando se agotan otros nutrientes (Siegele y Kolter, 1992; Schurdell *et al.*, 2007).

Los genes que codifican las proteínas ESAT-6 (por sus siglas en inglés: **Early Secreted Antigen Target-6**) están presentes en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, también se observan en los genomas de otras micobacterias, tales como *M. bovis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium avium* y la cepa avirulenta *M. smegmatis* (Gey Van Pittius *et al.*, 2001). Pero la expresión de ESAT-6 en *M. smegmatis*, requiere de ciertas condiciones de medio de cultivo durante su crecimiento. Por ejemplo, estas proteínas se secretan en medio Sauton pero no en 7H9, por lo que probablemente el sistema de secreción único para las micobacteria se manifiesta cuando uno o más componentes del medio en el que crece están presentes. El esfuerzo para determinar el componente preciso de esta regulación no ha sido exitoso. Por lo que se requiere entender la regulación potencial de la secreción de SmESAT-6 (Converse y Cox, 2005).

La tesis planteada aquí, se fundamenta en los factores ambientales como condición para la expresión genética y proteica. Por lo que se probó el medio de cultivo Hartmans de Bond (HdB) y distintas limitaciones de nutrientes para observar bajo qué condiciones de estrés se presentaba la expresión del gen *esat-6* de *M. smegmatis*. Además, se determinó el efecto del estrés por limitación de fósforo en la expresión de los grupos de proteínas de *M. smegmatis*, separadas por su tamaño

molecular, para observar su antigenicidad mediante sueros de bovinos positivos tuberculosis mediante la prueba Quantiferon®.

1.2. REVISIÓN DE LITERATURA

1.2.1. Tuberculosis, un problema reemergente de salud mundial

La tuberculosis es una enfermedad reemergente, en el humano y la principal causa de muerte por infección en los adultos. La causa más común de la tuberculosis en humanos es *M. tuberculosis* aunque se desconoce la proporción de casos debido a otras micobacterias como *M. bovis* (Cosivi *et al.*, 1998). El bacilo se dispersa a través de la vía respiratoria; es decir, los individuos con enfermedad activa pueden transmitir la infección si las partículas llevadas por el aire, producidas cuando se tose, habla o canta, son inhaladas por otros. Una vez que se implanta la infección, se puede manifestar por los síntomas, pero la otra forma de infección es la latente, durante la cual, los individuos no exhiben síntomas y no son infecciosos para los demás. Algunos humanos son capaces de contener esta infección latente indefinidamente, mientras que en un 10%, la enfermedad puede progresar y contagiar a los demás (Van Soolingen, 2001). Los brotes de tuberculosis, pueden ocurrir como un resultado de la heterogeneidad, tanto del hospedero, como por la variabilidad antigénica de la cepa. Por lo que la composición no aleatoria de una población, conduce a la aparición reemergente de la enfermedad en los grupos locales, en los cuales la enfermedad está lo suficientemente concentrada, la reinfección se convierte en un contribuyente potencial a nivel global de la tuberculosis. De esta manera, el efecto de la dinámica de la transmisión de la enfermedad, tienen implicaciones la aparición de nuevas cepas y en las políticas de control (Colijn *et al.*, 2007).

En los sondeos efectuados a través de la reactividad de la tuberculina, para la década 2000/2010 se estima que alrededor de una tercera parte de la población mundial, o 2,200 millones de individuos, se infectaron con el bacilo tuberculoso. Aunque la vasta mayoría de estos individuos llevan en sí una latencia asintomática, la cual no exhiben señales de la enfermedad (Tufariello *et al.*, 2006). Debido a la insuficiente protección de las vacunas actuales y la necesidad de nuevos y más activos medicamentos, no queda claro como puede ser controlada la tuberculosis en los países donde es verdaderamente endémica. Sin embargo, en el periodo 1995 al 2008, se trataron 36 millones de pacientes alrededor del mundo, y se evitaron más

de 8 millones de muertes (Russell *et al.*, 2010). Por tal situación, la tuberculosis permanece constante en la agenda global de salud, al ser fatal hasta en un 50% de los casos que no se tratan; aunado al problema de mortalidad por la co-infección con VIH/SIDA, que ha tenido un impacto en la crisis social y económica. No obstante, los riesgos futuros que se prevén para el control, los estudios clínicos y económicos siguen revelando que, el tratamiento farmacológico combinado para la tuberculosis es uno de los más eficaces en cuanto a todas las intervenciones de salud (Dye y Williams, 2010). A pesar de la eficacia de los tratamientos, es indispensable el monitoreo para evaluar la eficacia de los tratamientos de la tuberculosis, como herramienta para el éxito de las campañas para la erradicación de la tuberculosis. Al respecto, el análisis del esputo es una medida fiable y eficaz para la gestión y supervisión de la terapia indicada en pacientes con tuberculosis. Por otra parte, como existen relaciones simbióticas entre VIH y la infección por micobacterias, las respuestas a la terapia en los individuos infectados son un factor determinante para los resultados en los tratamientos (Salihu *et al.*, 2003).

Para finales de la década 2010, de los 33 millones de habitantes que vivían con VIH/SIDA a nivel mundial, aproximadamente 13 millones se encontraban infectados con *M. tuberculosis*. Esta co-infección incrementa el riesgo de mortalidad y morbilidad (Hurtley *et al.*, 2010), con una mortalidad del 20% en algunas áreas (Nunn *et al.*, 2005). En la mayoría de los países del Este de África y la parte meridional, la tasa de notificación de la tuberculosis se había incrementado hasta por cinco o más veces, como un resultado de la epidemia de VIH (Corbett *et al.*, 2003.; Aziz y Wright, 2005). Afortunadamente, la cooperación multilateral que se da a través del Fondo Global para la Lucha contra el SIDA, la Tuberculosis y la Malaria (The Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria), ha salvado millones de vidas en los países en vías de desarrollo. Por lo que se estima que aproximadamente 5 millones de personas pudieron haber muerto de SIDA, tuberculosis, o malaria en las pasadas 5 décadas, si no hubiera sido por la intervención del Fondo Global, que permitió que 2.5 millones de personas recibieran medicamentos terapéuticos para VIH. Mientras

que alrededor de 6 millones de pacientes recibieron un tratamiento efectivo contra la tuberculosis (Bloom, 2010).

En contraste a otras infecciones oportunistas, la infección *M. tuberculosis* ocurren con un elevado índice en las personas infectadas por VIH, en las etapas clínicas tempranas de la enfermedad, a pesar de la relativa protección de los linfocitos T CD4⁺ (acrónimo en inglés: **C**luster of **D**ifferentiation) (Williams y Dye, 2003; Sonnenberg *et al.*, 2005). En los países occidentales, la tuberculosis se desarrolla típicamente de la reactivación de la infección latente y raramente de la infección primaria, con un periodo de incubación que hace difícil su valoración. Las presentaciones clínicas difieren de acuerdo con el grado de inmunidad. Es decir, la representación clásica de la tuberculosis pulmonar es vista principalmente en los pacientes levemente inmunodeprimidos (células T CD4⁺ > 200/mm³), y es secundaria a una infección reciente. Esto puede tener repercusiones en la reacción intradérmica para el diagnóstico de la tuberculosis, que depende del estado inmune. Es decir, la reacción intradérmica de la tuberculina y la presencia de una reacción granulomatosa en los tejidos, requieren de una respuesta Th1 (acrónimo en inglés: linfocitos **T** helper) (Aaron *et al.*, 2004). Por lo que se tiene dificultades para establecer un diagnóstico basado en pruebas inmunológicas.

Una razón más por la cual la tuberculosis permanece en la agenda del Fondo Global contra esta enfermedad, es debido a la amenaza por la aparición de cepas que no pueden ser eliminadas por los medicamentos anti-tuberculosis estándares, recomendados por norma (Lawn y Wilkinson, 2006). La tuberculosis resistente a las drogas, surge comúnmente a través de la selección de cepas mutadas por la quimioterapia inadecuada. La resistencia al menos a los dos principales fármacos contra la tuberculosis, la isoniazida y la rifampicina se ha denominado como tuberculosis multi-resistente (TB-MDR). Para el tratamiento de la TB-MDR se requiere quimioterapia prolongada y costosa y son necesarios fármacos de segunda línea de toxicidad elevada. En caso de resistencia a los medicamentos de segunda línea, la enfermedad se vuelve virtualmente imposible de su tratamiento (Zager y McNerney, 2008).

Aunado a los problemas relacionados con la multi-resistencia y al sistema inmunológico, el agente causal de la tuberculosis es un complejo de micobacterias. Por lo que la variabilidad entre los organismos que causan la tuberculosis en el humano y el ganado, dificulta el diagnóstico y tratamiento de esta afección. De las más de 70 especies incluidas en el género *Mycobacterium*, 7 son las que conforma el complejo, entre ellas se encuentra el propio bacilo *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae* y *M. pinnipedii* y se encuentran estrechamente relacionadas (Aranaz *et al.*, 2003). La tuberculosis en el ganado, es el principal problema económico en muchos países. Aunque su transmisión zoonótica es mínima, pero causa una significativa morbilidad y mortalidad en el humano (Cosivi *et al.*, 1998). Además, la forma de presentación clínica de la enfermedad en el ganado, es similar al humano (Wedlock *et al.*, 1999).

La tuberculosis se puede presentar en varias formas, entre las que se incluye el ataque a los huesos y causar deformidades en el esqueleto. De esta manera, los tejidos duros como el hueso, pueden preservar el bacilo tuberculoso por miles de años. Por lo que se ha sugerido que en el antiguo Egipto era una enfermedad común en la población. Esto es debido a las evidencias presentadas por los esqueletos exhumados con aparentes deformidades tuberculosas. El descubrimiento de deformidades similares de los huesos en varios sitios neolíticos en Italia, Dinamarca y el Medio Oriente, también indican que la tuberculosis se encontraba en el mundo desde hace más de 4,000 años. El origen de *M. tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis en el humano, se ha sujetado a muchas investigaciones y se piensa que el género *Mycobacterium*, como otros actinomicetos, están inicialmente en el suelo y que algunas especies se encuentran involucrados con la vida de los mamíferos. Aún más, se ha considerado que la tuberculosis aparece con la domesticación del ganado, que ocurrió entre 10,000 a 25,000 años, por lo que pudo haber seguido el pasaje del patógeno micobacteriano del ganado doméstico al hombre y de esta manera la adaptación al nuevo hospedero (Smith, 2003). Estas interacciones hospedero-patógeno históricas y contemporáneas, son críticas para el entendimiento de la tuberculosis, así como para el desarrollo de vacunas, medicamentos

antituberculosos y métodos diagnósticos para erradicar esta enfermedad (Lin *et al.*, 2006).

1.2.2. Activación de las micobacterias y los macrófagos.

Los bacilos tuberculosos pueden permanecer en estado aletargado durante toda la vida del hospedero. Por lo que esta infección continúa siendo un problema de salud y probablemente sea un factor que contribuya a la reactivación continua de la tuberculosis en la población humana. De esta manera, la infección por micobacterias tuberculosas se transforma en un proceso complejo, en el que después de iniciada la exposición del bacilo ante el hospedero, la bacteria puede entrar a los macrófagos aprovechando las actividades de reconocimiento y fagocitosis posteriormente se apoderan del funcionamiento de los fagolisosomas, para impedir la fusión del fagosoma y el lisosoma que puede conducir a la muerte posterior del bacilo. Cuando no sucede este desenlace, el avance del bacilo desencadena otras respuestas inmunes del hospedero, lo que puede resultar en la formación del granuloma, en el cual las bacterias son rodeadas por y encontradas dentro de los linfocitos. Mientras que en el interior del granuloma, se presume que existe un ambiente hipóxico en el cual las bacterias disminuyen su reproducción. En ese momento, se pueden formar las lesiones necróticas focales en el hospedero, mediante las cuales las bacterias se encontrarán extracelularmente en un microambiente anaeróbico carente de nutrientes. Por lo que la adaptación en un ambiente bajo en oxígeno, es parte de la capacidad de las micobacterias tuberculosas para persistir en el hospedero (Muttucumaru *et al.*, 2004).

Después de ingresar las micobacterias tuberculosas en el interior de los macrófagos, inician su activación. Esto lo efectúan a nivel epigenético, en las histonas, que son proteínas modulan el cambio de la fase de apagado/encendido en las bacterias (White-Ziegler *et al.*, 1998; White-Ziegler *et al.*, 2000). Esta es una autorregulación positiva y negativa que implica una dicotomía o variación de la expresión de los genes que se pueden activar o desactivar en las bacterias. La variación multi-fase puede ser dividida en dos amplias categorías. La primera fase de variación, en la cual la expresión de un factor dado puede ser tanto encendido como apagado, es

usualmente reversible (encendido ↔ apagado), pero pueden ser irreversibles (apagado → encendido) y son eventos que ocurren generalmente al azar a una elevada frecuencia ($>10^{-5}$ por generación) y resultan en una población fenotípicamente heterogénea (Hernday *et al.*, 2002). En la mayoría de los casos, el significado preciso de la fase de variación referida, queda en la especulación. Además, la función adaptadora de este fenómeno puede variar ampliamente de organismo a organismo (Saunders *et al.*, 2003).

Entre las estrategias de sobrevivencia de las micobacterias al interior de los macrófagos, se ha postulado la acción de los sulfolípidos, por poseer una función significativa en la interacción de *M. tuberculosis* con el hospedero. Tal como la prevención de la fusión del fagosoma-lisosoma (Goren *et al.*, 1976). Además, existen evidencias de que los sulfolípidos de *M. tuberculosis*, inhiben el recubrimiento por los monocitos con los componentes de la célula bacteriana (ej. lipopolisacáridos) o las citocinas inducidas en los monocitos [ej. interferón gamma (IFN- γ)] (Brozna *et al.*, 1991). Pero los sulfolípidos, también pueden suprimir la formación de oxígeno reactivo por los monocitos, por lo que debilitan la capacidad antibacteriana de los monocitos/macrófagos (Sirakova *et al.*, 2001). Ante tal acción ejercida por las células del hospedero, es posible que aumente la expresión de la policétido sintasa-2, que incorpora las cadenas metilo en los lípidos, que actúan en la virulencia desencadenada por los sulfolípidos, misma que es conocida por la respuesta de la fagocitosis contra *M. tuberculosis* en los cultivos primarios de macrófagos del humano (Graham y Clark-Curtiss, 1999). Aunque la síntesis de los sulfolípidos, representa un costo energético para el patógeno; sin embargo, es requerido para reducir la efectividad de la activación de los macrófagos (Sirakova *et al.*, 2001).

En las etapas posteriores de la infección o después de que el hospedero se recupera, los linfocitos encuentran antígenos de los organismos infectantes, mismos que son conferidos a los macrófagos para aumentar su capacidad de aniquilar a los patógenos o los organismos que se encuentren relacionados con el causante de la enfermedad; a este proceso se le denomina activación de los macrófagos (Mackness, 1969). Pero la autorregulación de los macrófagos, también se efectúa a

nivel del encendido/apagado de los genes. Este es un proceso que se lleva a cabo, gracias a la actividad cooperativa de algunas proteínas, entre las que se encuentra la calmodulina, la cual actúa como factor de transcripción al unirse a elementos como el calcio, lo que favorece la detección de la elevación del calcio y pueden funcionar como interruptores cuando incrementa la concentración. Además, los sistemas efectores pueden funcionar como sintonizadores selectivos para responder a frecuencias pico particulares, como si fuera la transmisión de una frecuencia modulada para la detección por los macrófagos (Mackness, 1969). El efecto interruptor de la calmodulina, en el desarrollo de la patogénesis intracelular de *M. tuberculosis*, puede ser crítico para el hospedero cuando se inhibe la señal del Ca^{2+} . Debido a que su elevación farmacológica en el citosol de los macrófagos, resulta en la fusión fagosoma-lisosoma y de esta manera se incrementan las condiciones que exterminan a la bacteria. Inversamente, cuando el incremento en Ca^{2+} del citosol se acompaña normalmente de la fagocitosis de *M. tuberculosis* muertos, se obstruye la fusión de fagosoma-lisosoma con los quelantes intracelulares de Ca^{2+} (Malik *et al.*, 2001).

La presencia de las micobacterias también trae consigo la activación de los macrófagos. Es decir, como todos los virus y algunas bacterias y protozoarios patógenos de los mamíferos que han evolucionado para sobrevivir y reproducirse dentro de las células; el reconocimiento inmune de estos patógenos depende del despliegue de los antígenos en la superficie de la célula. A partir de este reconocimiento, surge la activación de los macrófagos, que se desarrolla en respuesta a dos señales. La primera señal correspondiente al hospedero, se da mediante IFN- γ y la segunda señal se efectúa por los denominados patrones de las moléculas asociadas a los patógenos (PAMPs) (Gilleron *et al.*, 2006). En la respuesta inmune temprana, se puede producir IFN- γ por las células inmunes innatas, tales como las células NK o NKT (acrónimo en inglés: **N**atural **K**iller **T**hymocytes), aunque la fuente principal de IFN- γ como respuesta inmune, son las células Th1 antígeno específicas (Young, 2006). En la mayoría de las descripciones de la activación de los macrófagos la segunda señal se provee por un microbio que

expresa una o más PAMPs, las cuales estimulan la activación de los macrófagos a través de los receptores Toll o TLRs, (acrónimo en inglés: **Toll Like Receptors**) (Gilleron *et al.*, 2006).

Durante las respuestas de la inmunidad innata, los macrófagos sirven para el reconocimiento y las funciones efectoras, tales como la fagocitosis, la desgranulación de las células cebadas y los neutrófilos, la liberación de citocinas y moléculas citotóxicas por las células NK, que finalmente terminan con los microbios invasores. Los macrófagos reconocen los patógenos microbianos por vías múltiples, tales como la superficie celular, el endosoma y los receptores citosólicos, los cuales interactúan con los componentes de la pared celular o los ácidos nucleicos de los microbios (Akira *et al.*, 2006). Este reconocimiento de eventos que aumentan la muerte de los microbios a partir de la producción de quimiocinas, citocinas y mediadores, también coordinan la respuesta inflamatoria para la eliminación de las toxinas y desechos celulares.

Entre los mediadores se encuentran los TLR-1, -2 y -6, que intervienen en las respuestas para los lipopéptidos de los microbios; los TLR-4 que intervienen ante los lipopolisacáridos, los TLR-5 que actúan ante los flagelos; los TLR-7, -8 y -9 que actúan ante los ácidos nucleicos. Todos estos están entre los más potentes activadores de las respuestas inflamatorias de los macrófagos (Hu *et al.*, 2007). Mientras que las citocinas tipo I, son inducidas por estímulos proinflamatorios tales como IFN- γ , y solas o acompañadas con los productos de los microbios tales como los lipopolisacáridos, producen un elevado nivel de intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno. Por otra parte, las citocinas de tipo II, tales como IL-4 e IL-13, antagonizan los macrófagos y suprimen la producción de óxido nítrico sintetasa. Adicionalmente, los factores tales como IL-10, los glucocorticoides y el factor de la transformación del crecimiento beta o **TGF** (acrónimo en inglés: **Transforming Growth Factor**)– β , inducen fenotipos que se traslapan parcialmente con la activación alternativa provocada por IL-4 e IL-13, por lo que contribuye con la heterogeneidad de las citocinas tipo II. Además, la activación alternativa de los macrófagos por la exposición a las citocinas tipo II (IL-4 o IL-13) inducen la formación de las células

gigantes multinucleadas *in vitro* (McInnes y Rennick, 1988; McNally y Anderson, 1995). Esta activación alternativa de los macrófagos, por oposición a la activación clásica por la citocina tipo 1 como IFN- γ , se asocia con los procesos de reparación, la atenuación de la excesiva inflamación, alergia y las defensas del hospedero en contra de las infecciones parasíticas tales como *Schistosoma mansoni* (Herbert *et al.*, 2004).

La función asignada al factor alternativo en cuanto a la activación de los macrófagos, se ha limitado a la acción de las linfocinas IL-4 y/o IL-13 (Gordon, 2003). La exposición de los macrófagos a las citocinas IL-4 e IL-13 tipo II y a las de tipo I, inducen las dos distintas rutas para la activación (Munder *et al.*, 1998); lo que permiten a los macrófagos activados, desarrollar una acción vital en respuesta a los patógenos intracelulares como *M. tuberculosis* y *Leishmania major*, donde la inmunidad protectora está mediada por IFN- γ (Holscher *et al.*, 2001). Pero las citocinas proinflamatorias por sí mismas, también pueden tener consecuencias patológicas sobre los tejidos, pero al acompañarse de la activación alternativa de las respuestas tipo II, se provoca un mecanismo que atenúa la inflamación excesiva (Gordon, 2003). Las células de los tejidos, al ser estimuladas por IL-4, expresan los receptores de la manosa de los macrófagos, la arginasa I y la reprogramación de la expresión del gen *fizz-1*, que induce una proteína de secreción rica en cisteína del epitelio de recubrimiento y el gen *ym-1*, que induce un factor eosinófilo quimiotáctico; ambos definen la progresión del estado crónico característico del asma (Holcomb *et al.*, 2000; Loke *et al.*, 2002; Raes *et al.*, 2002). Las interleucinas (IL-4, IL-10 y IL-13), promueven el fenotipo del factor de activación alternativo II de los macrófagos *in vitro*. También la IL-4 e IL-13 pueden inducir la sobre-expresión del receptor de la manosa y la expresión MHC-clase II (acrónimo en inglés: **Major Histocompatibility Complex**); mientras que la IL-10 tiene efectos ampliamente supresores en la producción de las citocinas de los macrófagos y en la expresión de las moléculas co-estimuladoras (Goerdts y Orfanos, 1999).

Como se describe anteriormente, los mecanismos de secreción de las linfocinas, permite inhibir o eliminar los patógenos que se encuentran en el interior de los

macrófagos tales como *Mycobacterium* (Crowle y May, 1981; Zlotnik y Crowle, 1982; Douvas *et al.*, 1985) y *Leishmania major* (Kaufmann y Hahn, 1982, Kaufmann, 1983). También se ha observado este mismo efecto en otros patógenos intracelulares como *Listeria* (Cole, 1975), *Legionella* (Horwitz y Silverstein, 1981), *Toxoplasma* (Nathan *et al.*, 1983), *Trypanosoma* (Nogueira y Cohn, 1978), *Histoplasma* y *Coccidioides* (Wu-Hsieh *et al.*, 1984). Todos ellos provocan la inmunidad adquirida de manera similar, en la que se involucra la activación de los macrófagos inducida por las linfoquinas, lo que les permite a los macrófagos llegar a ser microbicidas. Aunque la diferencia en el ingreso y el destino intracelular de los patógenos a los macrófagos activados por IFN- γ , sugiere que los mecanismos de inmunidad no pueden ser los mismos. Estas diferencias pueden alterar la respuesta de las poblaciones de los linfocitos que producen las linfoquinas y consecuentemente, el tipo de estimulación inducida a los macrófagos (Kaufmann y Hahn, 1982; Kaufmann, 1983).

Con respecto a la activación de los macrófagos en los modelos murinos de la infección experimental con *M. tuberculosis*, indican que la inmunidad adquirida por estos organismos está mediada por las poblaciones de los linfocitos T, que restringen la clase I y II del MHC. Estas células secretan citocinas que resultan en la activación de los macrófagos parasitados y la promoción de las respuestas granulomatosas (Flynn *et al.*, 1992). En tal activación, IFN- γ es particularmente relevante para la secreción de las citocinas de los linfocitos T específicos contra la tuberculosis (Nathan *et al.*, 1983). Esta activación puede suceder en las etapas posteriores a la infección o después de que el hospedero entra en la etapa de recuperación. En la que los linfocitos encuentran los antígenos del organismo infectante y confieren a los macrófagos una mayor capacidad de eliminar patógenos (Mackaness, 1969).

Una activación apropiada permite a los macrófagos aniquilar y degradar los parásitos intracelulares. Pero también existen citocinas como IL-6, que puede tener actividad anti-inflamatoria y proinflamatoria. En la activación de los macrófagos la IL-6 participa en reacciones de la fase aguda. Su liberación está inducida por IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF α (acrónimo en inglés: Tumor **N**ecrosis **F**actor) (Garman *et al.*, 1987). Además, IL-6, originalmente se demostró que estimula las células B. Esta

activación en los macrófagos de ratón infectados por tuberculosis, depende de una segunda señal, la cual es provista por la infección con los bacilos tuberculosos. De manera contraria, IFN- γ se activa en los macrófagos de ratones no infectados y se inactiva (o es menos activa) en los macrófagos de ratones infectados. Además, IL-6 *in vivo* puede afectar de preferencia a los macrófagos en una lesión granulomatosa la cual ya ha cubierto a las micobacterias, mientras que IFN- γ puede operar preferentemente en los monocitos inmaduros en inmigración. Por lo que IL-6 e IFN- γ , pueden ser requeridos para la protección óptima cuando se presentan lesiones (Flesch y Kaufmann, 1990).

Entre los inductores de IFN- γ por las células T en ratones infectados con *M. tuberculosis* o *M. bovis*, se encuentra el dímero compuesto por ESAT-6/CFP-10 (Andersen *et al.*, 1995; Pollock y Andersen, 1997). Ambos antígenos, son identificados como potentes inductores de IFN- γ se observa en los pacientes con tuberculosis clínicamente activa y en los individuos saludables pero infectados que son identificados como positivos a las pruebas TST (acrónimo en inglés: **T**uberculin **S**kin **T**est) (Arend *et al.*, 2001), pero no para los pacientes vacunados con BCG (Ulrichs *et al.*, 1998; Ravn *et al.*, 1999; Arend *et al.*, 2000a).

1.2.2.1. Variación antigénica de las micobacterias.

La capacidad de *M. tuberculosis* para responder a los distintos microambientes proporcionados por el hospedero, depende de la expresión de diferentes genes individuales en *M. tuberculosis*, lo que le permite sustituir diferentes funciones que conducen a la variación antigénica, con el consiguiente escape al reconocimiento del hospedero (Brodin *et al.*, 2004a). Esta fase de variación se observa en diversas especies de bacterias, que incrementan su bienestar bajo determinadas circunstancias, su diversidad poblacional se ve favorecida y les permite una mejor adaptación a los nichos. La variabilidad antigénica es un proceso reversible, pero si la frecuencia fenotípica de la acción del interruptor es constante, puede ocasionar la mutación, mediada por la reorganización o la modificación (Saunders *et al.*, 2003). La fase de variación, se dilucida por el hecho de que los epítomos que exponen los

patógenos cambian (Pedersen *et al.*, 2004). La fase de variación ocurren cuando existe una elevada frecuencia de interrupción que es $>10^{-15}$ células por generación, por lo que puede resultar en la interrupción reversible “encendido” y “apagado”, de los rasgos o la variación de los fenotipos de la superficie (Henderson *et al.*, 1999).

Los factores que participan en la permeabilidad de la envoltura celular, la inmunomodulación y la persistencia de *M. tuberculosis*. La modificación del ciclopropano de los ácidos micólicos por la ciclopropano sintetasa en *M. tuberculosis*, se efectúa a través de las metiltransferasas es la única estructura de los lípidos que se ha ligado a la patogénesis de esta infección. Las modificaciones ocurren en el sitio caracterizado por el doble enlace, en la que se incorpora a la cadena, en la parte proximal (cerrada para β -hidroxi) o la distal de la doble ligadura (Glickman, 2003). Además, las enzimas S-adenosil-metionina- que dependen de las metil transferasas, de las cuales se han estudiado varios genes, principalmente, *mmaA1* (acrónimo en inglés: **m**ethoxymycolate **m**odification α -A1) a través de *mmaA4*, *pcaA* (acrónimo en inglés: **p**yruvate **c**arboxylase-A) y *mmaA2* que expresan proteínas en *M. tuberculosis* (Takayama *et al.*, 2005). La función patógena y bioquímica de PcaA que es una sintetasa *cis*-ciclopropano α -micolato proximal y es una molécula esencial para la virulencia en el ratón. Además, *mmaA2* (acrónimo en inglés: **c**yclopropane **m**ycolate **a**cid) se ha definido como la sintetasa *trans*-ciclopropano, tanto de los metoxi como de los cetomicolatos (Glickman *et al.*, 2001).

El gen *pcaA*, codifica la ciclopropanación proximal de los α -micolatos, tanto en *M. tuberculosis*, como en BCG. Cuando el gen *pcaA* de *M. tuberculosis* se inactiva, se produce un dramático incremento en los cetomicolatos comparado con *M. tuberculosis* cepa tipo silvestre (Glickman *et al.*, 2000). Aunado a este incremento, se presenta un efecto compensatorio de la pérdida intacta de los α -micolatos y se modulan a la baja en el organismo, durante la fase crónica de la infección (Yuan *et al.*, 1998a). Esto se relaciona los anillos del ciclopropano y la persistencia de las micobacterias, que modifican la presentación del antígeno de los ácidos micólicos por las CD1 a las células T. Es decir, la presentación de los antígenos de los lípidos a las moléculas CD1, se conectan con los receptores de las células T y determina la

especificidad para el reconocimiento del antígeno. Estos grupos de lípidos se insertan en la bolsa hidrofóbica de las moléculas CD1 (Moody *et al.*, 1997; Kawano *et al.*, 1997). De esta manera, los linfocitos T responden a los ácidos micólicos libres presentes en las moléculas CD1 y a los grupos polares de los ácidos micólicos (Glickman *et al.*, 2000).

Otros factores de variación antigénica son las proteínas producto de los genes PE_PGRS (acrónimo en inglés: **P**olymorphic **GC**-rich-**R**epetitive **S**equence). Estas proteínas tienen la propiedad de inactivar por sí mismas el gen que las expresa; o bien, puede variar la secuencia de aminoácidos que compromete los epítomos para las células B. Al respecto, los genes PE/PPE de la familia PE-PGRS [el nombre de las proteínas PE se deriva de los modos Pro-Glu (PE) y mientras que las PPE se derivan de los modos Pro-Pro-Glu], además de la variabilidad antigénica, se sospecha que están involucradas en varios aspectos de las interacciones entre el hospedero y el patógeno, tales como, la virulencia y la persistencia de los bacilos. Debido a que los dominios de la superficie expuesta de los genes PE/PPE, están involucrados en la forma de la estructura celular de la bacteria (Ramakrishnan *et al.*, 2000; Brennan *et al.*, 2001; Delogu *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2005b). La variabilidad genética que les permite a las micobacterias evadir la respuesta inmunológica, está dada por las secuencias polimórficas repetitivas Pro-Glu ricas en G+C (guanina-citosina) (80%) y son la fuente principal de polimorfismos en el complejo *M. tuberculosis*, de tal manera que sin ellos, desplegarían una remarcada homología genética y muy pocos nucleótidos serían los polimorfismos (Sreevatsan *et al.*, 1997). Es decir, si se compara la secuencia de los genes PE y PE_PGRS entre las cepas H37Rv y CDC1551 de *M. tuberculosis*, se demuestra que todos los 37 genes PE son los mismos en ambas. Sin embargo, 39 de los 62 genes comunes PE_PGRS, tienen diferencias que pueden resultar en la ausencia de proteína, debido a la estructura de las mutaciones o a diferencias en el tamaño de los eventos de la inserción-eliminación (Banu *et al.*, 2002).

Algunos miembros de las familias PE y PPE, se encuentran asociados con los cúmulos de genes de las regiones de diferencia que expresan la proteína ESAT-6,

los cuales son regiones relacionadas con la inmuno-patogenia, y codifican un sistema dedicado a la secreción de los miembros de la familia del potente antígeno ESAT-6, para las células T. Estos genes se encuentran en *M. tuberculosis* H37Rv y en otras micobacterias, tales como *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium* y la cepa avirulenta *M. smegmatis*; por lo que la presencia de elevadas proporciones en G+C del cúmulo de genes que expresan ESAT-6, es una característica de algunas bacterias Gram positivas. El genoma de *M. tuberculosis* contiene cinco copias de inmuno-patogénicas del cúmulo de genes que expresan ESAT-6 (Gey Van Pittius *et al.*, 2001). De estas cinco, el genoma de *M. smegmatis* contiene tres regiones que forman un grupo de genes *esat-6*, dentro de las que se encuentran las regiones 1, 3 y 4, las cuales en término de la proteína muestra un 60 y 75% de similitud a las de *M. tuberculosis* H37Rv. Las cinco proteínas pertenecientes a la familia ESAT-6/CFP-10, son expresadas por los genes *esxG*, *esxH*, *esxQ*, *esxR* y *esxS* (Gold *et al.*, 2001). Mientras que *esxG* (CFP-10) y *esxH* (ESAT-6) forman parte del cúmulo de la región 3 para ESAT-6 y se asocian físicamente con los genes *esxQ*, *esxR* y *esxS*, pero ninguno pertenecen a los cúmulos de genes de las cinco regiones (Gey Van Pittius *et al.*, 2001).

El análisis de la secuencia del genoma de *M. smegmatis* para el cúmulo de genes del sistema de secreción ESAT-6, revela sólo dos pares de genes de la familia PE y PPE. Ninguno de los otros miembros de las familias de genes PE o PPE se han detectado en el genoma de *M. smegmatis*, incluyen alguno de los genes PE_PGSR o PPE-MPTR (por sus siglas en inglés: "Major Polymorphic Tandem Repeat" que también pertenecen a la familia PPE). El primer par de genes *esx*, corresponde a los ortólogos *Rv3872* y *Rv3873* de *M. tuberculosis* (que en *M. smegmatis* se identifican como MSMEG0062 y MSMEG0063 según claves de GenBank) y se encuentran incluidos en el vínculo de genes de la región 1 (con 70% y 55% similitud con las proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv, respectivamente) mientras que el segundo par corresponde a los ortólogos *Rv0285* y *Rv3876* (que corresponden a MSMEG0608 y MSMEG0609 en *M. smegmatis*) de ESAT-6 (*esx*) del cúmulo de genes de RD3 (con 87% y 64% de similitud para las proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv,

respectivamente). Estos dos pares de genes se ha demostrado que se requieren para el crecimiento *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, en *M. tuberculosis* H37Rv (Camacho *et al.*, 1999, Sasseti *et al.*, 2003).

Los homólogos de la proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis*, se han identificado en una variedad de otras especies de bacterias. Mientras que los primeros estudios identifican homólogos con una alta proporción de G+C, en las especies de bacterias tales como actinobacterias y otras micobacterias (Gey Van Pittius *et al.*, 2001). Aunque existen homólogos distantes en varias especies de bacterias Gram positivas, pero con una baja proporción del grupo G+C, entre las que se incluyen *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp. y *Listeria* spp. (Mahairas *et al.*, 1996). Pero los niveles de similitud en las secuencias de estas proteínas comparado con ESAT-6, es relativamente baja (~30% similitud y ~15% de identidad), en ellos se conserva el triptófano-x-glicina (W-X-G) y ~100-residuos de longitud en la inclusión de estas proteínas en una superfamilia ESAT-6 de proteínas “WXG100” (Way y Wilson, 2005). Al respecto, se encontró un homólogo de ESAT-6 de *M. tuberculosis* en *Staphylococcus aureus*, que tiene una función esencial en la virulencia de *S. aureus*, después de la infección intravenosa (Burts *et al.*, 2005).

Los datos de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* permiten descubrir aproximaciones de antígenos postgenómicos basados en la denotación por criba de las familias de proteínas que contienen moléculas inmunodominantes. La familia de proteínas que se derivan de los genes *esat-6* en *M. tuberculosis*, está formada de 14 a 23 proteínas de bajo peso molecular, dependiendo del criterio de definición usado (Skjot *et al.*, 2000). De estas proteínas, al menos 13 pueden dividirse en subfamilias, debido a la gran cantidad de secuencias relacionadas de moléculas en las subfamilias de genes-proteínas individuales (Skjot *et al.*, 2002). Una subfamilia de *esat-6*, es la que expresan los antígenos Mtb 9.9, que consiste de cinco marcos de lectura abiertos (ORFs) (*Rv1037c*, *Rv1198*, *Rv1793*, *Rv2346c* y *Rv3619c*) (Alderson *et al.*, 2000). Una segunda subfamilia QILSS (Cole *et al.*, 1998), consiste de cinco ORFs vecinos (*Rv1038c*, *Rv1197*, *Rv1792*, *Rv2347c* y *Rv3620c*) que comparten una identidad en las proporciones de proteína de ~98%. Ambas familias, probablemente

resulten de una duplicación de genes, como lo indica la homología de las proteínas (96 a 99% identidad). Aunque tres de estas moléculas son homólogas, las respuestas de las células T específicas para estas moléculas difieren marcadamente, y tienen muy pocos epítomos que comparten entre los tres miembros de las familias, a pesar de que son reconocidas por el sistema inmune del hospedero (Skjot *et al.*, 2002). Adicionalmente, otros miembros de la familia ESAT-6 (Rv3809c, Rv3905c), se reportan alterados en *M. bovis* cepa AF2122/97 (Garnier *et al.*, 2003). En su conjunto, es plausible que la variación de la familia de proteínas ESAT-6 en las cepas de *M. tuberculosis* y/o miembros del complejo *M. tuberculosis*, pueden contribuir a la variación antigénica y eventualmente ayudan a la bacteria a escapar del reconocimiento inmune del hospedero (Marmiesse *et al.*, 2004).

1.2.3. Estimulación inmunológica a la que se enfocan las vacunas futuras.

La vacunación actual contra *M. tuberculosis*, basada en *M. bovis* BCG, se ha evaluado extensamente y ha demostrado que su viabilidad y efectividad protectora, tiene un rango que va desde 0 a 85%, en diferentes pruebas de campo (Fine, 1995). Para el diseño de nuevas vacunas que sustituyan a la actual BCG, se debe tomar en cuenta que *M. tuberculosis*, es capaz de interferir en casi todas las etapas de la respuesta inmune del hospedero que le permiten tal efectividad al patógeno. Como se menciona al respecto, tener en cuenta estas complejas estrategias en el diseño de las nuevas vacunas es una tarea abrumadora, que requiere la activación de las respuestas en contra de los objetivos antigénicos correctos (Dietrich y Doherty, 2009).

La vacunación sólo ha tenido un éxito parcial, a pesar del hecho de que una sola vacuna actual contra *M. tuberculosis*, desarrollada a partir de BCG, es la más ampliamente usada en el mundo. Esto se debe a que la vacuna, tiene claros beneficios en la población infantil. Sin embargo no es eficiente, ni consistente en la protección de la forma pulmonar en los adultos, que es la forma más prevalente de la enfermedad. Aunado a esto, la población de ancianos para el 2050, se predice que sustancialmente se incrementará a 2,000 millones (www.who.int/ageing/global) y con tal significativa expansión de los ancianos alrededor del mundo, se incrementará

la necesidad del desarrollo de vacunas que puedan proteger las personas adultas de las enfermedades infecciosas. El hecho es que las células T, fracasan en la respuesta inmunes de los ancianos, por lo que se cita frecuentemente como una razón por la cual los ancianos son más susceptibles a las enfermedades infecciosas, mientras las vacunas que son recomendadas y usadas para este sector de la población, se destinan para estimular este mismo tipo de células (Turner *et al.*, 2002).

Las nuevas estrategias para la elaboración de vacunas antituberculosis, pueden dividirse en tres amplias categorías. La primera, es mejorar la vacuna BCG a través de la adición de antígenos inmunogénicos de *M. tuberculosis* mediante la sobreexpresión genética, los cuales pueden aumentar y ampliar las respuestas inmunes inducidas por recombinación efectuada en el mismo bacilo (Grode *et al.*, 2005). Segundo, utilizar las cepas atenuadas de *M. tuberculosis* a través de la eliminación de genes de rutas metabólicas específicas requeridas para la supervivencia o de la virulencia en su conjunto (Hinchey *et al.*, 2007; Aguilar *et al.*, 2007). Tercero, el uso de estrategias para los estímulos primarios, que directa y amplificadamente dan una respuesta inmune inicial “protectora” a través de subsecuentes inoculaciones con vectores virales codificados con antígenos de *M. tuberculosis* o subunidades de proteínas (Elvang *et al.*, 2009; Tchilian *et al.*, 2009; Vordermeier *et al.*, 2009; Whelan *et al.*, 2009).

El mejoramiento de las vacunas profilácticas basadas en BCG, se fundamenta en el reconocimiento de antígenos que se manifiestan durante la reproducción de la bacteria, ya sean estos secretados o no durante las primeras etapas de la infección (ej. ESAT-6 o Ag85A/B). También se ha planteado la producción de vacunas a través de mutantes (substitutos atenuados vivos de BCG) y las que aún están indefinidas como vacunas post exposición (BCG estimulantes), cuya meta es la prevención de la reactivación o eliminación de la tuberculosis latente. Idealmente, una primera aproximación es comprender el estímulo de las vacunas para el tratamiento profiláctico, ya sea a través de subunidades, vectores virales o vacunas que fundamenten la inducción de los antígenos en etapas posteriores relacionadas con el

aletargamiento (la transición reproductiva a la etapa no reproductiva, con base en los antígenos de la latencia), la etapa de reactivación/reactivación o bien, para toda la etapa de la infección con *M. tuberculosis* (Sable *et al.*, 2005).

Algunas cepas candidatas a vacunas post exposición, principalmente se seleccionan como productos de un sólo gen, incluyendo: vacunas rBCG (ej. rBCG30 que expresa Ag85B o la cepa Δ ureCHly⁺rBCG que es deficiente en ureasa y que expresa la listeriolisina), las vacunas basadas en la recombinación con virus (ej. MVA85A – Rv3804c que se expresa en la replicación deficiente del virus vaccinia), las cepas vivas atenuadas de *M. tuberculosis* y las vacunas de subunidades que comprenden los antígenos del aletargamiento, los cuales pueden estimular la respuesta inmune después de haber sido iniciada con BCG (ej. Mtb72F, que fusiona los antígenos Ag85B-ESAT-6) (Kaufmann *et al.*, 2005). El desarrollo de estas vacunas post exposición, requieren de la identificación de los productos de los genes que participan en la adaptación de *M. tuberculosis*, en su hábitat intracelular cuando los cambios reproductivos de la micobacteria, entra del estado de aletargamiento a la reactivación (Zvi *et al.*, 2008).

Otra de las proteínas promisorias para el desarrollo de subunidades de vacunas es la proteína TB10.4; un blanco de las respuestas inmunes antimicobacterianas en el humano (Skjot *et al.*, 2000; Skjot *et al.*, 2002). La proteína TB10.4 se codifica por el gen Rv0288 localizado en el conjunto de genes *esx* (Kato-Maeda y Small, 2000). Esta proteína, es fuertemente reconocida por los individuos vacunados con BCG así como por alrededor del 70% de los pacientes con tuberculosis; en estos individuos induce un elevado nivel de IFN- γ (Skjot *et al.*, 2002). Por lo que TB10.4 representa un candidato atractivo para el desarrollo de las nuevas vacunas contra *M. tuberculosis*. TB10.4 es una proteína de baja masa molecular que pertenece a la familia ESAT-6 y se encontró una elevada inmunogenicidad. Además, confiere protección contra el reto de *M. tuberculosis* en aerosol en ratón, cuando se usa una subunidad de vacuna compuesta por TB10.4 sola o fusionada con la proteína el antígeno Ag85B (Dietrich *et al.*, 2006).

Las vacunas de subunidades representan las versiones más puras del desarrollo de vacunas contra la tuberculosis y son preparadas como proteínas recombinantes (purificadas y expresadas en vectores y como vacunas denominadas como desnudas). Estas consisten de la recombinación de plásmidos de los antígenos codificados en *M. tuberculosis*, bajo el control de promotores eucariotas. Entre estas se incluyen las proteínas recombinantes más prometedoras y que se fusionan entre los antígenos secretados por las micobacterias. Tales como la combinación de los antígenos Ag85B y ESAT-6 (Serum Institute, Copenhagen, Denmark) (Weinrich Olsen *et al.*, 2001) o las proteínas identificadas por su respuesta inmune en las células T del humano Mtb72f (Glaxo Smith Kline, Bruselas, Bélgica) que contiene dominios de proteína de Mtb32 y Mtb39 (Skeiky *et al.*, 2004). Aunque un inconveniente de las subunidades de proteínas recombinantes es la insuficiente disponibilidad de adyuvantes, los cuales se hayan aprobados para el uso del hombre, capaces de inducir las respuesta protectoras de las células T (Hoft, 2008). Ellos incluyen los vehículos que presenten los antígenos al sistema inmune de manera óptima, contenga la liberación controlada y que actúen como sistemas de depósito para la presentación de los antígenos (Reed *et al.*, 2009a).

1.2.3.1. Interferencia de las micobacterias ambientales en la vacunación

Se ha demostrado en el humano (Brown *et al.*, 1968) y otras especies tales como el ratón (Shepard *et al.*, 1976), que son capaces de generar una inmunidad protectora contra las micobacterias patógenas, por inmunización con especies no relacionadas. Lo que soporta la sugerencia de que la exposición de las micobacterias ambientales puede proteger contra *M. tuberculosis*. Aunque también se puede presentar una ineficiente respuesta inmune en los individuos presensibilizados a las micobacterias ambientales, antes de la vacunación con BCG. Pues las micobacterias ambientales, también tienen capacidad antigénica para bloquear la eficacia protectora inmune, posterior a la vacunación (Rook *et al.*, 1987).

Las evidencias mostradas por Sieling *et al.* (2005), indican que la reactividad cruzada puede deberse a que las moléculas MHC-II y las CD1 estén restringidas a las células

T. Por lo que se limitan al reconocimiento de antígenos similares que permiten la reactividad cruzada. En consecuencia, imparten una función distinta en las respuestas del hospedero para reaccionar con patógenos inmunológicamente relacionados. Aunque en la protección inmune contra la infección de las micobacterias, es probable que se requiera un reconocimiento complementario de las propiedades de los péptidos y de los lípidos reactivos de los antígenos por las células T; de tal manera que se cubra un amplio espectro de los epítomos micobacterianos. Por tanto, si las moléculas CD1 y MHC fijan y presentan distintas estructuras a las células T, las funciones de MHC y CD restringidas a las células T contra las micobacterias se traslapan; es decir, la producción de las citocinas activan los macrófagos (Yamamura *et al.*, 1991; Salgame *et al.*, 1991; Sieling *et al.*, 1995); mientras que la lisis de las células infectadas, será para controlar el crecimiento de las bacterias (Stenger *et al.*, 1998). La acción de estas moléculas, es lo que actualmente se toma en cuenta para la generación de vacunas formadas por subunidades y debido a que en su mayoría son inmunológicamente pobres, se requieren adyuvantes para la generación de respuestas inmunes efectivas (Sieling *et al.*, 2005).

1.2.4. Reactividad cruzada y diagnóstico de tuberculosis.

M. tuberculosis es un complejo de micobacterias (Wedlock *et al.*, 1999). Como tal, los procedimientos que se usan para el diagnóstico pueden ser similares para las especies que lo conforman. Por lo que en el ganado, el control de la tuberculosis, de la misma manera que en el humano, es urgente la definición de reactivos específicos para el diagnóstico. Es factible proponer el desarrollo de una vacuna para el ganado, siempre y cuando se resuelva el problema de la especificidad de las pruebas diagnósticas. Tal especificidad, puede ser mejorada mediante el uso de antígenos que se expresen primordialmente para *M. bovis* (Vordermeier *et al.*, 2004).

Respecto a la tuberculosis en humanos, las dos principales metas de los estudios inmunológicos son esclarecer la mejor eficiencia de las vacunas candidatas a sustituir la vacuna BCG actual y el o los métodos para inmunodiagnóstico de mayor sensibilidad y especificidad, que prácticamente superen la prueba a la reacción

intradérmica de la tuberculina o TST. Al respecto, las pruebas existentes son indicativas de las dificultades para el diagnóstico preciso de la enfermedad. Por ejemplo, se ha llegado a determinar que entre el 40 al 60% de los enfermos por tuberculosis pulmonar y alrededor del 75% de los que padecen la enfermedad extrapulmonar, son negativos en las muestras tomadas de esputo, aunque se han desarrollado métodos para el diagnóstico alternativo que se basan en las técnicas moleculares, cromatográficas e inmunológicas, que son costosas y difíciles fuera del ámbito científico (Pottumarthy *et al.*, 2000). Desde otra perspectiva, las pruebas económicas y de fácil manejo, se basan en las pruebas serológicas para el diagnóstico de la tuberculosis. La complejidad de los estudios para la definición de pruebas diagnósticas se ven desfavorecidas, por el hecho de que los patrones de respuesta de los anticuerpos después de la infección con el complejo *M. tuberculosis*, varían de una lesión a otra y de un enfermo a otro. Además, las especies de *Mycobacterium* expresan moléculas de PPD que muestran una hipersensibilidad de tipo retardado o DTH (acrónimo en inglés: **Delayed Type Hypersensitivity**), similar a las de otras micobacterias patógenas o las ambientales, entre las que se incluyen *M. kansasii*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. terrae*, *M. smegmatis*, y *M. vaccae* (Coler *et al.*, 2001).

Minden *et al.* (1972), presentan evidencias de la existencia de los determinantes antigénicos compartidos entre los organismos Gram positivos y Gram negativos, así como por las micobacterias. Los amplios rangos de antígenos que se comparten o tienen una reactividad cruzada entre los microorganismos, pueden explicar la presencia de anticuerpos de muchas bacterias en el suero de humanos y los animales de experimentación. Lo que sugiere que las respuestas inmunológicas a las bacterias, puede, en algún momento representar una elevación del estado iso inmune más que una nueva respuesta inmune activamente adquirida. Por tanto, la resistencia a las enfermedades infecciosas en parte, puede depender del estado preexistente de la sensibilización a las bacterias que se encuentran ubicuas en el ambiente. Al respecto, los análisis posteriores realizados por inmunodifusión, demuestran que los antígenos de las micobacterias, se pueden dividir en cuatro

grupos: los comunes para todas las micobacterias (grupo *i*); los restringidos para las especies que crecen lentamente (grupo *ii*); los que se obtienen de las especies que crecen rápidamente (grupo *iii*) y los que son únicos para cada una de las especies (grupo *iv*) (Morley *et al.*, 1987).

Aunque las preparaciones de reactivos antigénicos muestran una gran variabilidad y reactividad cruzada con las micobacterias relacionadas, se reconoce que estas pruebas pueden potencialmente ser mejoradas, si se identifican sólo unos cuantos antígenos (Waters *et al.*, 2004b). De tal manera que la identificación de *M. tuberculosis* sea específica en la obtención de respuestas DTH ante la tuberculosis. Aunque un sólo antígeno puede dar una elevada especificidad, pero a pesar de que sea potente, su fijación puede ser inadecuada para las pruebas intradérmicas, esto es debido a que un antígeno puede contener poco epítomos para reclutar al sitio de la inyección del antígeno el número de células efectoras para DTH; mismas que son necesarias para obtener una respuesta que se pueda medir; el reconocimiento de los antígenos en tuberculosis es amplio y de alta variabilidad de individuo a individuo (Schoel *et al.*, 1992; Lyashchenko *et al.*, 1998a). De esta manera se recomienda que sea antígenos conjugados, los necesarios para detectar la infección con *M. tuberculosis* en las pruebas intradérmicas. Para tal efecto, los antígenos de *M. tuberculosis* se pueden purificar como proteínas recombinantes, desde que se requiere a gran escala para los reactivos de las pruebas intradérmicas. La producción de estas proteínas recombinantes se pueden purificar de *E. coli* y estar disponibles como reactivos para el diagnóstico de las pruebas intradérmicas; aunque varios antígenos recombinantes, no se distinguen en las pruebas intradérmicas de cobayos, las proteínas nativas como MPB70, MPT63, Ag85B y MPT51 (Lyashchenko *et al.*, 1998b) y MPT64, si son factibles de distinguir (Oettinger *et al.*, 1995).

Aunado a las dificultades para el diagnóstico de la tuberculosis por la reacción cruzada con las micobacterias ambientales y los efectos de la vacunación, el principal problema a resolver es el diagnóstico del estado latente de la enfermedad. Sin embargo, en algunas circunstancias, la respuesta inmune del hospedero se perturba y la infección latente de la tuberculosis, se puede transformar en una

infección post primaria. Este proceso puede ocurrir, por ejemplo, seguido de la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana, la malnutrición, uso de esteroides u otras medicaciones inmunosupresores, diabetes o por avanzada edad (Gomez y McKinney, 2004).

En la infección latente, *M. tuberculosis* es 10 veces más frecuente que la activa. Una estrategia para el control de la tuberculosis, es prevenir la progresión de la infección latente de *M. tuberculosis* mediante la terapia de medicamentos preventivos, de tal manera que no surja como tuberculosis clínicamente activa. Ya que diagnosticar el momento en el que la tuberculosis se vuelve activa se dificulta mientras pasa el tiempo y a pesar de la implementación de nuevas pruebas inmunológicas *in vitro*, estas fracasan en la determinación de la enfermedad latente (Menzies *et al.*, 2007; Dewan *et al.*, 2007). Esto es debido a que la infección latente desde la perspectiva clínica es relativa y las pruebas de tuberculina varían de positivas a negativas, después de que la exposición del bacilo tuberculoso no ocasiona daños clínicos aparentes. Especialmente en los países donde la tuberculosis es endémica y se ha difundido la vacunación con BCG de *M. bovis* o la exposición a las micobacterias ambientales es frecuente (Capuano *et al.*, 2003).

El diagnóstico de la tuberculosis bovina, usualmente se basa en una sola prueba intradérmica o aplicada como doble comparativa. En esta se mide la reacción DTH, después de la inyección del antígeno. Esta prueba mayormente es útil, en el intento de erradicar la tuberculosis bovina en los países sin reservorios de animales silvestres. Aunque uno de los problemas con la prueba intradérmica, es su moderada sensibilidad, por lo que la inyección de los antígenos en el animal puede influir en las pruebas posteriores. También es necesario manejar al ganado 2 veces, una en el momento de la administración del antígeno y otra a las 72 horas posteriores de su aplicación para la evaluación de la respuesta. Además, en los animales silvestres como el venado, reducir el manejo pueden minimizar los riesgos asociados con la captura, tales como laceraciones, fracturas y miopatías (a las cuales el venado cola blanca es particularmente propenso), por lo que las pruebas basadas en la respuesta celular *in vitro* parecen prometedoras, aunque se requiere procesar las muestras de

sangre en las 24 horas subsecuentes a la toma y están sujetas a complicaciones asociadas a la fluctuación de la temperatura en el periodo de la entrega (Waters *et al.*, 2004b).

El desarrollo de pruebas sencillas para el diagnóstico de la tuberculosis, que permitan su aplicación a nivel de campo, o bien mediante kits para su desarrollo en laboratorios con carencia de equipo especializado. Estos antígenos se refieren a proteínas filtradas de los cultivos (CFPs) de las micobacterias tuberculosas, que son las que se encuentran en el medio de cultivo en el cual han crecido. Las proteínas se definen por mecanismos de secreción en las micobacterias y son aproximadamente 200 (Sonnenberg y Belisle, 1997). Adicionalmente algunas de las proteínas se asocian con las células, de tal manera que la definición CFPs sólo es meramente operacional. Las CFPs son activamente estudiadas por muchos investigadores, desde que muchas de ellas se reconocen en el suero de los pacientes con tuberculosis (Champion *et al.*, 2006). Entre los antígenos de *M. tuberculosis* que ahora se encuentran integrados en algunas pruebas clínicas para el diagnóstico de laboratorio están ESAT-6 y los péptidos Ag85A, Ag85B, Rv1196 y Rv0125. ESAT-6, tiene una fuerte actividad para la obtención de respuestas DTH específicas en la tuberculosis de los cobayos en el ganado y en la tuberculosis pulmonar en humanos, en donde la respuesta de las células T a ESAT-6, se observa aproximadamente en la mitad de los pacientes (Pollock y Andersen, 1997; Elhay *et al.*, 1998; Ulrichs *et al.*, 1998; Ravn *et al.*, 1999). Las respuestas de las células T para ESAT-6, puede discriminar entre el ganado infectado con *M. bovis* y el ganado sensible a las micobacterias ambientales (Pollock y Andersen, 1997).

El diagnóstico convencional oficial en el ganado depende de la prueba de reacción intradérmica con PPD de *M. bovis* y a menudo se compara con *M. avium* (PPDa), por la especificidad y sensibilidad entre ambas (Mackintosh *et al.*, 2000). Como alternativa, el uso de antígenos específicos como ESAT-6 para IFN- γ *in vitro*, ha mostrado ser prometedor para detectar varias enfermedades infecciosas en el ganado, entre las que se incluye la tuberculosis (Taggart *et al.*, 2006). Esta prueba se basa en la detección de IFN- γ de la sangre total, relacionado específicamente con los

cultivos después de la estimulación con PPD de *M. bovis*. Sin embargo, las pruebas diagnósticas basadas en PPDs, se limitan por el hecho de que la mayoría de las proteínas en estas preparaciones se comparten con otras especies de micobacterias y las tuberculinas son pobremente definidas, lo que resulta en la variación, desde que el ganado es comúnmente sensibilizado por la exposición a las micobacterias ambientales no patógenas (Aagaard *et al.*, 2003).

Una diferencia entre PPD y ESAT-6 es la composición física: PPD particularmente es una mezcla desnaturalizada de proteínas no específicas y componentes no proteicos, mientras ESAT-6 es un sólo polipéptido purificado y al aplicarse como prueba intradérmica, da respuestas mucho menores que PPD. Mientras que en las preparaciones *in vitro*, las respuestas con ambos reactivos son manifiestas. Esto puede ser debido al pequeño tamaño de la molécula de ESAT-6, la cual comparada con PPD, puede conducir a una rápida difusión desde el sitio de la inyección y necesitar cantidades relativamente mayores de las que requiere la proteína (Pollock *et al.*, 2003). Al respecto, en los resultados presentados por Kang *et al.* (2005) la proporción de los positivos a la prueba con TST fue de 58% a 10 mm de grosor y 37% a 15 mm de grosor, mientras que las pruebas con IFN- γ /ESAT-6 fue del 15% de los participantes. Por lo que esta discrepancia se debe explicar por los falsos positivos de los resultados de TST y los falsos negativos de los resultados de las pruebas con IFN- γ .

Aunque los métodos de detección por anticuerpos son simples, rápidos, exactos y relativamente baratos, tienen el inconveniente de la reactividad cruzada con los antígenos de diferentes organismos, por lo que el manejo de pruebas que combinan antígenos de relativa especificidad con la secreción de citocinas por las células T, han demostrado una mejor sensibilidad y especificidad. Para el desarrollo de estas pruebas, los nuevos antígenos se han identificado mediante el uso de los datos genómicos aplicados en inmunoarreglos, tales como las pruebas de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), inmunomarcaje, o las pruebas de liberación de IFN- γ (Bannantine *et al.*, 2008). Entre los mejores métodos de inmunodiagnóstico se encuentran las mezclas de péptidos con los ensayos de

enzimas ligadas al inmunomarcaje (ELISpot) que posiblemente también sean complejos para el uso del servicio médico (Arend *et al.*, 2002).

A partir de la investigación sobre IFN- γ , se desarrollaron las pruebas QuantiFERON-Gold[®] y T SPot-TB[®], se basan en las respuestas inmunes mediada por células, a través de la medición de IFN- γ liberado de los linfocitos sensibilizados (Pai *et al.*, 2004; Mazurek *et al.*, 2005). Ambas pruebas contienen los péptidos de los espacios de traslape de ESAT-6 y CFP-10 y de las proteínas completas y emplean las técnicas de ELISA (acrónimo en inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) o ELISpot. Aunque estos ensayos proveen un diagnóstico exacto de la infección por el complejo *M. tuberculosis*, ellas no discriminan entre la tuberculosis activa y tuberculosis latente (Goletti *et al.*, 2006). La prueba QuantiFERON-Gold[®] mide la cantidad de INF- γ liberado después de que la sangre se incuba con los antígenos sintéticos (ESAT-6 y CFP-10) que simulan las proteínas presentes en *M. tuberculosis* (Ravn *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2006).

Las pruebas basadas en serodiagnóstico es determinante una elevada sensibilidad, por lo que requieren del uso de antígenos seroactivos, particularmente de la fusión de proteínas con poliepítopos (Waters *et al.*, 2004a). En tal caso, se requiere tomar en cuenta la expresión del genoma que es aproximadamente de 4,000 genes en *M. bovis* y *M. tuberculosis* (<http://www.sanger.ac.uk/Projects/>), que codifican para casi el mismo número de proteínas, no tomando en cuenta los genes que codifican para la iniciación y parada de los múltiples sitios de transcripciones/translaciones y las modificaciones postranslación de cada región que codifican. Mientras que esto puede ser una tarea enorme para probar todas las proteínas, en un proceso de escrutinio para el diagnóstico de los antígenos. Aunque los procesos actuales en la secuenciación del genoma de los cromosomas de las micobacterias permiten hacer investigaciones comparativas de los genomas enteros de *M. avium*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* y los genomas casi completos de *M. marinum*, *M. paratuberculosis* y *M. ulcerans* (Coler *et al.*, 2000).

Las especies de micobacterias no tuberculosas tales como *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium flavescens* y *Mycobacterium gastri*, contienen genes que codifican proteínas homólogas ESAT-6 y CFP-10 (Pollock y Andersen, 1997; Arend *et al.*, 2005). Entre estas proteínas homólogas, se encuentran algunas subfamilias de proteínas que se define en la base de datos TIGR y se expresan por tres miembros de la familia de genes *tb10.4*, que son parálogos de la familia *esat-6* (<http://www.tigr.org>), lo que significa que estos genes posiblemente se han duplicado en *M. tuberculosis* durante la evolución. La presencia del gen *tb10.4* (gen *esat-6* de RD3) en la cepa de la vacuna BCG, a la cual se le eliminó RD1 correspondiente a los genes *esat-6/cfp-10*, ilustra que la atenuación se puede obtener a través de la inactivación de varias combinaciones de los distintos genes *esat-6/cfp-10* (Skjot *et al.*, 2002). *M. kansasii* que cuenta con los genes homólogos *tb10.4* y *tb10.3* (van Pinxteren *et al.*, 2000), puede causar también enfermedad pulmonar en humanos inmunocompetentes y diseminar la enfermedad entre los individuos inmunocomprometidos (Arend *et al.*, 2005). Se ha reportado además, respuestas *in vitro* para ESAT-6 y CFP-10 de *M. tuberculosis* en humanos infectados con *M. kansasii*, con una reactividad cruzada entre las proteínas homólogas *M. tuberculosis* y *M. kansasii*. De la misma manera que en el ganado infectado con tales micobacterias que expresan ESAT-6 o CFP-10, por lo que surgen respuestas falsas positivas a estos antígenos (Waters *et al.*, 2006; Vordermeier *et al.*, 2007).

1.2.5. Capacidad de los bacilos tuberculosos para inactivar las defensas del hospedero.

M. tuberculosis y el hombre han coevolucionado por miles de años. Esto ha dado como resultado, que sea una de las bacterias más adecuadas para explotar las células del hospedero. Por ejemplo, *M. tuberculosis* se adaptó a las células del hospedero por desarrollar mecanismos anti apoptóticos, al reducir los componentes que inducen la apoptosis en la superficie de su célula, cuando se compara con las micobacterias no patógenas (Briken *et al.*, 2004; Karakousis *et al.*, 2004b). La inducción o inhibición de la apoptosis puede ser diferenciada a nivel de las caspasas

y representan las estrategias específicas de *M. tuberculosis* para sobrevivir en el hospedero. Es decir, mediante el efecto proapoptótico, se puede favorecer la dispersión de *M. tuberculosis*. Mientras que la antiapoptosis le permite continuar su reproducción intracelular o bien provocar la necrosis (Danelishvili *et al.*, 2003).

Bioquímicamente, al iniciarse la apoptosis se efectúa el desmantelamiento silencioso de una célula, seguido de la activación de una familia de cisteína-proteasas conocidas como caspasas (la caspasa deriva su nombre precisamente de esta acción **cisteinil-aspartato proteasas**). Estas son enzimas mediadoras críticas de la apoptosis clásica. Sin embargo, su activación no parece ser obligada para todas las formas de apoptosis. La apoptosis clásica, se puede iniciar vía dos distintos mecanismos bioquímicos, ambos de los cuales, resultan en la activación de la caspasa: (i) una ruta intrínseca que se involucra a la ligación de los receptores de la superficie de la célula muerta por sus respectivos ligandos y (ii) una ruta de las mitocondrias mayormente controlada por la familia de proteínas pro y antiapoptóticas BCL-2 (acrónimo en inglés: **B-Cell Lymphoma 2**) (Danial y Korsmeyer, 2004). La supresión de la actividad de la caspasa puede ser cito-protectora cuando las células son estimuladas para experimentar la apoptosis vía la ligación de los receptores muertos (O'Sullivan *et al.*, 2007). Las caspasas son efectores terminales, más que iniciadores, de la ruta de las mitocondrias y este tipo de muerte celular a menudo es independiente de las caspasas (Xiang *et al.*, 1996). Las proteínas BCL-2 y BCL-XL (acrónimo en inglés: **extra large**, también conocida como BAX), forman homodímeros pero se pueden heterodimerizar con antagonistas de la muerte (Sedlak *et al.*, 1995). La proporción de antagonistas de la muerte para la familia BCL-2, dicta la susceptibilidad de las células para un estímulo apoptótico. Cuando BAX se encuentra en exceso, genera los estímulos de la muerte, entre los que se incluye los del retraimiento de los factores de sobrevivencia, los de la irradiación- γ y la dexametasona resultante de la apoptosis (Knudson *et al.*, 1995; Deckwerth *et al.*, 1996).

La muerte celular, puede ayudar a la micobacteria intracelular a escapar de los macrófagos infectados de un hospedero permisivo y promover la dispersión

extracelular de la infección (Lee *et al.*, 2006). La subersión del patógeno implica que su acción puede ser concomitante en cuanto a los factores pro apoptóticos y anti apoptóticos. Al respecto, se han identificado mutantes pro-apoptóticos de *M. tuberculosis*, que permite desarrollar *in vivo* los estudios necesarios para establecer una liga causal, entre las capacidades de la bacteria para inhibir la apoptosis de las células del hospedero y su virulencia (Edwards *et al.*, 2001; Velmurugan *et al.*, 2007).

Estudios reportan que los granulomas son abundantes en células con capacidad apoptótica aunque estas se encuentran retringidas en dicho proceso, por lo que se asocia con el control deficiente de la infección por *M. tuberculosis* (Patel *et al.*, 2007). En este proceso, también interviene TNF- α , que es un potente inductor de la muerte celular por apoptosis (Stenger, 2005). De esta manera, el centro de los grandes granulomas no disueltos, a menudo llegan a ser necróticos con la consecuente destrucción del tejido que permite la dispersión de *M. tuberculosis* (Dietrich y Doherty, 2009). Pero TNF- α , no induce la apoptosis en ausencia de la infección de micobacterias (Keane *et al.*, 1997), la inducción de la apoptosis de los macrófagos por *M. tuberculosis*, implica la transmisión de señales por la superficie celular de los macrófagos, pertenecientes a la subfamilia del gen receptor de *TNF* entre los que se incluye *TNFR1*, el cual desencadena la apoptosis en interacción con los trímeros de TNF- α , lo que conduce al reclutamiento y activación de las caspasas, que fragmentan posteriormente al ácido aspártico (Nagata, 1997). La caspasa 3, es la ejecutora esencial para la apoptosis (Thornberry y Lazebnik, 1998), se activa por las caspasas corriente arriba, entre las que se incluye la caspasa 9 (Li *et al.*, 1997). La activación de la caspasa 9, resulta de la formación del complejo de la pro-caspasa 9 con una proteína adaptadora Apaf-1 (acrónimo en inglés: **A**popotic **p**rotease **a**ctivating **f**actor-1) y la citocromo C, seguido de la liberación de citocromo C del compartimiento de la mitocondria (Hengartner, 2000).

La apoptosis de los macrófagos, remueve los nichos celulares en los cuales el bacilo se aloja, permite la respuesta inmune adaptativa a través de la activación de las células dendríticas, posteriormente facilita la presentación de los antígenos, y

también reduce la viabilidad bacteriana (Armstrong y Hart, 1971; Riendeau y Kornfeld, 2003; Gan *et al.*, 2005). La apoptosis de los macrófagos, puede contribuir a la respuesta de la inmunidad innata contra la infección intracelular, por contener y limitar el crecimiento de los bacilos, tal como se ha observado en otros agentes infecciosos y además, puede ser parte de un exitoso mecanismo de defensa del hospedero (Khelef *et al.*, 1993; Dockrell *et al.*, 2001). Los macrófagos infectados con cepas atenuadas de *M. tuberculosis*, pueden sufrir la apoptosis de una manera que involucra a TNF- α (Keane *et al.*, 2000). Este proceso de muerte celular, también resulta en una reducida supervivencia de las micobacterias y conduce a la preparación para la exposición de *M. tuberculosis* a las células T CD8⁺ específicas (Molloy *et al.*, 1994; Laochumroonvorapong *et al.*, 1996; Pais y Appelberg, 2000).

Los procesos apoptóticos, se pueden dividir en al menos tres fases que se traslapan funcionalmente: iniciación, efectora, y degradación (Liu *et al.*, 1996). En las células T, la fase de iniciación incluye la ligación de los receptores, particularmente Fas (acrónimo en inglés: **F**atty **a**cid **s**ynthase) (Nagata y Golstein, 1995; Ju *et al.*, 1995) y TNF- α (Zheng *et al.*, 1995). Sin embargo, las células T de individuos no infectados con tuberculosis, son típicamente resistentes a la apoptosis inducida con el contra-receptor ligando de Fas (FasL), a pesar de la expresión del antígeno Fas (Li *et al.*, 1998). Sólo la estimulación antigénica extensa en la presencia de IL-2 (generada por células T blastos) se reporta como capaz de sensibilizar las células T periféricas para FasL y TNF- α , lo que se interpreta como susceptible para la activación-inducción de la muerte celular. Durante la subsiguiente fase efectora, mediada por el receptor de la muerte, las señales pueden ser trasladadas en un patrón regular de reacciones metabólicas y en la última fase, se lleva a cabo la muerte de la célula (Zamzami *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1997).

La apoptosis de las células T específicas, llega después de que ellas mismas proliferan al encontrarse con el antígeno y se diferencian en efectoras de un variado tipo de distintas señales en su ambiente. Esta expansión es usualmente seguida por una contracción de la fase donde las células T desaparecen y de esta manera se eliminan, junto con la remoción del antigénico desafiante (Busch *et al.*, 1998). En

ciertas enfermedades infecciosas donde los microbios se resisten a morir por el sistema inmune, esta secuencia de eventos, quizá no siempre esté presente como cuando las estimulaciones antigénicas persisten por un prolongado periodo. Un ejemplo de tales infecciones son las invasiones de diferentes especies de micobacterias, *Schistosoma* y el VIH. En las infecciones, la persistencia micobacteriana es acompañada por los resultados inmunopatológicos, entre los que se incluye el desarrollo de necrosis, fibrosis y linfopenia (Florido *et al.*, 2005). Por el contrario, cuando la micobacteria es apatógena o bien es usada como vacuna como BCG, se desarrolla una expansión de las células T y en su posterior contracción se facilita la eliminación del antígeno desafiante. Es decir, las células T CD4 al secretar IFN- γ , agilizan a los macrófagos para incrementar la actividad antimicrobiana. Esto es más frecuente en la infección causada por la vacuna BCG, que no tienen la capacidad de causar la enfermedad. Con la cual, la actividad de los macrófagos genera óxido nítrico y otros efectores moleculares, tales como superóxido, lo que les permite eliminar a BCG. En presencia de los macrófagos activados, mientras que las células T CD4, empiezan a experimentar un incremento en la apoptosis, lo que regresa a los niveles normales el número de células T CD4 activadas. Además, las células T CD4 activadas al secretar IFN- γ , indirectamente desencadenan su propia apoptosis de los macrófagos activados (Dalton *et al.*, 2000; Florido *et al.*, 2005).

La apoptosis como mecanismos de defensa en contra de *M. tuberculosis* es contradictoria, ya que en algunos reportes se describe por inducir la muerte celular programada de las células del hospedero, mientras que en otros el patógeno se piensa que inhibe estos procesos. Algunas de estas diferencias se deben explicar por la complejidad de los sistemas experimentales, los cuales dependen de la interacción de las bacterias viables y las células del hospedero (Briken y Miller, 2008). Aunque lo consistente es que *M. tuberculosis* se adapta a las células del humano por el desarrollo de mecanismos antiapoptosis y concomitantemente, reduce su exposición de los componentes que inducen la apoptosis a su superficie cuando se compara con las micobacterias no patógenas (Karakousis *et al.*, 2004a; Briken *et al.*, 2004). Sin embargo, los macrófagos humanos han evolucionado para sentir la

persistencia de los patógenos intracelulares. Es en este contexto que se deben considerar las evidencias de que *M. tuberculosis*, inhibe las rutas intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis, mientras que en algún momento se inducen las señales de la proapoptosis. Esto conduce al delicado equilibrio entre la supervivencia de las células o las señales de la muerte de la célula, que dependen por mucho de los tipos de células del hospedero, sus antecedentes en cuanto a resistencia o susceptibilidad genética y la composición genética de los patógenos (Khelef *et al.*, 1993; Briken y Miller, 2008).

La apoptosis es un mecanismo de defensa innata durante la infección intracelular controversial, esto debido a que *M. tuberculosis* es capaz de inducirla, a la vez que emplea estrategias múltiples para inhibirla (Molloy *et al.*, 1994; Plácido *et al.*, 1997; Oddo *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2006). Las explicaciones al respecto surgen cuando se comparan los aislados de *M. tuberculosis* virulentos que inducen menos la muerte celular con relación a las micobacterias no patógenas o cepas patógenas facultativas de micobacterias que carecen de los mecanismos del *M. tuberculosis* (Briken y Miller, 2008). Esto sugiere una relación casual entre la virulencia y la inhibición de la apoptosis de los macrófagos (Oddo *et al.*, 1998; Keane *et al.*, 2000; Pais y Appelberg, 2000; Sly *et al.*, 2003; Velmurugan *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha postulado que los bacilos tuberculosos activos manipulan la apoptosis extrínseca a nivel de la caspasa-8, para escapar de los macrófagos e invadir otras células (Derrick y Morris, 2007). Este mecanismo es mediado por la proteína ESAT-6 que es capaz de eliminar las membranas artificiales (Hsu *et al.*, 2003; Guinn *et al.*, 2004). Aún más, perfora la membrana de los macrófagos (Derrick y Morris, 2007). La estructura de la proteína ESAT-6 son similares a las amiloidogénicas en solución, que forman poros como si fueran toxinas bacterianas (Hsu *et al.*, 2003).

Otros componentes de las micobacterias que evocan la respuesta apoptótica son la lipoproteína de 19 kDa y los lipoarabinomananos que aparentemente la inducen a través de los receptores Toll2 como mediadores de los mecanismos de la apoptosis (Lopez *et al.*, 2003; Dao *et al.*, 2004). La apoptosis también estimula la respuesta inmune por mecanismos de presentación cruzada. Como *M. tuberculosis* puede

detener la maduración del fagosoma de los macrófagos, la estimulación apreciable de las células CD8⁺ vía la presentación la ruta clásica MHC-I es la que mayormente se previene. Sin embargo, recientes estudios sugieren que la retención de las vesículas apoptóticas que contienen antígenos derivados de tuberculosis por las células dendríticas y la subsiguiente migración de estas células a los ganglios linfáticos permite señalización eficaz de las células T en los tejidos linfáticos (Winau *et al.*, 2006). Esta es una proteína que se secreta en la etapa temprana de la infección de la tuberculosis y se acompaña en su función como heterodímero de la proteína de los filtrados de los cultivos (CFP-10) (Berthet *et al.*, 1998). Al parecer, ESAT-6 interviene en la dispersión de la infección, pues se ha demostrado que aumenta la permeabilidad de las membranas artificiales, lo que sugiere una posible función directa en la citólisis de los macrófagos infectados que permiten a la micobacteria dispersarse a otras células (Hsu *et al.*, 2003; Guinn *et al.*, 2004). La estimulación de ESAT-6 para las células T de los pacientes con tuberculosis, también hace que proliferen y produzcan IFN- γ (Sorensen *et al.*, 1995; Lalvani *et al.*, 2001; Ulrichs *et al.*, 1998). Lo que activa el sistema inmune para dar respuesta a la infección.

Contrario a la apoptosis, Fadok *et al.* (2001) considera que *M. tuberculosis* virulento, subvierte la apoptosis un momento dado, para inducir la lisis de la membrana las células en las que se encuentra contenido (necrosis), de tal manera que los patógenos se dispersan para aumentar la infección. El autor citado explica que la propia naturaleza activa de *M. tuberculosis* virulento es la que induce la necrosis. Misma que se revela claramente después de la infección de los macrófagos con mutantes de *M. tuberculosis* incapaces de inducir la lisis. Lo que contradice a los autores Hsu *et al.* (2003), Guinn *et al.* (2004) y Derrick y Morris, (2007); que sustentan la permeabilidad de las membranas por manipulación la apoptosis extrínseca a nivel de la caspasa-8.

Respecto a los estudios relacionados con el efecto de la necrosis por *M. tuberculosis*, la formación del centro necrótico del granuloma es un prerrequisito para su dispersión célula a célula (Gao *et al.*, 2004; Guinn *et al.*, 2004). La necrosis es un

modo de muerte celular proinflamatoria independiente de las caspasas, inducida por diferentes tipos de estrés, la inflamación o la infección microbiana. Se caracteriza por la desorganizada hidrólisis del ADN, la desestabilización del lisosoma y las mitocondrias, la permeabilización de la membrana plasmática y la liberación de la proteína 1 de elevada movilidad (HMGB1) de los núcleos (Lamkanfi y Dixit, 2010). Las cepas virulentas de *M. tuberculosis* inducen más la necrosis y menos la apoptosis que las atenuadas/avirulentas (Keane et al., 2000; Park et al., 2006; Rodrigues et al., 2008). Estudios previos también han mostrado que un daño intracelular elevado de *M. tuberculosis* inhibe la apoptosis (Velmurugan et al., 2007; Danelishvili et al., 2010; Briken y Miller, 2008). También se ha propuesto que *M. tuberculosis* virulento es antiapoptótico con un bajo daño intracelular, mientras que en un cierto umbral del número de bacterias, el bacilo induce la citolisis para promover la dispersión adyacente a las células (Welin et al., 2011).

La necrosis de los macrófagos es inducida por un elevado daño de *M. tuberculosis* H37Rv (Lee et al., 2006; Chen et al., 2006; O'Sullivan et al., 2007; Gan et al., 2008; Divangahi et al., 2009; Welin et al., 2011). La infección con H37Rv previamente ha mostrado que induce una fuerte respuesta de los macrófagos a la IL-1 β (Koo et al., 2008; Carlsson et al., 2010; Mishra et al., 2010). La caspasa-1 dependiente de la secreción de la IL-1 β de los monocitos derivados de los macrófagos de humano (hMDMs) infectados con *M. tuberculosis* solamente se desencadena por el elevado MOI de H37Rv, dado un gran incremento de la IL-1 β en el sobrenadante del cultivo celular (Welin et al., 2011). La inducción de IL-1 β es dependiente de ESAT-6 (Koo et al., 2008; Carlsson et al., 2010; Mishra et al., 2010).

Existen estudios sobre la actividad de lisis de las membranas que tiene ESAT-6, por lo que lo hace un candidato atractivo como factor responsable de la necrosis en las bacterias (Lewis et al., 2003; Gao et al., 2004; Guinn et al., 2004; Smith et al., 2008). Un estudio de mutantes de RD1 sugiere que los factores expresados en el locus RD1 causan la formación de poros en la membrana celular, seguido del flujo de potasio conduciendo al ensamblaje del inflammasoma, la activación de la caspasa-1 y la liberación de la IL-1 β , posiblemente a través de esa actividad formadora de poros

(Kurenuma *et al.*, 2009). ESAT-6 y el sistema de secreción ESX-1, ambos codificados por la región RD1 del genoma de *M. tuberculosis* (Gao *et al.*, 2004). Por otra parte, se han desarrollado estudios con la eliminación del gen que codifica ESAT-6 o la región RD1, lo que conduce a la abrogación del efecto inductivo de la necrosis de *M. tuberculosis*, así como por la disminución de la secreción de IL-1 β por los macrófagos del hospedero, lo que sugiere que ESAT-6 es causa de necrosis (Welin *et al.*, 2011). Un estudio previo muestra que los mutantes de ESAT-6 y RD1, son capaces de reproducción intracelular, pero no se dispersan de célula a célula, lo que finalmente resulta en una baja en el conteo celular total (Guinn *et al.*, 2004). En otros estudios en un modelo que muestra que *M. marinum* induce el daño de los tejidos provocado por RD1 a través de la necrosis, así como la excesiva producción de IL-1 β , pero la inducción de la necrosis no está involucrada en los componentes del inflammasoma ASC o que contienen proteínas con dominios 3 NLRP3 (Carlsson *et al.*, 2010).

Con base a la influencia que tienen los inhibidores específicos sobre la muerte celular inducida tales como ESAT-6 de *M. tuberculosis* (Gan *et al.*, 2005; O'Sullivan *et al.*, 2007; Lee y Kornfeld, 2010). Se planteó la hipótesis sobre la presencia intracelular de *M. tuberculosis* en un número bajo, lo que hace que se conserven vivas las células del hospedero y mantiene el nicho bacteriano. Después de cierto umbral, los bacilos usan sus recursos para escapar e infectan otras células para su diseminación (Welin *et al.*, 2011).

1.2.6. Adaptación de los bacilos tuberculosos para persistir en el hospedero.

Cuando dos organismos ocupan el mismo nicho, resulta un conflicto o una serie de compromisos. En algún momento los elementos disponibles son para ambos, y el rango de interacciones es una pugna tipo 'guerra fría' para el establecimiento de una coexistencia en paz, que permite la adaptación de las partes en conflicto. Es decir, el invasor adapta su metabolismo para sobrevivir a las condiciones de rechazo o aceptación, que a su vez le impondrá el hospedero o nicho. Aunque pueden surgir conflictos intensos que en su mayoría son accidentales. Por ejemplo, cuando un microbio se encuentra en un nicho u hospedero, al cual no está acostumbrado y las

interacciones son a menudo a corto plazo, esto conduce a la erradicación del microbio o a la modificación irreversible del nicho o a la muerte del hospedero (Blaser y Kirschner, 2007).

La adaptación en las bacterias, en parte implica que pueden entrar en un estado de aletargamiento. Esto se refiere a que la actividad metabólica se minimiza, de tal manera que pueden sobrevivir a condiciones adversas, tales como temperatura, disecación y al efecto de los antibióticos. Para soportar dichas condiciones, los microorganismos generan estructuras especializadas como las endosporas, quistes, conidias, o bien, adoptan un estado de actividad metabólica reducida como lo sucedido en las micobacterias, que carecen de estructuras celulares especializadas. El término aletargado en las micobacterias, se usa primordialmente cuando se encuentra en los medios de cultivo, aunque se puede utilizar la palabra aletargado, para describir el estado de las micobacterias en la infección latente del hospedero. Durante las primeras etapas de la infección, *M. tuberculosis* encuentra en el hospedero un ambiente cambiante. En respuesta, el bacilo debe activar sus defensas, compensar sus mecanismos con respecto a los del hospedero y reprogramar su fisiología para asegurar su sobrevivencia (Raman *et al.*, 2004). Ante tal situación, los bacilos que se encuentran en los macrófagos inmunológicamente inactivos, están contenidos en las vacuolas de reciclamiento del compartimiento del endosoma, en el que se mantiene un pH relativamente bajo (6.3–6.5), por exclusión de la bomba formada por la enzima protón ATPasa (Minamino y Namba, 2008). Además, en el interior de los macrófagos se producen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que son metabolitos antimicrobianos (Nathan y Shiloh, 2000). La supervivencia bajo estas condiciones, presumiblemente requiere de bacterias metabólicamente activas, capaces de producir una variedad de efectores contrainmunológicos (Darwin *et al.*, 2003; Hisert *et al.*, 2004); o en su defecto, los bacilos tuberculosos desarrollan capacidades de supervivencia para adaptarse en el centro de las lesiones caseosas, pero aparentemente no se pueden multiplicar por la privación de oxígeno u otras condiciones adversas (Lim *et al.*, 1999).

Las bacterias raramente viven en un ambiente que les permita un crecimiento exponencial continuo, que es típicamente limitado a la terminación de los nutrientes o la acumulación de metabolitos. En los medios de cultivo líquidos, el crecimiento exponencial se entiende que se detiene cuando la biomasa no presenta un incremento neto y se le denomina fase estacionaria. Pero en la fase logarítmica, las bacterias poseen ciertas características que las capacitan para un rápido crecimiento cuando los nutrientes están disponibles y las condiciones son apropiadas para su reproducción. De la misma manera que se inhibe su crecimiento cuando las condiciones *in vivo* no son propicias. La energía requerida para adaptarse exitosamente a las condiciones de la fase estacionaria, se piensa que generalmente llega a ser por la utilización de los compuestos almacenados en la degradación de las proteínas no necesarias y al ARNm de la célula (Siegele y Kolter, 1992). Durante el rápido crecimiento de las bacterias, la estabilidad del ARN decrece, cuando las células entran a la fase estacionaria y del 20 al 40% del total del ARN se pierde durante el inicio de la fase estacionaria provocada por la limitación de nutrientes (Mandelstam, 1960). Además, los diferentes estímulos ambientales causan que las bacterias intercambien las subunidades sigma en la enzima ARN polimerasa implicada en la transcripción del ADN y por tanto, sintonizan su expresión genética de acuerdo con las nuevas necesidades emergidas, sobre todo, durante el estrés provocado por la fase estacionaria (Typas *et al.*, 2007).

1.2.7. El metabolismo de los nutrientes principales en las micobacterias

M. tuberculosis es un patógeno sofisticado que es capaz de persistir en el hospedero humano por décadas. Para poder persistir entra en un estado no reproductivo que se caracteriza por la carente división del bacilo con cambios básicos en su actividad metabólica. Por tal motivo, comprender a profundidad las características centrales del metabolismo y sus cambios durante el crecimiento hasta su estado no reproductivo puede abrir nuevas vías para eliminar los patógenos. Aunque la nutrición de las bacterias intracelulares en general y en particular de *M. tuberculosis* es ignorada en la mayoría de las áreas del conocimiento en su conjunto (Tang *et al.*, 2009).

De la misma manera que entender el proceso metabólico sobre el cual *M. tuberculosis* entra en un estado no reproductivo, es relevante comprender cómo el debilitamiento de la inmunidad del hospedero puede resultar en la transición del aletargamiento a la reactivación del bacilo para provocar la enfermedad. Esto sugiere que existe la variación de las etapas fisiológicas por las que pasa la micobacteria. Por lo que la flexibilidad metabólica le permitirá adaptarse a la variación de los cambios ambientales. Un rasgo crucial en la adaptación de las bacterias son las fuentes de energía y el cambio de los parámetros ambientales que se relaciona con el balance de las reacciones oxidativas y reductivas en el esquema metabólico, todo ello ajustado a la disponibilidad de electrones donadores y aceptores, así como a la acumulación por parte de la micobacteria (Shi *et al.*, 2005).

Todos los cambios metabólicos descritos anteriormente son respuestas a las condiciones ambientales. Por lo que una bacteria necesita codificar sólo un subconjunto de enzimas para propagarse cuando se activa o para aletargarse y persistir, al mismo tiempo debe regular la expresión de los genes diferencialmente. Esto se manifiesta en el uso de los sustratos cuando abundan en general y en particular cuando uno de ellos se encuentra ausente, los genes codificarán la enzima que se requiere para tomar acumulación y posteriormente metabolizar el sustrato que a menudo se reprime. La disponibilidad del sustrato conduce entonces a la relevación de la represión (Deutscher *et al.*, 2006).

Entender el metabolismo de las micobacterias es fundamental para el desarrollo de los fármacos. Para tal efecto es indispensable la selección de blancos metabólicos, pero se ve obstaculizada por la falta de comprensión de la dinámica de la respuesta metabólica a la interrupción de la función objetivo, incluso por agentes actuales. La predicción de los objetivos que manifiestan una actividad bactericida, por lo tanto, está limitada por nuestra comprensión incompleta de la fisiología de los bacilos y su capacidad de adaptarse a la interrupción del metabolismo (Sola-Landa *et al.*, 2003).

Un organismo responde a cambios en su entorno mediante la alteración del nivel de expresión de genes críticos que transducen señales en tales cambios metabólicos

que favorecen el crecimiento continuo y la supervivencia (Sola-Landa *et al.*, 2003). Para lograr tal efecto, un enfoque convencional ha sido poner células micobacterianas en un estado metabólico lento utilizando las siguientes estímulos; por ejemplo el carencia de nutrientes (Betts *et al.*, 2002), hipoxia (Fontan *et al.*, 2009) y extender la fase estacionaria (Hampshire *et al.*, 2004; Voskuil *et al.*, 2004). Mientras que el posterior restablecimiento de las condiciones implicaría conocer la expresión de los genes que se sobre expresan durante la activación.

1.2.7.1 Metabolismo del nitrógeno, su toxicidad y disponibilidad

La regulación del metabolismo del nitrógeno ocurre en dos niveles, a saber, el primer nivel se refiere a la transcripción de los genes implicados en el metabolismo y el segundo nivel se da en el control posterior a la traducción, correspondiente a la actividad de las enzimas dentro de la ruta de la asimilación del nitrógeno. Con respecto a la asimilación de nitrógeno, el metabolismo del amonio (NH_4^+), es la fuente que favorece el suministro de nitrógeno de la mayoría de las bacterias, esto les permite elevar su velocidad de crecimiento, más que alguna otra fuente de nitrógeno. El amoniaco (NH_3) es la forma no cargada del amonio, que puede difundirse rápidamente a través de las membranas plasmáticas y prové elevadas concentraciones ambientales de amonio. Tanto el amonio como el amoniaco se incorporan en el glutamato (Glu) y la glutamina (Gln) dentro de la célula y subsecuentemente sirven como el principal donador de nitrógeno para las reacciones de biosíntesis. En la mayoría de las bacterias son dos las rutas a través de las cuales esto puede ocurrir, a decir, la enzima glutamato-deshidrogenasa (GDH) y la enzima glutamina-sintetasa/glutamato sintasa (GS) (Harper *et al.*, 2008).

Las enzimas GS, se encuentran en todas las células, de todos los organismos y ocurre en al menos tres de las formas descritas anteriormente. También se ha sugerido que las GS, pueden manipular la modulación del pH del fagosoma y la consecuente prevención de la fusión del fagolisosoma (Harth *et al.*, 1994; Tullius *et al.*, 2001). Además, la enzima GS1 extracelular, se encuentra involucrada en la síntesis de poli-L-glutamina-glutamato, un constituyente de las micobacterias

patógenas (Tullius *et al.*, 2001; Harth y Horwitz, 2003). Por lo que se puede usar L-metionina-SR-sulfoximina (MSO) como inhibidor de GS, o bien los oligonucleótidos antisentido del ARNm, específicos para inhibir la formación poli-L-glutamato-glutamina, que forma parte de la estructura de la pared celular durante el crecimiento de *M. tuberculosis*. Paralelo a este efecto, estos agentes también inhiben el crecimiento bacteriano, lo que indica que la enzima tiene una función en la homeostasis bacteriana (Harth y Horwitz, 1999; Harth *et al.*, 2000). MSO, bloquea selectivamente el crecimiento en los medios de cultivo líquidos de las micobacterias patógenas, entre las que se incluyen *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium*, pero MSO, no afecta a las micobacterias apatógenas o a otros microorganismos distintos a las micobacterias (Harth y Horwitz, 1999).

La regulación del metabolismo del nitrógeno a nivel del genoma, se efectúa por la transcripción del gen *glnA1*, que codifica la enzima GS. *M. tuberculosis* posee cuatro genes homólogos de GS: *glnA1* y *glnA2* que se encuentran en la misma región del cromosoma de *glnE*. El gen *glnA1*, codifica la enzima GS-I y tres modos asociados con la glutamina sintetasa, entre las que se incluye un residuo conservado de la tirosina (Pesole *et al.*, 1991), mientras que *glnA2*, probablemente codifique una GS-II. *GlnA3* y *GlnA4*, es probable que sean similares a las enzimas GS-I y GS-II, respectivamente. Mientras que sólo una copia de *glnE*, se encuentra dentro del genoma H37Rv (Cole *et al.*, 1998).

El metabolismo de los aminoácidos implica la aminación y desaminación oxidativa. En ello intervienen las enzimas GDH y L-alanina deshidrogenasa (Ald). La degradación de los aminoácidos se puede dividir en 3 etapas: transaminación-desaminación oxidativa [síntesis de urea (ciclo de la urea)] y la degradación del esqueleto carbonado α -oxácido. En la transaminación, los aminoácidos reaccionan con α -oxoglutarato y se obtienen como productos α -oxácido y glutamato. Este último, es el sustrato de la reacción de la desaminación oxidativa. Esta reacción, en los mamíferos se da sobre todo en el hígado y se cataliza por la enzima GDH. Mientras que la enzima Ald depende de NAD(H), que cataliza la desaminación oxidativa de L-alanina para convertirla en piruvato y amonio (reacción catabólica) o, en dirección

inversa, tiene afinidad reductora del piruvato para convertirla L-alanina (reacción biosintética). Desde el punto de vista inmunológico, la proteína Ald, es uno de los antígenos predominantes en los filtrados de los cultivos de *M. tuberculosis*, aunque carece de péptidos señal, como varias de las proteínas extracelulares de *M. tuberculosis*. Por otra parte, los análisis de inmuno-marcaje, fallan en la detección de Ald en *M. bovis* cepa BCG (Andersen *et al.*, 1992).

M. smegmatis crece mejor con L-asparagina como única fuente de nitrógeno. La asparagina se metaboliza en aspartato, el cual es precursor de la β -alanina y de la familia de aminoácidos del aspartato: treonina, isoleucina, metionina, ácido diaminopimélico, ácido gamma-aminobutírico (GABA) y lisina. La regulación se efectúa a partir de aspartato cinasa y la homoserina deshidrogenasa, las cuales son enzimas iniciales en la biosíntesis de estos aminoácidos, que se encuentran involucradas en diferentes rutas. El primer paso en la utilización de la asparagina por las células bacterianas, es su desaminación en ácido aspártico y amoníaco por la L-asparaginasa. Al parecer, en *M. tuberculosis* la aspartato cinasa es el producto de un sólo gen (*Rv1538c*) (Malhotra *et al.*, 2009). Mientras que la actividad metabólica en *M. smegmatis*, se da a partir de tres diferentes isoenzimas, que representan el 8% de las proteínas solubles. Estas isoenzimas son la aspartocinasa I que es inhibida por la treonina y la homoserina y la aspartocinasa III inhibida por la lisina, pero la aspartocinasa II no se inhibe por ningún aminoácido (Sritharan *et al.*, 1989).

El precursor de la asparagina es el oxaloacetato, que es convertido en aspartato por medio de la enzima transaminasa. Mientras que la enzima asparagina sintasa produce asparagina, AMP, glutamato y pirofosfato a partir de aspartato, glutamina y ATP. En la reacción de la asparagina sintasa, el ATP se usa para activar el aspartato, formando β -aspartil-AMP. La glutamina confiere un grupo amonio, que reacciona con β -aspartil-AMP para formar asparagina y tres AMP. Mientras que la deficiencia de Zn^{2+} disminuye la actividad de la enzima glutámico-oxaloacetato transaminasa, la cual es responsable de la biosíntesis de L-glutamato en el crecimiento de BCG en el medio Sauton, cuando se usa asparagina como fuente de nitrógeno (De Bruyn *et al.*, 1981). Esto adquiere especial relevancia cuando se usa

medio Sauton sin Zn^{2+} y se requieren establecer algunas relaciones respecto a la expresión genética.

El efecto de la promoción del crecimiento en las micobacterias como *M. smegmatis* 607 y la cepa avirulenta para el humano *M. tuberculosis* (H37Ra) con la utilización de concentraciones μM (5 $\mu M/ml$) de L-alanina, ácido L-aspártico, glutamato monosódico o cloruro de amonio se comparan con las fuentes de L-asparagina, que es la fuente de nitrógeno regular del medio sintético líquido Sauton (Lyon *et al.*, 1970). Además existe un amplio rango de di y tripéptidos, que a concentraciones de 2 a 5 mM son capaces de sostener el crecimiento de *M. smegmatis* en medio mínimo como única fuente de carbono o nitrógeno. Pero algunos aminoácidos como L-histidina, L-lisina, L-ornitina, L-alanina y L-prolina como única fuente de nitrógeno son incapaces de sostener el crecimiento en BCG (Bhatt *et al.*, 1998). No hay que olvidar que las concentraciones de los péptidos como fuente única de carbono y energía pueden provenir del reciclamiento de los desechos de las bacterias muertas en los cultivos axénicos y/o de la acumulación o el reciclamiento interno de las micobacterias vivas.

Entre las fuentes de nitrógeno para las micobacterias, también se encuentran los nitritos y los nitratos. Aunque la mayoría de las micobacterias reducen el nitrato, pero no el nitrito. *M. kansasii*, *M. bovis* y *M. tuberculosis*, no crecen en nitrito como única fuente de nitrógeno, mientras que *M. Smegmatis* y *Mycobacterium phlei* crecen lentamente y *M. fortuitum* utiliza el $NaNO_2$ eficiente y rápidamente (Tsukamura y Tsukamura, 1965). Aunque la mayoría de los miembros del complejo *M. avium* reducen lentamente el nitrato, el nitrito lo reducen rápidamente. *M. avium* no utiliza los aminoácidos (con excepción de la glutamina) como fuente de nitrógeno, pero si puede utilizar tanto las sales de nitrato como de nitrito. De esta manera, la actividad metabólica es económica para éste organismo, si se cuenta con sólo una fuente para crecer. Mientras que la prevalencia de la actividad de la enzima nitrito reductasa, sugiere que *M. avium*, usa nitrito no sólo para su asimilación, sino que éste se usa para disminuir el efecto desintoxicante del nitrito (McCarthy, 1987).

En los medios anaeróbicos, muchas bacterias son capaces de usar nitrato como un electrón aceptor final, en la disposición de oxígeno para el mantenimiento de un modo gradiente de protones, que les permita continuar creciendo (Tsukamura y Tsukamura, 1965). Conjuntamente, los experimentos *in vivo*, han demostrado que el óxido nítrico producido por la actividad de los macrófagos contribuye fuertemente a la inducción y mantenimiento del aletargamiento del bacilo (Chan *et al.*, 1992; Nathan y Shiloh, 2000; Chan *et al.*, 2001a). Sin embargo, la infección tuberculosa se manifiesta como un balance dinámico entre el efecto de la inmunidad y el crecimiento de *M. tuberculosis*; lo que indica que en el bacilo tuberculoso opera un mecanismo endógeno para resistir al óxido nítrico. Por lo que la pregunta es clave es cómo actúa *M. tuberculosis* cuando el óxido nítrico está presente. Al respecto, al considerar el hecho de que ni *M. tuberculosis* ni *M. Bovis* reducen el nitrito (Tsukamura y Tsukamura, 1965), se sugiere que la reducción de nitrato, puede servir como una fuente de energía alterna durante la adaptación a las condiciones hipóxicas (Sohaskey y Wayne, 2003).

El óxido nítrico es parte de las defensas del hospedero contra los patógenos microbianos, por inhibir o inactivar enzimas clave tales como las oxidasas terminales de la respiración (Stevanin *et al.*, 2000) y la enzima hierro/azufre-aconitasa (Gardner *et al.*, 1998); la cual es miembro del ciclo del ácido cítrico. El óxido nítrico también combina con la tasa límite de la difusión del superóxido (O_2^-), producido por la respiración de peroxinitrito por las células, el cual es un agente altamente oxidante (Pfeiffer *et al.*, 1997). En respuesta a las defensas del hospedero, los microorganismos han desarrollado varios mecanismos de protección, por los cuales los efectos tóxicos del óxido nítrico puede ser evadido. Uno de tales mecanismos, es mediado por dos dominios de las flavohemoglobinas, que se encuentran en ciertas bacterias y levaduras. La flavohemoglobina, desintoxica del óxido nítrico en una rápida reacción de las ligaduras heme para el O_2^- con el óxido nítrico para formar el nitrato inocuo y el nitrato férrico por la flavohemoglobina ($Fe(II)O_2 + NO \rightarrow Fe(III) + NO_3^-$) (Gardner *et al.*, 1998; Hausladen *et al.*, 2001). Esta misma función es realizada por la mioglobina animal y la hemoglobina (Minning *et al.*, 1999; Flogel *et al.*, 2001).

Para efecto de la desintoxicación del óxido nítrico, *M. tuberculosis* no posee genes *FHb*, que expresan las flavohemoglobinas (Poole y Hughes, 2000), pero si codifica pequeñas Hbs, llamadas Hemoglobinas truncadas (trHbs). Las trHbs representan una clase de pequeñas hemeproteínas ampliamente distribuidas en las bacterias, plantas y en los eucariotas unicelulares; en los cuales forman un grupo separado de otras Hbs que incluyen las flavohemoglobinas (Moens *et al.*, 1996). Entre las hemoglobinas truncadas, se distinguen tres grupos distantes, pero relacionados con la familia trHbs y algunos organismos expresan las trHbs codificadas por los genes en más de un grupo (Wittenberg *et al.*, 2002). Aún más, ya están descritas las funciones para las trHbs, aunque recientemente la trHbO de *M. tuberculosis* se ha demostrado que en *E. coli* aumenta la toma de oxígeno por la fracción membranosa (Pathania *et al.*, 2002).

En estudios realizados en *M. bovis* la trHbN, *in situ* en las células vivas, remueve rápidamente el óxido nítrico y los protectores de la respiración anaeróbica, para la inhibición bajo la tensión biológicamente relevante de O₂. Asimismo, el ión de trHbN, puede reducir la formación de un peroxinitrito elevadamente reactivo, por lo cual previene la oxidación irreversible y la nitrificación de las proteínas. De esta manera trHbN, actúa bajo condiciones donde la complementación de O₂ es limitada y las concentraciones de óxido nítrico son elevadas, tal como se anticipa durante la reactivación de los bacilos que se encuentran en el granuloma caseoso (Ouellet *et al.*, 2002).

1.2.7.2. Metabolismo del carbono

Las bacterias del género *Mycobacterium*, se caracterizan por ser facultativas quimiolitotróficas competentes en el crecimiento aeróbico no sólo en CO, sino también en metanol como única fuente de carbón y energía (Ro *et al.*, 1997). Esto significa que las micobacterias son capaces de emplear tres distintos tipos de nutrición, quimioheterotrófica, quimiolitotrófica y metilotrófica, dependiendo de la disponibilidad de los substratos. Entre las micobacterias que son capaces de oxidar el CO, se incluye *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998), *M. avium*, *M. bovis*, *M. leprae*

(Cole *et al.*, 2001), *M. smegmatis* y *M. phlei* (Bartholomew y Alexander, 1979) y con excepción de *M. tuberculosis*, las demás son aptas para crecer con el uso metanol como fuente de carbono (Park *et al.*, 2003b).

Las bacterias patógenas deben competir exitosamente por los nutrientes, en los que se incluye el carbono, para reproducirse y sobrevivir en los tejidos del hospedero. Estas condiciones hasta cierto punto, no son un obstáculo para las micobacterias, pues son heterótrofas. Por tanto, son capaces de subsistir en una variedad de substratos de carbono. Estos pueden, incluir los carbohidratos, lípidos, glucolípidos, ácidos dicarboxílicos y aminoácidos. El catabolismo del carbono, provee energía a las células bacterianas en la forma de reducciones equivalentes y ATP, así como precursores esenciales biosintéticos que incluyen la glucosa-6-fosfato, fructosa-6-fosfato, 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, acetil-CoA, propionil-CoA, oxaloacetato y α -cetoglutarato (Munoz-Elias y McKinney, 2006).

Los aislados de micobacterias de los tejidos respiran preferentemente ácidos grasos más que azúcares (Segal y Bloch, 1956). De esta manera, los ácidos grasos se convierten en la principal fuente de carbono, los cuales reemplazan al ácido cítrico como intermediarios. Este fenómeno conocido como anaplerosis ocurre vía el ciclo del glioxilato, el cual convierte las moléculas de acetil-CoA derivadas de la β -oxidación de los ácidos grasos en oxaloacetato, un intermediario del ciclo de ácido cítrico. Aunque el ciclo del ácido cítrico y el ciclo del glioxilato, tiene muchas enzimas en común, dos enzimas son específicas para las reacciones posteriores: la enzima isocitrato liasa (ICL) es crítica en el metabolismo de acetil-CoA y propionil-CoA, que en el ciclo metil-citrato, lo deriva del glioxilato para la producción de energía, carbohidratos y la biosíntesis de micolípidos (Murphy y Brown, 2008).

Como primera enzima de ciclo del glioxilato, ICL se requiere para la persistencia a largo plazo de *M. tuberculosis* en el ratón. Lo que sugiere que las micobacterias deben intercambiar una dieta de fuentes de carbono C₂, tales como los ácidos grasos *in vivo*; de esta manera, aumentan el ciclo del glioxilato por anaplerosis del carbono. Al respecto, se ha observado que ICL es esencial para la persistencia de *M.*

tuberculosis y los niveles normalizados de ARNm del gen *icl1*, se incrementan durante la infección; lo que sugiere que la bacteria *in vivo*, se le obstaculiza la disposición de glucosa. La glucosa 6-fosfato es un intermediario esencial en un número de rutas metabólicas; si una fuente externa de glucosa está disponible, la glucosa 6-fosfato se sintetiza *de novo* por gluconeogénesis (McKinney *et al.*, 2000). El carbono derivado de la β -oxidación de los ácidos grasos es desviado en la gluconeogénesis considerado como PckA (acrónimo en inglés: **phosphoenolpyruvate carboxykinase**), el cual se convierte de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato. La expresión de *pckA* es inducida cuando las micobacterias crecen *in vitro* en sustratos de ácidos grasos (Tuckman *et al.*, 1997). La reacción catalizada por PckA, desvía un punto de entrada alternativo para el carbono en la gluconeogénesis, a saber, la conversión del piruvato a oxaloacetato por la piruvato carboxilasa (Pca) (Timm *et al.*, 2003).

La derivación del metabolismo hacia el glioxilato para la obtención de fuentes de carbono, es ampliamente usada entre los procariotas, en menor grado por los eucariotas y las plantas, pero se encuentra ausente en los vertebrados. La enzima ICL, se sobreexpresa en los cultivos 'aletargados' de *M. tuberculosis* bajo limitación de oxígeno (Wayne y Lin, 1982), esto sugiere que esta enzima debe contribuir a la adaptación de la hipoxia. Además, McKinney *et al.* (2000), encontraron que bajo condiciones *in vivo*, la utilización de las fuentes de carbono, requieren de la enzima ICL, la cual ha sido asociada con la capacidad de *M. tuberculosis* para persistir en el huésped. Al respecto, los dos genes que codifican las enzimas ICL en *M. tuberculosis*, *icl1* e *icl2*, cuando se anula la *icl1* en las cepas de *M. tuberculosis*, éste es capaz de establecer una infección aguda en el ratón, pero no es capaz de sostenerse en la infección crónica. Aunado a esto, las bacterias carentes de *icl1* e *icl2*, son incapaces de crecer en ácidos grasos o en los macrófagos y son eliminados rápidamente de los pulmones de los ratones infectados (Munoz-Elias *et al.*, 2005). Estas observaciones, sugieren que la adaptación al ambiente de los pulmones, implica un cambio metabólico en las fuentes de carbono usadas por la bacteria para

generar la acetil-CoA, a través de la β -oxidación de los ácidos grasos (Gould *et al.*, 2006).

El mantenimiento anaplerótico del ciclo del ácido tricarboxílico, es costeado por el ciclo del glioxilato, durante las condiciones donde la generación del piruvato de la glicólisis se reduce, mientras que la β -oxidación de los ácidos grasos, es la forma de abastecimiento principal de las fuentes de carbono y se convierten en elementos vitales para la supervivencia de la micobacteria. La β -oxidación de los ácidos grasos, puede resultar en el incremento de los niveles de la acetil-CoA. En el ciclo de glioxilato, la enzima ICL convierte el isocitrato a glioxilato y succinato. La siguiente enzima en este ciclo, es la malato sintetasa que condensa al glioxilato y la acetil-CoA para producir malato. Una desventaja del ciclo del glioxilato, durante las condiciones donde la β -oxidación es elevada, es el doble paso del CO₂, que se genera en los pasos del ciclo de ácido tricarboxílico, en el que el ciclo del glioxilato, puede reponer la concentración de los dos intermediarios, el succinato y el malato, los cuales pueden tener un efecto completo del mantenimiento de los niveles del oxaloacetato. Este es necesario para continuar manteniendo el ciclo del ácido tricarboxílico por el oxaloacetato, el cual normalmente es producido por el ciclo del piruvato, que es necesario para entrar en la acetil-CoA (Gould *et al.*, 2006).

2.8.2.1 Metabolismo de los ácidos grasos

De acuerdo con el genoma de *M. tuberculosis* posee aproximadamente 250 enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos (Cole *et al.*, 1998), en comparación con el genoma de *E. coli* que contiene aproximadamente 50 de tales enzimas (Kinsella *et al.*, 2003). Por lo que es intrigante que *M. tuberculosis* necesite muchas más enzimas, cuando los genomas de estos dos organismos son similares en tamaño. El metabolismo de los ácidos grasos en *M. tuberculosis* es vital para la supervivencia de esta bacteria en el hospedero, porque los ácidos micólicos, producen elongaciones de ácido grasos, forman una capa protectora de lípidos en la pared celular (Barry *et al.*, 1998).

Existen ácidos grasos en la membrana plasmática que ofrecen protección contra los estresantes a los que se enfrentan las micobacterias. La protección es necesaria durante el crecimiento y en la fase estacionaria *in vitro*; o bien, ante el aletargamiento que sufre *M. tuberculosis* en el hospedero. De esta manera, las condiciones ambientales hacen que el patógeno ajuste su metabolismo a una mínima actividad, representada por la expresión genética; como lo demuestra Betts *et al.* (2002), en un modelo restrictivo en nutrientes, en el cual una cepa de *M. tuberculosis* resistente a isoniazida y rifampicina, pero sensible a metronidazol; de los 63 genes involucrados en la biosíntesis de los lípidos se observó que sólo 10 son reprimidos y tres se sobre expresan. Entre los que se reprimen, se encuentran los de la síntesis de los ácidos grasos de tipo I, sintetizados por el producto del gen *fas* (acrónimo en inglés: **fatty acid synthase**). Estos generan esteres de CoA de la acetil-CoA, para crear los precursores de la elongación de todos los demás ácidos grasos y el sistema de los policétidos que también son reprimidos. Igualmente, se reprimen varios genes involucrados en la modificación de los ácidos micólicos, así como los genes *desA3* y *desA2*, que codifican las enzimas desaturasas aeróbicas putativas. Otros genes que también son reprimidos son los *cmaA1* y *umaA2* (acrónimo en inglés: **unsaturated meromycolic acid**) cuyo producto es parte de la familia de las metiltransferasas. Los productos de ambos genes, intervienen en la síntesis de los anillos de ciclopropano en los ácidos micólicos de la pared celular de *M. tuberculosis* (Barry *et al.*, 1998). Además, *umaA2* también se requiere para la virulencia en *M. tuberculosis* (Glickman *et al.*, 2000). Por otra parte, los genes *fbpA* y *fbpB* (acrónimo en inglés: **fibronectin binding protein**) del complejo antigénico 85, son enzimas que poseen la actividad micolil transferasa y se consideran como las involucradas en la transferencia de los ácidos micólicos a los arabinogalactanos de la pared celular (Dubnau *et al.*, 2000).

En el mantenimiento de los ácidos grasos de *M. tuberculosis* actúa el operón *mymA* (homólogo de varias mono oxigenasas presentes en el genoma *M. tuberculosis* y de esta manera se le designó como *mymA*, (acrónimo en inglés: **mycobacterial monooxygenase**). Este se organiza divergentemente al gen *virS*, que actúa como un regulador de la transcripción de este operón (Singh *et al.*, 2005a). El operón *mymA*

se induce con el pH ácido y en la infección de los macrófagos y se ha sugerido que utiliza los ácidos grasos C24 y C26, que se acumulan producidos por desregulación de la enzima FAS II bajo condiciones de acidez (Fisher *et al.*, 2002). Además, se ha comprobado que el operón *mymA* actúa en el mantenimiento adecuado de la composición de los ácidos micólicos que permiten la permeabilidad de las envolturas de *M. tuberculosis* durante la exposición al pH ácido (Singh *et al.*, 2005b).

Los ácidos grasos son postulados como la fuente principal de energía requerida para la persistencia. Se sabe que la biosíntesis de los ácidos grasos, es dependiente de la carboxilación de la acetil-coenzima A (CoA) de la biotina para producir la malonil-CoA y la metilmalonil-CoA, esta se cataliza por la acetil-CoA carboxilasa. La reacción consiste de dos pasos catalíticos, los cuales involucran la carboxilasa de la biotina y la carboxil transferasa. En *M. tuberculosis* el paso de la carboxilación de la biotina es catalizado por la subunidad α ; y son tres los marcos de lectura abierta que pueden codificar la subunidad α (*accA1* a la *-A3* acrónimo en inglés: **acyl-CoA carboxylase components**) en el genoma. La transferencia del grupo carboxilo es catalizada por la subunidad β y son seis las subunidades β (*accD1* a la *-D6*) en el genoma del patógeno (Cole *et al.*, 1998). Además, se ha observado que los genes *fas* y *accD4* y *accD5* (**acyl-CoA carboxylase components**), se sobre expresan durante las condiciones de hipoxia (Daniel *et al.*, 2004).

Con la persistencia de *M. tuberculosis* dentro del granuloma, se inducen varios genes *fad* (acrónimo en inglés: **flavin adenin dinucleotide**), también se activan tres sintetisas acil-CoA. Los genes *fad* se encuentran involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos, tanto en la ruta de degradación como en la biosintética. *FadD26* forma parte de un gran operón en el que se incluye un gen que expresa la enzima policétido sintetasa, la cual es responsable de la biosíntesis del ftiocerol dimicocerosato. Estos genes y sus productos, previamente se encuentran implicados en la virulencia, toda vez que a los mutantes atenuados para estos genes, no responden en los modelos de infección en ratones (Cox *et al.*, 1999). La inducción de *fadD26* para los genes relacionados con el estado no reproductivo durante la persistencia (*NRP*)-1 y *NRP*-2, en contraste con la limitación de carbono se

preservan, aunque no se sobre-expresan para todas las condiciones de estrés. Asimismo, la proteómica y los perfiles de transcripción después de 6 semanas de inanición, revelan en el genoma amplios cambios en la expresión de los genes. Mientras que los genes que dirigen la biosíntesis de PDIMs (**P**hthiocerol **D**imycocerosate) son *fadD26*, *papA5* y *mmpL* (Cox *et al.*, 1999), todos son desactivados en contraste a los sobre expresados vistos desde la perspectiva de la eliminación de oxígeno inicial (Muttucumaru *et al.*, 2004).

La ciclopropanación de los ácidos micólicos son los factores clave que participan en permeabilidad de la envoltura celular, la inmunomodulación y la persistencia de *M. tuberculosis* (Grogan y Cronan, 1997). Las micobacterias patógenas llevan en sí un sub tipo de ácidos micólicos que contienen anillos de ciclopropano. Las metil transferasas de *M. tuberculosis* se han estudiado, principalmente, MmaA1 (acrónimo en inglés: **M**ethoxy-**m**ycolate **a**cid) a través de *mmaA4*, PcaA (acrónimo en inglés: **P**roximal **c**yclopropane **a**lfa) y CmaA2. Las modificaciones ocurren en el sitio caracterizado por el doble enlace, en la que se incorpora a la cadena, en la parte proximal (cerrada para β -hidroxi) o la distal de la doble ligadura (Takayama *et al.*, 2005). El gen *pcaA* codifica la ciclopropanación proximal de los micolatos alfa, tanto en *M. tuberculosis*, como en BCG. Cuando el gen *pcaA* de *M. tuberculosis* se inactiva, se produce un dramático incremento en los cetomicolatos comparado con *M. tuberculosis* infectante (Glickman *et al.*, 2000). Aunado a este incremento, se presenta un efecto compensatorio de la pérdida intacta de los α -micolatos y se modulan a la baja en el organismo durante la fase crónica de la infección (Yuan *et al.*, 1998b).

El hecho de que el gen *pcaA* intervenga en la formación el anillo de ciclopropano permite plantear la posibilidad de que el contenido de ciclopropano en el dimicolato de trealosa o TDM (acrónimo en inglés: **T**rehalose 6,6'-**D**imycolate), determine si una cepa forme los cordones, no si contiene o no contiene TDM. Esto se relaciona con los anillos del ciclopropano y la persistencia de las micobacterias; pues se modifica la presentación del antígeno de los ácidos micólicos para las CD1 a las células T. Este modo de presentación de los antígenos de los lípidos a las moléculas CD1, sugiere

que la cabeza polar de los grupos de lípidos, contactan con los receptores de las células T y determina la especificidad para el reconocimiento del antígeno, mientras que los grupos de lípidos se incrustan en la bolsa hidrofóbica de las moléculas CD1 (Moody *et al.*, 1997; Kawano *et al.*, 1997). Bajo el modelo descrito, los linfocitos T responden a los ácidos micólicos libres presentados en las moléculas CD1 y pueden responder de la misma manera a los ácidos micólicos con grupos polares (Glickman *et al.*, 2000).

La trealosa es uno de los glucolípidos que permite la persistencia de las micobacterias en el hospedero. Esta estructura, almacena carbohidratos y es un protector contra factores estresantes. Las moléculas de trealosa, funciona como un soluto compatible a la estabilización de la célula durante el estrés osmótico y su acumulación tiene una amplia implicación en la preservación de la viabilidad de la célula durante la exposición a un rango de estresantes ambientales, en los que se incluye el choque calórico, la deshidratación y la hipoxia (Alvarez-Peral *et al.*, 2002; Chen y Haddad, 2004). Las rutas independientes que están disponibles para la biosíntesis de la trealosa en *M. tuberculosis* son: La trealosa-6-fosfato fosfatasa, producto del gen *otsB* (acrónimo en inglés: **o**smotic **s**tress), la ruta TreYZ (la cual hace la trealosa a partir del glicógeno) y la enzima TreS (la cual puede convertir la maltosa a trealosa) (De Smet *et al.*, 2000). El gen homólogo (*otsB1* o *Rv2006*), es un miembro del regulón que es inducido por la exposición a la hipoxia o a bajas concentraciones del óxido nítrico y se encuentra asociado con la supervivencia en la fase no reproductiva de *M. tuberculosis* (Voskuil *et al.*, 2003). En el análisis de la secuencia del genoma se han identificado dos marcos de lectura abiertos en *M. tuberculosis* con homología para el gen *otsB* (Cole *et al.*, 1998). Esta ruta es la dominante para la biosíntesis de la trealosa en *M. tuberculosis* y su pérdida no puede ser compensada por las otras dos rutas alternativas (Murphy *et al.*, 2005).

Las envolturas celulares y la capacidad de persistir en el hospedero están reguladas a nivel de la transcripción por el gen *sigF*. Esto se ha demostrado en ratones infectados con mutantes *M. tuberculosis* carentes de *sigF*, los cuales atenúan el daño a los tejidos a pesar de la persistencia de este microorganismo en el ratón (Geiman

et al., 2004), así como la reducción de la letalidad, comparado con la cepa isogénica no modificada (Chen *et al.*, 2000). De manera similar las cepas carentes en *sigF*, se encontró que inducen un daño en los cobayos, relativo a la falta de necrosis localizada en el granuloma con respecto a las cepas no modificadas (Karls *et al.*, 2006). Las relaciones existentes entre el gen *sigF* y las envolturas de *M. tuberculosis*, se manifiestan en los experimentos con mutantes que carecen del gen $\Delta sigF$. Este gen regula a través de los genes que promueve, los rasgos característicos a las micobacterias, tal como el teñido de rojo neutro a las cepas de *M. tuberculosis*, lo que sugiere que se reduce la síntesis de las envolturas asociadas con los sulfolípidos. El gen mutante $\Delta sigF$ de *M. tuberculosis* durante la fase estacionaria, revela la desregulación relativa de varios genes implicados en la biosíntesis y la estructura de la envoltura celular; así como los genes involucrados en la biogénesis y degradación de los polisacáridos y lipopolisacáridos (Geiman *et al.*, 2004).

1.2.7.3. Metabolismo del fósforo

Respecto al fósforo como fuente de energía, existen evidencias en levaduras, que los polifosfatos suministran tanto el fósforo como la energía requerida para la síntesis de ácidos nucleicos, que se efectúa al pasar de la etapa intermediaria de ATP a ADP (Scott *et al.*, 1956). Además, en las micobacterias puede servir como un fosfógeno que se acumula a partir del puente de energía del fosfato con los aminoácidos, una función quizás análoga a la de la fosfoarginina y la fosfocreatina en invertebrados y animales vertebrados (Denneny y Winder, 1956). Las reacciones que requieren suplementos de energía, tales como la síntesis de proteína, síntesis de ARN y ADN, la división celular, etc., aceleran la consunción de los polifosfatos. Al disminuir el metabolismo, se incrementa la acumulación de polifosfatos. Esto sugiere que hay un equilibrio dinámico entre el ATP, ADP, los polifosfatos en *Mycobacterium* (Mudd *et al.*, 1958).

Dado que el fosfato tiene una función nuclear en la célula, no es sorpresa que existan múltiples mecanismos de señalización para comunicar las limitaciones y dar una respuesta general al estrés (Schurdell *et al.*, 2007). En este sentido, son varios

genes de la virulencia de las bacterias que se expresan bajo condiciones de estrés, por las carencias relacionadas con el metabolismo del fósforo (Mekalanos, 1992). En las bacterias, muchas de las respuestas al estrés son mediadas por los factores sigma-alternativos, que reprograman la enzima ARN polimerasa a un subconjunto de promotores celulares. Las rutas que controlan la actividad de los factores sigma alternativos son centrales para el éxito de estas estrategias reguladoras y aseguran que los factores sigma dirigen el encendido y apagado en el momento apropiado para una cinética adecuada (Costanzo y Ades, 2006). Entre los mecanismos de acción se mencionan el sistema de los dos componentes, tales como la proteína sensora PhoB, que al fosforarse junto con la subunidad σ^{70} de la enzima ARN polimerasa activan la transcripción de los genes *phoE*, *phoA*, *pstSCAB-phoU* y *phoBR* (Schurdell *et al.*, 2007). El gen *phoE* codifica la proteína PhoE de la membrana externa, *phoA* codifica la fosfatasa alcalina PhoA, *pstSCAB* codifica para Pst (acrónimo en inglés: **P**hosphate **s**pecific **t**ransport) y el sistema de los dos componentes *phoB* y *phoR* codifican para las proteínas reguladoras (Makino *et al.*, 1993). En *E. coli* los genes son inducidos por la carencia del fosfato y requieren de la proteína PhoB para activar la transcripción. La proteína PhoB debe ser fosforilada por la proteína PhoR para activarse y transducir la señal (Makino *et al.*, 1989).

La carencia de fosfatos desencadena una respuesta general para el estrés, en el cual las células incrementan la resistencia a muchos estresantes ambientales que se presentan en la fase estacionaria (Gentry *et al.*, 1993; Majdalani *et al.*, 1998). Esto es debido a que las limitaciones de fuentes de fósforo y carbono, se relacionan con las reducciones de ATP. Pues éste nucleótido, está formado por una base nitrogenada (adenina) unida al carbono 1 de la ribosa, que en su carbono 5 y tiene enlazados tres grupos fosfatos. En las respuestas al estrés generadas ante tales carencias y especialmente en las limitantes de fosfatos, interviene como regulador el factor σ^S (RpoS). Este es un factor sigma alternativo que compete con el factor σ^{70} , para dirigir la transcripción de los genes bajo su control (Hengge-Aronis, 2002). La regulación de σ^S es muy compleja y tiene numerosos formas de intrusión. Sus cantidades celulares son controladas a los niveles de la transcripción, traducción y rotación de la proteína.

Durante el crecimiento exponencial, la región no traducida log 5σ , de las formas mensajeras del gen *rpoS*, forman una estructura de horquilla que oculta la fijación del sitio del ribosoma y previene la iniciación de la traducción. También se sugiere que los reguladores DsrA y RprA del ARN, median la inducción de la respuesta general al estrés debido a la limitación de fosfato (Peterson *et al.*, 2005). Estos pequeños reguladores del ARN, se ha demostrado que regulan la traducción de *rpoS*, por pareado de las bases con una secuencia marcadora no traducida del ARNm de *rpoS*, que revela al sitio de fijación al ribosoma mensajero y estimula la traducción. Es decir, el producto de la expresión del gen *dsrA*, actúa en conjunción con ARN no traducido, o un ARN antisentido, que incrementa la expresión del gen *rpoS* (Majdalani *et al.*, 2002).

Durante la regulación del metabolismo ante situaciones de estrés por carencia de nutrientes se da un fenómeno denominado respuesta estricta. En el interviene la alarmona Guanosina 3',5'-bispirofosfato [pppGpp acrónimo en inglés: guanosine 5'-triphosphate, 3'-diphosphate], se genera vía la sintetasa pppGpp, también conocida como RelA, y convierte pppGpp a ppGpp vía la fosfohidrolasa pppGpp. La enzima RelA se asocia con alrededor de unos doscientos ribosomas y se activa cuando una molécula de ARNt no cargada, entra en el sitio A del ribosoma, debido a la escasez de aminoácidos requeridos por el ARNt. De esta manera, ppGpp funciona como una señal ante el estrés por carencia de nutrientes y también es requerida para la activación de los factores sigma alternativos σ^S y σ^{54} cuando las bacterias entran en la fase estacionaria (Magnusson *et al.*, 2005). Primm *et al.* (2000) demostraron en las micobacterias que la eliminación de gen *Rel_{Mtb}*, en la cepa mutante H37Rv Δ *rel_{Mtb}* de *M. tuberculosis*, fue incapaz de sintetizar los nucleótidos (p)ppGpp bajo condiciones limitantes o los sintetiza con defectos cuando su supervivencia es a largo plazo *in vitro*. (p)ppGpp también media la suspensión de los aminoácidos por los ribosomas cuando se acumula. Estas moléculas marcadoras, se sintetizan por el transferidor enzimático del pirofosfato de GTP. La respuesta estricta, es revertida cuando las condiciones ambientales llegan a ser favorables y los niveles (p)ppGpp decrecen. En *Escherichia coli*, (p)ppGpp actúa por fijación de la β -subunidad de la enzima ARN

polimerasa y altera la expresión de >80 diferentes genes por afectar la especificidad del promotor (Chang *et al.*, 2002). Recientemente la respuesta restringida se mostró que tiene una función en el crecimiento en la biopelícula y la adherencia en *Listeria monocytogenes* (Taylor *et al.*, 2002), en la detección de quórum y en el gen que expresa la dependencia de la densidad celular en *Pseudomonas aeruginosa* (van Delden *et al.*, 2001), en la generación del cuerpo fructífero *Myxococcus xanthus* (Crawford y Shimkets, 2000), en la producción de antibióticos por *Streptomyces* (Hoyt y Jones, 1999), en la regulación de la virulencia en *Legionella pneumophila* (Bachman y Swanson, 2001) y el desarrollo de la resistencia a los antibióticos (Greenway y England, 1999).

1.2.8 Aletargamiento y activación de los bacilos: estados que influyen en la variación antigénica.

La variación antigénica, es parte de los mecanismos que le permiten a los patógenos evadir el sistema inmune del hospedero. La capacidad de un organismo para regular la expresión de diferentes estructuras de la superficie en sucesiones rápidas y en diferentes microambientes, puede contribuir a la patogenicidad. Existen distintas formas de variación antigénica, algunos patógenos pueden alterar la expresión de las estructuras de la superficie por variación de la fase; es decir, la modulación reversible de caracteres fenotípicos, como resultado de las variaciones en la expresión de uno o varios genes. En las bacterias, la variación de fase, puede ser definida como el fenómeno observado cuando la expresión de un componente de la superficie a manera de un interruptor, reversiblemente se enciende o se apaga. La variación de fase contribuye a la virulencia; esto es debido a la generación de la heterogeneidad de ciertos ambientes o presión de selección impuesta por el hospedero, la bacteria expresa el fenotipo que mejor se adapta a tal situación. Esto puede ocurrir de una forma aparentemente al azar o por una regulación concordada. En algunos casos, tanto en la variación de fase como en la antigenicidad, pueden afectar la expresión de una sola estructura de la superficie, mientras que otras estructuras son reguladas únicamente por la variación de fase o la variación antigénica (Maskell *et al.*, 1993). Esto es común en las micobacterias, cuando entran en la fase de aletargamiento y

provocan un estado de latencia de la infección en el hospedero. Pero esta variación de fase se revierte cuando se activa la enfermedad, por lo que en ambas condiciones, interviene la regulación antigénica. De tal forma que las pruebas inmunológicas *in vitro*, tienen ciertas fallas para determinar los momentos en los que las micobacterias se encuentran en estas fases (Dewan *et al.*, 2007).

Los antígenos relacionados con el estado aletargado, así como los que se expresan durante la reactivación y reavivación del bacilo aletargado, son candidatos a biomarcadores para la tuberculosis latente y la reactivación de la enfermedad (Biketov *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2000; Chan y Flynn, 2004). Los antígenos que se expresan con mayor potencia durante el aletargamiento de los bacilos tuberculosos en los individuos infectados con *M. tuberculosis* (Leyten *et al.*, 2006) y en los ratones (Roupie *et al.*, 2007), son los que se reconocen de preferencia por las células T, de los individuos con infección latente comparado con los pacientes que padecen la enfermedad activa (Leyten *et al.*, 2006). Al respecto, los hallazgos reportados demuestran una dicotomía entre la proteína α -cristalina del regulón del aletargamiento DosR (acrónimo en inglés: **D**ormancy **s**ystem **R**egulon) (Voskuil *et al.*, 2003) respecto a los los antígenos secretados, tales como el complejo Ag85 y los miembros de la familia ESAT-6. Una fuerte respuesta de la proteína α -cristalina, se encuentra estrechamente relacionada con individuos que padecen la infección latente, mientras que las respuestas a Ag85 y ESAT-6, se asocian con los humanos que padecen la enfermedad activa (Demissie *et al.*, 2006a).

Bajo condiciones iniciales de hipoxia en los macrófagos, *M. tuberculosis* entra en aletargamiento, un estado que se caracteriza por la inducción del regulón DosR, que incluye los genes *dosR* y *dosS*, que están bajo el control del regulador de la transcripción PhoP (acrónimo en inglés: **P**hosphate metabolism) como una respuesta inicial a la hipoxia (Sherman *et al.*, 2001). Se ha demostrado que por la falta del regulón DosR, las cepas BCG [Connaught JPG, Pasteur 140, Suecia (Gothenburg), Connaught (Toronto), Japón (Tokyo), Canadá, Vietnam, Dinamarca, Rusia, Brasil (Moreau), Tice (Chicago), Moscú y Pasteur 133A], son defectuosas en la inducción de dos genes del aletargamiento, *narK2* y *narX* (nombradas por su producto: nitrato

reductasas) (Honaker *et al.*, 2008). En *M. tuberculosis*, la eliminación de *narK2* impide la reducción anaeróbica del nitrato (Sohaskey y Wayne, 2003), pero no para *narX*, pues su ausencia no afecta la reducción en medio aeróbico ni anaeróbico (Cole *et al.*, 1998). Por el contrario, la cepa BCG Beijing, se ha asociado con la diseminación epidémica y se ha demostrado que el aumento de su virulencia, se debe a la expresión constituida del regulón DosR (Reed *et al.*, 2009b).

Los productos de los genes que controla el regulón DosR (Rv3133c) son alrededor de 48 y se sobre expresan en condiciones de hipoxia *in vitro* o altas concentraciones de óxido nítrico (Voskuil *et al.*, 2003). El regulón DosR codifica antígenos preferidos por las células T para su reconocimiento, en los humanos positivos a la tuberculosis latente mediante la prueba de Mantoux, comparado con los pacientes con infección de tuberculosis activa. Lo que sugiere que la respuesta inmune a los productos de los genes regulados por DosR, son parte de la inmunidad protectoras contra *M. tuberculosis* (Rosenkrands *et al.*, 2002; Demissie *et al.*, 2006). Tal como lo marcan las evidencias de la proteína alfa-cristalina, que es inmunogénica para las células B y es determinada por la presencia de anticuerpos en alrededor del 70% de los individuos positivos a la prueba de esputo y un 50% de negativos a esta misma prueba con tuberculosis pulmonar y en muchos sujetos saludables pero con infección latente, después de la exposición por contacto con pacientes tuberculosos (Jackett *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1992; Raja *et al.*, 2002; Demissie *et al.*, 2006b). Con respecto a la inmunidad celular de las células T, Caccamo *et al.* (2003, 2004), reportaron el reconocimiento de los epítomos de alfa-cristalina por las células Th1 tipo CD4⁺ y CD8⁺ en pacientes con tuberculosis. Desde otra perspectiva, Vekemans *et al.* (2001), mostraron que los neonatos vacunados con BCG, no inducen respuestas IFN- γ a la alfa-cristalina, mientras que la vacuna es capaz de inducir respuestas inmunes a otros antígenos de tuberculosis, tales como la proteína micolil transferasa Ag85A.

Otro regulón que interviene en el control de los genes que causan variabilidad genética es IdeR (acrónimo en inglés: Iron **d**epletion). Este actúa en la transcripción de los genes involucrados en la adquisición y almacenaje del hierro, para facilita la supervivencia de los bacilos tuberculosos en los macrófagos. Además, es capaz de

regular las proteínas de secreción y de superficie antigénicas (Gold *et al.*, 2001). Este regulón es un homólogo de la toxina represora de la difteria (DtxR por su acrónimo en inglés: **D**iphtheria **t**oxin **R**epressor) (Schmitt *et al.*, 1995; Camacho *et al.*, 1999). Los genes que controla IdeR, codifican proteínas con diversas funciones, entre los que se incluyen las enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos (Rv1344, Rv1345, y Rv1347), miembros de la familia de proteínas PE/PPE ricas en glicina (Rv0285, Rv0286 y Rv2123) y MmpL4 (acrónimo en inglés: **M**ycobacterial **m**embrane **p**rotein) y MmpS4 (Rodríguez *et al.*, 2002). Estos últimos pertenecen a los grupos de proteínas conservadas de la membrana en *M. tuberculosis* y comparten secuencias y estructuras similares (Cole *et al.*, 1998). Además, la proteína reguladora IdeR, cuando existen limitantes de hierro, induce los genes que codifican los transportadores del sistema de secreción único para las micobacterias (Rv0282, Rv0283 y Rv0284), así como los genes que expresan las proteínas de secreción de este sistema (CFP-10 y ESAT-6), propuestos por Gey Van Pittius *et al.* (2001) para la región de diferencia 3, de la misma manera que los reprime bajo condiciones elevadas de hierro (Rodríguez *et al.*, 2002).

En los pacientes con afección pulmonar, son las células broncoalveolares más no las células mononucleares de la sangre periférica las que muestran un aumento en la reactividad por los antígenos de las micobacterias (Schwander *et al.*, 1998). Mientras que el reclutamiento periférico de las células CD4⁺, permite distinguir entre los pacientes con tuberculosis activa y aquellos con enfermedades no tuberculosas. En pacientes que sufren de tuberculosis activa, muestran un sorprendente enriquecimiento de células T específicas contra *M. tuberculosis*, en el sitio de la infección. Tres de cada diez pacientes con otras enfermedades diferentes a la tuberculosis mostraron la respuesta IFN- γ después de la estimulación con ESAT-6. Mientras que la marca distintiva de la enfermedad, no es la presencia de células T específicas para *M. tuberculosis* en la sangre periférica, pero si la acumulación de estas células que afectan el compartimiento. De esta manera, la reactividad de las células T para los antígenos específicos contra *M. tuberculosis*, tales como ESAT-6 en la sangre periférica sin el enriquecimiento en el sitio de la enfermedad, es

indicativo de la infección latente más no de la enfermedad activa (Nemeth *et al.*, 2009).

1.2.8.1 Regulación de los genes ante el estado aletargado y activo de los bacilos tuberculosos

El problema de la tuberculosis es debido a la notoria capacidad de *M. tuberculosis* para ocultarse y sobrevivir por largos periodos dentro de los macrófagos. Esto pasa ante la presencia de una respuesta inmune efectiva; probablemente por confundir o despojar la maquinaria de destrucción de los macrófagos. Entre la infección y la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad, las micobacterias interactúan con diferentes microambientes dentro del hospedero (Talaat *et al.*, 2004). El bacilo *M. tuberculosis*, una entidad singular cuya respuesta en la infección del pulmón, está representada en dos aspectos: la progresión primaria es rápida y la etapa de transición lenta de la infección (latencia) hasta desaparecer la capacidad infectante o bien se renueva la enfermedad. Tales aspectos regulados genéticamente, se han caracterizado como un principio básico, al cual se suman cada vez más evidencias a las interacciones no lineales, como la retroalimentación positiva y negativa dentro de las rutas señal, el retardo, la oligomerización y la comunicación de las diferentes carencias. Un modelo relativamente simple para entender la regulación genética, es el de los factores de transcripción que se encuentran sujetos a la autorregulación positiva y negativa de su propia transcripción. Los elementos responsables que afectan la regulación de los genes, pueden proveer una comunicación entre los sistemas reguladores y su propia retroalimentación. Esta comunicación, puede efectuarse a través del sistema de los dos componentes que actúan en la ruta de las señales de transducción, en la cual los estímulos conducen a la generación de un mensajero como segundo componente de la señal, con la consecuente fosforilación de los factores de transcripción, los cuales posteriormente se unen a las secuencias específicas de los aminoácidos en los factores de transcripción, conocidas como elementos responsables de la regulación de la transcripción de genes específicos (Karin, 1994).

Entre los reguladores se encuentran los miembros de las proteínas receptoras del monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), de la reductasa del complejo regulador receptor (CRP por su acrónimo en inglés: **C**omplex **R**egulator **R**eceptor **P**rotein) y la reductasa reguladora del Fumarato de Nitrato o FNR. Estos forman una superfamilia de factores de la transcripción que regulan una diversidad de funciones fisiológicas en un amplio rango de bacterias. CRP es el miembro mejor caracterizado de la familia; en *E. coli*, controla la expresión de numerosos genes en respuesta a los cambios en la concentración intracelular de cAMP (Gosset *et al.*, 2004). Este es uno de los reguladores de la transcripción mejor estudiados y también se le conoce como proteína activadora de los catabolitos (CAP por su acrónimo en inglés: **c**atabolite **a**ctivator **p**rotein). CRP es una proteína dimérica de 45 kDa, que tiene dominios tanto para cAMP- como para la fijación a los sitios específicos de las secuencias genéticas (Aiba *et al.*, 1982).

La enzima responsable para la síntesis de la adenosina 3',5'-monofosfato o cAMP, es la adenilil ciclasa (AC). cAMP participa como un segundo mensajero virtualmente en todos los organismos. La síntesis del segundo mensajero cAMP se acompaña por un grupo de adenilil ciclasas, las cuales actualmente se ordenan en cinco clases de estructuras primarias no relacionadas (Sismeiro *et al.*, 1998). Rv1625c es un residuo adenilil ciclasa, que comprende seis hélices transmembrana y un dominio catalítico citosólico, el cual se dimeriza para formar una enzima homodimérica transmembrana-12, con dos centros catalíticos, en contraste a la enzima heterodimérica de los mamíferos (Guo *et al.*, 2001). Los nucleótidos cíclicos tales como la adenilil ciclasa, regulan diversos procesos celulares (Cooper, 2003). En los procariotas, los nucleótidos cíclicos tienen una función clave en diversos procesos tales como la adaptación a los nutrientes, respuesta al estrés osmótico, la acidificación y la patogenicidad (Leppla, 1982; Susstrunk *et al.*, 1998; Kimura *et al.*, 2002).

Comúnmente, los dominios catalíticos de las nucleotidil ciclasas, como enzimas que catalizan la síntesis de cAMP y cGMP, se agrupan en cinco clases basadas en la similitud de sus secuencias (Sismeiro *et al.*, 1998). La mayoría de ellas, incluidas en

las ACs y guanilil ciclasas (GCs) de los mamíferos que contiene homología dominio de las ciclasas, los cuales además se subdividen en cuatro subclases [IIIa–III d; (Linder y Schultz, 2003)]. Las isoformas de los la homología dominio de las ciclasas de los procariotas, identificadas en su mayor parte en las secuencias disponibles del genoma actual, parecen estar directamente ordenadas por una variedad de dominios potenciales reguladores que se apegan directamente a la homología dominio de las ciclasas. *M. tuberculosis* tiene 15 clases de genes ACs de tipo III. La caracterización de estas enzimas es esencial para elucidar la función de los nucleótidos cíclicos en *M. tuberculosis* así como en otros procariotas (Sinha *et al.*, 2005).

Las enzimas ACs son reguladas por las proteínas G, estas son proteínas transductoras de señales de la membrana, que llevan información desde el receptor hasta una o más proteínas efectoras (como las ACs). Las subunidades de las proteínas G, ejercen efectos específicos en las ACs. Estas observaciones, actualmente resuelven dos conflictivos propuestos para el mecanismo de inhibición de las ACs por parte las proteínas G. Dichas observaciones se basaron en la reconstrucción de pruebas de purificación de las subunidades de las proteínas G, con fuentes de ACs de la membrana (Cooper, 2003). Las proteínas G, se fijan directamente a los centros catalíticos de las ACs, los cuales consisten en dos dominios citosólicos homólogos denominados C1 y C2. La estructura cristal de los dominios C1 y C2, se identifican como residuos de aspartato están presentes en el dominio C1 para fijar los metales; mientras que los residuos que fijan los nucleótidos de adenina (residuos de lisina y glutamato) están presentes en los dominios C2 (Tesmer *et al.*, 1997; Tesmer *et al.*, 1999).

La conversión de ATP a cAMP por la ACs, es el paso clave en la modulación intracelular de la concentración de cAMP, en respuesta a la estimulación extracelular. Los análisis genéticos y bioquímicos de las ACs tipo I solubles, indican que los dominios C1 y C2, son esenciales para elevar la actividad enzimática y sólo el dominio C2 es catalítico (Chen *et al.*, 1995). Los residuos conservados de asparagina y arginina son cruciales para la catálisis y ellos deben ser dos de los residuos clave para prevenir que el dominio C1, al inicio sea catalíticamente activo (Weng *et al.*,

1996; Yan *et al.*, 1997). Las subunidades C2 contribuyen a la asparagina implicada en la orientación de los sustratos, un residuo de asparagina estabiliza el estado de transición (Tesmer *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1997) y una adenina que especifica el acoplamiento de la lisina-aspartato (Sunahara *et al.*, 1998). Mientras que la catálisis de Rv1625c (Guo *et al.*, 2001) y Rv1264 en las micobacterias (Linder *et al.*, 2002), dependen los seis residuos en total, varios de los demás dominios homólogos de las ciclasas de *M. tuberculosis* y otros procariontes no tienen un complemento completo de estos residuos, desde que la actividad de las ciclasas no es definitivamente asignada a estos dominios homólogos de las ciclasas (Sinha *et al.*, 2005).

De acuerdo a Cole *et al.* (1998), *M. tuberculosis* (cepa H37Rv), resguarda 16 genes que muestran similitudes con las ciclasas III de los mamíferos. En contraste, la secuencia genómica de *M. leprae* (Cole *et al.*, 2001), indica la pérdida masiva de genes en comparación de *M. tuberculosis* y muchos de los genes que expresan las adenil ciclasas en *M. leprae*, están ausentes, mientras que los presentes son pseudogenes. De la misma manera que el gen *Rv1120c* en *M. tuberculosis* y sus ortólogos en cepas relacionadas, tales como CDC1551 y *M. bovis*, en las que se predice que son pseudogenes, debido a que la eliminación de un sólo nucleótido, puede resultar en la formación de un producto truncado, que carece de muchos de los residuos críticos requeridos para la actividad de la adenilil ciclasas (Shenoy *et al.*, 2004). Tal como la actividad inhibidora de los sitios-P por parte de la adenilil ciclasa, producto de los genes ortólogos *Rv1120* en *M. tuberculosis* y *M. avium* *Rv1120c*, *Rv1119c* y *Rv1118c* y que es probable su presencia como un operón en *M. tuberculosis* (Shenoy *et al.*, 2005).

La trascendencia de las ciclasas en *M. tuberculosis* se debe a que las isoformas de tipo III, se estimulan por la presencia de Ca^{2+} /calmodulina. Cuya concentración en el interior de los macrófagos de las células en las que reside *M. tuberculosis* puede ser detectada. Lo que le permite transducir las señales que se dan en la interacción parásito-hospedero. Pues las señales provocadas por la disminución del Ca^{2+} , están correlacionadas con la inhibición de la fusión del fagosoma-lisosoma y el incremento de la supervivencia intracelular de *M. tuberculosis*. Mientras que la elevación del Ca^{2+}

se asocia con el incremento de la fusión de fagosoma-lisosoma y la reducción de la viabilidad del bacilo al interior del macrófago (Malik *et al.*, 2000).

Otro sistema regulador de la respuesta a los estímulos ambientales es el sistema de los dos componentes. En este sistema, interviene la histidina cinasa que es una proteína anclada a la membrana y actúa como un sensor característico consistente de un dominio para la dimerización contenida en la histidina y un dominio catalítico. En respuesta a los estímulos extracelulares y en pocos casos, a las condiciones intracelulares, la histidina cinasa autofosforila al residuo de histidina, usualmente en el dominio para la dimerización por transferencia del fósforo al dominio catalítico (ATPasa) del promotor adyacente. Estos actúan como un donador del fósforo para un residuo del ácido aspártico universalmente conservado como regulador de la respuesta que consiste de dos dominios, uno que es el dominio en la región terminal N (receptor), aceptor del fósforo y el otro dominio en la región terminal C, que es el efector del fósforo. En la mayoría de los casos, el efector es el que se acopla al y se encuentra implicado en la regulación de la transcripción de los genes necesarios para dar respuesta al estímulo ambiental (Nowak *et al.*, 2006).

La reactivación de *M. tuberculosis*, puede ser causada por una variedad de señales ambientales mediada por varios reguladores de la transcripción. Estos factores de transcripción son estimulados por señales citosólicas. Por lo que forman parte del proceso de comunicación que ocurre entre las bacterias y lo que ocurre en el ambiente. Las señales ambientales se perciben a través de los dos componentes del sistema señales de transducción, que se ubican rápidamente en las bacterias (Parkinson y Kofoed, 1992); de tal manera que la respuesta de los agentes infecciosos, deben ser capaces de sentir cuando están en posición de invadir. Esta

idea puede proveer valorables agentes terapéuticos adjuntos. Tales como el compuesto RWJ-49815 (un sustituto de la fenetilguanidina), que inhibe *in vitro* el sistema de las señales de transducción de los dos componentes, a través de la autofosforilación de la cinasa A (KinA::Spo0F) (Barrett *et al.*, 1998). Después de que las señales indicativas de los cambios medioambientales son sentidas y transducidas, la bacteria responde para sintetizar nuevas proteínas y regular otras. Esta regulación balanceada de la expresión de los genes en la bacteria, ocurre primariamente a niveles de la transcripción, mayormente a través de la actividad de las proteínas-puente llamadas represoras o activadoras. La operación coordinada de la maquinaria molecular implicada en la señalización bacteriana y la transcripción, es esencial para *M. tuberculosis*, para exitosamente adaptarse dentro del hospedero (Fontan *et al.*, 2004). Desde otro punto de vista, las respuestas de la transcripción de los macrófagos también discriminan entre diferentes patógenos y da respuesta a las señales producidas por *M. tuberculosis* (Nau *et al.*, 2002).

Ante la gran variedad de cambios que se presentan durante el estado fisiológico del aletargamiento y reactivación, el sistema de los dos componentes, también se encuentra implicado. Las bacterias patógenas usan este sistema, como regulador de la expresión de los factores de virulencia (Mekalanos, 1992). El genoma completo de *M. tuberculosis* revela la presencia de 11 pares del sistema regulador de los dos componentes, dos genes distintos que expresan la histidina cinasa y seis genes impares reguladores de la respuesta (Cole *et al.*, 1998). De estos, los cinco sistemas que se han caracterizado parcialmente son, MtrA/MtrB (Via *et al.*, 1996), TrcR/TrcS (Haydel *et al.*, 2002), SenX3/RegX3 (Parish *et al.*, 2003a), PhoP/PhoR (Perez *et al.*, 2001) y DevR/DevS o DosR/DosS (Rv3133c/Rv3132c) (Sherman *et al.*, 2001). Este último sistema se manifiesta como respuesta a la hipoxia y se requieren para la supervivencia (Boon y Dick, 2002, Park *et al.*, 2003a).

Para la supervivencia por largos periodos en el hospedero, *M. tuberculosis* regula coordinadamente un subconjunto de rutas metabólicas. Una de las cuales, puede ser la alteración de la membrana por la proteína alfa-cristalina o Acr (Yuan *et al.*, 1996), que además engruesa la pared celular (Cunningham y Spreadbury, 1998). Esta proteína es expresada por el gen *acr*, el cual se incrementa *in vitro* durante las

condiciones hipóxicas y la fase de crecimiento estacionaria (Yuan *et al.*, 1996), *in vivo* en el ratón (Shi *et al.*, 2003) y en los pulmones de humano (Timm *et al.*, 2003), lo que sugiere que este gen funciona para facilitar la supervivencia del bacilo bajo estrés. Ante la gran variedad de cambios que se presentan fisiológicamente, el sistema de los dos componentes también se encuentran implicado. Bajo esas condiciones, las señales de transducción que se manifiestan, son la proteína sensora histidina cinasa DevR–DevS (*DosR–DosS*), que se inducen en respuesta a la hipoxia y son requeridos para la supervivencia (Boon y Dick, 2002, Park *et al.*, 2003a). El gen *dosS* que es adyacente a *dosR* y el gen *dosT* (*Rv2027c*), codifican una cinasa sensora, cada uno de los cuales pueden autofosforilar a una histidina cinasa y después transferir el fosfato a un residuo de aspartato del regulador DosR (Roberts *et al.*, 2004). DosS y DosT son proteínas heme, que directamente perciben el O₂, NO y CO, para modular la expresión del regulón del aletargamiento de *M. tuberculosis* (Steyn *et al.*, 2002). Algunos trabajos sugieren la implicación de una heme contenida en la citocromo C oxidasa y/o la presencia de un regulador fumarato nitrato FNR (acrónimo en inglés: **F**umarate **N**itrate **R**eductase **R**egulator), tiene una función similar a un sensor (Ohno *et al.*, 2003; Boshoff *et al.*, 2004). Los genes mencionados [*devR-devS*, *Rv3134c* y *hspX* (*Rv2031c* o *acr*)], tienen un comportamiento similar ante la hipoxia, lo que sugiere que los mecanismos moleculares implicados en respuesta a la latencia, es probable que sean conservados en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* (Mayuri *et al.*, 2002).

Ante los estímulos de la hipoxia y el óxido nítrico, al parecer existen elementos en común entre los patrones de la expresión de los genes de *M. tuberculosis*. Algunos estudios revelan ciertas redes de la respiración de *M. tuberculosis* que presumiblemente conducen al decrecimiento de la producción de energía durante la adaptación *in vivo* (Voskuil *et al.*, 2003). En esta situación, es evidente que existe la regulación autógena de *M. tuberculosis*, que es llevada a cabo por el sistema de los dos componentes, formado por cuatro reguladores, RegX3, TrcR, PrrA y MprA, capaces de fijar sus respectivos promotores y autoregular su expresión (Ewann *et al.*, 2004; He y Zahrt, 2005).

El regulador RegX forma parte del sistema de los dos componentes con el sensor SenX3. La retención de estos componentes ha permanecido en los genomas de *M. leprae* y de *M. tuberculosis*, al pasar por una extensa reducción evolutiva. Ellos representan un complemento mínimo de los genes requeridos para que un micobacteria sobreviva en un ambiente intracelular. SenX3–RegX3, soportan su función como un sistema de supervivencia en ambientes hostiles. SenX3 es un sensor que contiene un dominio PAS (acrónimo en inglés: **PER-ARNT-SIM**) que en otras proteínas es conocida como una función de la molécula de la activación al sentir el oxígeno y el potencial redox (Rickman *et al.*, 2004). Los dominios PAS, son dominios de señalización que se encuentran ampliamente distribuidos en las proteínas de los miembros de las archaeas y bacterias, hongos, plantas, insectos y vertebrados; ellas funcionan como módulos para la activación ante varios estímulos. Mientras que la especificidad en el sentir surge, en parte, de los diferentes cofactores que pueden estar asociados con los plegamientos de PAS. Las proteínas PAS siempre se localizan intracelularmente pero pueden monitorear tanto el ambiente externo como el interno y en los procariontes, los dominios PAS se encuentran casi exclusivamente en los dominios de encendido de los sensores del sistema de las señales de transducción de los dos componentes (Taylor y Zhulin, 1999).

El sistema de los dos componentes *trcR* y *trcS*, son dos genes adyacentes uno al otro en el cromosoma de *M. tuberculosis*, con el regulador de la respuesta localizado corriente arriba del sensor. Los genes *trcR* y *trcS* se expresan después de la infección temprana de los macrófagos, pero no después de un periodo largo de la infección, lo que indica que este sistema de los dos componentes puede tener una función que permite al organismo adaptarse al ambiente intracelular. Además, una función posible en la adaptación intracelular de *M. tuberculosis*, los genes *trcR* y *trcS* también se pueden expresar cuando el bacilo tuberculoso se reproduce extracelularmente dentro de las cavidades en licuefacción después del rompimiento de la pared del granuloma. Aún más, la expresión de *trcR/trcS*, puede ocurrir al final de la etapa del aletargamiento o al inicio de la reactivación. De esta manera, el sistema regulador TrcR-TrcS puede actuar como un sistema regulador de transición

involucrado en la adaptación a un ambiente intracelular y la transición de la latencia a la reactivación (Haydel *et al.*, 2002).

Haydel *et al.* (2006), sugieren que el sistema TrcR/TrcS, no interviene en el crecimiento de *M. tuberculosis* en los macrófagos de humano para su supervivencia. Sin embargo, cuando se crece *M. tuberculosis* en medios de cultivo líquido, el regulador de la respuesta TrcR reprime el gen *Rv1057*, el cual se expresa durante el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*. De esta manera, restringir el gen *Rv1057* y otros genes por parte el regulón *trcRS*, para entrar a los macrófagos de humano, puede ser una faceta del control regulado por *trcRS*. Pues el gen *Rv1057*, se encuentra involucrado en el metabolismo de los ácidos grasos como sustrato (Schnappinger *et al.*, 2003) e interviene en el proceso de infección de las micobacterias. Pues los análisis de transcripción, revelan que *Rv1057* es reprimido por el regulador de la respuesta, pero se expresa durante el crecimiento de *M. tuberculosis* en los monocitos de sangre periférica de humano derivados de los macrófagos (Haydel y Clark-Curtiss, 2006).

Otro autoregulador de la respuesta que interviene en ciertas redes de la respiración de *M. tuberculosis* es el PrrA. Este pertenece a la familia de los OmpR/PhoB, son miembros de la familia de las proteínas aladas hélice-vuelta-hélice, que se une al ADN (Brennan, 1993). En *M. tuberculosis*, la estructura de los dos dominios del regulador de la respuesta PrrA muestra una estructura compacta con un interdominio interfase bien definido (Nowak *et al.*, 2006). Aunque no es la regla, muchos de los miembros de esta superfamilia, se demostró que son capaces de autoregularse (Lucas *et al.*, 2000). Con respecto a PrrA se une específicamente sus propios promotores, lo cual sugiere, de la misma manera que como varios de los reguladores de la respuesta pertenecientes a la familia OmpR, la expresión del gen *prpA* se autoregula. Se ha observado en el sistema PrrA–PrrB, se induce después de la fagocitosis de los macrófagos y se requiere transitoriamente durante las primeras etapas de la infección de los macrófagos (Ewann *et al.*, 2004). De esta manera, *M. tuberculosis* se adapta al ambiente intracelular en la etapa inicial. Lo cual le permite

usar los genes temporalmente requeridos para las diferentes etapas en el curso de la infección (Ewann *et al.*, 2002).

El gen *Rv3676* de *M. tuberculosis* se registra en la base de datos TubercuList (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>) como un probable regulador de la transcripción de la proteína CRP/FNR (acrónimo en inglés: **C**omplex **R**egulator **P**rotein receptor/**F**umarate **N**itrate **R**egulator). El análisis del transcriptoma *in vitro* revela significativos cambios en la transcripción de un mutante *Rv3676*, comparado con el no modificado, entre los que se incluye la expresión del gen *rpfA* (acrónimo en inglés: **r**esucitacion **p**romoting **f**actor), que codifica una de las cinco proteínas Rpfs (Mukamolova *et al.*, 2002a), las cuales pueden involucrarse en la regulación de la persistencia y la reavivación. Estas proteínas Rpfs, son reguladoras en concentraciones picomolares y son capaces de estimular el crecimiento que va más allá de la fase estacionaria de los cultivos de *M. bovis* BCG (Mukamolova *et al.*, 2002b). *M. tuberculosis* H37Rv, también contiene las proteínas CRP/FNR homólogas, codificadas por un marco abierto de lectura del gen *Rv3676* (Cole *et al.*, 1998). Éste se reporta como un factor de transcripción específico, que cuando se elimina, se conoce que causa un defecto del crecimiento en medios de cultivo de macrófagos derivados de médula ósea y en el modelo de tuberculosis en ratón (Rickman *et al.*, 2005). El arquetipo de CRP, es una estructura versátil que evolucionó para acomodar diferentes especificidades funcionales en la percepción de la señal, la fijación de ADN y la interacción con la enzima ARN polimerasa, lo que permite a diferentes miembros de la familia responder a un amplio rango de señales (Kolb *et al.*, 1983; Thompson y Landy, 1988; Schultz *et al.*, 1991).

Como parte del sistema de los dos componentes, en *M. tuberculosis*, el gen *whiB3*, funciona como un factor de transcripción que regula los genes que influyen en la respuesta inmune del hospedero (Steyn *et al.*, 2002). Por lo que la función de la familia de proteínas WhiB en *M. tuberculosis*, es percibir las señales del hospedero. Es decir, WhiB3 contiene un grupo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ que es responsable de una reacción redox, que ante la exposición de oxígeno genera una especie de $[3\text{Fe-4S}]^+$ y eventualmente se destruye; lo que sugiere que WhiB3, es un sensor del O_2 . Además

el NO, también es un ligando de WhiB3 y es esencial para el crecimiento óptimo en diversas fuentes de carbono, entre las que se incluyen los intermediarios del ácido tricarbóxico. Estas evidencias, muestran que WhiB3 de *M. tuberculosis*, es un factor transcripción redox, al sentir los cambios redox intracelulares a través de su grupo Fe-S, e integrar las señales ambientales, con el metabolismo intermediario esencial para la sobrevivencia. WhiB3 también tiene la capacidad para reaccionar con diversas señales redox que se encuentran ampliamente involucradas en los mecanismos de persistencia (Singh *et al.*, 2007).

1.2.9. Expresión genética durante la reactivación de las micobacterias.

Para dar respuesta al estado de infección latente, la persistencia y aletargamiento que toleran las micobacterias, se ha propuesto que aunque las actinobacterias no forman endosporas, varias de ellas pueden entrar en un estado en el cual reducen mucho su actividad metabólica a tal grado de perder su capacidad para cultivarse. Bajo condiciones *in vitro*, ellas requieren reavivarse en un medio líquido bajo en nutrientes, antes de reanudar la actividad de crecimiento en un medio de cultivo sólido con agar (Mukamolova *et al.*, 2006). Por el contrario, para lograr el estado aletargado, existen modelos como el desarrollado por Wayne; en el cual las células de *M. tuberculosis* se sujetan a una eliminación gradual de oxígeno. Esto resulta en la formación de anaerobiosis, resistencia a los medicamentos y un estado no reproductivo (Wayne y Hayes, 1996); en el que las bacterias detienen la síntesis de proteínas, pero se restaura inmediatamente después de la reintroducción del oxígeno (Lim *et al.*, 1999). Por otra parte, cuando las micobacterias entran en un estado aletargamiento y no es posible restaurar su reproducción, se ha determinado que existen factores que promueven la reactivación (Rpf). Esto se demuestra al utilizar cultivos conjugados de células viables de *Micrococcus luteus*, con células *M. smegmatis*, las cuales no eran susceptibles de cultivo, sin embargo, se produjo una significativa reactivación. Lo anterior, permitió entender que en las bacterias, existe una producción constante de moléculas biológicas activas que promueve la reactivación (Shleeva *et al.*, 2004).

Al hacer una homología de los estudios *in vitro* sobre la reactivación de *M. luteus*, el Rpf de *M. tuberculosis* se estima que es un regulador potencial para la reactivación cuando los bacilos permanecen aletargados en el hospedero. Al respecto, *M. tuberculosis* codifica una familia de cinco proteínas que son homólogos del Rpf de las bacterias que no esporulan como *M. luteus*, estas son proteínas ricas en glicina y cisteína (Tufariello *et al.*, 2004). El factor Rpf de *M. luteus*, es una proteína de secreción de 16 kDa, que ha demostrado restaurar el crecimiento activo de los cultivos de *M. luteus* que se encuentran en estado aletargados debido a la prolongada incubación en la fase estacionaria (Mukamolova *et al.*, 1998). El gen *rpf* de *M. luteus*, es homólogo de los que se encuentran en *M. tuberculosis*, Rv0867c (*rpfA*), Rv1009 (*rpfB*), Rv1884c (*rpfC*), Rv2389c (*rpfD*) y Rv2450c (*rpfE*) (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>), también se ha demostrado que se encuentran en *M. bovis* BCG. El producto de estos genes, estimulan el crecimiento a partir de la fase estacionaria de las micobacterias. Estos estudios sugieren que las proteínas Rpf pueden regular el crecimiento micobacteriano; aunque sus funciones *in vivo* de esta familia de proteínas están incompletamente definidas (Mukamolova *et al.*, 2002a).

Puesto que las bacterias en crecimiento, necesitan escindir los peptidoglicanos que conforman la pared celular. Las proteínas Rpf, actúan en las células que crecen y se dividen. Es decir, es necesario crear una apertura para la inserción de los nuevos monómeros peptidoglicanos y para separar las células hijas que se conectan al septo. Al menos dos mecanismos se han sugerido para el fenómeno de reactivación que sigue al aletargamiento (Ravagnani *et al.*, 2005), el primer mecanismo se refiere a que la proteína Rpf enzimáticamente liberadas, deben ser una molécula de la pared celular capaz de señalar los eventos corriente abajo, como aparece con la inducción de la β -lactamasa (Jacobs y Shapiro, 1999). El segundo mecanismo alternativo, se refiere a que la actividad enzimática de Rpf en la pared celular, puede ser suficiente para liberar la bacteria de una pared celular inerte y tenga un crecimiento moderado. Esto es debido a que la lisozima por sí misma como agente de escisión, no es capaz de estimular las bacterias aletargadas (Mukamolova *et al.*,

2006). Por lo que es probable que en algún momento se incorpore la actividad enzimática de Rpf requerida para la reactivación (Hett *et al.*, 2008).

En un intento de explicar la función de Rpf, se ha observado que su actividad, está relacionada con la lisis del ácido murámico. Desde que esta es una sustancia única que conforma la pared celular de las bacterias y sirve como un marcador de la presencia de los peptidoglicanos (Fox *et al.*, 1996; Barry *et al.*, 2007). Por lo que se considera que este puede ser disuelto por la acción de enzimas con actividad muralítica tales como, lisozima, hidrolasas, transglucosilasas líticas, entre otras. Este tipo de actividad se plantea para Rpf, que se ha observado en la reactivación de las células aletargadas y en la estimulación del crecimiento, cuando la incubación de las bacterias da lugar a una baja densidad, en un medio de cultivo con un mínimo contenido de nutrientes, o manejadas en una fase estacionaria prolongada (Mukamolova *et al.*, 2006). Además, se ha reportado que el dominio central de Rpf, comparte la similitud de su estructura con la lisozima y con las enzimas que degradan los peptidoglicanos denominadas transglucosilasas líticas, las cuales están involucradas en el metabolismo (reembolso) de la capa de peptidoglicanos de la pared celular de las bacterias (Cohen-Gonsaud *et al.*, 2004). La proteína Rpf recombinante purificada de *M. luteus* se demostró que posee una actividad muralítica sobre los sustratos que conforman los peptidoglicanos; mientras que los análisis de las mutaciones revelan alguna correlación entre la pérdida de la actividad muralítica y la pérdida de la actividad estimuladora del crecimiento (Mukamolova *et al.*, 2006).

La eliminación primaria del gen *rpfB* y varias de las combinaciones triples, producen cepas incapaces de crecer y dividirse en condiciones de estrés *in vitro* e *in vivo* (Downing *et al.*, 2005). Esto sugiere que ciertas proteínas potenciales de la división celular parecen tener funciones no esenciales en los procesos homeostáticos, pero pueden llegar a ser vitales en condiciones de estrés (Tufariello *et al.*, 2006). Tal como se ha demostrado para las hidrolasas RpfB y RpfE, que interactúan con la proteína RipA (acrónimo en inglés: **R**pf-interacting **p**rotein **A**), que es una peptidoglicano endopeptidasa (Hett *et al.*, 2007). Las proteínas Rpf constituyen una familia de enzimas transglucosilasas capaces de hidrolizar los puentes glucosídicos en los

momentos esenciales del estrés, formando la capa de mantenimiento de peptidoglicanos (Mukamolova *et al.*, 2006). Tanto RpfB como RipA se localizan en el septo de división de la bacteria (Hett *et al.*, 2007) y de esta manera es probable que tengan una función en las etapas posteriores a la división celular de las micobacterias, posiblemente durante la reanudación del crecimiento después del estado de estrés (Hett y Rubin, 2008).

Se conoce que las bacterias permanecen en un estado no cultivable desde hace muchos años (McCune *et al.*, 1966), por lo que se han propuesto modelos para el estudio de estas aproximaciones entre ellos se encuentran los modelos de Wayne y de Cornell. Al respecto, los análisis de los mutantes Δrpf que usan la reactivación adicional en los modelos de Cornell en ratón, pueden ilustrar los mecanismos por los cuales varios Rpfs de *M. tuberculosis*, interactúan con el hospedero en la infección de la tuberculosis (Downing *et al.*, 2005). El estudio del fenotipo de la cepa $\Delta Rv1009$ en los modelos de la latencia, incluyen la eliminación de CD4 y la neutralización de factor de necrosis tumoral o TNF, en el contexto de bajas dosis de infección con *M. tuberculosis* de ratones C57BL/6. La eliminación de CD4 como modelo, es especialmente atractivo debido a su relevancia en el entorno de la infección del virus de la inmunodeficiencia humana y también por la reactivación ocurre a pesar de continuar la expresión de IFN- γ y NOS2 (acrónimo en inglés: **Nitric Oxide Synthetase**) (Scanga *et al.*, 2000).

El modelo de Wayne y Hayes (1996) que funciona en la experimentación *in vitro*, las micobacterias quedan cultivables, mientras que en el modelo de Cornell *in vivo*, las bacterias permanecen no cultivables (Briggs *et al.*, 1986). Las evidencias que soportan esto, resultan de experimentos con un modelo de tuberculosis crónica en ratón, en el cual el conteo viable de *M. tuberculosis* de 10 meses post-infección, es del doble de la magnitud, cuando se mide en un medio líquido que permite la reactivación, que cuando se mide por conteo convencional en placas o UFC en un medio sólido sin el pasaje por un medio líquido (Dhillon *et al.*, 2004). En el modelo de Cornell, los genes *rpf* de las micobacterias, se expresan *in vivo* en los pulmones de ratón con infección aguda con *M. tuberculosis* virulento (Tufariello *et al.*, 2004). Esto

puede permitir determinar, si el fenotipo es específico para la inhibición de la producción del NO de los macrófagos por la aminoguanidina o reflejar un déficit de la post-reactivación más general (Tufariello *et al.*, 2006). El tratamiento de la neutralización de TNF conduce a un decremento en la expresión de NOS2 a nivel del ARNm del pulmón y además puede compartir los rasgos con el modelo de reactivación por aminoguanidina (Flynn *et al.*, 1998; Mohan *et al.*, 2001). La aminoguanidina se conoce por inhibir NOS, pero puede tener efectos adicionales fisiológicamente relevantes, tales como la alteración del metabolismo de la poliamida y la modificación de los ligandos receptores de rastreo de los macrófagos (Flynn *et al.*, 1998).

1.2.9.1 Atenuación de las cepas BCG y la región de diferencia 1.

La cepa *M. bovis*, perdió su virulencia después de 13 años y 230 pasajes y al derivado atenuado se le denominó bacilo de Calmette–Guérin o BCG. Esta cepa es la única vacuna de bacterias viables usadas para prevenir la tuberculosis y se ha distribuido por muchos países alrededor del mundo. La cepa original de BCG ha producido muchas cepas hijas, las cuales son progenitoras de las vacunas comúnmente usadas. Las principales cepas de BCG usada para la producción de vacunas son la cepa Danesa, Glaxo, Pasteur, Moreau, Tokio y Rusa. Estas cepas, se han propagado por separado como cultivos frescos preparados a través de pasajes seriales en diferentes países, por lo que las duplicación de estos sub cultivos de las cepas BCG, difieren marcadamente entre sí (Seki *et al.*, 2009). BCG, está estrechamente relacionado con *M. tuberculosis* y las comparaciones genómicas identificadas, son menos de 100 marcos de lectura abierta u ORFs (acrónimo en inglés: **O**pen **R**eadin**G** **F**rame) ausentes en las sub cepas de BCG, comparado con *M. tuberculosis* virulento. Estos genes tienen entre 14 a 16 regiones del cromosoma distintas en *M. tuberculosis*, las cuales se refieren a las regiones de diferencia 1-16 (Mahairas *et al.*, 1996; Behr *et al.*, 1999).

Las cepas de BCG que se cultivan y usan como vacunas BCG en diferentes partes del mundo, son alrededor de catorce. Estas surgieron de una cepa única. Pero los laboratorios han mantenido sus propias subcepas por pasaje y a pesar de que se recomienda que las

preparaciones de las vacunas no sufran más de 12 pasajes de cada lote diseminado, las cepas han variado. Esto ha dado margen a la pérdida de fragmento de ADN del cromosoma o deleción, origina una mutabilidad de las reordenaciones estructurales, que se refiere a la deleción que ocasiona un tipo especial de anomalía estructural cromosómica con la pérdida de fragmentos del ADN (Brosch *et al.* 2007). Estas diferencias genéticas se manifiestan en las cepas BCG Rusa, Moreau y Tokio consideradas como cepas del grupo I y consisten de las primeras cepas que comparten una genética similar que se relaciona con las características originales de la cepa Pasteur, donde se expresa la mayor conservación por tener menos inserciones y mutaciones en el genoma del bacilo. Entre las cepas primarias compartidas, BCG-Moreau, carece de la región de diferencia 16 del genoma, mientras que la BCG-Rusa carece de *Rv3698* y la BCG-Tokio carece de *Rv3405c* (Honda *et al.*, 2006).

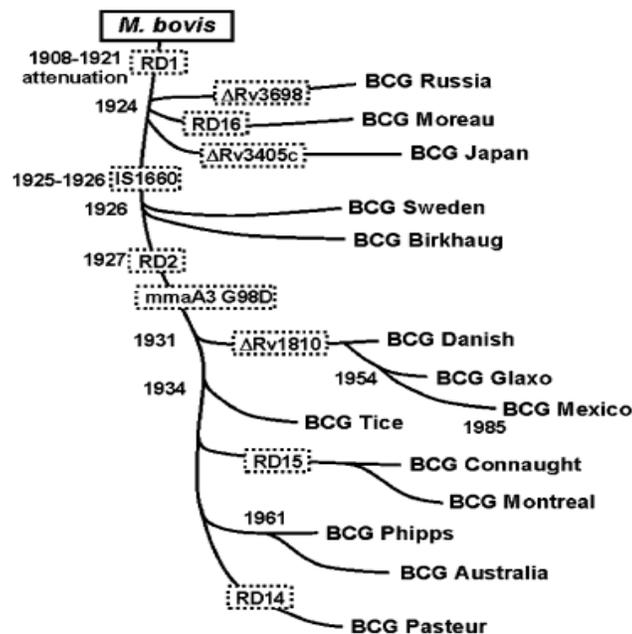


Figura 1. Genealogía de las subcepas BCG. En el esquema se despliegan *M. bovis*, la cepa de la vacuna BCG original y las series de alteraciones de las sub cepas BCG incluidas las deleciones de las RDs, los polimorfismos de un sólo nucleótido y las duplicaciones de las regiones genómicas. La figura se retomó de Hayashi *et al.* (2009), la cual es el producto de la revisión de Behr *et al.* (1999); Brosch *et al.* (2007) y Keller *et al.* (2008).

La región RD1 está presente en los aislados clínicos de *M. tuberculosis* y *M. bovis* y es el primer fragmento de *M. bovis* BCG que se perdió durante los procesos de atenuación entre 1908 y 1921 (Behr *et al.*, 1999). Los estudios realizados con las cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis*, indican que la región RD1 fue eliminada por mutación y a partir de ese momento exhibe una virulencia disminuida (Guinn *et al.*,

2004; Gao *et al.*, 2004). Esto se ha corroborado al reintroducirla a *M. bovis* BCG, lo que resulta en un incremento significativo en su capacidad infectante. La eliminación de RD1 en BCG, ha permitido distinguir la virulencia de *M. tuberculosis* con relación a los genes *cfp10*, *esat6* y *Rv3876*. Notablemente, *esat-6* y *cfp-10* codifican proteínas que se describen como antígenos, mientras que los genes vecinos se han caracterizado por codificar un aparato de secreción dedicado a la exportación (Mostowy *et al.*, 2004). En esta región se predicen que dos de los ORF, están comprometidos al operón *lhp-esx* (acrónimo en inglés: **I45 homologus protein-Ess extracellular**) que codifica dos antígenos para las células T inmunodominantes, estos son ESAT-6 y CFP-10 (Sorensen *et al.*, 1995; Berthet *et al.*, 1998). Además, la eliminación independiente de las regiones traslapadas, como RD5 y RD1, confirman los eventos genómicos que pueden usarse como marcadores filogenéticos (Mostowy *et al.*, 2002). Por ejemplo, la ausencia del gen *mtp40* (acrónimo en inglés: **M. tuberculosis protein40** o proteína Rv2351c por el gen que la codifica) que en BCG se ha propuesto como un marcador de *M. bovis* (Del Portillo *et al.*, 1991).

Un reconocimiento de las secuencias del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv reveló al menos 23 proteínas ESAT-6 homólogas (Pallen, 2002), 10 de los cuales se codifican dentro de cinco grupos de genes que especifican grandes ATPasas solubles y fijas a la membrana con dos dominios o similares a las de FtsK/SpoIIIE (FSDs) (Gey Van Pittius *et al.*, 2001). Pallen (2002) encontró proteínas ESAT-6 homólogas en la secuencia de los genomas de otras bacterias Gram positivas, entre las que se incluye a *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium acetobutylicum*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. En RD1, los genes de las proteínas ESAT-6 se agrupan con al menos un gen, que codifica una proteína tipo FSD. Entre los que se encuentran los genes (Rv3870, Rv3871) que permiten la secreción de ESAT-6 y CFP-10 en *M. tuberculosis* (Pym *et al.*, 2003; Stanley *et al.*, 2003). Se encontró

además, que se requiere una tercera proteína de membrana codificada por el gen *Rv3877*, para la secreción de ESAT-6 y CFP-10 (Hsu *et al.*, 2003).

Con la reintroducción de RD1 en BCG (BCG::RD1) se encontró que se modifica la morfología de las colonias; se incrementa la virulencia en los ratones inmunodeficientes, a los cuales se les monitoreó por la proliferación bacteriana; y finalmente, se incrementa la persistencia en los hospederos inmunocompetentes por la presencia de la bacteria en los organismos blanco (Hendrickson *et al.*, 2000). Por contraste, la eliminación de RD1 de *M. tuberculosis* resultan en: 1) una severa reducción en el crecimiento *in vivo* y disminución de su diseminación y 2) se incrementa la supervivencia de los ratones inmunocompetentes (Lewis *et al.*, 2003).

La secuencia genómica de BCG, ha permitido sugerir que las primeras vacunas de BCG, pueden ser superiores a las posteriores, esto es con base a la estabilidad de la duplicación de los genes en *tándem* (Brosch *et al.*, 2007), los cambios de los genes que codifican los factores sigma y los reguladores de la transcripción y la comparación de la respuesta inmune obtenida en los bebés (Lagranderie *et al.*, 1997). La cepa BCG Pasteur, sólo existe una duplicación en *tándem*, misma que no la tiene BCG Tokio. La duplicación en *tándem* difieren entre las dos sub cepas con respecto al número de copias y la longitud, esto es la duplicación de las *tándem* polimórficos que varían entre las subcepas de BCG (Brosch *et al.*, 2000).

1.2.9.2 Participación del operón de la región de diferencia 1 en la expresión del gen *esat-6*.

Los genes del operón de RD1 trabajan juntos para un singular determinante de la virulencia, por lo que se argumenta que RD1, codifica un sistema de secreción especializado que se requiere para la patogénesis de *M. tuberculosis* (Guinn *et al.*, 2004). RD1 está formada por 9 genes (en *M. tuberculosis Rv3871-Rv3879c*) los cuales funcionan como una unidad de cistrones que muestran una expresión coordinada y unos centros de control estrechamente asociados (Behr *et al.*, 1999). El análisis de los genes vecinos del operón *esat-6/cfp-10* (homólogos en *M. smegmatis Ms3874* y *Ms3875*), tienen una relación con la secreción de ESAT-6 y CFP-10, pues

los genes de *M. tuberculosis* conocidos como *Rv3870*, *Rv3871* y *Rv3877*, los cuales se encuentran al lado de los genes *esat-6* y *cfp-10*, codifican parte de un aparato de secreción que permite la exportación de ESAT-6 y CFP-10 (Mustafa *et al.*, 2002).

El análisis de la secuencia primaria de los genes de RD1, sitúan a *Rv3870* y *Rv3871*, en la subfamilia de SpoIIIE/FtsK de las AAA ATPasas (acrónimo en inglés: **ATPasas Associated with diverse cellular Activities**) (Gey Van Pittius *et al.*, 2001). Su actividad diversa está relacionada con la traducción de la energía química en fuerza (Vale, 2000), lo que hace posible que el producto de los genes *Rv3870* y *Rv3871* impelen las enzimas ESAT-6 y CFP-10 a través del canal codificado por el gen *Rv3877*. Esta actividad puede ser análoga a otras ATPasas, tales como FtsH (**F**ormation **t**ubulin **s**eptum) en *E. coli*, que interactúa con y transloca las proteínas sustrato que cruzan las membranas celulares (Stanley *et al.*, 2003). ESAT-6 y CFP-10 se pliegan y forman un dímero estable en el citosol antes de exportarse. El dominio de la terminal C de CFP-10 es reconocido por la proteína transmembrana *Rv3871*, esto conduce a ESAT-6 y CFP-10. El sustrato de fijación *Rv3871* interactúa con *Rv3870*, un componente de fijación a la membrana de ESX-1 (acrónimo en inglés: **E**jectosome **S**ecretion **B**ox), de esta manera se fija al dispositivo citosólico del sistema con los componentes de la membrana (Champion *et al.*, 2006).

A un lado de los genes en *tándem esx-6/cfp-10*, se localizan dos juegos de genes corriente arriba y corriente abajo (*rv3872* y *rv3873* abajo, *rv3876* y *rv3879* arriba) al parecer codifican el aparato de secreción dedicado a la exportación de CFP-10 y ESAT-6 (Pym *et al.*, 2003). El producto del gen *rv3872* es una proteína prolina-glutamato (PE)³⁵ y el del gen *Rv3873*, cuyo producto es una prolina-prolina-glutamato (PPE)⁶⁸, que conforman dos superfamilias de proteínas repetitivas con función desconocida (Cole *et al.*, 1998), aunque algunos miembros de la familia pueden tener una función en la patogénesis bacteriana (Camacho *et al.*, 1999). La familia de proteínas PE/PPE o PE-PGRS de *M. tuberculosis*, comprende alrededor del 5% de las codificadas por *M. tuberculosis*. Los genes de esta familia se distribuyen a través del genoma de *M. tuberculosis* y otras micobacterias cercanamente relacionadas (Ross *et al.*, 1992; Cole *et al.*, 1998; Tonjum *et al.*, 1998).

Esta familia de proteínas, se caracteriza por una terminal NH₂ de 110 aminoácidos relativamente conservada y se subdividen en las subfamilias PE y PPE o PGRS ya mencionadas. En las proteínas PE-PGRS, la terminal conservada NH₂ es seguida por una región de un dipéptido de glicina repetitivo irregularmente espaciado con 100 a 500 residuos. La mayoría terminan justas después de la región rica en glicina, mientras que unas pocas tienen una sola extensión más allá de la terminal de COOH (Ramakrishnan *et al.*, 2000).

Entre los demás genes que integran RD1, está el gen *rv3876* que se expresa en un producto final como una chaperona putativa y su inactivación, no impide la secreción de ESAT-6 y CFP-10 (Brodin *et al.*, 2004b), mientras que el gen *rv3877* expresa una proteína de membrana (Demangel *et al.*, 2004) que es una chaperona dependiente del ATP y del translocón, es esencial para la secreción de ESAT-6 y CFP-10. Como hecho relevante, se ha observado que la pérdida de ORFs *rv3878* y *rv3879c* en RD1, no son esenciales para la virulencia de *M. tuberculosis* (Pym *et al.*, 2003).

Entre la familia de proteínas ESAT-6, sólo los genes que codifican ESAT-6 (*Rv3875*) y CFP-10 (*Rv3874*) en *M. tuberculosis*, son conservados individualmente en *M. leprae* (ML0049 y ML0050, respectivamente), mientras que las proteínas de *M. leprae* codificadas por ML2531/ML2532 parece ser que se sustituyen por los pares *Rv0287/Rv0288* y *Rv3019c/Rv3020c* de *M. tuberculosis* y otros pares singulares de proteínas de *M. leprae* (ML1055/1181 y ML1056/1180), parecen sustituir cinco pares de proteínas de *M. tuberculosis* (*Rv1037c/Rv1038c*, *Rv1197/Rv1198*, *Rv1792/Rv1793*, *Rv2346c/Rv2347c* y *Rv3619c/Rv3620c*). Estas no aparentan ser homólogas de los genes pareados que representan la codificación de ESAT-6/CFP-10- relacionadas con los genes (*Rv3890c/Rv3891c* y *Rv3904c/Rv3905c*) y un par donde este es un equivalente de *M. leprae* (*Rv3444c/Rv3445c*) (Renshaw *et al.*, 2002).

1.2.10. Productos de los genes *esat-6* y sus homólogos.

La familia ESAT-6 son 23 miembros en la cepa *M. tuberculosis* H37Rv nombrados en orden alfabético como *esxA-W* (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). De los 23

genes que se expresan, 13 *loci* se encuentran dispersos a través del genoma, mientras que los 10 restantes se localizados entre los *loci* ESX-1 al ESX-5 (Gey Van Pittius *et al.*, 2001). La familia de proteínas ESAT-6, son proteínas pequeñas secretadas por las micobacterias, particularmente en la fase primaria de crecimiento. Las proteínas ESAT-6, regularmente se encuentran en el sobrenadante del medio de cultivo en forma de heterodímeros (Renshaw *et al.*, 2002). Esta familia de proteínas es el producto final de las expresiones de los genes *esx*, los cuales se localizan en extensos *locus*, agrupados para codificar proteínas relacionadas con el ATP, del cual depende el aparato secretor en las micobacterias y permite la exportación de miembros específicos de la familia de proteínas ESAT-6. Los genes *cfp-10* y *esat-6*, así como otros genes de RD1 forman parte de grupo llamado superfamilia ESAT-6, de la cual se encuentran múltiples copias en varios genomas micobacterianos y forma un nuevo aparato de secreción de proteínas específico de las micobacterias (Hsu *et al.*, 2003, Stanley *et al.*, 2003).

Las respuestas inmunes generadas durante una infección de tuberculosis a menudo son muy potentes, mientras que el antígeno de pequeña masa molecular ESAT-6, es el único antígeno que atrae la mayor atención del sistema inmune (Boesen *et al.*, 1995). Comparado con la gran cantidad de epítomos que contiene ESAT-6 (Mustafa *et al.*, 2000), la respuesta de los individuos infectados (Ravn *et al.*, 1999), a menudo se enfoca en un número muy limitado de epítomos para las células T (Aagaard *et al.*, 2009); por lo que las proteínas ESAT-6, se han identificado como potentes blancos de las respuestas de las células B y T. Además, las respuestas inmunes directas contra otras proteínas ESAT-6, se han identificado en ganado infectado con *M. bovis* (van Pinxteren *et al.*, 2000; Aagaard *et al.*, 2006), ratón (Andersen *et al.*, 1995) y cobayos (Elhay *et al.*, 1998; Aagaard *et al.*, 2006). Mientras los epítomos antigénicos en varias proteínas ESAT-6, también se han caracterizado en estudios realizados en humanos (Alderson *et al.*, 2000; Skjot *et al.*, 2002), tales como EsxH (Rv0288) de la RD3, se han identificado como antígenos potentes en los pacientes con tuberculosis y donadores vacunados con BCG (Alderson *et al.*, 2000). El comportamiento de la amplia familia ESAT-6, es diverso, pues los estudios con Rv3017c, o EsxQ y

Rv3019c o EsxR, a pesar de su elevado grado de identidad con Rv0288, despliegan un patrón único de epítomos (Majlessi *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Genes que expresan las proteínas ESAT-6. En *M. tuberculosis* y *M. bovis*, los genes frecuentemente más reconocidos (Renshaw *et al.*, 2005; Gey van Pittius *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2010).

<i>M. tuberculosis</i> Designación	<i>M. bovis</i> designación ^a	Tamaño (aminoácidos)	Detalles de los antígenos
Rv0287c	Mb0295	97	(<i>esxG</i>) (R3) (TB9.8) CFP-10
Rv0288c	Mb0296	95	(<i>esxH</i>) (R3) (TB10.4) ESAT-6
Rv1037c	Mb1066c	94	(<i>esxI</i>) (Mtb 9.9D)
Rv1038c	Mb1067c	98	(<i>esxJ</i>)
Rv1197	Mb1229	98	(<i>esxK</i>) (R3) (TB11.0)
Rv1198	Mb1230	94	(<i>esxL</i>) (R4) (Mtb9.9C)
Rv1792	Mb1820	98	(<i>esxM</i>) (R5) (Mtb9.9A) CFP-10
Rv1793	Mb1821	98	(<i>esxN</i>) (R5) (Mtb9.9B) ESAT-6
Rv2346c	Mb2375c	94	(<i>esxO</i>), (Mtb9.9E)
Rv2347c	eliminado en BCG	98	(<i>esxP</i>)
Rv3017c	Mb3042c	120	(<i>esxQ</i>), (TB12.9)
Rv3019c		95	(<i>esxR</i>), (TB10.3) CFP-10
Rv3020c	Mb3046c	97	(<i>esxS</i>) ESAT-6
Rv3444c	Mb3474c	100	(<i>esxT</i>) (Región 4)
Rv3445c	Mb3475c	125	(<i>esxU</i>) (Región 4)
Rv3619c	eliminado en BCG	94	(<i>esxV</i>) (Región 2),
Rv3620c	eliminado en BCG	99	(<i>esxW</i>) (Región 2)
Rv3874c	eliminado en BCG	100	(<i>esxB</i>) (Región 1)
Rv3875c	eliminado en BCG	96	(<i>esxA</i>) (Región 1)
Rv3890c	Mb3919c	95	(<i>esxC</i>) (Región 2) CFP-10
Rv3891c		103	(<i>esxD</i>) (Región 2) ESAT-6
Rv3905c	Mb3935c	103	(<i>esxF</i>)
Rv3904c	Mb3934c	103	(<i>esxE</i>)

^a Mb designación para *M. bovis* de acuerdo con la clasificación AF 2122/97. Las proteínas de la lista eliminadas se refieren a las proteínas codificadas por las regiones presentes en *M. tuberculosis*, más no en *M. bovis* y se incluyen como controles para investigar las respuestas inmunes cruzadas.

La familia de antígenos ESAT-6, son de pequeña masa molecular (Cuadro 1) y estas pueden ser expresadas por recombinación genética. Algunas de ellas se han expresado de acuerdo con su masa molecular como Mtb8.4 (Alderson *et al.*, 2000); TB12 (Skjot *et al.*, 2002); HSP-10 o CFP-10 o GroES (Berthet *et al.*, 1998); TB10.4 (Skjot *et al.*, 2000); TB9.9 (Alderson *et al.*, 2000); TB7.3 (Skjot *et al.*, 2000) y TB9.8, TB9.4, TB11.0, y TB11.2 (Rosenkrands *et al.*, 2000). Entre los genes que se describen, se encuentra una de las subfamilias del gen *esat-6* que codifican el antígeno de 9.9-kDa, se le ha denominado *Rv1793B*, el cual se acompaña de los ORFs de los genes vecinos *Rv1037c*, *Rv1198*, *Rv1793*, *Rv2346c* y *Rv3619c* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db>). Una segunda subfamilia del gen *esat-6*

es un antígeno que también tiene una masa de 9.9 kDa y se le ha denominado *Rv1792A*, esta se caracteriza por la secuencia de aminoácidos QILSS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db>) y consiste de los ORFs vecinos: *Rv1038c*, *Rv1197*, *Rv1792*, *Rv2347c* y *Rv3620c*. Estos genes *esat-6*, forman una identidad individual a nivel de la proteína de aproximadamente 98% (Skjot *et al.*, 2002).

Entre las proteínas ESAT-6 descritas, se encuentran TB10.3 y TB12.9, éstas son codificadas por los genes *Rv3019c* y *Rv3017c* respectivamente y son en general menos antigénicas que el antígeno TB10.4, un producto del gen *Rv0288*, pero contienen epítomos para las células T y varios de ellos son únicos para estas proteínas. Mientras que la homología del ORF en *Rv3019c* es idéntico en un 84% a TB10.4 (247 de 291 pb) y el otro ORF (*Rv3017c*) forma una identidad en su secuencia del 74% con respecto TB10.4 (156 de 206 pb en la terminal 5'). Estas moléculas juntas, constituyen la familia TB10.4, las cuales corresponden a las secuencias de TB10.4, TB10.3 y TB12.9 en *M. bovis*, en el que son 100% idénticas a las secuencias de H37Rv, excepto para la secuencia de TB12.9 de *M. bovis*, la cual sólo tiene una identidad del 88.4% (Skjot *et al.*, 2002). Además, existe un fuerte reconocimiento para TB10.4 por los pacientes vacunados con BCG, en los cuales no se obtiene una respuesta para ESAT-6 y CFP10 de la región RD1 y el hecho de que esto no esté correlacionado entre las respuestas de los antígenos individuales de los pacientes, confirma que los diferentes epítomos son reconocidos en estas diferente moléculas (Skjot *et al.*, 2000).

Los antígenos pueden tener sus diferenciaciones cuando se analizan sus epítomos de acuerdo con los péptidos que los conforman. Por lo que al llevar a cabo la reacción antígeno-anticuerpo, estos pueden manifestar diferentes tipos de respuestas; de esta manera el péptido Rv0140:79-87 que se encuentra compartido en las proteínas Rv0288 (TB10.4), se constituye por la secuencia de aminoácidos SYYSVTTDA y genera sólo una débil respuesta citotóxica de los linfocitos T, mientras que el epítomo GYAGTLQSL, de Rv3019c (TB10.3) (referido como TB10.3/4:20-28) y Rv3804c (Ag85A):144-152 como péptido control positivo, se obtienen respuestas citotóxica

con linfocitos T, capaces de lisar eficientemente el péptido control. TB10.3 y TB10.4 con una identidad de secuencias de 84.4% con TB12.9 (Rv3017c) (Skjot *et al.*, 2002), una de las subfamilias de ESAT-6. Mientras que TB12.9, no forma el epítipo GYAGTLQSL (Berthet *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 1998; Tekaiia *et al.*, 1999).

La recombinación de los homólogos en la generación de mutantes a través del intercambio de alelos, facilita el entendimiento de los mecanismos moleculares de la patogénesis y los procesos evolutivos. De esta manera, la evolución en paralelo de genes homólogos posibilita el reconocimiento de funciones comunes, ya sea gracias a los genes ortólogos (genes homólogos presentes en distintos organismos que codifican proteínas con la misma función y que han evolucionado mediante descendencia directa) o a los genes parálogos (genes homólogos presentes en un mismo organismo que codifican proteínas con funciones similares, pero no idénticas). En el genoma de *M. tuberculosis*, han evolucionado 10 genes que se formaron por la duplicación del gen *cfp-10*, como un resultado de numerosas duplicaciones del operón *esxA/esxB*. Al menos tres parálogos de CFP-10 (EsxG, EsxW, y EsxJ, K, o M) y cinco parálogos de ESAT-6 (EsxH, EsxL, EsxN, EsxO y EsxR) se han identificado en el sobrenadante del cultivo de *M. tuberculosis* (Skjot *et al.*, 2002). El alineamiento de la secuencia de los aminoácidos de estas proteínas revela que cinco parálogos de CFP-10 (EsxJ, EsxK, EsxP, EsxM y EsxW) con los aminoácidos BQILSS como terminal, los cuales son similares a BQALSS que se encuentran cerca de la terminal COOH de CFP-10, pero carecen de la terminal BMGF que se requiere para la secreción de CFP-10. Los aminoácidos BASTYTGF de las terminales de EsxG, sustituyen los residuos críticos L94 y M98 de CFP-10 con alanina y treonina, respectivamente (Champion *et al.*, 2006).

La familia de proteínas ESAT-6 contiene epítopos antigénicos principales o inmunodominantes y menores. Los principales epítopos inmunodominantes se localizan en regiones de diversidad en las secuencias, es decir, los residuos de aminoácidos clave pueden ser críticos para la antigenicidad, en ellos se incluyen: a) la treonina en una posición 58 para la subfamilia QILSS, b) la glicina y la serina en una posición 22 y 23 de la subfamilia Mtb9.9 y c) numerosos residuos potenciales

entre las posiciones 33 y 52 de la subfamilia Mtb9.9 (Jones *et al.*, 2010). El efecto de la composición y las posiciones 22 y 23 del aminoácido en la antigenicidad de las proteínas Mtb9.9 se ha demostrado por Andersen *et al.* (1995) en estudios realizados en humanos, en líneas de células T específicas para Rv1198 (mismas que tienen glicina y leucina en las posiciones 22 y 23, respectivamente) que son aberrantes para el reconocimiento de los péptidos de Rv1793 (con alanina y serina en las posiciones 22 y 23, respectivamente) o Rv3619c (con glicina y serina en las posiciones 22 y 23, respectivamente). Mientras que en el modelo generado para el ganado con la infección de *M. bovis* también se involucra la antigenicidad de *M. tuberculosis* que se planteó con humanos (Jones *et al.*, 2010).

La similitud de las secuencias entre especies, es un resultado que proviene directamente de la observación, mientras que la homología es una interpretación de que una alta similitud entre dos secuencias, se debe a las especies que se comparan, poseen un origen común. Tales secuencias o genes pueden ser ortólogos, cuando las secuencias homólogas se han separado por un evento de especiación. Los genes ortólogos pueden tener o no la misma función y pueden proveer información útil en taxonomía y en estudios filogenéticos. Estas premisas, se pueden apreciar en el operón conservado *esx* y varios de los genes circundantes que facilitan la secreción de ESAT-6 en las micobacterias, cuando se comparan con otras bacterias Gram positivas, entre las que se incluye *Bacillus subtilis* y *Corynebacterium diphtheriae* (Pallen, 2002). Sin embargo, sólo las micobacterias poseen el juego completo de genes conservados de *M. tuberculosis* que circundan al operón *esx*. Entre estas micobacterias se encuentra *M. smegmatis*, la cual vive en el suelo, distante relativamente de *M. tuberculosis*, que contiene 5 homólogos de los 11 *loci esx* en *M. tuberculosis*, entre los que se incluyen los *locus esxA/esxB* y todos los genes circundantes conocidos o genes que conforman el sistema de secreción único para las micobacterias. Estos se encuentran en las regiones 1, 3 y 4, los cuales en término de proteína muestra una similitud de 60 y 75% con respecto a *M. tuberculosis* H37Rv (Gey Van Pittius *et al.*, 2001).

Los estudios entre similitudes ortólogas entre las micobacterias no tuberculosas, tales como *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. marinum*, *M. szulgai*, *M. flavescens* *M. gastri* y *M. smegmatis*, contienen genes homólogos de ESAT-6 y CFP-10 (Pollock y Andersen, 1997; Arend *et al.*, 2005) y se ha demostrado en los estudios de Waters *et al.* (2006), la existencia de reactividad cruzada en respuesta a IFN- γ con las especies de proteínas ESAT-6 y CFP-10 en *M. bovis*, en el ganado experimentalmente infectado con *M. kansasii*. Estos genes homólogos de *M. kansasii* también se han descrito para otros antígenos de *M. tuberculosis*, tales como MPB83, TB10.4 y TB10.3 (Skjot *et al.*, 2002). Lo que concuerda con los datos de Cole *et al.* (1998) y Garnier *et al.* (2003), que definen las moléculas de CFP-10 y ESAT-6 de *M. bovis* y *M. tuberculosis* como idénticas. Además, se describe que en el antígeno ESAT-6 de ambas micobacterias se encuentran contenidos múltiples epítomos para las células B. En los estudios de Kanaujia *et al.* (2004) relacionados con estos antígenos en primates, los anticuerpos producidos para este antígeno, predominantemente reaccionan con las secuencias en la mitad de la proteína terminal COOH. Además, los anticuerpos contra los péptidos de la terminal COOH, llegan a ser detectables en la fase temprana de la infección más que los que se generan en contra de la mitad de la proteína terminal NH₂. Mientras que los estudios comparativos de los homólogos de *M. kansasii* con respecto a las secuencias de *M. bovis* en humanos, demuestran que también existe un elevado grado de identidad (>95%) a nivel de los aminoácidos (Arend *et al.*, 2005). Por ejemplo, los homólogos de ESAT-6 difieren sólo en dos posiciones (*M. kansasii* subtipos I a IV) o tres posiciones (*M. kansasii* subtipo V), mientras que los homólogos de CFP-10 difieren entre la proteína de *M. bovis* y los diferentes subtipos de *M. kansasii* para cinco de los siete subtipos. Los epítomos derivados de ESAT-6 y CFP-10 se reconocen confusamente para la clase II de las células T restringidas para los bacilos tuberculosos del ganado (Waters *et al.*, 2006) y además es posible valorar el impacto potencial del alto grado de la identidad de las secuencias entre los homólogos de *M. kansasii* y *M. bovis* en relación a estos epítomos inmunodominantes (Vordermeier *et al.*, 1999; Vordermeier *et al.*, 2001; Vordermeier *et al.*, 2003). Las secuencias de los aminoácidos de la mayoría de estas

regiones fenotípicas son completamente idénticas entre las proteínas homólogas (i.e., la terminación N de ambos epítomos ESAT-6 y CFP-10) (Vordermeier *et al.*, 2007).

Respecto a la proteína CFP-10 (producto del gen *Rv3874* o *esxB*), es considerada un antígeno confuso relacionado con el inmunodiagnóstico de tuberculosis en conjunción con su dímero ESAT-6. El antígeno CFP-10, también es llamado GroES, CPN10, HSP10 o antígeno 10 kDa (una chaperona deshidrogenasa/ β -barril), es una proteína de choque calórico en *M. tuberculosis*, GroES se conoce por producirse extracelularmente, de tal manera que puede recuperarse del medio de cultivo de las bacterias (Verbon *et al.*, 1990). GroES es una fracción de baja masa molecular y frecuentemente se reconoce y da una producción elevada de IFN- γ en pacientes con tuberculosis (Boesen *et al.*, 1995). La misma fracción es capaz de producir elevados niveles de IFN- γ de los linfocitos de la memoria inmune en modelos de ratones infectados con tuberculosis (Andersen *et al.*, 1995). GroES de las micobacterias, previamente se describió como un antígeno principal para las células T, que es reconocido acentuadamente por los pacientes con tuberculosis y animales infectados (Mehra *et al.*, 1992). Sin embargo, varios estudios han probado que GroES recombinante de *M. tuberculosis* sólo tiene respuestas limitadas para las células T, en ratones infectados o en pacientes con tuberculosis (Mehra *et al.*, 1992; Andersen *et al.*, 1995; Silveira *et al.*, 1997). Por otra parte, la inmunización intradérmica en ratones con GroES recombinado de *M. leprae*, emulsionado en adyuvante de Freund incompleto, ha demostrado proteger a los animales contra la multiplicación de *M. leprae* (Gelber *et al.*, 1994). Además, la inmunización con una recombinación de GroES de *H. pylori*, con la toxina de cólera, han demostrado proteger a los ratones en contra de la infección de *H. pylori* (Ferrero *et al.*, 1995).

La homología entre CFP-10 de *M. tuberculosis* y otras micobacterias, tales como *M. leprae*, es de un 40% de similitud. Similar a la que se da entre el antígeno ESAT-6, aunque generalmente se conoce que tiene una diferencia menor, entre los aminoácidos por lo que puede resultar en diferencias significativas en las respuestas de las células T. Mientras que la identificación y caracterización de los estímulos del antígeno CFP-10 para las células T de *M. leprae* (ML0050, homólogo de *Rv3874*),

muestran que este antígeno es potencialmente reconocido a nivel de las células T por los pacientes con lepra tuberculoide. Además, CPF-10 presenta reactividad cruzada a nivel de las células T con respecto a su homólogo de *M. tuberculosis*. De esta manera, el uso de los antígenos CFP-10, tienen un uso restringido como herramientas para el diagnóstico en la tuberculosis y la leprosis. Aunque CFP-10 se puede usar como un marcador sensible para las personas que han tenido contacto con *M. leprae* y/o *M. tuberculosis* (Geluk *et al.*, 2004). Pero los estudios de Arend *et al.* (2000) han demostrado la presencia homólogos de ESAT-6 y CFP-10 en otras especies de micobacterias; aunque al parecer no confunde la detección específica de las respuestas asociadas con *M. tuberculosis* (Gey Van Pittius *et al.*, 2001). De la misma manera que las diferencias antigénicas encontradas para el homólogo de CFP-10, entre la proteína de *M. bovis* y los cinco diferentes subtipos de siete residuos de CFP-10 de *M. kansasii* (Vordermeier *et al.*, 1999; Vordermeier *et al.*, 2007).

Rv3614c o *espA* (acrónimo en inglés: **ESX-1 secretion associated protein A**) se requiere para la secreción de ESAT-6 y CFP-10 (Sasseti y Rubin, 2003). El gen *espA*, codifica la proteína que se secreta por las cepas que contienen el *locus* ESX-1, pero no por las cepas a las cuales se les eliminó ESX-1. De este modo, la secreción de EspA, depende de la presencia de ESAT-6 y CFP-10, de la misma manera la secreción de EspA depende de ESAT-6 y CFP-10 en forma codependiente. Es decir, cada miembro del trío de proteínas se secreta y se requiere para la secreción de las demás. La importancia de esta asociación entre EspA y el sistema de secreción ESX-1, se da en el modelo murino, donde la eliminación de *espA* tanto de *M. tuberculosis* y H37Rv Δ RD1, resultan en una atenuación idéntica a la eliminación de RD1 (Fortune *et al.*, 2005).

El operón en que se encuentra el gen *espA* (*Rv3616c-Rv1614c*), incluye cierto grado de homología con algunos de los genes de *Rv3864-Rv3876*, mismos que son miembros de la familia CBXX/CFQX; las PE, PPE, ESAT-6 y CFP-10. El *locus* de *espA* o *Rv3616c*, comparte una homología significativa para los genes corriente arriba del *locus* ESX-1. La proteína EspA, comparte un 31.75% de identidad en un

traslape de 400 aminoácidos con Rv3864. Mientras que con la proteína Rv3867 comparte una identidad del 54.9% en 173 aminoácidos. La proteína Rv3615 comparte una identidad de 36.25% en 102 aminoácidos que se traslapan con Rv3865 (Fortune *et al.*, 2005).

El operón *Rv3616c-Rv1614c* es probable que emerja de la duplicación del gen que se origina del *locus* RD1, por su homología con *Rv3864*, *Rv3865* y *Rv3866* (Cole *et al.*, 1998). Además, en el *locus* *ESX-1*, hay 10 operones parálogos adicionales al operón *esxBA* como un resultado de numerosas duplicaciones en el genoma de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998). Muchas de estas proteínas CFP-10/ESAT-6 parálogas (proteínas Esx) se han identificado en el proteosoma secretado de *M. tuberculosis* pero no en los sustratos *ESX-1* (Champion *et al.*, 2006). Los genes que codifican cinco proteínas parálogas a CFP-10/ESAT-6 se incrustan dentro del loci *ESX-2–ESX-5* en sintonía con el *locus* *ESX-1* (Gey Van Pittius *et al.*, 2001). Los estudios adicionales en *M. smegmatis*, en los cuales se eliminan varios genes en la región homóloga de *M. tuberculosis* RD1, demuestran que el sistema de secreción es único para las micobacterias, en *M. smegmatis* requiere del gen *Rv3866*, *Rv3869*, *Rv3882c* y *Rv3883c* (Converse y Cox, 2005). Además, en *M. marinum*, la inserción de los transposones en otros genes de *locus* distintos a RD1 resulta en la pérdida del sistema de secreción en la micobacteria (Gao *et al.*, 2004).

1.2.11. Sistemas de secreción, sus mecanismos y productos.

En la secreción el problema fundamental a entender es, ¿cómo le hacen los organismos para que sus polipéptidos crucen la membrana celular? y ¿cuáles polipéptidos asisten en el plegamiento para la conformación tridimensional final de las proteínas secretadas? Al respecto, los procesos de descargas de las cadenas nacientes de los polipéptidos se reconocen en el retículo endoplásmico de los eucariontes, mientras que en los procariontes carentes de este organelo, los procesos operan de manera similares (Smith *et al.*, 1977). De esto, se deduce también opere alguna forma modificada de descarga dentro de los organelos semiautónomos de los eucariontes tales como las mitocondrias y los cloroplastos. En estos casos, las cadenas nacientes de los polipéptidos son unidos a los organelos de la membrana

por los ribosomas (Chua *et al.*, 1973; Kuriyama y Luck, 1973; Sevarino y Poyton, 1980), de la misma manera sucede con los ribosomas procarióticos (Smith *et al.*, 1977).

Una de las principales vías por la que la bacteria trastorna las defensas del hospedero, es por la secreción de proteínas virulentas. Ellas producen mecanismos que al transportarse, disponen de los factores de defensa del hospedero, a menudo marcando el impacto, el sitio y el tiempo indicado para su secreción. Este efecto, lo logran al producir sustratos que son directa o indirectamente tóxicos para las células del hospedero. Usualmente estas son exotoxinas que se secretan en forma de enzimas pueden destruir las células del hospedero a concentraciones bajas. Este es un paso que permite el éxito de la colonización, acompañada de la capacidad que le brindan las moléculas secretadas, para adherirse a la superficie de las células del hospedero. Los receptores de las células del hospedero que permiten la asociación patogénica de las adhesinas, probablemente reconozcan determinados tejidos de la superficie para que la adhesión y la colonización de la bacteria en sí, persistan (Ize y Palmer, 2006).

En los microbios patógenos se encuentra en un amplio rango de adhesinas. En algunos patógenos se reportan no menos de una docena de diferentes adhesinas expresadas al mismo tiempo o en distintos momentos o diferentes cepas de la misma especie. Afortunadamente, algunos rasgos en común de las moléculas de las adhesinas y su montaje son aparentes. Las adhesinas bacterianas pueden dividirse en dos grupos principales: pili (*fimbriae*) y adhesinas no pilosas (adhesinas sin fimbria). Uno de los principales rasgos entre los diversos pili es la conservación de la maquinaria molecular necesaria para la biogénesis de los pilus y el montaje en la superficie de la bacteria (Horwitz y Maxfield, 1984). Existen bacterias como *B. pertussis* que tienen factores potenciales de adherencia, que incluyen al menos cuatro genes para fimbria y varias adhesinas sin fimbria, estos incluyen la hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina, toxina pertussis, y la enzima BrkA (acrónimo en inglés: **B**reast tumor **K**inase). La adhesina FHA es una gran molécula (220 kDa) secretada que tiene varios dominios que son homólogos para esta u otras

moléculas de adherencia o para las secuencias eucarióticas que median la adhesión célula a célula (Finlay y Falkow, 1997). Las FHAs son necesarias para varias adhesinas sin fimbria; desde esta perspectiva, la adhesina FHA es homóloga a las dos adhesinas de elevado peso molecular, que conforman las adhesinas no pilosas de *Haemophilus influenzae*, las cuales están en otros patógenos que se adhieren a la superficie del sistema respiratorio. La adhesina FHA también contiene una secuencia tripeptídica compuesta por R-G-N, que es una característica del modo de reconocimiento eucariótica para fijarse a las integrinas de la superficie de la célula (Ishibashi *et al.*, 1994).

La fijación de las micobacterias se efectúa mediante las adhesinas sin fimbria, ellas poseen fibronectinas como las del complejo antigénico 85. Al menos dos de las fibronectinas como moléculas de fijación se han descrito en las especies de micobacterias. Una de estas se describe para *M. avium* y *M. intracellulare* (Rao *et al.*, 1993), como una proteína de 120 kDa reconocida por anticuerpos contra las integrinas $\alpha 3\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$ las cuales indican que estas bacterias se pueden expresar como integrinas que pueden mediar la matriz de adherencia. Estas proteínas de fibronectinas en *M. avium* también se han caracterizado y demuestran que están elevadamente conservadas en *M. leprae*, *M. tuberculosis* y otras micobacterias (Schorey *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1999).

1.2.11.1. Mecanismos relacionados con la exportación de proteínas

Se le conoce como exportación, a las trayectorias que recorren las proteínas entre las membranas y el pasaje de las proteínas hidrofílicas a través de las barreras de la membrana hidrofóbica. Los tipos de exportación de las bacterias Gram negativas (I al VI), se codifican en las llamadas islas de patogenicidad, las regiones de los genomas que se asocian con la virulencia. La secreción de la proteína en las bacterias Gram negativas es particularmente compleja, porque ellas las fijan a dos capas de lípidos, y sus proteínas deben pasar a través de ambas barreras hidrofóbicas para alcanzar las células del hospedero. Las bacterias Gram positivas son generalmente simples

en su estructura en cuanto a que ellas carecen de una segunda bicapa de lípidos (Ize y Palmer, 2006).

Las proteínas secretadas se caracterizan porque su destino final es el exterior de la célula; se elaboran por una ruta en la que no hay necesidad de penetrar en el entramado intermedio de las membranas. Además, todas las proteínas secretadas cruzan la bicapa completamente, mientras que las proteínas de membrana asumen diferentes topografías con respecto a su membrana. Aunque las células bacterianas no contienen organelos especializados para la exportación, ellas tienen distintos compartimientos y algunos de ellos les sirven para tal fin. En los procariotas, muchas proteínas se producen en el citosol y pasan por “la secreción intracelular”, en un organelo específico tal como el mitocondrión, donde ellas encuentran, de una manera u otra, un compartimiento soluble (matriz) o un organelo dentro de la membrana. En las bacterias, varias proteínas secretadas y de membrana, se producen en los polisomas que se apegan a las membranas, mientras que los polisomas no fijos, elaboran algunas proteínas citosólicas como el factor de elongación Tu y las proteínas de la membrana plasmática, de la misma manera que la proteína de cubierta del virus M13 (Randall y Hardy, 1977; Ito *et al.*, 1979).

Las bacterias Gram negativas exportan dos grupos de proteínas, las proteínas de la membrana externa, una estructura cuyo exterior contiene tanto la membrana citosólica, como la capa de peptidoglicanos y las proteínas solubles localizadas en el espacio periplásmico entre el citosol y la membrana externa. La clase de proteínas a): que se contienen en la membrana externa quedan asociadas con la membrana y pueden liberarse sólo por tratamientos que solubilicen la membrana y b) una clase de proteínas que son contenidas en el periplasma que incluye las proteínas que se fijan a la maltosa lo que hace que queden asociadas con la membrana. Ambas clases de proteínas se exportan por la célula, por lo que se plantea que probablemente esto ocurra *in vivo* en los polisomas que se fijan a la membrana (Randall y Hardy, 1977).

A diferencia de las proteínas de secreción, la característica estructural de las proteínas de membrana, es que tienen una superficie hidrofóbica que se ancla en la

bicapa. Esta superficie puede ser una larga secuencia de aminoácidos polares, una superficie apolar en una α -hélice, o porciones no continuas de cadenas de polipéptidos las cuales se conducen juntas por los patrones de plegamiento de la proteína. Además, las proteínas de la membrana también tienen una superficie polar, que es la que se expone al agua. Una vez que una proteína reacciona a su conformación final con respecto a la membrana, su rotación espontánea de adentro hacia fuera a través de la bicapa medular de hidrocarburos que es inusualmente baja (Wickner, 1980).

1.2.11.2. Modificación de las proteínas durante y después de la translación

Las proteínas también se pueden modificar tanto en la etapa de cotranslación, como en la postranslación. Este es un proceso químico en el que se adiciona un carbohidrato a otra molécula. Esta molécula se denomina aceptor. Éste es el primero de los cuatro pasos principales de modificación en la síntesis de las proteínas de las células. Para las funciones de glucosilación, se proponen y definen acciones que incluyen la alteración de la antigenicidad, actividades de control enzimático y resistencia a los procesos proteolíticos. Esta transformación de las proteínas, alteran su conformación y es un mediador de la adherencia. Un ejemplo de proteínas glucosiladas son las glicoproteínas de membrana, las de la capa superficial, entre las que se incluyen numerosas pilinas, flagelinas y proteínas de la fimbria, así como enzimas, toxinas, y adhesinas. Entre las funciones de las glicoproteínas en la capa superficial, está la de formar el entramado en las superficie de las células y pueden contener un total de carbohidratos que va del 2 al 20% (relación peso/peso). Este es típicamente un tipo de cadena de glicanos por polipéptido, pero estos pueden variar en longitud debido a los diferentes grados de polimerización de las unidades (20 a 50) que se repiten entre dos a seis monosacáridos. Estas cadenas de glicanos pueden tener una base de tres azúcares y se adhieren a dos de seis sitios por polipéptido, predominantemente ligados en el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos (O-glicoproteínas) (Bensing *et al.*, 2004).

Una amplia variedad de proteínas eucarióticas son modificadas postranslación, con la adición de residuos de carbohidratos en las O-ligaduras y N-ligaduras, pero la glucosilación es mucho menos frecuente entre las proteínas bacterianas, que se representan por tres grupos: el primer grupo de glicoproteínas se involucran en el mantenimiento de la estructura de la pared celular de algunas bacterias (S-capas de glicoproteínas) y se ha caracterizado en detalle particularmente entre las arqueobacterias y eubacterias, como evidencias de nuevos glicanos ligados a la tirosina, por sus O-ligaduras y N-ligaduras, las cuales se ensamblan en diferentes enrejados superficiales de la célula (Mescher y Strominger, 1976; Bock *et al.*, 1994). El segundo grupo de glicoproteínas de las bacterias incluyen un rango de enzimas secretadas, asociadas a la pared celular, a menudo con una función relacionada con la hidrólisis de los sustratos de carbohidratos (Gerwig *et al.*, 1989; Plummer *et al.*, 1995; Reinhold *et al.*, 1995). Las proteínas involucradas en las interacciones con los componentes de las células del hospedero, representan un tercer grupo de glicoproteínas, entre las que se incluyen las proteínas pili de la familia *Neisseriae* patógenas (Kirchner *et al.*, 2005; Kirchner y Meyer, 2005) y *Pseudomonas aeruginosa* (Castric, 1995) y la agregación de las plaquetas por la asociación de las proteínas de *Streptococcus sanguis* (Erickson y Herzberg, 1993).

Tanto la acilación, como la O-glicosilación, indispensables en los procesos de mantenimiento de la pared celular, requieren de explicaciones anticipadas, para entender su funcionamiento. Por lo que se ha planteado la hipótesis general de las secuencias señal. Esta se basa en los datos obtenidos de las investigaciones en la secreción de los eucariotas, que postulan que un aparato de complejo de proteínas, es responsable del pasaje de los polipéptidos a través de la membrana rugosa del retículo endoplásmico (Blobel y Dobberstein, 1975a, Blobel y Dobberstein, 1975b). Esta hipótesis propone que tan pronto emerge del ribosoma la secuencia señal, interactúa con las partículas de reconocimiento de la señal que existen libres en el citosol (Figura 2) (Walter y Blobel, 1981a; Walter y Blobel, 1981b; Walter *et al.*, 1981). La fijación de esta partícula bloquea la elongación adicional, hasta que entra el complejo a interactuar con una proteína de acoplamiento asociada a la membrana;

lo que resulta en la liberación del bloque de proteínas sintetizadas. La cadena nascente de polipéptidos es constitutivamente extrudida de acuerdo a su elongación, a través de un canal de proteínas en la membrana. En el lumen de dicho canal, se localiza una enzima al lado de la membrana que remueve la señal proteolíticamente (Walter *et al.*, 1981) (Fig. 2).

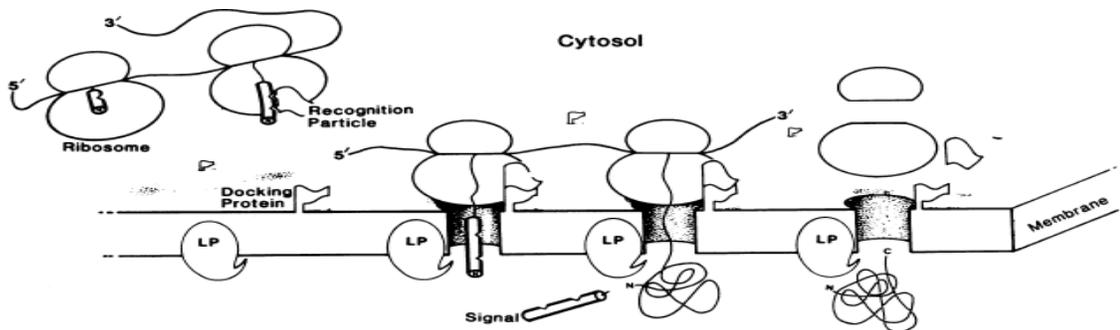


Figura 2. Hipótesis de la señal: La secreción de una proteína a través de la membrana del retículo endoplásmico rugoso. LP, peptidasa conductora. La proteína acopladora (Docking protein) y la peptidasa conductora se representan como proteínas asociadas a la membrana (LP) y la secuencia señal (signal) que se desprende al translocar la proteína (Blobel y Dobberstein, 1975b).

Comúnmente, pero no siempre, la secuencia señal, se localizan en el extremo de la terminal N del sustrato, y a menudo se cortan durante el transporte por peptidasas específicas (Sargent *et al.*, 2006). La secuencia señal, son los aminoácidos al final de la terminal amino de una proteína secretora, que guía a la proteína hacia la membrana del retículo endoplásmico, las mitocondrias, los cloroplastos y las envolturas de las bacterias y que por lo general es eliminada enzimáticamente. Aunque las proteínas del retículo endoplásmico y de las bacterias comparten las mismas secuencias señal, los primeros estudios sugieren que sus mecanismos de translocación son muy diferentes. La translocación en las bacterias requiere de ATP y el potencial electroquímico de la membrana, mientras que el retículo endoplásmico sólo necesita de los nucleótidos. Las secuencias señal de cada organelo, comparten los modos de la polaridad y la estructura pero no la conservación de la secuencia. Por ejemplo, las bacterias o el retículo endoplásmico exportan las señales básicas para la región terminal-N, seguida por una extensión de ocho a catorce residuos apolares y un motivo hendidura corto, que es reconocido por una peptidasa (Wickner y Schekman, 2005).

Las proteínas se clasifican por su translocación a través de las membranas celulares durante el reconocimiento de las secuencias señal (Wickner y Schekman, 2005). Estas proteínas precursoras son el camino que conduce a la translocasa, o canal a

través de cual las proteínas se translocan para viajar el cruce de la membrana. Este camino se marca por el péptido señal del extremo de la terminal N, que se registra por la partícula de reconocimiento de la señal (SRP, por su acrónimo en inglés: **S**ignal **R**ecognition **P**article), lo que da como resultado el destino de la proteína a una vía de secreción. En la célula eucariota, estas proteínas son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso. En las células procariotas, las proteínas son exportadas a través de la membrana plasmática. En los cloroplastos, el péptido señal destina las proteínas a los tilacoides. Las secuencias señal, están comprendidas de una estructura dominio tripartita: una terminal amino cargada, un centro hidrofóbico y una región polar que contiene un sitio polar hendido de una peptidasa señal (Pugsley, 1993).

Durante la translocación, la secuencia señal se separa del péptido señal mediante una peptidasa, para generar la exportación de la proteína madura. Los ejemplos de las proteínas secretadas estudiadas en las secuencias señal se localizan en la terminal NH₂ y se entrecorta durante o después de la translocación (Muller y Blobel, 1984) (Figura 3). En las bacterias Gram negativas, las secuencias señal son aproximadamente de 20 aminoácidos de longitud, mientras que en las bacterias Gram positivas puede ser de más de 60 aminoácidos (Wiker *et al.*, 2000).

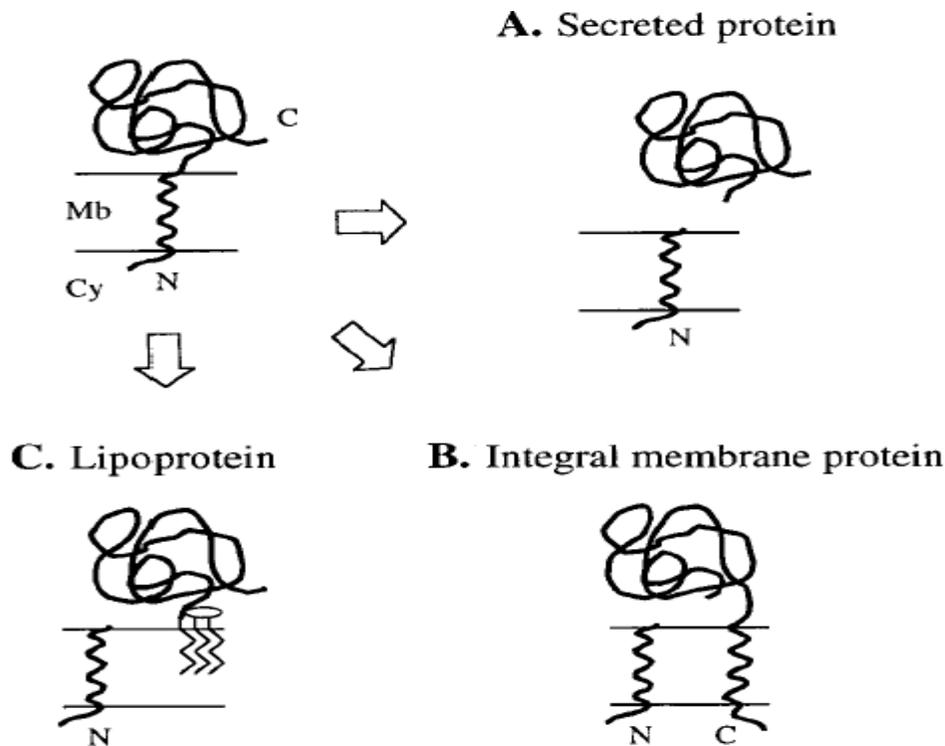


Figura 3. Destino de las proteínas que tienen péptido señal en la terminal-NH₂. El péptido señal de la terminal-NH₂ se transloca directamente de una proteína que cruza la membrana celular (parte derecha del cartel). El procesamiento de las proteínas por la peptidasa señal tipo I libera la proteína madura (A), por lo que no provee dominios adicionales a la transmembrana (B), la translocación de lipoproteínas a través de la membrana se sigue por la modificación con el glicerol y los ácidos grasos de la prolipoproteína y por un peptidasa señal tipo II. El extremo de los lípidos de la lipoproteína se ancla a la membrana (C). Las abreviaciones indicativas son: Mb, membrana celular; Cy, citosol; N, terminan NH₂; C, terminal COOH (Gomez y Bishai, 2000).

La acilación y la O-glicosilación, son necesarias para que la proteína permanezca dentro de la célula bacteriana. Las lipoproteínas se caracterizan por una terminal acilada, proceso por el cual se media la consecuente actividad de la prolipoproteína diacilglicerol transferasa (Lgt) y la lipoproteína señal peptidasa (LspA). Estas proteínas intervienen en el mantenimiento de la estructura de la pared celular de *M. tuberculosis*, por lo que la eliminación del gen que codifica LpsA, reduce la virulencia de *M. tuberculosis* (Wilkinson *et al.*, 2009). Al igual que la glucolipoproteína lqpH/Rv3763 de 19 kDa, que se expresa asociada abundantemente a la pared celular y en las secreciones. Esta proteína, tiene seis residuos secuencia consenso, muy conservados para su lapidación adyacente al péptido señal, con su consecuente

hidrofobicidad. El precursor experimenta la acilación de la postranslación y la subsecuente escisión al péptido-senal, antes de la secreción al cruzar la membrana celular (Herrmann *et al.*, 1996). Además, la lipoproteína codificada por el gen *Rv3763*, se ha estudiado por sus efectos pleiotrópicos en la respuesta inmune innata, en la que se incluye la inducción de los genes de las citocinas, muerte de las bacterias, inducción de la apoptosis, disminución del IFN- γ e inducción de la expresión del MHC Clase II (Brightbill *et al.*, 1999; Noss *et al.*, 2001; Pai *et al.*, 2003; Fortune *et al.*, 2004).

La glucosilación en *M. tuberculosis* se efectúa en el proceso de exportación de las proteínas que se posicionan en la superficie de la célula bacteriana. Además, la misma glucosilación de las proteínas secretadas por el bacilo les permite posicionarse idealmente para interactuar con los componentes de las células del hospedero, que además incluye los factores de virulencia que promueven la supervivencia intracelular (McDonough *et al.*, 2005). Para este proceso, *M. tuberculosis* modifica las proteínas de exportación con una variedad de residuos glucosil que influyen en varios eventos biológicos. Las dos glicoproteínas de *M. tuberculosis* que están bien caracterizadas son la Apa/Rv1860 y MPB83/Mb2898. Estas poseen residuos de treonina lineal con la oligomanosa $\alpha(1\rightarrow2)$ y $\alpha(1\rightarrow3)$, un patrón de glucosilación que recuerda las cadenas cortas de manoproteínas de los eucariotas (Dobos *et al.*, 1996; Michell *et al.*, 2003). Como en otras bacterias patógenas, la glucosilación de las proteínas en las micobacterias influye en las interacciones con el hospedero; por ejemplo, los antígenos específicos para el reconocimiento por las células T, del complejo antigénico de 45/47 kDa (Apa), requieren de la manosilación (Romain *et al.*, 1999).

Las proteínas de la membrana son requeridas para las actividades esenciales de la célula tales como la adhesión, digestión, transporte, detección de quórum, transmisión de las señales de transducción, crecimiento y cambios morfológicos tales como la formación de las esporas en las bacterias, etc. El rasgo de la estructura primaria de la proteína de la membrana exterior, es la modificación de los grupos grasos acil en la terminal N, los cuales se derivan de los fosfolípidos de las bacterias,

para proveer un ajustado anclaje a la superficie de la membrana. A partir de aquí, el resto de las proteínas desarrollan funciones bioquímicas relevantes en la interfase acuosa de la membrana. Las modificaciones que les permiten el anclaje, se efectúa a través de la ruta biosintética que contiene tres enzimas: la primera enzima en la ruta es para sujetar el grupo diacilgliceril del fosfatidilglicerol al tiol de la cisteína, el primer aminoácido después del péptido señal; la segunda enzima corta el péptido señal después de la modificación inicial del lípido; y la tercer enzima, acila el grupo amino de la terminal N, con un ácido graso disponible de los fosfolípidos (Innis *et al.*, 1984; Sankaran y Wu, 1994; Gan *et al.*, 1995) (Figura 4).

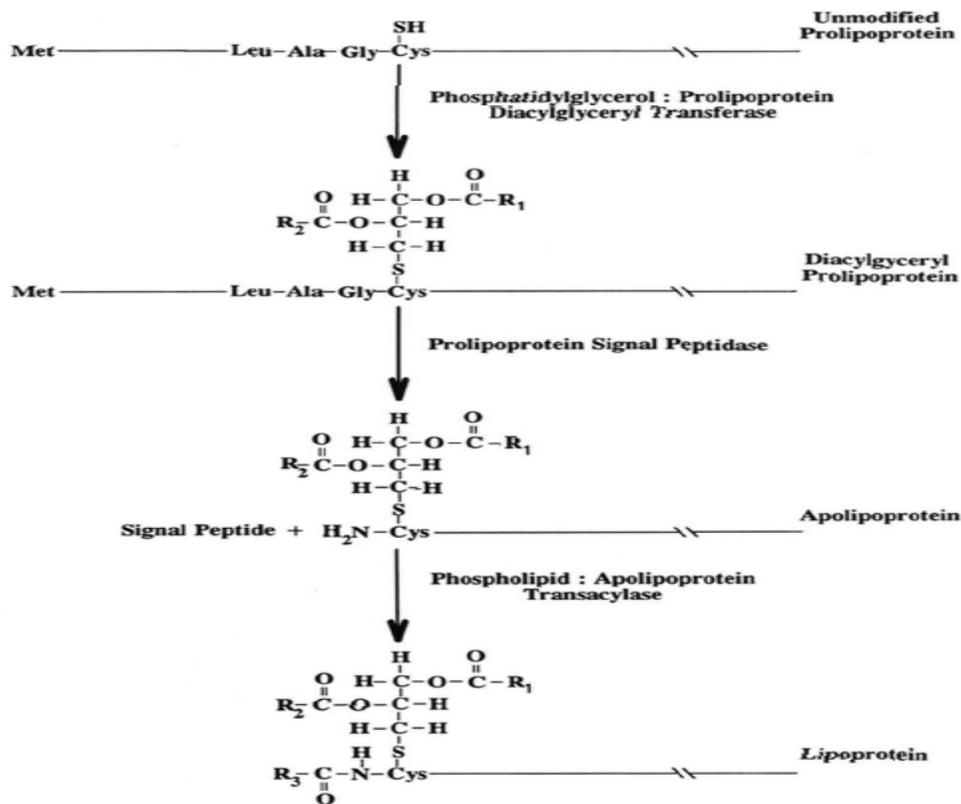


Figura 4. Ruta propuesta para la maduración de las lipoproteínas (Tokunaga *et al.*, 1982).

La ruta común para la biosíntesis de las lipoproteínas se propuso en 1982 por Tokunaga *et al.* (1982) (Figura 4). El primer paso en la ruta para la biosíntesis de las lipoproteínas es la transferencia de las mitades no aciladas del gliceril del fosfatidilglicerol a los grupos sulfidriolo de los residuos de cisteína de la terminal N, en las prolipoproteínas antes de su modificación por la prolipoproteína fosfatidilglicerol gliceril transferasa (gliceril transferasa, de manera resumida) (Chattopadhyay y Wu,

1977). El segundo paso es la acción de una o más, O-aciltransferasas que acilan los hidroxilos sn-3 y sn-2 de las mitades del gliceril de la glicerilcisteína para formar la prolipoproteína diacilgliceril modificada (Chattopadhyay *et al.*, 1979). Las modificaciones de diacilgliceril son un prerrequisito para la escisión del péptido señal por una lipoproteína específica peptidasa señal llamada señal peptidasa II (Tokunaga y Wu 1984; Dev y Ray, 1984). La amino-terminal (N-terminal) del producto, apolipoproteína, es adicional a la transferasa N-acilada por la enzima N-acil-transferasa, la cual no tiene especificidad con respecto a los fosfolípidos como donadores acil (Hussain *et al.*, 1982; Gupta *et al.*, 1991).

1.2.11.3. Translocación

A los procesos que controlan la exportación a nivel de la traducción se le conoce como translocación. Esto también comprende el control de la expresión de un gen, con base en la regulación de la tasa de traducción del ARNm; que al asociarse con los ribosomas realiza la traducción simultánea de una misma proteína. Es decir, cada uno de los ribosomas localizados en cadena (polisomas), sintetizan un punto diferente de la proteína. Debido a que la traducción se ejecuta por varios ribosomas al mismo tiempo y estos tienen un gran tamaño, sólo se puede acoplar ARNm a una distancia de 35 nucleótidos unos de otros. Los polipéptidos translocados de esta manera, en algunas bacterias Gram negativas como *E. coli*, se localizan en el espacio periplásmico que se encuentra entre el citosol y las membranas. La translocación de las proteínas en el espacio periplásmico es análogo al paso inicial de la secreción que se da en los organismos superiores; a saber, la transferencia de las proteínas secretadas a través de la membrana en el lumen de la rugosidad del retículo endoplásmico (Randall y Hardy, 1984).

Los sistemas mediante los cuales las proteínas cruzan las membranas biológicas, varían significativamente en términos del mecanismo, pero emerge un tema común en la mayoría de los casos. Este se refiere a que las proteínas sustrato, son usualmente translocadas en un estado mayormente desplegado. Aunque existe la alternativa de la translocación de proteínas globulares (plegadas) que cruzan las

membranas biológicas y que se favorece por una variedad de sistemas de multicomponentes sofisticados, que se caracterizan sólo por algunos detalles. Mientras que las proteínas translocadas en su estado no plegado, se efectúa en el transporte que sirve para cruzar el retículo endoplásmico, en la importación de proteínas que cruzan las membranas externas e internas de las mitocondrias y en la exportación de las proteínas que cruzan la membrana plasmática de las bacterias por la maquinaria Sec (Muller y Zimmermann, 1988; Schatz y Dobberstein, 1996).

Para el proceso de translocación, la transmembrana contiene los translocones, que son poros acuosos que alternan la membrana y se ocupan de la secreción nascente de las proteínas o la ubicación de las proteínas de la membrana. Estos se encargan de acomodar los diversos substratos secretados y de la transmembrana. Johnson (2005), muestra que el engranaje de los translocones contiene un canal acuoso relativamente grande (40–60 Å), que se abre sobre la inserción de la secuencia señal y queda abierto durante la translocación de los dominios de la proteína secretada. En el caso de un sólo giro de las proteínas de la membrana, la ruta de translocación se cierra en su lumen al final, por la acción de una proteína Hsp70 (acrónimo en inglés: **Heat shock proteins**) relacionada con canal del translocón, responsable de cerrar el poro, antes de que el ribosoma se fije por un corto tiempo, después de que el ribosoma sea blanco del translocón (Alder *et al.*, 2005). Las chaperonas Hsp70, unen y estabilizan las proteínas desplegadas o parcialmente plegadas, para evitar de esta manera que se agrupen y que sean degradadas. Esta familia de chaperonas, se integran al citosol y la matriz de las mitocondrias de las células eucariotas, en el citosol de las bacterias a las que se les conoce como DnaK y en el retículo endoplasmático a las cuales se les conoce como BiP. Estas últimas, se abre al citosol después de la síntesis y compacta el segmento hidrofóbico de la transmembrana en los ribosomas afuera del túnel (Hamman *et al.*, 1998; Alder *et al.*, 2005).

Las proteínas de membrana tienen una biogénesis compleja. Especialmente porque los mecanismos involucrados, son adicionales a los que se utilizan para mantener la barrera de permeabilidad de la membrana. Los polipéptidos destinados a convertirse

en proteínas de la membrana, en la mayoría de los casos, se integran cotranslacionalmente en la bicapa de los lípidos, i.e. al mismo tiempo que ellas inician su síntesis por los ribosomas. Durante los procesos de integración de las proteínas de la membrana, la maquinaria de biosíntesis media la integración de las secuencias de la transmembrana en la médula no polar de la bicapa y entrega al citosol acuoso y a los dominios del lumen del canal en los compartimientos adecuados (Alder *et al.*, 2005). A la vez que las proteínas se integran a la membrana, la cadena nascente de proteína puede experimentar la modificación covalente (por ejemplo la escisión de las secuencias señal, la formación de los puentes de disulfuro y la glicosilación de la terminal N), el plegamiento y las interacciones con otras proteínas (por ejemplo las chaperonas), que finalmente conducen al ensamblaje del polipéptido en un complejo funcional monomérico o multimérico (Schnell y Hebert, 2003).

El cruce de las proteínas por la ajustada membrana, es acogida mayormente por la compleja maquinaria de secreción de los translocones. Los translocones reconocen sus substratos vía las secuencias señal, las cuales se requieren por el propio blanco para el translocón. Como un ejemplo de este proceso, en las células eucariotas la inserción de las proteínas α -hélices en la membrana del retículo endoplásmico es mediada por el translocón Sec61, un canal de proteína hetero- oligómero (Snapp *et al.*, 2004). Las α -hélices transmembrana, al parecer siguen una ruta de inserción ordenada, en la cual ellas pasan por el túnel las largas subunidades producidas por los ribosomas en el canal del translocón Sec61 y después salen del canal lateralmente en el lípido circundante de la membrana (Alder y Johnson, 2004).

Con respecto a los procariotas como *Streptomyces pyogenes*, que contiene solo la ruta Sec para la translocación de las proteínas; los polipéptidos nascentes son exportados en un estado no plegado y posteriormente, deben interactuar con los factores accesorios exteriores a la membrana celular para su plegamiento. En este proceso, el periplasma de las bacterias Gram positivas, funciona para coordinar la interacción de la cadena nascente de polipéptidos con los factores accesorios. La última fase del proceso de la exportación que culmina con la secreción en *S.*

pyogenes, se efectúa exclusivamente a través del sistema ExPortal, que es un sólo micro dominio de la membrana celular especializado que contiene los translocones Sec. Cada célula bacteriana de *S. pyogenes*, tiene un sólo ExPortal y este micro dominio se posiciona en un hemisferio distal para ambos polos de la célula (Rosch y Caparon, 2004).

Las bacterias Gram negativas se distinguen de los otros procariontes por una membrana externa que circunda sus capas de peptidoglicanos. La integración y ensamblaje de las proteínas en la membrana externa es esencial para el mantenimiento de la permeabilidad. El ensamblaje de la proteína en la membrana externa puede ser partido en una serie de eventos: fijación, inserción y formación de estructuras terciarias. La fijación de las proteínas sustrato en el periplasma se forma por un complejo, con una o más de las chaperonas que se encuentran en la membrana. Tal es el caso de las proteínas OmpA u Omp85 (acrónimo en inglés: **O**uter **m**embrane **p**roteins) y otras chaperonas periplásmicas como Skp (acrónimo en inglés: **S**-phase **k**inase-associated **p**rotein) y SurA (una isomerasa periplásmica peptidil prolil) que fijan los sustratos y posteriormente los presentan a la membrana externa (Mogensen y Otzen, 2005). Skp y SurA, reconocen la translocación inmediata de las formas de las proteínas β -barril. La proteína Skp, también lleva los lipopolisacáridos de su sitio de síntesis en la membrana citosólica; dado que los lipopolisacáridos fijan promotores separados de Skp de la membrana (De Cock *et al.*, 1999). Los lipopolisacáridos también están involucrados en las uniones de Skp con los compartimientos de la proteína Omp85, para que esta se inserte en la membrana externa (Bulieris *et al.*, 2003). Un sitio de fijación de los lipopolisacáridos parece estar en la estructura cristal de Skp, lo que debe permitir que una proteína sustrato se transporte junto con los lipopolisacáridos (Walton y Sousa, 2004). La maquinaria SecYEG es probable que inserte las proteínas en la membrana citosólica, y las proteínas sustrato β -barril pueden entrar en Omp85, posteriormente se liberan lateralmente en la fase de los lípidos de la membrana (Figura 5). Sin embargo, se estima que las dimensiones del poro para Omp85 es de $22 \times 15 \text{ \AA}$ en la zona holgada final y de $11 \times 7 \text{ \AA}$ en la zona de constricción (Voulhoux *et al.*, 2003).

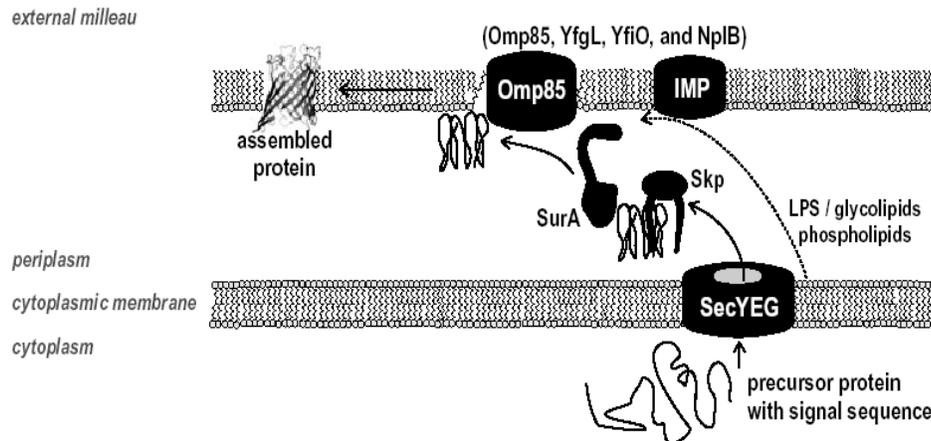


Figura 5. Ruta de las inserciones de proteína y lípido en la membrana externa de las bacterias. Todas las proteínas de las bacterias que se trasladan en los ribosomas a través del citosol y tienen como destino la secreción vía el complejo SecYEG, se hacen como precursores con una terminal N como secuencias guía.

1.2.11.4. Ruta general de secreción Sec

La ruta de exportación de las proteínas mejor estudiada en los procariontes es la clásica ruta Sec. Esta se refiere a la ruta general de secreción para la exportación de las proteínas con péptidos señal característicos en la terminal N y probablemente sea la principal ruta de exportación tanto de las bacterias Gram negativas como de las Gram positivas (Pugsley, 1993). En general, una preproteína se reconoce por primera vez por factores solubles de selección para su transporte al objetivo de la membrana, donde se asocia la proteína con un mecanismo de translocación. En seguida, la cadena de polipéptidos se transporta a través de un canal de proteínas. En la mayoría de los casos, este proceso de transporte es conducido por un motor de translocación que fija e hidroliza los trifosfatos. Al final del proceso, la proteína se madura al desprenderse por efecto de la translocasa o peptidasa señal (Tjalsma *et al.*, 2000).

Las rutas de secreción Sec incluyen a los sistemas de secreción Sec-dependiente y Sec-independiente (Tat). Las bacterias patógenas y no patógenas, utilizan estas rutas para confinar las proteínas en la superficie celular o como un primer paso en el secretado de las proteínas fuera de la célula (Schneewind *et al.*, 1993). En este proceso, las proteínas precursoras se conducen a los translocos, que son unos

canales a través de los cuales se exportan las proteínas que viajan del citosol para cruzar la membrana. En la ruta Sec-dependiente, el dominio integral de la preproteína translocasa que permite la translocación a través de la membrana, se compone de las subunidades SecA, SecY, SecE, SecG, SecD, SecF y YajC. El complejo SecYE activa a SecA, que es una preproteína dependiente, cuya función es la de una ATPasa y prové los sitios de fijación e inserción SecA. Sin embargo, la translocación eficiente de la preproteína y el reciclado de SecA de la membrana, también requieren de la función de SecG o del complejo SecDFyajC (Duong y Wickner, 1997a). Los eventos que se proponen para la translocación efectuada por el proceso de hidrólisis de ATP por SecA, se refieren a que los sustratos que quedan asociados con el núcleo de la translocasa se reinsertan y liberan, a través de múltiples rondas de fijación e hidrólisis de ATP. Por lo que SecA, se mueve entre el estado de “inserción” y “desinserción”, lo que resulta en un proceso de translocación entre el sustrato precursor y la proteína que se exporta al translocarse para cruzar la membrana en partes que van de 20 a 30 aminoácidos (van der Wolk *et al.*, 1997).

El complejo SecDFyajC es, en sí; una sola preproteína translocasa y como tal, es una enzima con subunidades múltiples. Como se describe anteriormente, sus dominios principales son la preproteína periférica SecA y la preproteína SecY/E incrustada en la membrana. La actividad de SecY es catalítica y soporta la translocación de la proteína precursora de la membrana externa (proOmpA). Los polipéptidos de la membrana externa, se presume que se fijan entre sí; es decir, a partir de las subunidades de uno de los dominios de la proteína. Esto se demuestra experimentalmente a través de anticuerpos contra los dominios terminal amino de SecY, que coprecipitan el dominio de la terminal carboxilo de SecY, la banda 1 o SecG y SecE, lo que reafirma la asociación estable del complejo y vuelve activa la preproteína (proOmpA), al pasar por el proceso de translocación (Brundage *et al.*, 1992). Un tercer elemento se integra como subunidad proteica, al cual se le denomina banda 1 (SecG). Esta banda, forma una preparación que solubiliza la membrana como un componente de incrustación para la translocasa en la membrana (Joly y Wickner, 1993).

En las bacterias, el translocón Sec representa el componente esencial mínimo necesario para la exportación y forman el poro de conducción (Brundage *et al.*, 1992). Cuando SecA se coordina con cada uno de sus ligandos apropiados (SecYE) y los lípidos acidificados, SecA se activa e interactuar con la preproteína proOmpA, al fijarse reversiblemente a la membrana plasmática y soportar la translocación e hidrólisis del ATP (Lill *et al.*, 1989; Cunningham *et al.*, 1989). La actividad de la enzima ATPasa SecA, aumenta significativamente cuando los proteoliposomas proOmpA y SecY-SecE contienen la banda 1 o SecG. Pues la proteína de la membrana SecG, estimula marcadamente la actividad de la translocación de los proteoliposomas cuando estos se reconstituyen juntos con SecY y SecE (Nishiyama *et al.*, 1993). La preproteína proOmpA se transloca en presencia de ATP y de la fuerza motriz de los protones (Hanada *et al.*, 1994). De tal manera que, esta fuerza puede actuar como una plantilla de conducción para las fuerzas complementarias de la translocación cuando una preproteína parcialmente translocada se asocia con SecA (Driessen y Wickner, 1991; Driessen, 1992). Otros estudios indican que la fuerza motriz de los protones actúa en la translocación de la enzima ATPasa SecA, por promover la liberación de ADP de SecA (Yamada *et al.*, 1987; Shiozuka *et al.*, 1990). De esta manera, SecA provee la energía para la translocación de las proteínas que actúa desde su ubicación periférica para acidificar la membrana (Schmidt *et al.*, 1988). Es decir, la translocación de las preproteínas requiere de dos formas de energía, el ATP que a través de la enzima ATPasa (SecA), se agrega un grupo fosfato al ADP y por consiguiente se genera el ATP; mientras que la fuerza motriz de los protones se genera al disociarse el átomo de hidrógeno para transferir un electrón y un protón (Geller *et al.*, 1986; Geller y Green, 1989). Aunque ambas formas de energía son esenciales *in vivo*, la translocación *in vitro* se puede conducir sólo por la energía de la hidrólisis de ATP, esta puede proveerse en presencia de SecA (Yamada *et al.*, 1989).

La difusión de iones se relaciona con la generación de ATP, mediante el movimiento de iones hidrógeno (protones o H⁺) a través de las membranas. A este proceso se le conoce como quimiosmosis, en el cual interviene la enzima ATPasa SecA, que

permite el paso de protones a su través y utiliza la energía cinética para fosforilar el ADP y crear ATP. Esta ATPasa, puede efectuar varias reacciones, en las que requiere energía cuando los protones son captados por las proteínas asociadas a la membrana. El poderoso empuje de estos motores moleculares se prové por el movimiento (usualmente una rotación) de dos nucleótidos adjuntos que integran las regiones de la proteína, que se inducen por las interacciones específicas del ATP y se le conoce como “interruptor en la fase de encendido.” Por virtud de la pérdida de las interacciones no covalentes clave entre la proteína y el γ -fosfato del ATP, la hidrólisis de ATP se ha demostrado que induce los cambios de conformación en dirección inversa, liberando dos regiones del nucleótido en la llamada fase del motor con “interruptor apagado” (Sharma *et al.*, 2003).

La proteína SecA, fija casi todos los componentes de la ruta Sec, incluyendo las proteínas precursoras, las chaperonas tales como SecB, fosfolípidos acidificados en la membrana y los componentes integrales de la translocasa de la membrana (Economou, 1998). SecA reconoce la chaperona SecB, las regiones maduras de las preproteínas (Cunningham *et al.*, 1989) e hidroliza ATP en la presencia del complejo precursor SecB (Joly y Wickner, 1993). La proteína SecB, es una chaperona del citosol la cual se asocia con varias formas precursoras de proteínas exportadas, como las MPB (acrónimo en inglés: **M**embrane **P**rotein **B**inding), OmpA y LamB (o maltoporina). Además, SecB desempeña una segunda función que aumenta la velocidad de exportación de la proteína. La actividad de SecB es presumiblemente transitoria; de tal manera que permite prevenir el plegamiento y ensamblaje de un complejo antes de su exportación. Tal como se demuestra a través del análisis de la mayoría de los materiales que se asocian con SecB, que pierden rápidamente la fracción de fijación anti-SecB. Lo que sugiere que los complejos formados por SecB, son intermediarios transitorios (Kumamoto, 1989), que mantiene las proteínas precursoras en un componente de la translocación, en estado plegado transitorio, que posteriormente se suelta (Weiss *et al.*, 1988; Lecker *et al.*, 1990).

Un tercer miembro componente de la holoenzima translocasa de la membrana, es SecG, que se identificó como una subunidad del complejo trimérico formado en

conjunción de SecYE. SecG se caracteriza porque su viabilidad se disipa a 37° C, pero incrementa la eficiencia de la translocación de la preproteína a la membrana tanto *in vivo* como *in vitro* (Nishiyama *et al.*, 1994). SecG interviene en los ciclos de inserción/desinserción de SecA estimulando su implantación, después de la iniciación de la translocación. Mientras que SecD/F/yajC facilitan y estabilizan la inserción de SecA (Duong y Wickner, 1997b).

El cuarto miembro que se integra a la preproteína compleja del sistema general de secreción, es SecD; que después de reconstruido el complejo SecA y SecYE, aumenta la reacción de la translocación de la proteína exportada (Matsuyama *et al.*, 1993). Los estudios de Duong y Wickner (1997a) revelan la integración física y funcional de las proteínas del operón *secD* y la integración funcional de las proteínas del operón *secD* en la preproteína holoenzima translocasa (SecA). Los trabajos de Matsuyama *et al.* (1993) y de Arkowitz y Wickner (1994), sugieren que la conjunción de SecD con SecF, se involucran en un paso de la liberación dependiente del gradiente electroquímico de protones al lado del periplasma de la membrana interna. Esta función de SecDF ofrece una explicación de porqué diferentes proteínas precursoras muestran severidad de los defectos de translocación con *secD/F in vivo* e *in vitro* (Duong y Wickner, 1997a).

Un análisis de la topología de SecD y SecF muestra que ambas proteínas, tienen un gran dominio periplásmico como emparedado, entre los primeros dos o seis tramos transmembrana (Pogliano y Beckwith, 1994). Aunque los otros dos componentes del sistema de exportación de la membrana, SecE y SecY, se predice que tienen casi toda su secuencia de aminoácidos integrados en la bicapa de lípidos, lo que hace que las SecD y SecF sean proteínas únicas de la membrana con largos tramos de secuencias hidrofílicas (Akiyama y Ito, 1987). A pesar de que se cuestiona que SecD y SecF no son imprescindibles para los procesos de exportación, los experimentos de Matsuyama *et al.* (1993), muestran que la exportación de proteína en los esferoplastos, es inhibida cuando se exponen a IgG anti-SecD, lo cual provee un soporte adicional a la implicación de SecD *in vivo*. Además, la sobre expresión de SecD depende de SecF, que se estabiliza cuando existe una sobreproducción de las

cantidades de SecF y esta a su vez estabiliza SecY. Esto sugiere la interacción de SecF con SecD y SecY en la membrana (Sagara *et al.*, 1994).

La mayoría de las proteínas de la membrana y algunas proteínas solubles se translocan vía la co translación, i.e. al mismo tiempo que ellas inician su síntesis por los ribosomas. Este es un proceso en el cual el ribosoma se fija a los complejos de los canales que conducen las proteínas y la translocación de las cadenas nacientes se asocia con la elongación de los polipéptidos. El canal que conduce las proteínas es dinámico, por lo que debe ser capaz de abrir y cerrar un canal acuoso (Gilmore *et al.*, 1982; Simon *et al.*, 1989). Este canal conductor de las proteínas, se compone de dos α -subunidades para SecY (en bacterias, eubacterias y arqueobacterias; Sec61 α en los mamíferos), la β -subunidad (SecG en las bacterias y eubacteria; Sec β en archaea; Sec61 β en los mamíferos) y la γ -subunidad (SecE en bacterias, eubacteria y arquea; Sec61 β en los mamíferos y Sec61p/Sss1p en las levaduras) (Simon *et al.*, 1989; Brundage *et al.*, 1992; Hartmann *et al.*, 1993). Se entiende además, que estas son altamente conservadas, por lo que es posible que formen un núcleo como una proteína que conduce la ruta. Por lo que no es extraño que la subunidad multi emparejadora SecY, está en la proximidad de la cadena de polipéptidos cuando ésta se mueve para cruzar la membrana (Joly y Wickner, 1993).

Entre las proteínas adicionales que se integran a la translocasa está YidC, la cual tiene una función en el ensamblaje de las proteínas de la membrana interior (Scotti *et al.*, 2000). Las interacciones de YidC con el complejo SecDFyajC, también se encuentran a los niveles de la proteína de los cromosomas de SecD, SecF y YajC. El examen detallado del complejo SecDFyajC–YidC muestra que YidC se fija a SecD y SecF, mientras que YajC interactúan sólo con SecF. Como SecF y YajC se ha demostrado previamente que interactúan con SecY. Nouwen y Driessen (2002) proponen que estas dos proteínas ligan al complejo heterodimérico SecDFyajC–YidC para el complejo SecYEG.

La proteína YidC, desciende de la proteína de la membrana interna, que es homólogo de Oxa1p, un componente que demostró funcionar en la membrana

interna del ensamblaje de la proteína en la mitocondria (He y Fox, 1997; Hell *et al.*, 1998). YidC se copurifica en el núcleo de la translocasa SecYEG y su expresión es sobre regulada con la expresión a su vez de los componentes de la translocasa. Basado en estas observaciones Scotti *et al.* (2000), sugieren que YidC es un componente de la translocasa que funciona en la transferencia de los segmentos de los polipéptidos hidrofóbicos del complejo SecAYEG en la bicapa de lípidos. En apoyo a estas apreciaciones, Nouwen y Driessen (2002), determinaron que la secuencia señal de YidC es una inserción 108mer, que se encuentra en los lípidos de YidC, mientras que las regiones hidrofílicas son adyacentes tanto para SecA como a SecY.

1.2.11.5. El sistema de secreción Sec en las micobacterias

Como todas las bacterias, las micobacterias poseen sistemas para confinar las proteínas a diferentes compartimientos subcelulares. Después de sintetizarlas en el citosol, algunas proteínas se exportan a la membrana citosólica o la pared celular (colectivamente denominada envoltura celular) o al ambiente extracelular. En las micobacterias, la ruta Sec, es muy probable que sea responsable de la mayoría de las proteínas exportadas más allá del citosol (Gibbons *et al.*, 2007). El proceso de translocación en las micobacterias, permite secretar las proteínas no plegadas con las secuencias señal de la terminal N, que cruzan la membrana citosólica (Gatsos *et al.*, 2008).

El genoma de *M. tuberculosis*, contiene homólogos de todos los componentes de la ruta Sec (Cole *et al.*, 1998; Braunstein *et al.*, 2000), con excepción de SecB, una proteína que no se encuentra en todos los sistemas Sec (Fekkes y Driessen, 1999). Además, las micobacterias son conocidas por secretar proteínas las cuales inicialmente se sintetizan como precursores y contienen secuencias señal que se reconoce en sus terminales amino. Las simples bases de esta información, permiten entender que las micobacterias contienen una ruta Sec, que es típica para la exportación de la proteína más allá del citosol. Independientemente de la carencia de SecB, las rutas Sec en las micobacterias, contiene las proteínas SecA1 y SecA2

(Braunstein *et al.*, 2001). Sin embargo, SecA2 funcionalmente no puede reemplazar a SecA1, a pesar de que SecA2 es elevadamente conservada en las micobacterias, lo que conducen a suponer que SecA2, tiene una segunda función en la célula. Esta segunda función, puede ser que se refleje en la exportación de un distinto subconjunto de proteínas que son exclusivas o sustratos preferenciales de SecA2, tal y como funciona para *Listeria* y *Streptococci* (Braunstein *et al.*, 2001; Lenz y Portnoy, 2002) y las mismas micobacterias (Braunstein *et al.*, 2003).

Aunque SecA2 de *M. tuberculosis* es un factor accesorio de secreción, promueve un subconjunto de proteínas que incluyen la superóxido dismutasa (SodA) y la catalasa peroxidasa (KatG) (Braunstein *et al.*, 2003). Por lo que esto puede estar relacionado con el gen *secA2* de *M. tuberculosis*, que se requiere para la prevención de la apoptosis de los macrófagos infectados con *M. tuberculosis*. De aquí la propuesta, que la prevención de la apoptosis de los macrófagos infectados por *M. tuberculosis* a los cuales se les suprimió el gen *SecA2*, se debe a que la preproteína que codifica, interviene en la secreción de SodA de las micobacterias (Hinchey *et al.*, 2007).

M. tuberculosis, dedica una gran proporción de su capacidad codificadora de su cromosoma, para la biosíntesis de lípidos de su pared celular (Cole *et al.*, 1998). Lo más prominente de los rasgos funcionales de la pared celular de las micobacterias es su baja permeabilidad, la cual la protege de las sustancias nocivas. Por lo que la difusión de las moléculas hidrofóbicas a través de la capa de ácidos micólicos ocurre vía las porinas (Trias *et al.*, 1992). Niederweis *et al.* (1999) identificaron la primer porina de *M. smegmatis*. La porina MspA (acrónimo en inglés: **M. smegmatis porina A**), es una proteína oligomérica, que exhibe una gran canal de conducción de 4.6 nS en 1 M de cloruro de potasio. Estas porinas tienen relación con el sistema de secreción Sec, en cuanto a que se sugiere que el transporte de las proteínas se efectúa por esta vía, la cual es dependiente de SecA1. Ésta a su vez, es esencial para el crecimiento *in vitro* de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, de tal manera que la translocación y la secreción se acoplan en la porina MspA en *M. smegmatis* (Guo *et al.*, 2007).

La proteína SecA1 de las micobacterias, es el homólogo de la proteína SecA de *E. coli*. La supresión por mutación del gen *secA1* en *M. smegmatis*, elimina la exportación de las secuencias señal Sec, contenidas en las porinas de *M. smegmatis* y se asocia con la pérdida de la viabilidad (Guo *et al.*, 2007). El gen *secA1* también parece ser esencial en *M. tuberculosis* (Sasseti *et al.*, 2001). En contraste, el gen *secA2* no es esencial y los mutantes de *secA2*, constituidos para *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG (Braunstein *et al.*, 2003). La proteína SecA2, que se identifica en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, existen ejemplos con y sin secuencias señal. Mientras que aún no se conoce sobre los factores que trabaja con SecA2 de las micobacterias para reconocer o translocar sustratos, si queda claro que el sistema SecA2, influye en la virulencia y protección de *M. tuberculosis*, contra la inmunidad del hospedero. Todas las proteínas SecA2 poseen dominios conservados de la proteína SecA: un dominio motor similar a la enzima ATPasa DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp), el cual incluye las cajas de fijación ATP Walker A y B, el dominio IRA1 (acrónimo en inglés: Intramolecular Regulator of ATP hidrólisis) y la preproteína dominio de fijación. Una distinción entre SecA2 y el canon SecA, es que la proteína SecA2 es pequeña, en parte por estar truncada en su unidad de fijación de la terminal C (Kimura *et al.*, 1991; Karamanou *et al.*, 1999).

Las translocasas SecA1 y SecA2 de *M. tuberculosis*, son fijadoras de ATP e hidrolizan las proteínas (Hou *et al.*, 2008). Estos dominios motor de SecA1 de *M. tuberculosis*, también muestran elevada similitud con SecA de *Bacillus subtilis* (Sharma *et al.*, 2003). A nivel de los aminoácidos, SecA1 y SecA2 de *M. tuberculosis* tienen alrededor del 50% entre si y entre 61 y 50% de similitud con respecto a SecA de *E. coli* respectivamente (Braunstein *et al.*, 2001). Asimismo, las proteínas exportadas por el sistema SecA2 en diferentes bacterias incluyen ejemplos con y sin secuencias señal en las terminales amino (Bensing y Sullam, 2002; Lenz *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2004; Archambaud *et al.*, 2006).

1.2.11.6. Sistema de secreción independiente Tat

La ruta de translocación Tat (acrónimo en inglés: **T**win-**a**rginine **t**ranslocation), se distingue de la ruta Sec, por transportar proteínas pre-plegadas y cruzarlas a través de las membranas selladas por efecto iónico. En las plantas, la translocasa en la membrana tilacoide de los cloroplastos, actúa para exportar las proteínas en el lumen tilacoide. En las bacterias, la translocasa se encuentra en la membrana citosólica y sirve para exportar las proteínas a las envolturas celulares o al espacio extracelular. Este es un transporte activo que se efectúa sin la translocación de la membrana, permeable para los protones y otros iones (Hynds *et al.*, 1998; Rodrigue *et al.*, 1999, Thomas *et al.*, 2001). Por lo que este sistema en las bacterias, parece operar primariamente con la exportación de proteínas que se fijan a un rango de cofactores redox, tales como los centros de FeS y molibdopterinas en el citosol (Santini *et al.*, 1998). La adquisición de estos cofactores, en la mayoría de los casos, debe necesitar un grado sustancial de plegamiento, a diferencia de la ruta Sec, es incapaz de exportar tales estructuras (Thomas *et al.*, 2001). La ruta alternativa denominada Tat, también es denominada ruta de la translocación al sitio de la membrana o Mtt por el acrónimo en inglés: **m**embrane **t**argeting y **t**ranslocation) (Weiner *et al.*, 1998; Sargent *et al.*, 1998). Mtt es una nomenclatura alternativa para el sistema Tat. Este término surge de la premisa de que ciertas rutas de sustratos no son transportados por Tat. Entre estos sustratos se encuentran la subunidad dimetil sulfóxido (DMSO) reductasa de *E. coli*, y forma la deshidrogenasa-O, mientras que el otro sustrato es la tetracloroetano deshalogenasa que se localiza en *Dehalospirillum multivorans*. Ambos sustratos son extrínsecos a la membrana y se adhieren al aparato de Mtt en la fase citosólica de los patrones integrales a las proteínas de la membrana (Miller *et al.*, 1996; Benoit *et al.*, 1998).

Los sustratos de la ruta Tat, son sintetizados como proteínas precursoras que contienen una secuencia señal terminal N, con la misma estructura completa como las secuencias señal Sec. La denominación Tat, se debe que en la translocación de las argininas dobles, el precursor que atrae las proteínas en este mecanismo de exportación contiene un modo conservado S/T-R-R-X-F-L-K, con dos residuos contiguos de Arginina cercanos a la terminal-N del péptido guía; mientras que los

residuos de Arginina son invariantes y esenciales para la eficiencia de la fijación de la proteína (Berks *et al.*, 2000). Las Argininas dobles (RR) en el sistema de exportación Tat, son conservadas y pueden sustituir las Lisinas (K) en las secuencias señal Tat, las cuales eliminan la exportación de muchos sustratos nativos y proteínas reportadas como dependientes de Tat (Halbig *et al.*, 1999; Stanley *et al.*, 2000). Los arreglos de dichas secuencias se suceden en los péptidos señal de las proteínas Tat. Ellos se parecen a los péptidos señal del sistema Sec-dependientes, considerando su estructura completa, pero poseen en el modo de las Argininas dobles la región terminal N positivamente cargada, una región central ligeramente hidrofóbica y una señal Sec-esquiva, cargada positivamente en la región terminal C (Bogsch *et al.*, 1997; Cristobal *et al.*, 1999).

1.2.11.7. El sistema Tat en las micobacterias

Las micobacterias también usan la ruta de transporte Tat, una maquinaria de secreción Sec-independiente, que tiene como capacidad única, translocar los sustratos plegados de proteína que cruzan del plasma a la membrana (McDonough *et al.*, 2005), así como los complejos de enzimas dentro del periplasma (Posey *et al.*, 2006). Este sistema en las micobacterias es homólogo a los sistemas Tat en otras bacterias y se ha demostrado que es funcional tanto en *M. tuberculosis* como en *M. smegmatis* (McDonough *et al.*, 2005; Posey *et al.*, 2006). El sistema Tat, se requiere para un óptimo crecimiento *in vitro* y para la exportación de las β -lactamasas de las micobacterias; además, este sistema tiene el potencial de usar una β -lactamasa truncada (BlaC), carente de su secuencia señal nativa como lo reportado para las proteínas exportadas por la vía Tat, como parte de los factores de virulencia de *M. tuberculosis* (McDonough *et al.*, 2005). La mayoría de los sustratos Tat, son partes atractivas de los contenidos en los cofactores de las enzimas en los sistemas óxido-reducción, implicados en la conservación de la energía bajo condiciones anaeróbicas (Posey *et al.*, 2006).

La secuencia del genoma de *M. tuberculosis* (Bartholomew y Alexander, 1979) y el de *M. leprae* (Cole *et al.*, 2001) revelan que ambas micobacterias contienen genes

identificados como *tatA*, *tatB*, *tatC* y *tatD*, por lo que es factible la producción de las proteínas del sistema funcional Tat. Aunque, el grupo de genes *tatABCD* identificados en *E. coli* como tal, no se encuentran en *M. tuberculosis*. Más bien se parecen a los de *B. subtilis* por tener un operón *tatAC*, con *tatB* y *tatD* que se localiza en partes distintas (Saint-Joanis *et al.*, 2006).

1.2.11.8. Relaciones evolutivas de los siete sistemas de secreción

La mayoría de las especies de bacterias, son capaces de detonar sistemas de secreción especializados para transferir las macromoléculas a través de la membrana. Esta especialización ha conducido a la clasificación de siete sistemas de secreción que se relacionan evolutiva y funcionalmente (Stanley *et al.*, 2007). En la clasificación numérica del sistema de secreción de las proteínas, las rutas de desviación son el sistema de tipo I (T1SS) compuesto de tres dispositivos, y el sistema tipo III (T3SS) que se refiere al complejo inyectosoma y el sistema de secreción tipo II (T2SS), el cual toma las proteínas exportadas por la ruta de secreción Sec (o raramente, la ruta Tat) y las transloca después en un estado plegado para cruzar la membrana externa. De esta misma forma; sin embargo, el sistema de clasificación numérica excluye la ruta de ensamblaje de la chaperona puerta pilus y de ensamblaje de la ruta del flagelo. Esto último se demostró posteriormente como una variante (posiblemente un progenitor evolutivo) de T3SS, mientras que una de las más comunes rutas de la biogénesis pilus, es el sistema del pilus tipo IV (T4PS), que más recientemente se mostró que es casi idéntico al T2SS. Este último se representa en *Dichelobacter nodosus*, el cual secreta una proteasa a través de este sistema T4PS. Otros ejemplos es el de *Francisella* T4PS, el cual secreta varias proteínas (Hager *et al.*, 2006). El sistema de secreción tipo IV (T4SS) se descubrió posteriormente y es entendible que a menudo se confunda con el T4PS (acrónimo en inglés: **T**ype **I**V **P**ilus **S**ystem), que es completamente diferente. Las proteínas T4SSs, están ancestralmente relacionadas a la maquinaria de conjugación. Ellos son componentes de un canal de translocación y estructuras de superficie tales como los pili conjugados (bacterias Gram negativas) o las proteínas adhesivas de superficie de las bacterias Gram positivas para mediar su fijación a las células

blanco. Aunque el sistema de auto transporte es originalmente llamado tipo IV (T4SS), posteriormente se nombró el sistema V (T5SS), que es superficialmente similar pero estructuralmente un tanto distinto al sistema de secreción pareado (TPSS), que en las bacterias Gram negativas patógenas, se le ha nombrado como tipo VI (T6SS) (Economou *et al.*, 2006). En estas bacterias Gram negativas, la secreción se encuentra involucrada la translocación a través de la membrana interior y la membrana externa de diversas proteínas que comprometen la heterogeneidad de los sistemas. Por último, el sistema de secreción que recientemente se ha investigado es el tipo 7 (T7SS) y se definió para determinada secreción que presentan las micobacterias. Este último sistema, tiene algunas homologías en su estructura desplegada por los filamentos de los fagos, el pili del sistema de secreción T4SS y el aparato T2SS, que proveen un ejemplo de la multiplicidad de la función de la nanomaquinaria de penetración de la membrana (Leiman *et al.*, 2009).

1.2.11.9. Sistema de secreción único para las micobacterias (T7SS)

Las rutas de secreción Sec y Tat en las bacterias patógenas Gram negativas se manifiestan en el uso de una variedad de sistemas de secreción (Tipos 1 al 5). Los sustratos de los sistemas individuales difieren entre los patógenos, pero en los sistemas de secreción por sí mismos son primordialmente conservados. Aunque los homólogos de estos sistemas están ausentes en el genoma de *M. tuberculosis*, las equivalencias funcionales de estos sistemas, se les ha denominado ESX-1, que recientemente se ha identificado y ha tenido un floreciente enfoque en el campo de las micobacterias. El rastro inicial de la existencia de un sistema de secreción especializado en las micobacterias, vino de los estudios que identificaron las proteínas que tenían secuencias señal Sec carentemente obvias (Sorensen *et al.*, 1995). Las más notables son las proteínas de secreción ESAT-6 y CFP-10, que originalmente se identificaron como antígenos inmunodominantes de *M. tuberculosis*. Desde su identificación, varios estudios sugieren que estas proteínas intervienen en la virulencia. Puesto que la eliminación de los genes que codifican ESAT-6 y CFP-10 de la cepa BCG de *M. bovis*, resulta en una disminución de la virulencia (Wards *et al.*, 2000).

Como todas las otras bacterias, las micobacterias tienen una ruta esencial general de secreción. Este es sistema de secreción Sec, cuyas funciones son secretar las proteínas no plegadas con secuencias señal en la terminal N que atraviesan la membrana citosólica. Las proteínas extracelulares se liberan al crecer las bacterias en los medios de cultivo líquidos o bien intracelularmente dentro de los fagosomas de los fagocitos mononucleares de los hospederos (Pal y Horwitz, 1992; Harth *et al.*, 1996). Para desarrollar dichas funciones, los genomas de las micobacterias contienen arriba de cinco grupos de genes T7SS, que no se complementan funcionalmente unos a otros. Los grupos de genes T7SS más distantemente relacionados con las micobacterias, también se encuentran en los genomas de las especies patógenas Gram positivas que carecen de micomembranas tales como las especies de *Streptomyces* y *Firmicutes* entre las que se encuentran *Bacillus* y *Clostridium* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Listeria monocytogenes*. En la secreción T7SS, las chaperonas como las ATPasas se anclan a la membrana interior para unir los efectores de la terminal C, las cuales se secretan invariablemente como heterodímeros (Tseng *et al.*, 2009).

Las micobacterias que poseen una ruta Sec funcional, tienen dos proteínas SecA, que es inusual en otras bacterias, que le permite relacionar la ruta de secreción especializada de *M. tuberculosis*, con el aparato SecA/SecYEG de la ruta de general de secreción (Braunstein *et al.*, 2003). Esto es comprobable a través del sistema de complementación de los fragmentos de proteína, mediante el cual se identificaron los productos adicionales esenciales de los genes que participan en la secreción de ESAT-6 y CFP-10, dos componentes que se secretan por el sistema de secreción especializado de *M. tuberculosis* (Guinn *et al.*, 2004). El traslape de las rutas SecA/SecYEG y CFP-10, sugiere que ellas pueden formar componentes de secreción. También, la complementación del fragmento de la proteína de las micobacterias, puede involucrar los productos esenciales de genes tales como Pks13 (policétido sintetasa involucrada en la división celular), FtsQ (proteína homóloga de la tubulina con una actividad GTPasa, involucrada en la división celular), ClpC1 (una chaperona AAA-ATPasa involucrada en la translocación de proteína) y el complejo

SecYEG (Sasseti *et al.*, 2003). Este traslape entre estas dos rutas, forman los componentes de un sistema de secreción (Singh *et al.*, 2006), al cual se le denominó sistema de secreción en las micobacterias o T7SS, que inicialmente se predijo mediante la bioinformática, al basarse en los grupos de genes que codifican las proteínas secretadas que carecen de secuencias señal con las proteínas codificadas de la membrana, las ATPasas y/o las chaperonas. Bajo este sistema las proteínas ESAT-6 y CFP-10 secretadas, actúan en la virulencia de *M. tuberculosis*. Estas dos pequeñas proteínas son parte de un gran grupo de proteínas homólogas llamadas familia ESX, que carecen de secuencias señal (Stamm *et al.*, 2003; Guinn *et al.*, 2004).

De la misma manera que las chaperonas del sistema tipo III, las proteínas ESAT-6 y CFP-10 son pequeñas (10-15 kDa), con un pH ácido, se expresan por un gen adyacente, al gen que codifica el sustrato secretado y se une al sustrato con elevada afinidad. La chaperona, típicamente funciona para guardar el sustrato en una conformación de la secreción y para prevenir la interacción con otras proteínas o su agregación (Page y Parsot, 2002). La secreción de las proteínas CFP-10 y ESAT-6, se promueve por el acompañamiento continuo de los genes codificados en el *locus* RD1; estos genes codifican al menos una proteína transmembrana (Rv3877) y dos ATPasas de la familia AAA (Rv3870 y Rv3871) (Stamm *et al.*, 2003).

CAPITULO 2. ADAPTACIÓN DE *Mycobacterium smegmatis* ANTE EL AGOTAMIENTO DE NUTRIENTES Y SU EFECTO EN LA EXPRESIÓN DE *esat-6*.

2.1. INTRODUCCIÓN

El agente causal de la tuberculosis está conformado por el complejo *M. tuberculosis* capaz de sobrevivir y crecer dentro de los macrófagos, un ambiente hostil por la limitación de nutrientes y acidificación (Parish *et al.*, 2003b; de Jonge *et al.*, 2007; Rohde *et al.*, 2007). Su adaptación se efectúa a través de mecanismos que le permiten detectar su entorno y regular los genes que se expresan o reprimen durante su crecimiento y reproducción (Abramovitch *et al.*, 2011), que favorecen su persistencia en el hospedero (Dahl *et al.*, 2003).

Las células pueden responder a estímulos externos al iniciar un proceso que se da a partir de la unión de un efector a un receptor unido a la membrana. Este es un mecanismo de transducción, en el que los factores estresantes desencadenan una respuesta a través de la expresión de los genes, que preparan a las bacterias durante el agotamiento de los recursos (Siegele y Kolter, 1992). Hecho que se puede observar *in vitro* en la fase exponencial y son decisivos para la adaptación a las condiciones que se presenten en la fase estacionaria y sobrevivir (Gebhard *et al.*, 2008; Humpel *et al.*, 2010). Lo anterior, implica que la célula acumule protones del medio para mantener la homeostasis del pH en el citosol (Slonczewski *et al.*, 1981), polifosfatos para la conversión en fuentes de energía (Pepin *et al.*, 1986). En *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, además se acumula el glutamato (Lyon *et al.*, 1967) y la Asparagina (Sriharan *et al.*, 1987) que se relaciona con la inducción del aletargamiento de *M. tuberculosis* (Malhotra *et al.*, 2009).

Los bacilos tuberculosos responden a situaciones de estrés por agotamiento de nutrientes, pH ácido, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno causado por su crecimiento en los macrófagos (Gebhard *et al.*, 2008; Ganguly *et al.*, 2008; Humpel *et al.*, 2010). Para responder a estos estímulos, las micobacterias secretan enzimas como ESAT-6 y CFP-10 (de Jonge *et al.*, 2007; Welin *et al.*, 2011), que en las células

del hospedero, actúan en los procesos de necrosis, tales como la lisis del epitelio alveolar y membranas de los macrófagos, induce la fragmentación del ADN y la permeabilidad de la membrana de las mitocondrias (Welin *et al.*, 2011). Entre las funciones metabólicas propias de las micobacterias, se propone que regulan la transferencia de ADN, al recubrir la superficie celular que interviene en el contacto célula-célula durante la conjugación (Flint *et al.*, 2004).

M. smegmatis mc²155, es un mutante de la cepa silvestre *M. smegmatis*, es 10 a 100 mil veces más eficientemente transformada con plásmidos, ampliamente utilizada en el análisis de la función de las micobacterias (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_118168627). Debido a que su crecimiento es rápido, se ha propuesto como modelo *in vitro* para entender los cambios que promueven la adaptación (Cox y Garcia, 2013) y la persistencia en las micobacterias patógenas *in vivo* (Ojha *et al.*, 2000). Comparte 12 de 19 genes de virulencia con *M. tuberculosis* (Berthet *et al.*, 1998), entre los que se encuentran los genes *esat-6* y *cfp-10*, que codifican para las proteínas correspondientes secretadas por el sistema ESX-1 (acrónimo en inglés: Secretion Ejectosoma BOX) (Brodin *et al.*, 2006). Converse y Cox (2005) observaron el efecto de los medios de cultivo en el sistema de secreción ESX-1, por lo que proponen que este sistema puede ser sensible a uno o más nutrientes del medio de cultivo.

Durante el proceso de adaptación, algunos genes relacionados con redes metabólicas específicas se expresan como una respuesta al estrés ocasionado por la privación de nutrientes (Lamarche *et al.*, 2008). La adaptación de las micobacterias cultivada se puede observar después de la fase estacionaria, al cambiarse a un medio de cultivo fresco y reinician su actividad. Por lo que en el presente estudio se evalúan las condiciones de cultivo limitantes de nutrientes en el crecimiento de *M. smegmatis* para relacionarlas con la expresión del gen *esat-6*.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

La cepa usada fue *M. smegmatis* mc²155, se creció se desarrolló rutinariamente a 37 °C en Middlebrook 7H11. Para obtener las alícuotas iniciales de los medios de cultivo testigos y los probados se inoculó a *M. smegmatis* de una sola colonia en 10 ml de

medio líquido Middlebrook 7H9 y se creció por 24 h hasta media fase logarítmica (0.8-1.0 DO a 600 nm).

Los medios de cultivo utilizados como control para comparar el comportamiento metabólico de los bacilos y expresión del gen *esat-6* fueron 7H9 y Sauton sin zinc, suplementados ambos con 0.5% y 6% de glicerol respectivamente y 0.05% de Tween 80. Estos medios se escogieron porque se describe su uso para la expresión del gen *esat-6* (Converse y Cox, 2005). La inoculación inicial se efectuó con 100 µl del cultivo inicial en frascos de 225 ml que contenían 150 ml de medio de cultivo líquido para control y probados, se incubaron a 37 °C, con agitación a 250 r.p.m.

Todos los medios de cultivo probados para la privación de nutrientes se derivan del medio mínimo HdB, se ajustó el pH 7, se adicionó, 0.2% de glicerol, 0.05% de Tween 80, (Smeulders *et al.*, 1999), excepto para provocar el agotamiento de C (HdB<C) al que se limitó el glicerol a 0.08% (v/v). Para los experimentos en los que se requirió el agotamiento de nitrógeno (HdB<N), se usó (NH₄)₂SO₄ a una concentración menor (150 µM) que el usado para el medio mínimo HdB. Para los experimentos limitados 100X menor en Pi (HdB<Pi) se adicionó K₂HPO₄ a una concentración final de 890 µM (15.5 mg L⁻¹) y NaH₂PO₄ a una concentración de 708 mM (85 mg L⁻¹), para reemplazar la pérdida de capacidad amortiguadora se agregó ácido propanosulfónico 3-(N-morfolino) (MOPS) 50 mM (Smeulders *et al.*, 1999). Para establecer la fase estacionaria todos los cultivos se monitorearon por densidad óptica (DO a 600 nm) hasta las 144 h y se registró el pH final.

El fragmento predicho del gen *esat-6* se obtuvo por amplificación del ADN de *M. smegmatis* a partir de los iniciadores: F-5'ACAGGTATGGAATTTCCGCCG-3', R-5'-CAGGCAAACATTCCCGTGA-3', los cuales se diseñaron con el programa Oligo TM Software DNA Star Program. Para llevar a cabo la identificación mediante secuenciación enzimática, el producto amplificado fue purificado mediante un protocolo a base de columnas de silica (QIAquick Gel Extraction Kit, QIAGEN®), para ello, el fragmento amplificado fue visualizado en el gel de agarosa al 1.2% a través de un transiluminador de luz UV y se cortó mediante un bisturí estéril, llevando a cabo el protocolo mencionado. La calidad y la cantidad de ADN purificado se observó mediante un gel de agarosa y se procedió a enviar esta muestra amplificada para su

secuenciación. El proceso de secuenciación se realizó en el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato, Guanajuato, México, del Instituto Politécnico Nacional (IPN), basado por el método ddNTPs (Sanger *et al.*, 1977), utilizando un secuenciador 3730 XL DNA, (Applied Biosystems, Foster City, CA) y el kit Big Dye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

La búsqueda de similitud entre secuencias de ADN se realizó por medio del programa BLAST (Programa Informático de Alineamiento de Secuencias de Tipo Local) (Altschulf *et al.*, 1990), con el cual se comparó la homología de la secuencia de nucleótidos en este estudio, con las bases de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información de Biotecnología) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), de esta manera se identificó al gen *esat-6*, obteniendo un número de accesoión: KR363260. La comparación de la homología consultada en la base de datos que le corresponde al gen *esat-6*, se localiza en el sitio del 87,387 a 87,604 pb de la secuencia del genoma completo de *M. smegmatis* cepa MC²155, reportada en el NCBI con el número de accesoión:CP000480.

Para la extracción de ARN, el cultivo de *M. smegmatis* se adaptó en los medios de cultivo correspondientes hasta el inicio de la fase estacionaria (96 h). En esta fase se cosechó el 30% de las células, se lavaron con PBS y se colocaron en 150 ml de medio de cultivo fresco con las mismas condiciones nutritivas, se incubaron por 14 h. El ARN se extrajo mediante el uso de TRIzol (Invitrogen®). Se observó por electroforesis en geles de agarosa (1.2%) con MOPS X (200 mM de MOPS, 50 mM de acetato de sodio y 10 mM de EDTA, pH 7) y 3.15% de formaldehído. La electroforesis se corrió en una solución amortiguadora TAE (40/1 mM pH 8.0).

La hibridación Northern se efectuó de acuerdo con Sambrook y Russell (2006) de la siguiente manera: se utilizaron de 8 a 12 ng del ARN extraído y transferido por capilaridad descendente en membranas de Nylon, en citrato de sodio y cloruro de sodio 20X. El ARN se fijó con luz ultravioleta durante 5 min. Mientras que la sonda se elaboró a partir del fragmento del gen *esat-6* amplificado por PCR. La sonda fue marcada con biotina acoplada a fosfatasa alcalina (Gene Images Alkphos Direct

Labelling and Detection System-GE Health Care®). La hibridación se efectuó durante toda la noche y se reveló por la autoradiografía (Hyperfilm-MP autoradiography, Amersham Pharmacia Bioscience®).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos del crecimiento y pH, se obtuvieron de seis repeticiones y se aplicó la prueba *t* de student, para expresar los resultados de la media, el error estándar de la media y las correspondientes comparaciones entre ellas (Dowdy *et al.*, 2004), de todos los cultivos de *M. smegmatis*. A partir de este ensayo se estableció el tiempo para definir la fase estacionaria y observar el comportamiento adaptativo de los cultivos.

2.3. RESULTADOS.

En los medios de cultivo probados, se observó que *M. smegmatis* tiene el crecimiento más bajo en los medios HdB<N, HdB<C (0.659 y 1.697) respecto al medio de cultivo HdB mínimo y HdB>Pi (2.170 y 1.982) ($P<0.05$). Se observó que *M. smegmatis* en HdB<Pi tiene un crecimiento similar al cultivo en HdB mínimo ($P>0.05$) (Figura 6). Lo que es indicativo de un crecimiento continuo a pesar de las condiciones de estrés por la disminución de 100 veces en Pi. Con excepción del cultivo en HdB>Pi, en los demás medios de cultivo probados y los usados como controles, *M. smegmatis* reanuda su crecimiento al cambiarlo al medio de cultivo fresco correspondiente, después de 144 h de cultivo.

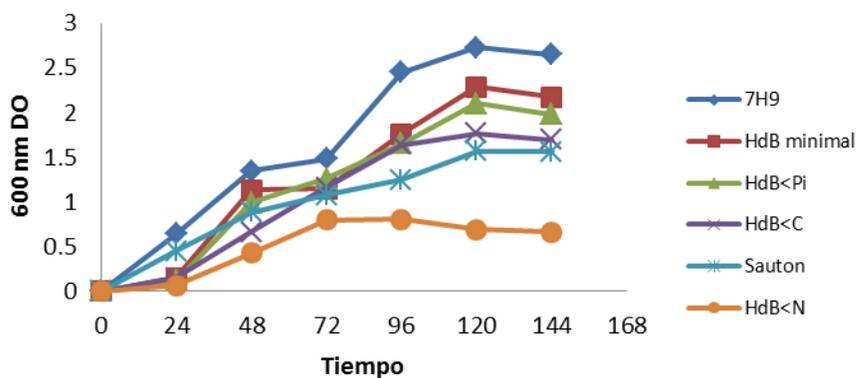


Figura. 6. Estandarización de la fase estacionaria. El crecimiento de *M. smegmatis* a 144 h en los medios de cultivo usados para el experimento HdB<N (0.659 ± 0.12), Sauton (1.559 ± 0.03), HdB<C (1.697 ± 0.07), HdB<Pi (1.982 ± 0.11) HdB mínimo (2.170 ± 0.12) y 7H9 (2.638 ± 0.12).

En el medio de cultivo HdB<Pi se observó una relación entre el crecimiento de *M. smegmatis*, el pH y la pérdida de resistencia alcohol-ácido. Es decir, a mayor número de horas de cultivo (144 h), se disminuyó el pH (5.4 ± 0.16), aunado a la incapacidad de recuperar su actividad metabólica cuando se cambia el cultivo a medio fresco. Esto se observó por los cúmulos de células que se tiñeron con el color característico que da la técnica Ziehl-Neelsen y que desaparecen partir de las 100 h hasta teñirse todas las células de color azul (Figura 7a y 7b).

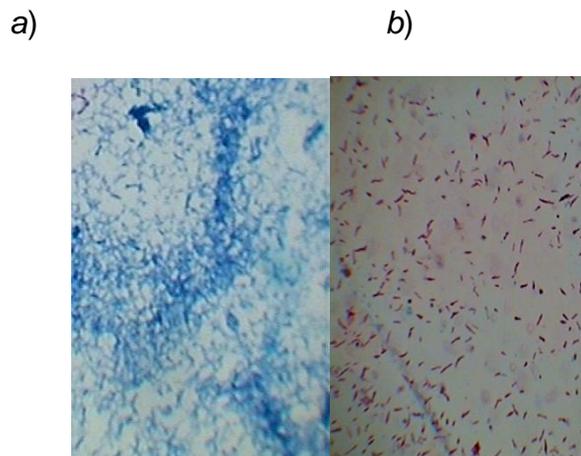
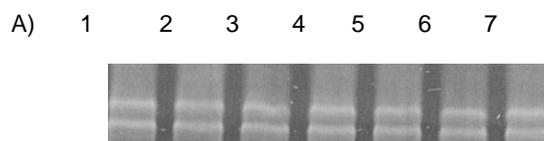


Figura 7. Tinción Ziehl-Neelsen de *M. smegmatis*. a) Pérdida de resistencia alcohol-ácido en cultivo HdB<Pi a 96 horas. b) mismo cultivo cambiado a medio fresco 1 horas después en el que se observa la recuperación de la capacidad de respuesta de *M. smegmatis* al alcohol-ácido.

Dado a que los cultivos inician su decrecimiento en la fase estacionaria y el cultivo en HdB<Pi pierde su capacidad de resistencia al alcohol-ácido a partir de las 96 h. Tiempo que se tomó en cuenta para la adaptación de *M. smegmatis* de todos los cultivos, hacer el cambio a medio de cultivo fresco para extraer el ARN total (Figura 8A) y llevar a cabo la hibridación Northern. Al respecto, los resultados de la prueba revelan que *M. smegmatis* cultivado en HdB<C, HdB<N y HdB medio mínimo, no expresa el gen *esat-6*. Mientras que en el cultivo limitado 100 veces en Pi (Figura 8B carril 7) si se observó la expresión, de la misma manera que en los medios de cultivo usados como control (7H9 y Sauton carriles 1 y 3 de la Figura 8B).



B)

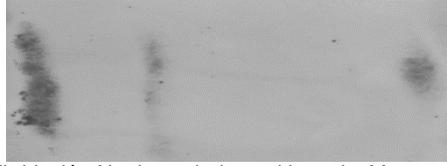


Figura 8. Hibridación Northern de los cultivos de *M. smegmatis*. A) ARN total de *M. smegmatis* en los medios de cultivo: 1) 7H9, 2) HdB medio mínimo, 3) Sauton sin Zn, 4) variable no controlada 5) HdB<N, 6) HdB<C, 7) HdB<Pi. B) Mismos carriles con los resultados de la hibridación Northern para el gen *esat-6* de *M. smegmatis*.

2.4. DISCUSIÓN

La capacidad que poseen las micobacterias para acumular las fuentes de energía, les permiten persistir *in vivo* durante la fase de infección (Gomez y McKinney, 2004). En este mismo sentido, las micobacterias *in vitro* logran adaptarse al agotamiento de los nutrientes y sobrevivir por más de 650 días (Smeulders *et al.*, 1999). Al parecer, esto es debido a la acumulación de energía de los compuestos almacenados y de la degradación de proteínas innecesarias y ARNm bacteriano (Siegele y Kolter, 1992). Lo anterior puede provocar una situación emergente en el cual las micobacterias tienen que responder al ambiente a través de los genes que regulen los cambios adecuados a las condiciones impuestas. De esta manera se propuso el modelo del presente estudio para observar la expresión del gen *esat-6* de *M. smegmatis* bajo restricción de nutrientes en HdB mínimo y modificado para limitar C, N y Pi.

En el presente estudio, es evidente que se da un proceso de adaptación de *M. smegmatis* hasta por 144 h en todos los medios de cultivo, excepto para las micobacterias crecidas por en HdB<Pi (Fig. 1). Algunas de las razones por las cuales se plantea la inestabilidad de la bacteria al cultivo, es su crecimiento continuo con respecto al cultivo en HdB mínimo ($P>0.05$) y su metabolismo inactivo al cambiar las micobacterias a un medio de cultivo fresco, en donde se observa la pérdida de la capacidad alcohol-ácido (Fig 2: a y b), resultados similares a los de Rifat *et al.* (2009) al restringir Pi en Medio 7H9 en el crecimiento de *M. tuberculosis*.

Esto hace suponer que bajo las condiciones propuestas, existe un estado de emergencia en el cual *M. smegmatis* puede tener diferentes formas de adaptación, en el que se comprometen diversas rutas de transducción mediante los cuales las

micobacterias detectan y dan una respuesta al medio. Tales rutas, pueden estar relacionados con la alarmona ppGpp que desencadena la respuesta estricta. Un mecanismo indispensable para la adaptación de las bacterias durante la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria (Artsimovitch *et al.*, 2004; Gralla, 2005; Costanzo y Ades, 2006). Al respecto, en *E. coli*, por carencia de aminoácidos, carbono, o Pi, se acompaña por el incremento de los niveles de ppGpp y se observan acumulaciones de polifosfatos (Ahn y Kornberg, 1998; Spira y Yagil, 1998).

Bajo las condiciones limitantes de Pi y un crecimiento sostenido muy cercano al HdB medio mínimo (Fig. 1), *M. smegmatis* aparentemente termina los recursos externos y las reservas de energía interna. Para evitar este desgaste de las reservas de energía se ha propuesto la respuesta estricta, que se caracteriza por la regulación de ppGpp, que incrementa la ciclopropanación (Eichel *et al.*, 1999), la inhibición y síntesis de los ácidos grasos y los fosfolípidos (Heath *et al.*, 1994).

Aunque la propuesta de la respuesta estricta está relacionada con la posibilidad de la estabilización del metabolismo para la adaptación de la micobacteria a las condiciones de estrés. Es decir, bajo condiciones de abundancia, los polifosfatos pueden servir como donadores de ADP, GDP y otras reacciones en las que se involucra la enzima Rel que actúa en la síntesis e hidrólisis de ppGpp (Dahl *et al.*, 2003; Sureka *et al.*, 2007). Pero cuando no hay suficientes reservas de Pi y las reservas de energía son mínimas, la respuesta estricta puede fallar para que *M. smegmatis* se adapte y entrar en un estado no cultivable.

Un incremento en los niveles de ppGpp y polifosfatos induce la transcripción de 150 genes involucrados en la disminución del crecimiento y el metabolismo (Hengge-Aronis *et al.*, 2002). Por lo contrario, lo encontrado en la presente investigación respecto a la limitación de Pi en HdB, es que se mantiene el crecimiento, similar al del medio HdB ($P < 0.05$) mínimo en el que no se restringe el Pi. Por otra parte, la expresión de gen *esat-6* en HdB<Pi que se dio a nivel de los ARNm (Fig: 3B), que es comparable a 7H9 y Sauton, aunque la proteína codificada por este gen, se secreta sólo en el medio Sauton (Converse y Cox, 2005), lo que falta por determinar es si bajo las condiciones de cultivo HdB<Pi se secreta la proteína ESAT-6. Esta proteína, también se ha propuesto como una ATPasa (Pallen *et al.*, 2002), que modifica las

propiedades del compartimiento del fagosoma donde reside *M. tuberculosis*, como lo evidenciado por la retención aberrante o a adquisición defectuosa de un rango de proteínas del hospedero, entre las que se incluyen las Rab GTPasas (Via *et al.*, 1997; Clemens *et al.*, 2000) y la protón-ATPasa de la vacuola (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994).

En *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, los polifosfatos regulan la síntesis de ppGpp a través del control de la transcripción de *relA* vía la ruta *mprA-sigE-relA* (Manganelli *et al.*, 2001; Sureka *et al.*, 2007). Existen otros sistemas de los dos componentes que pueden contribuir a la regulación de *relA*. Por lo que se plantea como perspectivas, estudios las relaciones entre los reguladores de la expresión de los genes que dependen de Pi. Entre ellos está SenX3-RegX3 y su relación con los genes que regulan el sistema ESX-1 y las proteínas de secreción en *M. smegmatis* (Glover *et al.*, 2007). Aunque existen algunas controversias en torno a MprAB, como segundo sistema de los dos componentes conocido por regular ESX-1. En cuanto a que Pang *et al.* (2013), confirman que en *M. tuberculosis*, *esat-6* no es regulado por MprAB bajo crecimiento en 7H9 normal. Por lo que se debe entender si *esat-6* de *M. smegmatis* es regulado por este sistema en condiciones limitantes de Pi. Al respecto, los estudios de Rifat *et al.* (2009), enfocados a la restricción de Pi, demuestran que no se expresa *esat-6* en *M. tuberculosis*. Aunque ellos restringieron el Pi en medio 7H9 con L-glutamato como fuente de nitrógeno orgánico, mientras que en este modelo se limita el Pi y la fuente de nitrógeno es inorgánico. Pang *et al.* (2013) también indican que al menos indirectamente hay una regulación del ESX-1 por PhoPR. Por lo que se propone investigar las relaciones entre la limitación de Pi y PhoPR, bajo el modelo propuesto en esta investigación.

CAPITULO 3. EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE *Mycobacterium smegmatis* Y SU ANTIGENICIDAD CON SUEROS DE TUBERCULOSIS BOVINA.

3.1. INTRODUCCIÓN

Los mecanismos de patogenicidad del complejo *Mycobacterium tuberculosis* se relacionan con su capacidad de sobrevivir en un ambiente hostil dentro de los macrófagos. Al estar atrapadas en el interior de las células del hospedero *M. tuberculosis* debe responder a las condiciones de carencia de nutrientes. Lo que implica que se inducen determinadas proteínas, las cuales dependen del tipo de nutriente que está limitado (ej. carbono, nitrógeno y fósforo) (Groat *et al.*, 1986; Siegele y Kolter, 1992). Por lo que algunos aspectos de la patogenicidad son una respuesta de supervivencia por el agotamiento de nutrientes (Siegele y Kolter, 1992). De la misma manera que la antigenicidad como se ha demostrado con la síntesis del antígeno b de 38 kDa que se induce bajo la carencia de fosfato, lo que indica que la proteína está involucrada en el metabolismo del fosfato en *M. tuberculosis* (Andersen *et al.*, 1990), con la consecuente generación de antígenos para el reconocimiento de las micobacterias invasoras.

Las funciones metabólicas que sirven para la adaptación a las condiciones cambiantes hacen que varíe la antigenicidad de las micobacterias patógenas (Brodin *et al.*, 2004). Por lo que las micobacterias avirulentas como *M. smegmatis*, en un esfuerzo por sobrevivir a las condiciones hostiles, pueden obtener una respuesta similar a *M. tuberculosis* con sus enzimas ortólogas en los hospederos aunque sin prosperar por largos periodos, por no estar adaptadas a esas condiciones. Al respecto, *M. smegmatis* induce una activación sostenida de la p38 de MAPKs (acrónimo en inglés: **Mitogen-Activated Protein Kinases**) y la ERK $\frac{1}{2}$ en los macrófagos derivados de la médula ósea de ratón (Derrick y Morris *et al.*, 2007; Ganguly *et al.*, 2007). Esta activación de MAPKs es necesaria para elevar los niveles de producción de TNF- α durante la infección de *M. smegmatis*, que no se presenta en el complejo *M. tuberculosis* (Roach y Schorey, 2002; Yadav *et al.*, 2004). En *M. tuberculosis*, dichas acciones permiten manipular la apoptosis a nivel de las

caspasas (Herbst *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Derrick y Morris, 2007). Así como translocarse del fagosoma al citosol (van der Wel *et al.*, 2007; MacGurn y Cox, 2007; Simeone *et al.*, 2012; De Leon *et al.*, 2012). La virulencia de *M. tuberculosis* le permite evadir el factor de necrosis tumoral-alfa de los macrófagos, que tiene una relación inversamente proporcional en las micobacterias apatógenas como *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* H37Ra y *M. bovis* BCG (Falcone *et al.*, 1994). Estas diferencias en *M. tuberculosis* son las que le permiten permanecer en el hospedero. Sin embargo, la actividad metabólica de las micobacterias como *M. smegmatis* es similar a las del complejo *M. tuberculosis*, por lo que están capacitadas para producir proteínas similares.

Los patrones de expresión de las proteínas se modifican como una respuesta al ambiente (Tobian *et al.*, 2003) y pueden ser el blanco de diagnóstico *in vivo*, al comportarse de manera similar en ambientes controlados *in vitro* (Gumber *et al.*, 2009). Por lo que en los estudios de las respuestas de adaptación al estrés, tanto en los medios de cultivo, como en el hospedero, son fundamentales la expresión de las proteínas y su antigenicidad. En consecuencia, se determinaron los grupos de proteínas de *M. smegmatis* que presentan reactividad cruzada con sueros de bovino positivos a tuberculosis.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

Preparación de los medios de cultivo. La cepa de *M. smegmatis* usada es la mc² 155, se cultivó en medio sólido 7H11 (Difco BD[®]) complementado con Tween 80 al 0.05% (v/v) y 0.2% de glicerol. Las placas se incubaron a una temperatura de 37° C, a partir de este medio se inoculó una sola colonia a un medio de cultivo líquido 7H9 (Difco BD), al cual se le adicionaron 0.05% (v/v) de Tween 80, 0.2% (v/v) de glicerol y se incubó a 37° C. El crecimiento se llevó a media fase logarítmica, con una densidad óptica de 0.6-0.8 (OD₆₀₀), (densitómetro Fisher Scientific). Posteriormente, se tomaron alícuotas de 100 µL para transferirlas a 150 mL de los medios de cultivo usados como controles positivos y los sometidos a prueba.

El medio de cultivo usado para la expresión de las proteínas fue 7H9 (Difco BD), suplementado con 0.5% de glicerol y 0.05% de Tween 80. La inoculación se efectuó

con 100 µl del cultivo inicial en frascos de 225 mL que contenían 150 mL, se incubaron a 37° C, con agitación a 250 rpm. Como control negativo, se usó la cepa *Escherichia coli* DH5 obtenida de Life Technologies (Gaithersbourg, MD) y se creció en medio LB.

Después de conocer el tiempo en el que establece la fase estacionaria y su adaptación, se llevaron a cabo los experimentos para extraer la proteína total y del sobrenadante. Por lo que los cultivos se crecieron hasta la fase estacionaria (96 h) En seguida, se obtiene el paquete celular por centrifugación a 4000 rpm/10 min, se transfirió a los medios cultivos frescos correspondientes y se incubaron durante 12 h, para obtener de nuevo el paquete celular por centrifugación, cada agregado se suspendió en HEPES a 10 mM y se sonicó en hielo 6 veces por un min con 30 seg de descanso. El material sonicado se centrifugó a 4000 rpm por 30 min y el lisado sobrenadante fue colectado. Antes de almacenar las proteínas extraídas se preparan con ácido etilendinitrilotetracético (EDTA) a una concentración final 10 mM y fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM, para su almacenaje final a -70° C. Mientras que las proteínas del sobrenadante se centrifugaron de nuevo por 4000 rpm 10 min y el sobrenadante se precipitó en alcohol absoluto 1:1, por 24 h en congelación a -70° C. Después se centrifugaron a 22000 rpm 1 h a 4° C para extraer las proteínas del sobrenadante. El concentrado de proteínas, se suspendió en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a la cual se le agregó EDTA para una concentración final de 10 mM y PMSF al 1 mM. La concentración de proteína se estimó mediante el método de Bradford (1976).

Inmunodetección por Western Blots. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12.5% (acrónimo en inglés: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), las muestras de proteína a cargar por pocilla (0.5 µg), se prepararon con β-mercaptoetanol 1 mM y un regulador de muestra (azul de bromofenol/pironina 2 mg, glicerol 25 g, SDS 2 g, Tris base 1.51 g, en 100 ml de H₂O bidestilada y se ajustó a un pH 6.8) se agregaron a una proporción 1:1; posteriormente se calentaron a 85° C por 5 min. Posteriormente las proteínas se separaron por electroforesis en el gel, una parte de los geles se tiñeron con azul Coomassie brillante R250 y la otra parte, se transfirieron en membranas de

nitrocelulosa (Bio-Rad[®]) (Reddy y Kumar, 2000). Las membranas de nitrocelulosas en las que se transfirieron las proteínas, se preincubaron en una solución de leche descremada al 5% (Difco BD[®]) que contenía en 0.05% de PBS-Tween 20 (PBS-T), por una hora a temperatura ambiente. En seguida se enjuagaron con PBS-T 3 veces x 10 min y se incubaron con 30 sueros de bovinos positivos a las pruebas Quantiferon[®], en la dilución apropiada (entre 1:100 a 1:200 dependiendo de la concentración del suero usado), durante la noche a 4^o C. Las membranas transferidas con los anticuerpos fijados, se lavaron 3 veces por 10 min en solución amortiguadora PBS-T. Posteriormente, las membranas se incubaron con proteína A conjugada a la peroxidasa durante 2 horas y se lavaron 3 veces, por 10 min, con PBS-T. Al final, la reacción antígeno-anticuerpo que se da en las membranas de nitrocelulosa es revelada por la reacción del peróxido de hidrógeno que reacciona con la peroxidasa conjugada a la proteína A, que se fija al Factor de complemento (Fc) de las IgG. Dicha reacción se efectúa en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.4, que contiene diaminobencidina, cloruro de níquel y cloruro de cobalto.

Diseño estadístico. Las mediciones para determinar la posición de los antígenos en los geles, así como el inmunomarcaje en las membranas de nitrocelulosa, se determinó por el programa para el análisis de imágenes ImageJ 1.43 (www.rsweb.nih.gov/ij/download.html). Se calculó la media y la desviación estándar de los datos obtenidos. Mientras que la diferencia entre los grupos se analizó por la *t* de Student y se consideró una *p* <0.05 como estadísticamente significativa.

Establecimiento de la homología de las proteínas. Para el establecimiento de la homología se consultó la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para hacer una lista de las proteínas de *M. smegmatis* equivalente a un rango que cubriera las proteínas resultantes del marcaje con los sueros positivos a tuberculosis en las pruebas de Western Blot. A partir de las secuencias se obtuvieron las proteínas y su grado de homología mediante el uso del Software en línea BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) que funciona con las bases de datos NCBI.

3.3. RESULTADOS

Inmunodetección por Western Blot. Los resultados de antigenicidad para las proteínas totales obtenidas del cultivo de *M. smegmatis* en medio 7H9, indican que de 30 sueros positivos a la prueba de Quantiferon[®], 17 marcaron las proteínas totales (PT) que se encuentran entre 34 a 43 kDa (ver Figura 1 Muestra 914tb y 3tb). Solo un suero de bovino positivo a tuberculosis marcó las proteínas antigénicas para el grupo de PT que estaban entre 72 a 95 kDa (ver Figura 9, muestra 3tb). Del total de sueros probados, 4 de ellos fueron positivos a la prueba Western Blot para las proteínas del sobrenadante (PS).

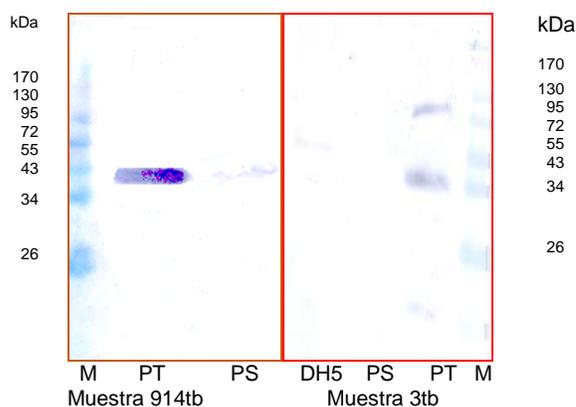


Figura 9. Muestra las proteínas fijadas en papel nitrocelulosa que reaccionaron con los anticuerpos de sueros de bovinos positivos a tuberculosis: en los márgenes se señala la masa molecular en kDa. Las imágenes muestran los resultados de dos de las muestras (914tb y 3tb). La letra “M” ubica el marcador; la sigla PT se refiere a proteínas totales; PS son las proteínas del sobrenadante.

Determinación de las proteínas ortólogas. Después de definir la posición de las proteínas antigénicas (rango entre 34-43 kDa) de *M. smegmatis* mc² 155, se buscaron entre las reportadas en la base de datos para *M. bovis* y se determinó la homología más cercana con base a la cobertura e identidad. Debido a que 4 de las respuestas de las PSs se localizan en la misma posición que las 17 de las PTs se escogieron sólo aquellas proteínas homólogas que aparecían en la membrana, pared celular y PSs de ambas micobacterias (Cuadro 2).

Cuadro 2. Proteínas de *M. smegmatis* que se encuentran entre un peso molecular de 34 a 43 kDa y que comparten un alto grado de homología con las proteínas de *M. bovis*

Clave de acceso en NCBI	Localización predicha en <i>M. smegmatis</i>	Tamaño/peso neto teórico para <i>M. smegmatis</i>	Proteína homóloga en <i>M. bovis</i>	Cobertura / identidad	Tamaño/peso neto teórico para <i>M. bovis</i>
AFP38530.1	Proteína secretada	337aa/36.49	WP_019283564.1	100% 69%	335aa/36.70
			WP_011799215.1	100% 68%	563aa/60.45
			WP_024456357.1	100% 71%	340aa/35.37
			YP_006566681.1	Sin dato	342aa/35.78
AFP38386.1 ABK72065.1	Proteína secret. Membrana	342aa/35.78 345aa/37.58	WP_024456357.1	99% 71%	340aa/35.37
			WP_023349802.1	98%/80%	369aa/39.54
AFP39187.1 A0R019.1	Membrana Pared celular	345aa/37.58 359aa/37.58	WP_031702634.1	98%/80%	369aa/39.56
			WP_031705617.1	98%/80%	369aa/39.54
			WP_024458607.1	100% 87%	359aa/37.58

3.4. DISCUSIÓN

La medición del grupo de proteínas en geles de una dimensión que dan reactividad cruzada con sueros positivos a tuberculosis, permite una aproximación para definir las proteínas de las micobacterias que causan reactividad cruzada con las del complejo *M. tuberculosis*. Cuando la intención es obtener resultados sobre los cambios metabólicos por efecto de la modificación del ambiente. Esto facilita la utilización de varios medios de cultivo a la vez, en los cuales se restrinjan los nutrientes o se utilicen diversas variables que provoquen estrés en las micobacterias. Lo anterior permite establecer relaciones entre las condiciones ambientales, las especies, géneros de los organismos, la actividad de determinadas proteínas durante el desarrollo de las distintas enfermedades.

Los falsos positivos que dan las pruebas de campo, se debe principalmente a las infecciones provocadas por otras micobacterias no tuberculosas. Por lo que para las pruebas iniciales que se usan para diagnosticar la tuberculosis bovina se basa en el derivado proteico purificado bovino (PPDb) que son extractos de proteínas totales de los cultivos de *M. bovis*. Pero se debe aplicar una segunda prueba, de tal modo que por comparación se aproxime con cierta veracidad al diagnóstico de la tuberculosis. El reactivo que se usa para esta prueba se fundamenta en el derivado proteico purificado (PPDa) aviar que se obtiene de los extractos de proteína de *M. avium*.

Respecto a los resultados de esta investigación, se ha determinado que las proteínas de *M. bovis* con mayor homología localizadas en la base de datos, coinciden con el antígeno 38 kDa. Esta es una proteína que se encuentra en los filtrados de los cultivos, tal como los resultados de este estudio en el que se encontró en las proteínas totales y del sobrenadante de los cultivos de *M. smegmatis*. El antígeno 38-kDa funciona como lipoproteína (Chan *et al.*, 1994). La clonación y secuenciación del gen que codifica la proteína 38-kDa en *E. coli*, reveló que el 30% de su secuencia se identifica con las proteínas de unión a fosfatos (PBP por sus siglas en inglés: Phosphate Binding Protein, también designada como PhoS o PstS) (Andersen y Hansen, 1989; Surin *et al.*, 1984; Magota *et al.*, 1984). Por lo que se involucre en el

metabolismo de los fosfatos (Andersen *et al.*, 1990). De la misma manera, se estableció que esta proteína funciona como PBP en *M. tuberculosis* y es un potente componente inmunógeno (Chan *et al.*, 1994).

El gen que codifica la proteína 38-kDa se identifica entre los genes de virulencia *virS*, y se involucra en el control de la patogenicidad. Se localiza cerca del gen *pknK*, aunque no es parte de ningún operón, pero sí influye en la transcripción del operón *mymA* (Singh *et al.*, 2003). Por lo que la eliminación del gen *virS* resulta en la alternación de la estructura de la pared celular (Singh *et al.*, 2005). Probablemente esto se deba a que el operón *mymA* codifica para siete cistrones que producen proteínas propuestas para la biosíntesis de los ácidos micólicos (Singh *et al.*, 2005). Cuando se expone al pH ácido la cepa natural *M. tuberculosis*, el operón *mymA* muestra 4 veces más inducción, lo que sugiere una función de las proteínas codificadas por este operón en la supervivencia del patógeno en condiciones de acidez severa de los macrófagos activados (Singh *et al.*, 2005).

Para una mejor protección anti-micobacteriana, se busca inducir niveles elevados de IFN- γ a partir de antígenos específicos que los generen (Ellner *et al.*, 2000). Característica que se encuentra en el antígeno 38-kDa que incrementa el promedio de producción de IFN- γ en los pacientes con tuberculosis cuando se combina con otros antígenos como 38 kDa/CFP-10 ($P < 0.012$) y 38 kDa/MPT-64 ($P < 0.035$), cuando se compara con uno solo (Tavares *et al.*, 2007).

En humanos, los títulos de anticuerpos más elevados se presenta contra los filtrados del antígeno de 38 kDa de *M. tuberculosis* son del 57% de un grupo de pacientes con tuberculosis pero no de los controles (Forget *et al.*, 1976). Las reacciones antígeno/anticuerpo contra la proteína 38-kDa se presentan con mayor frecuencia cuando la carga bacilar en el esputo está presente en los frotis de pacientes positivos a tuberculosis (36%, 8 de 22) que con los pacientes negativos al frotis de esputo para TB (16%; 4 de 24) (Lyashchenko *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que las combinaciones 38-kDa/CFP-10 predicen la sensibilidad para los pacientes con tuberculosis que es similar a la combinación de ESAT-6/CFP-

10 y su combinación es mejor que el uso de las proteínas solas y tiene una mayor reactividad selectiva entre los individuos positivos a las pruebas intradérmicas, lo que puede ser de interés para la evaluación diagnóstica de la tuberculosis (Tavares *et al.*, 2007).

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

Las conclusiones que aquí se plantean se relacionan con el agotamiento de nutrientes. Como el agotamiento del fósforo es uno de los factores de estrés para las micobacterias, si el sitio en el que crecen es limitado y la adaptación no se logra, usan otros recursos genéticos que les permitan adaptarse al permanecer aletargadas o escapar y como consecuencia invadir otras células. ESAT-6 de *M. tuberculosis* es una enzima que prepara las vías de escape al permeabilizar las membranas tanto de los de los macrófagos como de las mitocondrias (Pym *et al.*, 2003; Walin *et al.*, 2011). Además, confiere estabilidad bioquímica a la micobacteria y se ha propuesto como una enzima que facilita el intercambio de material genético (Meher *et al.*, 2006).

Las investigaciones sobre agotamiento de fósforo en las que no se expresa el gen *esat-6* (Rifat *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2013), se han hecho bajo condiciones distintas a las propuestas en esta tesis. Es decir, 7H9 y Sauton son medios de cultivo con fuentes orgánicas de nitrógeno, HdB no contiene fuentes de nitrógeno orgánico. Por lo que se concluye que el campo de investigación a desarrollar lo ya iniciado es promisorio cuando se usa este modelo.

Como la proteína ESAT-6 se expresó en el medio HdB<Pi, igualmente deben existir otras proteínas que se expresan bajo estas condiciones. La propuesta es desarrollar investigación sobre los patrones de proteínas que se expresan bajo estas condiciones. Porque las proteínas presentes en condiciones emergentes son las de mayor interés y pueden ser reconocidas por un hospedero cuando es invadido. Por otro lado, las proteínas que se expresan durante la adaptación, es poco probable que sean reconocidas por el hospedero. Porque el ordenamiento silencioso para dismantelar el crecimiento implica disminución de las proteínas de expansión por crecimiento, como de invasión/escape. La investigación preliminar enviada para su publicación sobre antigenicidad cruzada con proteínas en un medio estándar como lo es 7H9, es un intento de demostrar que algunas de las proteínas de *M. smegmatis* son antigénicas para los animales positivos a tuberculosis.

CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA

- GenBank of National Center for Biotechnology Information* [Online].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/tbl2asn/>. Available:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA57701> > [Accessed 10/02/2014].
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
Unidad Irapuato. CINVESTAV-Irapuato.
- Aagaard C., Govaerts M., Meikle V., Vallecillo A.J., Gutierrez-Pabello J.A., Suarez-Guemes F., *et al.* 2006. Optimizing antigen cocktails for detection of *Mycobacterium bovis* in herds with different prevalences of bovine tuberculosis: ESAT6-CFP10 mixture shows optimal sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol*, 44, 4326-35.
- Aagaard C.S., Hoang T.T., Vingsbo-Lundberg C., Dietrich J. and Andersen P. 2009. Quality and vaccine efficacy of CD4+ T cell responses directed to dominant and subdominant epitopes in ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 183, 2659-68.
- Aaron L., Saadoun D., Calatroni I., Launay O., Memain N., Vincent V., *et al.* 2004. Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review. *Clin Microbiol Infect*, 10, 388-98.
- Abramovitch R.B., Rohde K.H., Hsu F.F. and Russell D.G. 2011. aprABC: a *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome. *Mol Microbiol*, 80, 678-94.
- Aguilar D., Infante E., Martin C., Gormley E., Gicquel B. and Hernandez Pando R. 2007. Immunological responses and protective immunity against tuberculosis conferred by vaccination of Balb/C mice with the attenuated *Mycobacterium tuberculosis* (phoP) SO2 strain. *Clin Exp Immunol*, 147, 330-8.
- Ahn K. and Kornberg A. 1990. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *J Biol Chem*, 265, 11734-9.
- Aiba H., Fujimoto S. and Ozaki N. 1982. Molecular cloning and nucleotide sequencing of the gene for *E. coli* cAMP receptor protein. *Nucleic Acids Res*, 10, 1345-61.
- Akira S., Uematsu S. and Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- Akiyama Y. and Ito K. 1987. Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. *Embo J*, 6, 3465-70.
- Alder N.N. and Johnson A.E. 2004. Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 279, 22787-90.
- Alder N.N., Shen Y., Brodsky J.L., Hendershot L.M. and Johnson A.E. 2005. The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 168, 389-99.
- Alderson M.R., Bement T., Day C.H., Zhu L., Molesh D., Skeiky Y.A., *et al.* 2000. Expression cloning of an immunodominant family of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using human CD4(+) T cells. *J Exp Med*, 191, 551-60.

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman DJ. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 215:403-40.
- Alvarez-Peral F.J., Zaragoza O., Pedreno Y. and Arguelles J.C. 2002. Protective role of trehalose during severe oxidative stress caused by hydrogen peroxide and the adaptive oxidative stress response in *Candida albicans*. *Microbiology*, 148, 2599-606.
- Andersen A.B., Andersen P. and Ljungqvist L. 1992. Structure and function of a 40,000-molecular-weight protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 60, 2317-23.
- Andersen A.B., Ljungqvist L. and Olsen M. 1990. Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. *J Gen Microbiol*, 136, 477-80.
- Andersen P., Andersen A.B., Sorensen A.L. and Nagai S. 1995. Recall of long-lived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol*, 154, 3359-72.
- Appelberg R., Leal I.S., Pais T.F., Pedrosa J. and Florido M. 2000. Differences in resistance of C57BL/6 and C57BL/10 mice to infection by *Mycobacterium avium* are independent of gamma interferon. *Infect Immun*, 68, 19-23.
- Aranaz A., Cousins D., Mateos A. and Dominguez L. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al.* 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53, 1785-9.
- Archambaud C., Nahori M.A., Pizarro-Cerda J., Cossart P. and Dussurget O. 2006. Control of *Listeria* superoxide dismutase by phosphorylation. *J Biol Chem*, 281, 31812-22.
- Arend S.M., de Haas P., Leyten E., Rosenkrands I., Rigouts L., Andersen P., *et al.* 2005. ESAT-6 and CFP-10 in clinical versus environmental isolates of *Mycobacterium kansasii*. *J Infect Dis*, 191, 1301-10.
- Arend S.M., Engelhard A.C., Groot G., de Boer K., Andersen P., Ottenhoff T.H., *et al.* 2001. Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8, 1089-96.
- Arend S.M., Geluk A., van Meijgaarden K.E., van Dissel J.T., Theisen M., Andersen P., *et al.* 2000. Antigenic equivalence of human T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. *Infect Immun*, 68, 3314-21.
- Arend S.M., van Meijgaarden K.E., de Boer K., de Palou E.C., van Soolingen D., Ottenhoff T.H., *et al.* 2002. Tuberculin skin testing and in vitro T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with *Mycobacterium marinum* or *M. kansasii*. *J Infect Dis*, 186, 1797-807.
- Arkowitz R.A. and Wickner W. 1994. SecD and SecE are required for the proton electrochemical gradient stimulation of preprotein translocation. *Embo J*, 13, 954-63.

- Armstrong J.A. and Hart P.D. 1971. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med*, 134, 713-40.
- Artsimovitch I., Patlan V., Sekine S., Vassylyeva M.N., Hosaka T., Ochi K., *et al.* 2004. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell*, 117, 299-310.
- Aziz M.A. and Wright A. 2005. The World Health Organization/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Global Project on Surveillance for Anti-Tuberculosis Drug Resistance: a model for other infectious diseases. *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 4, S258-62.
- Bachman M.A. and Swanson M.S. 2001. RpoS co-operates with other factors to induce *Legionella pneumophila* virulence in the stationary phase. *Mol Microbiol*, 40, 1201-14.
- Bannantine J.P., Paustian M.L., Waters W.R., Stabel J.R., Palmer M.V., Li L., *et al.* 2008. Profiling bovine antibody responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection by using protein arrays. *Infect Immun*, 76, 739-49.
- Banu S., Honore N., Saint-Joanis B., Philpott D., Prevost M.C. and Cole S.T. 2002. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Mol Microbiol*, 44, 9-19.
- Barrett J.F., Goldschmidt R.M., Lawrence L.E., Foleno B., Chen R., Demers J.P., *et al.* 1998. Antibacterial agents that inhibit two-component signal transduction systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5317-22.
- Barry C.E., Crick D.C. and McNeil M.R. 2007. Targeting the formation of the cell wall core of *M. tuberculosis*. *Infect Disord Drug Targets*, 7, 182-202.
- Barry C.E., 3rd, Lee R.E., Mdluli K., Sampson A.E., Schroeder B.G., Slayden R.A., *et al.* 1998. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res*, 37, 143-79.
- Bartholomew G.W. and Alexander M. 1979. Microbial metabolism of carbon monoxide in culture and in soil. *Appl Environ Microbiol*, 37, 932-7.
- Behr M.A., Wilson M.A., Gill W.P., Salamon H., Schoolnik G.K., Rane S., *et al.* 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science*, 284, 1520-3.
- Benoit S., Abaibou H. and Mandrand-Berthelot M.A. 1998. Topological analysis of the aerobic membrane-bound formate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 180, 6625-34.
- Bensing B.A., Gibson B.W. and Sullam P.M. 2004. The *Streptococcus gordonii* platelet binding protein GspB undergoes glycosylation independently of export. *J Bacteriol*, 186, 638-45.
- Berks B.C., Sargent F. and Palmer T. 2000. The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol*, 35, 260-74.
- Berthet F.X., Rasmussen P.B., Rosenkrands I., Andersen P. and Gicquel B. 1998. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology*, 144 (Pt 11), 3195-203.

- Betts J.C., Dodson P., Quan S., Lewis A.P., Thomas P.J., Duncan K., *et al.* 2000. Comparison of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv with clinical isolate CDC 1551. *Microbiology*, 146 Pt 12, 3205-16.
- Betts J.C., Lukey P.T., Robb L.C., McAdam R.A. and Duncan K. 2002. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol*, 43, 717-31.
- Bhatt A., Green R., Coles R., Condon M. and Connell N.D. 1998. A mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in dipeptide transport. *J Bacteriol*, 180, 6773-5.
- Biketov S., Mukamolova G.V., Potapov V., Gilenkov E., Vostroknutova G., Kell D.B., *et al.* 2000. Culturability of *Mycobacterium tuberculosis* cells isolated from murine macrophages: a bacterial growth factor promotes recovery. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 29, 233-40.
- Blaser M.J. and Kirschner D. 2007. The equilibria that allow bacterial persistence in human hosts. *Nature*, 449, 843-9.
- Blobel G. and Dobberstein B. 1975. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol*, 67, 835-51.
- Blobel G. and Dobberstein B. 1975. Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol*, 67, 852-62.
- Bloom B.R. 2010. Support for global health. *Science*, 328, 791.
- Bock K., Schuster-Kolbe J., Altman E., Allmaier G., Stahl B., Christian R., *et al.* 1994. Primary structure of the O-glycosidically linked glycan chain of the crystalline surface layer glycoprotein of *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* L111-69. Galactosyl tyrosine as a novel linkage unit. *J Biol Chem*, 269, 7137-44.
- Boesen H., Jensen B.N., Wilcke T. and Andersen P. 1995. Human T-cell responses to secreted antigen fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 63, 1491-7.
- Bogsch E., Brink S. and Robinson C. 1997. Pathway specificity for a delta pH-dependent precursor thylakoid lumen protein is governed by a 'Sec-avoidance' motif in the transfer peptide and a 'Sec-incompatible' mature protein. *Embo J*, 16, 3851-9.
- Boon C. and Dick T. 2002. *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy. *J Bacteriol*, 184, 6760-7.
- Boshoff H.I., Myers T.G., Copp B.R., McNeil M.R., Wilson M.A. and Barry C.E., 3rd 2004. The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action. *J Biol Chem*, 279, 40174-84.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- Braunstein M., Brown A.M., Kurtz S. and Jacobs W.R., Jr. 2001. Two nonredundant SecA homologues function in mycobacteria. *J Bacteriol*, 183, 6979-90.

- Braunstein M., Espinosa B.J., Chan J., Belisle J.T. and Jacobs W.R., Jr. 2003. SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 48, 453-64.
- Braunstein M., Griffin T.I., Kriakov J.I., Friedman S.T., Grindley N.D. and Jacobs W.R., Jr. 2000. Identification of genes encoding exported *Mycobacterium tuberculosis* proteins using a Tn552'phoA in vitro transposition system. *J Bacteriol*, 182, 2732-40.
- Brennan M.J., Delogu G., Chen Y., Bardarov S., Kriakov J., Alavi M., et al. 2001. Evidence that mycobacterial PE_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect Immun*, 69, 7326-33.
- Brennan R.G. 1993. The winged-helix DNA-binding motif: another helix-turn-helix takeoff. *Cell*, 74, 773-6.
- Briggs M.S., Cornell D.G., Dluhy R.A. and Gierasch L.M. 1986. Conformations of signal peptides induced by lipids suggest initial steps in protein export. *Science*, 233, 206-8.
- Brightbill H.D., Libraty D.H., Krutzik S.R., Yang R.B., Belisle J.T., Bleharski J.R., et al. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, 285, 732-6.
- Briken V. and Miller J.L. 2008. Living on the edge: inhibition of host cell apoptosis by *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol*, 3, 415-22.
- Briken V., Porcelli S.A., Besra G.S. and Kremer L. 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol*, 53, 391-403.
- Brodin P., Rosenkrands I., Andersen P., Cole S.T. and Brosch R. 2004a. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol*, 12, 500-8.
- Brodin P., Majlessi L., Brosch R., Smith D., Bancroft G., Clark S., et al. 2004b. Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant *Mycobacterium microti* vaccine that induces T cell immunity against region of difference 1 antigens. *J Infect Dis*, 190, 115-22.
- Brodin P., Majlessi L., Marsollier L., de Jonge M.I., Bottai D., Demangel C., et al. 2006. Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infect Immun*, 74, 88-98.
- Brosch R., Gordon S.V., Buchrieser C., Pym A.S., Garnier T. and Cole S.T. 2000. Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. *Yeast*, 17, 111-23.
- Brosch R., Gordon S.V., Garnier T., Eiglmeier K., Frigui W., Valenti P., et al. 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 5596-601.
- Brown J.A., Stone M.M. and Sutherland I. 1968. B.C.G. vaccination of children against leprosy in Uganda: results at end of second follow-up. *Br Med J*, 1, 24-7.
- Brozna J.P., Horan M., Rademacher J.M., Pabst K.M. and Pabst M.J. 1991. Monocyte responses to sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*: inhibition of priming for enhanced release of superoxide, associated with increased

- secretion of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha, and altered protein phosphorylation. *Infect Immun*, 59, 2542-8.
- Brundage L., Fimmel C.J., Mizushima S. and Wickner W. 1992. SecY, SecE, and band 1 form the membrane-embedded domain of *Escherichia coli* preprotein translocase. *J Biol Chem*, 267, 4166-70.
- Bulieris P.V., Behrens S., Holst O. and Kleinschmidt J.H. 2003. Folding and insertion of the outer membrane protein OmpA is assisted by the chaperone Skp and by lipopolysaccharide. *J Biol Chem*, 278, 9092-9.
- Burts M.L., Williams W.A., DeBord K. and Missiakas D.M. 2005. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 1169-74.
- Busch D.H., Pilip I.M., Vijn S. and Pamer E.G. 1998. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity*, 8, 353-62.
- Caccamo N., Barera A., Di Sano C., Meraviglia S., Ivanyi J., Hudecz F., *et al.* 2003. Cytokine profile, HLA restriction and TCR sequence analysis of human CD4+ T clones specific for an immunodominant epitope of *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa protein. *Clin Exp Immunol*, 133, 260-266.
- Caccamo N., Meraviglia S., La Mendola C., Bosze S., Hudecz F., Ivanyi J., *et al.* 2004. Characterization of HLA-DR- and TCR-binding residues of an immunodominant and genetically permissive peptide of the 16-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol*, 34, 2220-9.
- Camacho L.R., Ensergueix D., Perez E., Gicquel B. and Guilhot C. 1999. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol*, 34, 257-67.
- Capuano S.V., 3rd, Croix D.A., Pawar S., Zinovik A., Myers A., Lin P.L., *et al.* 2003. Experimental *Mycobacterium tuberculosis* infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human *M. tuberculosis* infection. *Infect Immun*, 71, 5831-44.
- Carlsson F., Kim J., Dumitru C., Barck K.H., Carano R.A., Sun M., *et al.* 2010. Host-detrimental role of Esx-1-mediated inflammasome activation in mycobacterial infection. *PLoS Pathog*, 6, e1000895.
- Castric P. 1995. *pilO*, a gene required for glycosylation of *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin. *Microbiology*, 141 (Pt 5), 1247-54.
- Champion P.A., Stanley S.A., Champion M.M., Brown E.J. and Cox J.S. 2006. C-terminal signal sequence promotes virulence factor secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, 313, 1632-6.
- Chan E.D., Chan J. and Schluger N.W. 2001. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 25, 606-12.
- Chan J. and Flynn J. 2004. The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clin Immunol*, 110, 2-12.
- Chan J., Xing Y., Magliozzo R.S. and Bloom B.R. 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med*, 175, 1111-22.

- Chang D.E., Smalley D.J. and Conway T. 2002. Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. *Mol Microbiol*, 45, 289-306.
- Chattopadhyay P.K., Lai J.S. and Wu H.C. 1979. Incorporation of phosphatidylglycerol into murein lipoprotein in intact cells of *Salmonella typhimurium* by phospholipid vesicle fusion. *J Bacteriol*, 137, 309-12.
- Chattopadhyay P.K. and Wu H.C. 1977. Biosynthesis of the covalently linked diglyceride in murein lipoprotein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5318-22.
- Chen J., DeVivo M., Dingus J., Harry A., Li J., Sui J., *et al.* 1995. A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits. *Science*, 268, 1166-9.
- Chen L., Wu L.Y., Wang Y., Zhang S. and Zhang X.S. 2006. Revealing divergent evolution, identifying circular permutations and detecting active-sites by protein structure comparison. *BMC Struct Biol*, 6, 18.
- Chen P., Ruiz R.E., Li Q., Silver R.F. and Bishai W.R. 2000. Construction and characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the alternate sigma factor gene, sigF. *Infect Immun*, 68, 5575-80.
- Chen Q. and Haddad G.G. 2004. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. *J Exp Biol*, 207, 3125-9.
- Chen Q., Wu H. and Fives-Taylor P.M. 2004. Investigating the role of secA2 in secretion and glycosylation of a fimbrial adhesin in *Streptococcus parasanguis* FW213. *Mol Microbiol*, 53, 843-56.
- Chua N.H., Blobel G., Siekevitz P. and Palade G.E. 1973. Attachment of chloroplast polysomes to thylakoid membranes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70, 1554-8.
- Clemens D.L., Lee B.Y. and Horwitz M.A. 2000. Deviant expression of Rab5 on phagosomes containing the intracellular pathogens *Mycobacterium tuberculosis* and *Legionella pneumophila* is associated with altered phagosomal fate. *Infect Immun*, 68, 2671-84.
- Cohen-Gonsaud M., Keep N.H., Davies A.P., Ward J., Henderson B. and Labesse G. 2004. Resuscitation-promoting factors possess a lysozyme-like domain. *Trends Biochem Sci*, 29, 7-10.
- Cole P. 1975. Activation of mouse peritoneal cells to kill *Listeria monocytogenes* by T-lymphocyte products. *Infect Immun*, 12, 36-41.
- Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., *et al.* 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393, 537-44.
- Cole S.T., Eiglmeier K., Parkhill J., James K.D., Thomson N.R., Wheeler P.R., *et al.* 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 409, 1007-11.
- Coler R.N., Campos-Neto A., Ovendale P., Day F.H., Fling S.P., Zhu L., *et al.* 2001. Vaccination with the T cell antigen Mtb 8.4 protects against challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 166, 6227-35.
- Coler R.N., Skeiky Y.A., Ovendale P.J., Vedvick T.S., Gervassi L., Guderian J., *et al.* 2000. Cloning of a *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding a purified

- protein derivative protein that elicits strong tuberculosis-specific delayed-type hypersensitivity. *J Infect Dis*, 182, 224-33.
- Colijn C., Cohen T. and Murray M. 2007. Emergent heterogeneity in declining tuberculosis epidemics. *J Theor Biol*, 247, 765-74.
- Converse S.E. and Cox J.S. 2005. A protein secretion pathway critical for *Mycobacterium tuberculosis* virulence is conserved and functional in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*, 187, 1238-45.
- Cooper D.M. 2003. Regulation and organization of adenyl cyclases and cAMP. *Biochem J*, 375, 517-29.
- Corbett E.L., Watt C.J., Walker N., Maher D., Williams B.G., Raviglione M.C., *et al.* 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med*, 163, 1009-21.
- Cosivi O., Grange J.M., Daborn C.J., Raviglione M.C., Fujikura T., Cousins D., *et al.* 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis*, 4, 59-70.
- Costanzo A. and Ades S.E. 2006. Growth phase-dependent regulation of the extracytoplasmic stress factor, sigmaE, by guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp). *J Bacteriol*, 188, 4627-34.
- Cox J.S., Chen B., McNeil M. and Jacobs W.R., Jr. 1999. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature*, 402, 79-83.
- Cox R.A. and Garcia M.J. 2013. Adaptation of mycobacteria to growth conditions: a theoretical analysis of changes in gene expression revealed by microarrays. *PLoS One*, 8, e59883.
- Crawford E.W., Jr. and Shimkets L.J. 2000. The *Myxococcus xanthus* *socE* and *csgA* genes are regulated by the stringent response. *Mol Microbiol*, 37, 788-99.
- Cristobal S., de Gier J.W., Nielsen H. and von Heijne G. 1999. Competition between Sec- and TAT-dependent protein translocation in *Escherichia coli*. *Embo J*, 18, 2982-90.
- Crowle A.J. and May M. 1981. Preliminary demonstration of human tuberculoimmunity in vitro. *Infect Immun*, 31, 453-64.
- Cunningham A.F. and Spreadbury C.L. 1998. Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol*, 180, 801-8.
- Cunningham K., Lill R., Crooke E., Rice M., Moore K., Wickner W., *et al.* 1989. SecA protein, a peripheral protein of the *Escherichia coli* plasma membrane, is essential for the functional binding and translocation of proOmpA. *Embo J*, 8, 955-9.
- Dahl J.L., Kraus C.N., Boshoff H.I., Doan B., Foley K., Avarbock D., *et al.* 2003. The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10026-31.
- Dalton D.K., Haynes L., Chu C.Q., Swain S.L. and Wittmer S. 2000. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J Exp Med*, 192, 117-22.

- Danelishvili L., McGarvey J., Li Y.J. and Bermudez L.E. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cell Microbiol*, 5, 649-60.
- Danelishvili L., Yamazaki Y., Selker J. and Bermudez L.E. 2010. Secreted *Mycobacterium tuberculosis* Rv3654c and Rv3655c proteins participate in the suppression of macrophage apoptosis. *PLoS One*, 5, e10474.
- Daniel N.N. and Korsmeyer S.J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell*, 116, 205-19.
- Daniel J., Deb C., Dubey V.S., Sirakova T.D., Abomoelak B., Morbidoni H.R., *et al.* 2004. Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. *J Bacteriol*, 186, 5017-30.
- Dao D.N., Kremer L., Guerardel Y., Molano A., Jacobs W.R., Jr., Porcelli S.A., *et al.* 2004. *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect Immun*, 72, 2067-74.
- Darwin K.H., Ehrt S., Gutierrez-Ramos J.C., Weich N. and Nathan C.F. 2003. The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. *Science*, 302, 1963-6.
- De Bruyn J., Weckx M. and Beumer-Jochmans M.P. 1981. Effect of zinc deficiency on *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* (BCG). *J Gen Microbiol*, 124, 353-7.
- De Cock H., Schafer U., Potgeter M., Demel R., Muller M. and Tommassen J. 1999. Affinity of the periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* for phospholipids, lipopolysaccharides and non-native outer membrane proteins. Role of Skp in the biogenesis of outer membrane protein. *Eur J Biochem*, 259, 96-103.
- de Jonge M.I., Pehau-Arnaudet G., Fretz M.M., Romain F., Bottai D., Brodin P., *et al.* 2007. ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *J Bacteriol*, 189, 6028-34.
- De Leon J., Jiang G., Ma Y., Rubin E., Fortune S. and Sun J. 2012. *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 exhibits a unique membrane-interacting activity that is not found in its ortholog from non-pathogenic *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem*, 287, 44184-91.
- De Smet K.A., Weston A., Brown I.N., Young D.B. and Robertson B.D. 2000. Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology*, 146 (Pt 1), 199-208.
- Deckwerth T.L., Elliott J.L., Knudson C.M., Johnson E.M., Jr., Snider W.D. and Korsmeyer S.J. 1996. BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron*, 17, 401-11.
- Del Portillo P., Murillo L.A. and Patarroyo M.E. 1991. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol*, 29, 2163-8.
- Delogu G., Pusceddu C., Bua A., Fadda G., Brennan M.J. and Zanetti S. 2004. Rv1818c-encoded PE_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure. *Mol Microbiol*, 52, 725-33.
- Demangel C., Brodin P., Cockle P.J., Brosch R., Majlessi L., Leclerc C., *et al.* 2004. Cell envelope protein PPE68 contributes to *Mycobacterium tuberculosis* RD1

- immunogenicity independently of a 10-kilodalton culture filtrate protein and ESAT-6. *Infect Immun*, 72, 2170-6.
- Demissie A., Leyten E.M., Abebe M., Wassie L., Aseffa A., Abate G., *et al.* 2006. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol*, 13, 179-86.
- Demissie A., Wassie L., Abebe M., Aseffa A., Rook G., Zumla A., *et al.* 2006. The 6-kilodalton early secreted antigenic target-responsive, asymptomatic contacts of tuberculosis patients express elevated levels of interleukin-4 and reduced levels of gamma interferon. *Infect Immun*, 74, 2817-22.
- Denneny J.M. and Winder F.G. 1956. Phosphorus metabolism of Mycobacteria: determination of phosphorus compounds in some Mycobacteria. *J Gen Microbiol*, 15, 1-18.
- Derrick S.C. and Morris S.L. 2007. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. *Cell Microbiol*, 9, 1547-55.
- Deutscher M.P. 2006. Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res*, 34, 659-66.
- Dev I.K. and Ray P.H. 1984. Rapid assay and purification of a unique signal peptidase that processes the prolipoprotein from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem*, 259, 11114-20.
- Dewan P.K., Grinsdale J. and Kawamura L.M. 2007. Low sensitivity of a whole-blood interferon-gamma release assay for detection of active tuberculosis. *Clin Infect Dis*, 44, 69-73.
- Dhillon J., Lowrie D.B. and Mitchison D.A. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* from chronic murine infections that grows in liquid but not on solid medium. *BMC Infect Dis*, 4, 51.
- Dick T., Lee B.H. and Murugasu-Oei B. 1998. Oxygen depletion induced dormancy in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett*, 163, 159-64.
- Dietrich J., Andersen C., Rappuoli R., Doherty T.M., Jensen C.G. and Andersen P. 2006. Mucosal administration of Ag85B-ESAT-6 protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior bacillus Calmette-Guerin immunity. *J Immunol*, 177, 6353-60.
- Dietrich J. and Doherty T.M. 2009. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with the host: consequences for vaccine development. *Apmis*, 117, 440-57.
- Divangahi M., Chen M., Gan H., Desjardins D., Hickman T.T., Lee D.M., *et al.* 2009. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nat Immunol*, 10, 899-906.
- Dobos K.M., Khoo K.H., Swiderek K.M., Brennan P.J. and Belisle J.T. 1996. Definition of the full extent of glycosylation of the 45-kilodalton glycoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 178, 2498-506.
- Dockrell D.H., Lee M., Lynch D.H. and Read R.C. 2001. Immune-mediated phagocytosis and killing of *Streptococcus pneumoniae* are associated with direct and bystander macrophage apoptosis. *J Infect Dis*, 184, 713-22.
- Douvas G.S., Looker D.L., Vatter A.E. and Crowle A.J. 1985. Gamma interferon activates human macrophages to become tumoricidal and leishmanicidal but

- enhances replication of macrophage-associated mycobacteria. *Infect Immun*, 50, 1-8.
- Dowdy S., Weardon S. and D. C. 2004. Student's t Distribution *In: Dowdy, S., Weardon, S. and D., C. (eds.) Statistics for research*. Third ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Downing K.J., Mischenko V.V., Shleeva M.O., Young D.I., Young M., Kaprelyants A.S., *et al.* 2005. Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five rpf-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro. *Infect Immun*, 73, 3038-43.
- Driessen A.J. 1992. Precursor protein translocation by the *Escherichia coli* translocase is directed by the protonmotive force. *Embo J*, 11, 847-53.
- Driessen A.J. and Wickner W. 1991. Proton transfer is rate-limiting for translocation of precursor proteins by the *Escherichia coli* translocase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 2471-5.
- Dubnau E., Chan J., Raynaud C., Mohan V.P., Laneelle M.A., Yu K., *et al.* 2000. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol Microbiol*, 36, 630-7.
- Duong F. and Wickner W. 1997. Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *Embo J*, 16, 2756-68.
- Duong F. and Wickner W. 1997. The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *Embo J*, 16, 4871-9.
- Dye C. and Williams B.G. 2010. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science*, 328, 856-61.
- Economou A. 1998. Bacterial preprotein translocase: mechanism and conformational dynamics of a processive enzyme. *Mol Microbiol*, 27, 511-8.
- Economou A., Christie P.J., Fernandez R.C., Palmer T., Plano G.V. and Pugsley A.P. 2006. Secretion by numbers: Protein traffic in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 62, 308-19.
- Edwards K.M., Cynamon M.H., Voladri R.K., Hager C.C., DeStefano M.S., Tham K.T., *et al.* 2001. Iron-cofactored superoxide dismutase inhibits host responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 164, 2213-9.
- Eichel J., Chang Y.Y., Riesenber D. and Cronan J.E., Jr. 1999. Effect of ppGpp on *Escherichia coli* cyclopropane fatty acid synthesis is mediated through the RpoS sigma factor (sigmaS). *J Bacteriol*, 181, 572-6.
- Elhay M.J., Oettinger T. and Andersen P. 1998. Delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig. *Infect Immun*, 66, 3454-6.
- Ellner J.J., Hirsch C.S. and Whalen C.C. 2000. Correlates of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Clin Infect Dis*, 30 Suppl 3, S279-82.
- Elvang T., Christensen J.P., Billeskov R., Thi Kim Thanh Hoang T., Holst P., Thomsen A.R., *et al.* 2009. CD4 and CD8 T cell responses to the *M. tuberculosis* Ag85B-TB10.4 promoted by adjuvanted subunit, adenovector or heterologous prime boost vaccination. *PLoS ONE*, 4, e5139.

- Erickson P.R. and Herzberg M.C. 1993. Evidence for the covalent linkage of carbohydrate polymers to a glycoprotein from *Streptococcus sanguis*. *J Biol Chem*, 268, 23780-3.
- Ewann F., Jackson M., Pethe K., Cooper A., Mielcarek N., Ensergueix D., *et al.* 2002. Transient requirement of the PrrA-PrrB two-component system for early intracellular multiplication of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 70, 2256-63.
- Ewann F., Locht C. and Supply P. 2004. Intracellular autoregulation of the *Mycobacterium tuberculosis* PrrA response regulator. *Microbiology*, 150, 241-6.
- Fadok V.A., Bratton D.L. and Henson P.M. 2001. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest*, 108, 957-62.
- Falcone V., Bassey E.B., Toniolo A., Conaldi P.G. and Collins F.M. 1994. Differential release of tumor necrosis factor-alpha from murine peritoneal macrophages stimulated with virulent and avirulent species of mycobacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 8, 225-32.
- Fekkes P. and Driessen A.J. 1999. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63, 161-73.
- Ferrero R.L., Thiberge J.M., Kansau I., Wuscher N., Huerre M. and Labigne A. 1995. The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against mucosal infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 6499-503.
- Fine P.E. 1995. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*, 346, 1339-45.
- Finlay B.B. and Falkow S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61, 136-69.
- Fisher M.A., Plikaytis B.B. and Shinnick T.M. 2002. Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *J Bacteriol*, 184, 4025-32.
- Flesch I.E. and Kaufmann S.H. 1990. Stimulation of antibacterial macrophage activities by B-cell stimulatory factor 2 (interleukin-6). *Infect Immun*, 58, 269-71.
- Flint J.L., Kowalski J.C., Karnati P.K. and Derbyshire K.M. 2004. The RD1 virulence locus of *Mycobacterium tuberculosis* regulates DNA transfer in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 12598-603.
- Flogel U., Merx M.W., Godecke A., Decking U.K. and Schrader J. 2001. Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 735-40.
- Florido M., Goncalves A.S., Silva R.A., Ehlers S., Cooper A.M. and Appelberg R. 1999. Resistance of virulent *Mycobacterium avium* to gamma interferon-mediated antimicrobial activity suggests additional signals for induction of mycobacteriostasis. *Infect Immun*, 67, 3610-8.
- Florido M., Pearl J.E., Solache A., Borges M., Haynes L., Cooper A.M., *et al.* 2005. Gamma interferon-induced T-cell loss in virulent *Mycobacterium avium* infection. *Infect Immun*, 73, 3577-86.
- Flynn J.L., Goldstein M.M., Triebold K.J., Koller B. and Bloom B.R. 1992. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance

- to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 12013-7.
- Flynn J.L., Scanga C.A., Tanaka K.E. and Chan J. 1998. Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. *J Immunol*, 160, 1796-803.
- Fontan P.A., Voskuil M.I., Gomez M., Tan D., Pardini M., Manganelli R., *et al.* 2009. The *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor sigmaB is required for full response to cell envelope stress and hypoxia *in vitro*, but it is dispensable for *in vivo* growth. *J Bacteriol*, 191, 5628-33.
- Fortune S.M., Jaeger A., Sarracino D.A., Chase M.R., Sasseti C.M., Sherman D.R., *et al.* 2005. Mutually dependent secretion of proteins required for mycobacterial virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 10676-81.
- Fortune S.M., Solache A., Jaeger A., Hill P.J., Belisle J.T., Bloom B.R., *et al.* 2004. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol*, 172, 6272-80.
- Fox A., Fox K., Christensson B., Harrelson D. and Kraemer M. 1996. Absolute identification of muramic acid, at trace levels, in human septic synovial fluids *in vivo* and absence in aseptic fluids. *Infect Immun*, 64, 3911-5.
- Gan H., He X., Duan L., Mirabile-Levens E., Kornfeld H. and Remold H.G. 2005. Enhancement of antimycobacterial activity of macrophages by stabilization of inner mitochondrial membrane potential. *J Infect Dis*, 191, 1292-300.
- Gan H., Lee J., Ren F., Chen M., Kornfeld H. and Remold H.G. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence. *Nat Immunol*, 9, 1189-97.
- Gan K., Sankaran K., Williams M.G., Aldea M., Rudd K.E., Kushner S.R., *et al.* 1995. The *umpA* gene of *Escherichia coli* encodes phosphatidylglycerol:prolipoprotein diacylglycerol transferase (Igt) and regulates thymidylate synthase levels through translational coupling. *J Bacteriol*, 177, 1879-82.
- Ganguly N., Giang P.H., Basu S.K., Mir F.A., Siddiqui I. and Sharma P. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* 6-kDa early secreted antigenic target (ESAT-6) protein downregulates lipopolysaccharide induced c-myc expression by modulating the extracellular signal regulated kinases 1/2. *BMC Immunol*, 8, 24.
- Ganguly N., Giang P.H., Gupta C., Basu S.K., Siddiqui I., Salunke D.M., *et al.* 2008. *Mycobacterium tuberculosis* secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and the CFP10:ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide-induced NF-kappaB transactivation by downregulation of reactive oxidative species (ROS) production. *Immunol Cell Biol*, 86, 98-106.
- Gao L.Y., Guo S., McLaughlin B., Morisaki H., Engel J.N. and Brown E.J. 2004. A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol Microbiol*, 53, 1677-93.
- Gardner P.R., Costantino G. and Salzman A.L. 1998. Constitutive and adaptive detoxification of nitric oxide in *Escherichia coli*. Role of nitric-oxide dioxygenase in the protection of aconitase. *J Biol Chem*, 273, 26528-33.

- Garman R.D., Jacobs K.A., Clark S.C. and Raulet D.H. 1987. B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 7629-33.
- Garnier T., Eiglmeier K., Camus J.C., Medina N., Mansoor H., Pryor M., *et al.* 2003. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7877-82.
- Gatsos X., Perry A.J., Anwari K., Dolezal P., Woly nec P.P., Likic V.A., *et al.* 2008. Protein secretion and outer membrane assembly in Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 995-1009.
- Gebhard S., Humpel A., McLellan A.D. and Cook G.M. 2008. The alternative sigma factor SigF of *Mycobacterium smegmatis* is required for survival of heat shock, acidic pH and oxidative stress. *Microbiology*, 154, 2786-95.
- Geiman D.E., Kaushal D., Ko C., Tyagi S., Manabe Y.C., Schroeder B.G., *et al.* 2004. Attenuation of late-stage disease in mice infected by the *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the SigF alternate sigma factor and identification of SigF-dependent genes by microarray analysis. *Infect Immun*, 72, 1733-45.
- Gelber R.H., Mehra V., Bloom B., Murray L.P., Siu P., Tsang M., *et al.* 1994. Vaccination with pure *Mycobacterium leprae* proteins inhibits *M. leprae* multiplication in mouse footpads. *Infect Immun*, 62, 4250-5.
- Geller B.L. and Green H.M. 1989. Translocation of pro-OmpA across inner membrane vesicles of *Escherichia coli* occurs in two consecutive energetically distinct steps. *J Biol Chem*, 264, 16465-9.
- Geller B.L., Movva N.R. and Wickner W. 1986. Both ATP and the electrochemical potential are required for optimal assembly of pro-OmpA into *Escherichia coli* inner membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 4219-22.
- Geluk A., van Meijgaarden K.E., Franken K.L., Wieles B., Arend S.M., Faber W.R., *et al.* 2004. Immunological crossreactivity of the *Mycobacterium leprae* CFP-10 with its homologue in *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol*, 59, 66-70.
- Gentle I.E., Burri L. and Lithgow T. 2005. Molecular architecture and function of the Omp85 family of proteins. *Mol Microbiol*, 58, 1216-25.
- Gentry D.R., Hernandez V.J., Nguyen L.H., Jensen D.B. and Cashel M. 1993. Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *J Bacteriol*, 175, 7982-9.
- Gerwig G.J., de Waard P., Kamerling J.P., Vliegenthart J.F., Morgenstern E., Lamed R., *et al.* 1989. Novel O-linked carbohydrate chains in the cellulase complex (cellulosome) of *Clostridium thermocellum*. 3-O-Methyl-N-acetylglucosamine as a constituent of a glycoprotein. *J Biol Chem*, 264, 1027-35.
- Gey Van Pittius N.C., Gamiel dien J., Hide W., Brown G.D., Siezen R.J. and Beyers A.D. 2001. The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biol*, 2, RESEARCH0044.
- Gey van Pittius N.C., Sampson S.L., Lee H., Kim Y., van Helden P.D. and Warren R.M. 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.

- Gibbons H.S., Wolschendorf F., Abshire M., Niederweis M. and Braunstein M. 2007. Identification of two *Mycobacterium smegmatis* lipoproteins exported by a SecA2-dependent pathway. *J Bacteriol*, 189, 5090-100.
- Gilleron M., Nigou J., Nicolle D., Quesniaux V. and Puzo G. 2006. The acylation state of mycobacterial lipomannans modulates innate immunity response through toll-like receptor 2. *Chem Biol*, 13, 39-47.
- Gilmore R., Blobel G. and Walter P. 1982. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol*, 95, 463-9.
- Glickman M.S. 2003. The *mmaA2* gene of *Mycobacterium tuberculosis* encodes the distal cyclopropane synthase of the alpha-mycolic acid. *J Biol Chem*, 278, 7844-9.
- Glickman M.S., Cahill S.M. and Jacobs W.R., Jr. 2001. The *Mycobacterium tuberculosis* *cmaA2* gene encodes a mycolic acid trans-cyclopropane synthetase. *J Biol Chem*, 276, 2228-33.
- Glickman M.S., Cox J.S. and Jacobs W.R., Jr. 2000. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell*, 5, 717-27.
- Glover R.T., Kriakov J., Garforth S.J., Baughn A.D. and Jacobs W.R., Jr. 2007. The two-component regulatory system *senX3-regX3* regulates phosphate-dependent gene expression in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*, 189, 5495-503.
- Goerdts S. and Orfanos C.E. 1999. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity*, 10, 137-42.
- Gold B., Rodriguez G.M., Marras S.A., Pentecost M. and Smith I. 2001. The *Mycobacterium tuberculosis* *IdeR* is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. *Mol Microbiol*, 42, 851-65.
- Goletti D., Carrara S., Vincenti D., Saltini C., Rizzi E.B., Schinina V., *et al.* 2006. Accuracy of an immune diagnostic assay based on RD1 selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting: a pilot study. *Clin Microbiol Infect*, 12, 544-50.
- Gomez J.E. and Bishai W.R. 2000. *whmD* is an essential mycobacterial gene required for proper septation and cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8554-9.
- Gomez J.E. and McKinney J.D. 2004. *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis (Edinb)*, 84, 29-44.
- Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, 3, 23-35.
- Goren M.B., D'Arcy Hart P., Young M.R. and Armstrong J.A. 1976. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 2510-4.
- Gosset G., Zhang Z., Nayyar S., Cuevas W.A. and Saier M.H., Jr. 2004. Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 186, 3516-24.

- Gould T.A., van de Langemheen H., Munoz-Elias E.J., McKinney J.D. and Sacchettini J.C. 2006. Dual role of isocitrate lyase 1 in the glyoxylate and methylcitrate cycles in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 61, 940-7.
- Graham J.E. and Clark-Curtiss J.E. 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11554-9.
- Gralla J.D. 2005. *Escherichia coli* ribosomal RNA transcription: regulatory roles for ppGpp, NTPs, architectural proteins and a polymerase-binding protein. *Mol Microbiol*, 55, 973-7.
- Greenway D.L. and England R.R. 1999. The intrinsic resistance of *Escherichia coli* to various antimicrobial agents requires ppGpp and sigma s. *Lett Appl Microbiol*, 29, 323-6.
- Groat R.G., Schultz J.E., Zychlinsky E., Bockman A. and Martin A. 1986. Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J Bacteriol*, 168, 486-93.
- Grode L., Seiler P., Baumann S., Hess J., Brinkmann V., Nasser Eddine A., et al. 2005. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest*, 115, 2472-9.
- Grogan D.W. and Cronan J.E., Jr. 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61, 429-41.
- Guinn K.M., Hickey M.J., Mathur S.K., Zakel K.L., Grotzke J.E., Lewinsohn D.M., et al. 2004. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 51, 359-70.
- Gumber S., Taylor D.L., Marsh I.B. and Whittington R.J. 2009. Growth pattern and partial proteome of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* during the stress response to hypoxia and nutrient starvation. *Vet Microbiol*, 133, 344-57.
- Guo X.V., Monteleone M., Klotzsche M., Kamionka A., Hillen W., Braunstein M., et al. 2007. Silencing *Mycobacterium smegmatis* by using tetracycline repressors. *J Bacteriol*, 189, 4614-23.
- Guo Y.L., Seebacher T., Kurz U., Linder J.U. and Schultz J.E. 2001. Adenylyl cyclase Rv1625c of *Mycobacterium tuberculosis*: a progenitor of mammalian adenylyl cyclases. *Embo J*, 20, 3667-75.
- Gupta S.D., Dowhan W. and Wu H.C. 1991. Phosphatidylethanolamine is not essential for the N-acylation of apolipoprotein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 266, 9983-6.
- Haile Y., Bjune G. and Wiker H.G. 2002. Expression of the mceA, esat-6 and hspX genes in *Mycobacterium tuberculosis* and their responses to aerobic conditions and to restricted oxygen supply. *Microbiology*, 148, 3881-6.
- Halbig D., Wiegert T., Blaudeck N., Freudl R. and Sprenger G.A. 1999. The efficient export of NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase to the periplasm of *Zymomonas mobilis* depends both on an intact twin-arginine motif in the signal peptide and on the generation of a structural export signal induced by cofactor binding. *Eur J Biochem*, 263, 543-51.

- Hamman B.D., Hendershot L.M. and Johnson A.E. 1998. BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell*, 92, 747-58.
- Hampshire T., Soneji S., Bacon J., James B.W., Hinds J., Laing K., *et al.* 2004. Stationary phase gene expression of *Mycobacterium tuberculosis* following a progressive nutrient depletion: a model for persistent organisms? *Tuberculosis (Edinb)*, 84, 228-38.
- Hanada M., Nishiyama K.I., Mizushima S. and Tokuda H. 1994. Reconstitution of an efficient protein translocation machinery comprising SecA and the three membrane proteins, SecY, SecE, and SecG (p12). *J Biol Chem*, 269, 23625-31.
- Harper C., Hayward D., Wiid I. and van Helden P. 2008. Regulation of nitrogen metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*: a comparison with mechanisms in *Corynebacterium glutamicum* and *Streptomyces coelicolor*. *IUBMB Life*, 60, 643-50.
- Harth G., Clemens D.L. and Horwitz M.A. 1994. Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: extracellular release and characterization of its enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9342-6.
- Harth G. and Horwitz M.A. 1999. An inhibitor of exported *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase selectively blocks the growth of pathogenic mycobacteria in axenic culture and in human monocytes: extracellular proteins as potential novel drug targets. *J Exp Med*, 189, 1425-36.
- Harth G. and Horwitz M.A. 2003. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase as a novel antibiotic strategy against tuberculosis: demonstration of efficacy in vivo. *Infect Immun*, 71, 456-64.
- Harth G., Lee B.Y., Wang J., Clemens D.L. and Horwitz M.A. 1996. Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 64, 3038-47.
- Harth G., Zamecnik P.C., Tang J.Y., Tabatadze D. and Horwitz M.A. 2000. Treatment of *Mycobacterium tuberculosis* with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 418-23.
- Hartmann E., Gorlich D., Kostka S., Otto A., Kraft R., Knespel S., *et al.* 1993. A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Eur J Biochem*, 214, 375-81.
- Hausladen A., Gow A. and Stamler J.S. 2001. Flavohemoglobin denitrosylase catalyzes the reaction of a nitroxyl equivalent with molecular oxygen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10108-12.
- Hayashi D., Takii T., Fujiwara N., Fujita Y., Yano I., Yamamoto S., *et al.* 2009. Comparable studies of immunostimulating activities in vitro among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) substrains. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 56, 116-28.

- Haydel S.E., Benjamin W.H., Jr., Dunlap N.E. and Clark-Curtiss J.E. 2002. Expression, autoregulation, and DNA binding properties of the *Mycobacterium tuberculosis* TrcR response regulator. *J Bacteriol*, 184, 2192-203.
- Haydel S.E. and Clark-Curtiss J.E. 2006. The *Mycobacterium tuberculosis* TrcR response regulator represses transcription of the intracellularly expressed Rv1057 gene, encoding a seven-bladed beta-propeller. *J Bacteriol*, 188, 150-9.
- He H. and Zahrt T.C. 2005. Identification and characterization of a regulatory sequence recognized by *Mycobacterium tuberculosis* persistence regulator MprA. *J Bacteriol*, 187, 202-12.
- He S. and Fox T.D. 1997. Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol Biol Cell*, 8, 1449-60.
- Heath R.J., Jackowski S. and Rock C.O. 1994. Guanosine tetraphosphate inhibition of fatty acid and phospholipid synthesis in *Escherichia coli* is relieved by overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (plsB). *J Biol Chem*, 269, 26584-90.
- Hell K., Herrmann J.M., Pratje E., Neupert W. and Stuart R.A. 1998. Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2250-5.
- Henderson I.R., Owen P. and Nataro J.P. 1999. Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol*, 33, 919-32.
- Hendrickson R.C., Douglass J.F., Reynolds L.D., McNeill P.D., Carter D., Reed S.G., et al. 2000. Mass spectrometric identification of mtb81, a novel serological marker for tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 38, 2354-61.
- Hengartner M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407, 770-6.
- Hengge-Aronis R. 2002. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66, 373-95, table of contents.
- Herbert D.R., Holscher C., Mohrs M., Arendse B., Schwegmann A., Radwanska M., et al. 2004. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*, 20, 623-35.
- Herbst A., Hemann M.T., Tworkowski K.A., Salghetti S.E., Lowe S.W. and Tansey W.P. 2005. A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep*, 6, 177-83.
- Hernday A., Krabbe M., Braaten B. and Low D. 2002. Self-perpetuating epigenetic pili switches in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 Suppl 4, 16470-6.
- Herrmann J.L., O'Gaora P., Gallagher A., Thole J.E. and Young D.B. 1996. Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *Embo J*, 15, 3547-54.
- Hett E.C., Chao M.C., Deng L.L. and Rubin E.J. 2008. A mycobacterial enzyme essential for cell division synergizes with resuscitation-promoting factor. *PLoS Pathog*, 4, e1000001.
- Hett E.C., Chao M.C., Steyn A.J., Fortune S.M., Deng L.L. and Rubin E.J. 2007. A partner for the resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 66, 658-68.

- Hett E.C. and Rubin E.J. 2008. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72, 126-56, table of contents.
- Hinchey J., Lee S., Jeon B.Y., Basaraba R.J., Venkataswamy M.M., Chen B., *et al.* 2007. Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest*, 117, 2279-88.
- Hisert K.B., Kirksey M.A., Gomez J.E., Sousa A.O., Cox J.S., Jacobs W.R., Jr., *et al.* 2004. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* counterimmune (cim) mutants in immunodeficient mice by differential screening. *Infect Immun*, 72, 5315-21.
- Hoft D.F. 2008. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet*, 372, 164-75.
- Holcomb I.N., Kabakoff R.C., Chan B., Baker T.W., Gurney A., Henzel W., *et al.* 2000. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *Embo J*, 19, 4046-55.
- Holscher C., Atkinson R.A., Arendse B., Brown N., Myburgh E., Alber G., *et al.* 2001. A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection. *J Immunol*, 167, 6957-66.
- Honaker R.W., Stewart A., Schittone S., Izzo A., Klein M.R. and Voskuil M.I. 2008. *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains lack *nark2* and *narX* induction and exhibit altered phenotypes during dormancy. *Infect Immun*, 76, 2587-93.
- Honda I., Seki M., Ikeda N., Yamamoto S., Yano I., Koyama A., *et al.* 2006. Identification of two subpopulations of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo172 substrain with different RD16 regions. *Vaccine*, 24, 4969-74.
- Horwitz M.A. and Maxfield F.R. 1984. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J Cell Biol*, 99, 1936-43.
- Horwitz M.A. and Silverstein S.C. 1981. Activated human monocytes inhibit the intracellular multiplication of Legionnaires' disease bacteria. *J Exp Med*, 154, 1618-35.
- Hou J.M., D'Lima N.G., Rigel N.W., Gibbons H.S., McCann J.R., Braunstein M., *et al.* 2008. ATPase activity of *Mycobacterium tuberculosis* SecA1 and SecA2 proteins and its importance for SecA2 function in macrophages. *J Bacteriol*, 190, 4880-7.
- Hsu T., Hingley-Wilson S.M., Chen B., Chen M., Dai A.Z., Morin P.M., *et al.* 2003. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12420-5.
- Hu X., Chen J., Wang L. and Ivashkiv L.B. 2007. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J Leukoc Biol*, 82, 237-43.
- Humpel A., Gebhard S., Cook G.M. and Berney M. 2010. The SigF regulon in *Mycobacterium smegmatis* reveals roles in adaptation to stationary phase, heat, and oxidative stress. *J Bacteriol*, 192, 2491-502.
- Hussain M., Ichihara S. and Mizushima S. 1982. Mechanism of signal peptide cleavage in the biosynthesis of the major lipoprotein of the *Escherichia coli* outer membrane. *J Biol Chem*, 257, 5177-82.

- Hynds P.J., Robinson D. and Robinson C. 1998. The sec-independent twin-arginine translocation system can transport both tightly folded and malformed proteins across the thylakoid membrane. *J Biol Chem*, 273, 34868-74.
- Ideker T., Thorsson V., Ranish J.A., Christmas R., Buhler J., Eng J.K., et al. 2001. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*, 292, 929-34.
- Innis M.A., Tokunaga M., Williams M.E., Loranger J.M., Chang S.Y., Chang S., et al. 1984. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* prolipoprotein signal peptidase (*Isp*) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 3708-12.
- Ishibashi Y., Claus S. and Relman D.A. 1994. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Exp Med*, 180, 1225-33.
- Ito K., Mandel G. and Wickner W. 1979. Soluble precursor of an integral membrane protein: synthesis of procoat protein in *Escherichia coli* infected with bacteriophage M13. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 1199-203.
- Ize B. and Palmer T. 2006. Microbiology. Mycobacteria's export strategy. *Science*, 313, 1583-4.
- Jackett P.S., Bothamley G.H., Batra H.V., Mistry A., Young D.B. and Ivanyi J. 1988. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 26, 2313-8.
- Jacobs C. and Shapiro L. 1999. Bacterial cell division: a moveable feast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5891-3.
- Johnson A.E. 2005. Fluorescence approaches for determining protein conformations, interactions and mechanisms at membranes. *Traffic*, 6, 1078-92.
- Joly J.C. and Wickner W. 1993. The SecA and SecY subunits of translocase are the nearest neighbors of a translocating preprotein, shielding it from phospholipids. *Embo J*, 12, 255-63.
- Jones G.J., Gordon S.V., Hewinson R.G. and Vordermeier H.M. 2010. Screening of predicted secreted antigens from *Mycobacterium bovis* reveals the immunodominance of the ESAT-6 protein family. *Infect Immun*, 78, 1326-32.
- Ju S.T., Panka D.J., Cui H., Ettinger R., el-Khatib M., Sherr D.H., et al. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*, 373, 444-8.
- Kanaujia G.V., Motzel S., Garcia M.A., Andersen P. and Gennaro M.L. 2004. Recognition of ESAT-6 sequences by antibodies in sera of tuberculous nonhuman primates. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11, 222-6.
- Kang Y.A., Lee H.W., Yoon H.I., Cho B., Han S.K., Shim Y.S., et al. 2005. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *Jama*, 293, 2756-61.
- Karakousis P.C., Bishai W.R. and Dorman S.E. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cell Microbiol*, 6, 105-16.
- Karamanou S., Vrontou E., Sianidis G., Baud C., Roos T., Kuhn A., et al. 1999. A molecular switch in SecA protein couples ATP hydrolysis to protein translocation. *Mol Microbiol*, 34, 1133-45.

- Karin M. 1994. Signal transduction from the cell surface to the nucleus through the phosphorylation of transcription factors. *Curr Opin Cell Biol*, 6, 415-24.
- Karls R.K., Guarner J., McMurray D.N., Birkness K.A. and Quinn F.D. 2006. Examination of *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor mutants using low-dose aerosol infection of guinea pigs suggests a role for SigC in pathogenesis. *Microbiology*, 152, 1591-600.
- Kato-Maeda M. and Small P.M. 2000. How molecular epidemiology has changed what we know about tuberculosis. *West J Med*, 172, 256-9.
- Kaufmann S.H. 1983. Effective antibacterial protection induced by a *Listeria monocytogenes*-specific T cell clone and its lymphokines. *Infect Immun*, 39, 1265-70.
- Kaufmann S.H., Cole S.T., Mizrahi V., Rubin E. and Nathan C. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. *J Exp Med*, 201, 1693-7.
- Kaufmann S.H. and Hahn H. 1982. Biological functions of t cell lines with specificity for the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* in vitro and in vivo. *J Exp Med*, 155, 1754-65.
- Kawano T., Cui J., Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y., Motoki K., et al. 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*, 278, 1626-9.
- Keane J., Balcewicz-Sablinska M.K., Remold H.G., Chupp G.L., Meek B.B., Fenton M.J., et al. 1997. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun*, 65, 298-304.
- Keane J., Remold H.G. and Kornfeld H. 2000. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol*, 164, 2016-20.
- Keller P.M., Bottger E.C. and Sander P. 2008. Tuberculosis vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Russia is a natural recA mutant. *BMC Microbiol*, 8, 120.
- Khelef N., Zychlinsky A. and Guiso N. 1993. *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect Immun*, 61, 4064-71.
- Kimura E., Akita M., Matsuyama S. and Mizushima S. 1991. Determination of a region in SecA that interacts with presecretory proteins in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 266, 6600-6.
- Kimura Y., Mishima Y., Nakano H. and Takegawa K. 2002. An adenylyl cyclase, CyaA, of *Myxococcus xanthus* functions in signal transduction during osmotic stress. *J Bacteriol*, 184, 3578-85.
- Kinsella R.J., Fitzpatrick D.A., Creevey C.J. and McInerney J.O. 2003. Fatty acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*: lateral gene transfer, adaptive evolution, and gene duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10320-5.
- Kirchner M., Heuer D. and Meyer T.F. 2005. CD46-independent binding of neisserial type IV pili and the major pilus adhesin, PilC, to human epithelial cells. *Infect Immun*, 73, 3072-82.
- Kirchner M. and Meyer T.F. 2005. The PilC adhesin of the *Neisseria* type IV pilus-binding specificities and new insights into the nature of the host cell receptor. *Mol Microbiol*, 56, 945-57.

- Knudson C.M., Tung K.S., Tourtellotte W.G., Brown G.A. and Korsmeyer S.J. 1995. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*, 270, 96-9.
- Kolb A., Spassky A., Chapon C., Blazy B. and Buc H. 1983. On the different binding affinities of CRP at the *lac*, *gal* and *malT* promoter regions. *Nucleic Acids Res*, 11, 7833-52.
- Koo I.C., Wang C., Raghavan S., Morisaki J.H., Cox J.S. and Brown E.J. 2008. ESX-1-dependent cytolysis in lysosome secretion and inflammasome activation during mycobacterial infection. *Cell Microbiol*, 10, 1866-78.
- Kumamoto C.A. 1989. *Escherichia coli* SecB protein associates with exported protein precursors in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 5320-4.
- Kurenuma T., Kawamura I., Hara H., Uchiyama R., Daim S., Dewamitta S.R., et al. 2009. The RD1 locus in the *Mycobacterium tuberculosis* genome contributes to activation of caspase-1 via induction of potassium ion efflux in infected macrophages. *Infect Immun*, 77, 3992-4001.
- Kuriyama Y. and Luck D.J. 1973. Membrane-associated ribosomes in mitochondria of *Neurospora crassa*. *J Cell Biol*, 59, 776-84.
- Lagranderie M., Lo-Man R., Deriaud E., Gicquel B., Gheorghiu M. and Leclerc C. 1997. Genetic control of antibody responses induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing a foreign antigen. *Infect Immun*, 65, 3057-64.
- Lalvani A., Nagvenkar P., Udwadia Z., Pathan A.A., Wilkinson K.A., Shastri J.S., et al. 2001. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis*, 183, 469-77.
- Lamarche M.G., Wanner B.L., Crepin S. and Harel J. 2008. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 461-73.
- Lamkanfi M., Sarkar A., Vande Walle L., Vitari A.C., Amer A.O., Wewers M.D., et al. 2010. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J Immunol*, 185, 4385-92.
- Laochumroonvorapong P., Paul S., Elkon K.B. and Kaplan G. 1996. H₂O₂ induces monocyte apoptosis and reduces viability of *Mycobacterium avium-M. intracellulare* within cultured human monocytes. *Infect Immun*, 64, 452-9.
- Lawn S.D. and Wilkinson R. 2006. Extensively drug resistant tuberculosis. *Bmj*, 333, 559-60.
- Lecker S.H., Driessen A.J. and Wickner W. 1990. ProOmpA contains secondary and tertiary structure prior to translocation and is shielded from aggregation by association with SecB protein. *Embo J*, 9, 2309-14.
- Lee B.Y., Hefta S.A. and Brennan P.J. 1992. Characterization of the major membrane protein of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 60, 2066-74.
- Lee J. and Kornfeld H. 2010. Interferon-gamma Regulates the Death of M. tuberculosis-Infected Macrophages. *J Cell Death*, 3, 1-11.
- Lee J., Remold H.G., Jeong M.H. and Kornfeld H. 2006. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. *J Immunol*, 176, 4267-74.

- Lee J.Y., Choi H.J., Park I.N., Hong S.B., Oh Y.M., Lim C.M., *et al.* 2006. Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J*, 28, 24-30.
- Leiman P.G., Basler M., Ramagopal U.A., Bonanno J.B., Sauder J.M., Pukatzki S., *et al.* 2009. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 4154-9.
- Lenz L.L., Mohammadi S., Geissler A. and Portnoy D.A. 2003. SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12432-7.
- Lenz L.L. and Portnoy D.A. 2002. Identification of a second *Listeria secA* gene associated with protein secretion and the rough phenotype. *Mol Microbiol*, 45, 1043-56.
- Leppla S.H. 1982. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 3162-6.
- Lewis K.N., Liao R., Guinn K.M., Hickey M.J., Smith S., Behr M.A., *et al.* 2003. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *J Infect Dis*, 187, 117-23.
- Leyten E.M., Lin M.Y., Franken K.L., Friggen A.H., Prins C., van Meijgaarden K.E., *et al.* 2006. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*, 8, 2052-60.
- Li B., Bassiri H., Rossman M.D., Kramer P., Eyuboglu A.F., Torres M., *et al.* 1998. Involvement of the Fas/Fas ligand pathway in activation-induced cell death of mycobacteria-reactive human gamma delta T cells: a mechanism for the loss of gamma delta T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *J Immunol*, 161, 1558-67.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S., *et al.* 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91, 479-89.
- Li Q. and Engelhardt J.F. 2006. Interleukin-1beta induction of NFkappaB is partially regulated by H2O2-mediated activation of NFkappaB-inducing kinase. *J Biol Chem*, 281, 1495-505.
- Lill R., Cunningham K., Brundage L.A., Ito K., Oliver D. and Wickner W. 1989. SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. *Embo J*, 8, 961-6.
- Lim A., Eleuterio M., Hutter B., Murugasu-Oei B. and Dick T. 1999. Oxygen depletion-induced dormancy in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol*, 181, 2252-6.
- Lin P.L., Pawar S., Myers A., Pegu A., Fuhrman C., Reinhart T.A., *et al.* 2006. Early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection in cynomolgus macaques. *Infect Immun*, 74, 3790-803.
- Linder J.U., Schultz A. and Schultz J.E. 2002. Adenylyl cyclase Rv1264 from *Mycobacterium tuberculosis* has an autoinhibitory N-terminal domain. *J Biol Chem*, 277, 15271-6.

- Linder J.U. and Schultz J.E. 2003. The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell Signal*, 15, 1081-9.
- Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R. and Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86, 147-57.
- Loke P., Nair M.G., Parkinson J., Guiliano D., Blaxter M. and Allen J.E. 2002. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol*, 3, 7.
- Lopez M., Sly L.M., Luu Y., Young D., Cooper H. and Reiner N.E. 2003. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J Immunol*, 170, 2409-16.
- Lucas R.L., Lostroh C.P., DiRusso C.C., Spector M.P., Wanner B.L. and Lee C.A. 2000. Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *J Bacteriol*, 182, 1872-82.
- Lyashchenko K., Manca C., Colangeli R., Heijbel A., Williams A. and Gennaro M.L. 1998a. Use of *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific antigen cocktails for a skin test specific for tuberculosis. *Infect Immun*, 66, 3606-10.
- Lyashchenko K.P., Pollock J.M., Colangeli R. and Gennaro M.L. 1998b. Diversity of antigen recognition by serum antibodies in experimental bovine tuberculosis. *Infect Immun*, 66, 5344-9.
- Lyon R.H., Hall W.H. and Costas-Martinez C. 1970. Utilization of Amino Acids During Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in Rotary Cultures. *Infect Immun*, 1, 513-20.
- Lyon R.H., Rogers P., Hall W.H. and Lichtein H.C. 1967. Inducible glutamate transport in Mycobacteria and its relation to glutamate oxidation. *J Bacteriol*, 94, 92-100.
- MacGurn J.A. and Cox J.S. 2007. A genetic screen for *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective for phagosome maturation arrest identifies components of the ESX-1 secretion system. *Infect Immun*, 75, 2668-78.
- Mackanness G.B. 1969. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. *J Exp Med*, 129, 973-92.
- Mackintosh C.G., Qureshi T., Waldrup K., Labes R.E., Dodds K.G. and Griffin J.F. 2000. Genetic resistance to experimental infection with *Mycobacterium bovis* in red deer (*Cervus elaphus*). *Infect Immun*, 68, 1620-5.
- Magnusson L.U., Farewell A. and Nystrom T. 2005. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol*, 13, 236-42.
- Mahairas G.G., Sabo P.J., Hickey M.J., Singh D.C. and Stover C.K. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*, 178, 1274-82.
- Majdalani N., Cunning C., Sledjeski D., Elliott T. and Gottesman S. 1998. DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 12462-7.

- Majdalani N., Hernandez D. and Gottesman S. 2002. Regulation and mode of action of the second small RNA activator of RpoS translation, RprA. *Mol Microbiol*, 46, 813-26.
- Majlessi L., Rojas M.J., Brodin P. and Leclerc C. 2003. CD8⁺-T-cell responses of *Mycobacterium*-infected mice to a newly identified major histocompatibility complex class I-restricted epitope shared by proteins of the ESAT-6 family. *Infect Immun*, 71, 7173-7.
- Makino K., Shinagawa H., Amemura M., Kawamoto T., Yamada M. and Nakata A. 1989. Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J Mol Biol*, 210, 551-9.
- Malhotra V., Tyagi J.S. and Clark-Curtiss J.E. 2009. DevR-mediated adaptive response in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra: links to asparagine metabolism. *Tuberculosis (Edinb)*, 89, 169-74.
- Malik Z.A., Denning G.M. and Kusner D.J. 2000. Inhibition of Ca²⁺ signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J Exp Med*, 191, 287-302.
- Malik Z.A., Iyer S.S. and Kusner D.J. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. *J Immunol*, 166, 3392-401.
- Mandelstam J. 1960. The intracellular turnover of protein and nucleic acids and its role in biochemical differentiation. *Bacteriol Rev*, 24, 289-308.
- Marmiesse M., Brodin P., Buchrieser C., Gutierrez C., Simoes N., Vincent V., et al. 2004. Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial 'core' genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology*, 150, 483-96.
- Maskell D., Frankel G. and Dougan G. 1993. Phase and antigenic variation--the impact on strategies for bacterial vaccine design. *Trends Biotechnol*, 11, 506-10.
- Matsuyama S., Fujita Y. and Mizushima S. 1993. SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Embo J*, 12, 265-70.
- Mayuri, Bagchi G., Das T.K. and Tyagi J.S. 2002. Molecular analysis of the dormancy response in *Mycobacterium smegmatis*: expression analysis of genes encoding the DevR-DevS two-component system, Rv3134c and chaperone alpha-crystallin homologues. *FEMS Microbiol Lett*, 211, 231-7.
- Mazurek G.H., Jereb J., Lobue P., Iademarco M.F., Metchock B. and Vernon A. 2005. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR Recomm Rep*, 54, 49-55.
- McCarthy C.M. 1987. Utilization of nitrate or nitrite as single nitrogen source by *Mycobacterium avium*. *J Clin Microbiol*, 25, 263-7.
- McCune R.M., Feldmann F.M., Lambert H.P. and McDermott W. 1966. Microbial persistence. I. The capacity of tubercle bacilli to survive sterilization in mouse tissues. *J Exp Med*, 123, 445-68.

- McDonough J.A., Hacker K.E., Flores A.R., Pavelka M.S., Jr. and Braunstein M. 2005. The twin-arginine translocation pathway of *Mycobacterium smegmatis* is functional and required for the export of mycobacterial beta-lactamases. *J Bacteriol*, 187, 7667-79.
- McInnes A. and Rennick D.M. 1988. Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *J Exp Med*, 167, 598-611.
- McKinney J.D., Honer zu Bentrup K., Munoz-Elias E.J., Miczak A., Chen B., Chan W.T., *et al.* 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*, 406, 735-8.
- McNally A.K. and Anderson J.M. 1995. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *Am J Pathol*, 147, 1487-99.
- Mehra V., Bloom B.R., Bajardi A.C., Grisso C.L., Sieling P.A., Alland D., *et al.* 1992. A major T cell antigen of *Mycobacterium leprae* is a 10-kD heat-shock cognate protein. *J Exp Med*, 175, 275-84.
- Mekalanos J.J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol*, 174, 1-7.
- Menzies D., Pai M. and Comstock G. 2007. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med*, 146, 340-54.
- Mescher M.F. and Strominger J.L. 1976. Purification and characterization of a prokaryotic glucoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarium*. *J Biol Chem*, 251, 2005-14.
- Michell S.L., Whelan A.O., Wheeler P.R., Panico M., Easton R.L., Etienne A.T., *et al.* 2003. The MPB83 antigen from *Mycobacterium bovis* contains O-linked mannose and (1-->3)-mannobiose moieties. *J Biol Chem*, 278, 16423-32.
- Miller E., Wohlfarth G. and Diekert G. 1996. Studies on tetrachloroethene respiration in *Dehalospirillum multivorans*. *Arch Microbiol*, 166, 379-87.
- Minamino T. and Namba K. 2008. Distinct roles of the Flil ATPase and proton motive force in bacterial flagellar protein export. *Nature*, 451, 485-8.
- Minden P., McClatchy J.K. and Farr R.S. 1972. Shared antigens between heterologous bacterial species. *Infect Immun*, 6, 574-82.
- Minning D.M., Gow A.J., Bonaventura J., Braun R., Dewhirst M., Goldberg D.E., *et al.* 1999. *Ascaris* haemoglobin is a nitric oxide-activated 'deoxygenase'. *Nature*, 401, 497-502.
- Mishra B.B., Moura-Alves P., Sonawane A., Hacoheh N., Griffiths G., Moita L.F., *et al.* 2010. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol*, 12, 1046-63.
- Moens L., Vanfleteren J., Van de Peer Y., Peeters K., Kapp O., Czeluzniak J., *et al.* 1996. Globins in nonvertebrate species: dispersal by horizontal gene transfer and evolution of the structure-function relationships. *Mol Biol Evol*, 13, 324-33.
- Mogensen J.E. and Otzen D.E. 2005. Interactions between folding factors and bacterial outer membrane proteins. *Mol Microbiol*, 57, 326-46.

- Mohan V.P., Scanga C.A., Yu K., Scott H.M., Tanaka K.E., Tsang E., *et al.* 2001. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun*, 69, 1847-55.
- Molloy A., Laochumroonvorapong P. and Kaplan G. 1994. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J Exp Med*, 180, 1499-509.
- Moody D.B., Reinhold B.B., Guy M.R., Beckman E.M., Frederique D.E., Furlong S.T., *et al.* 1997. Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells. *Science*, 278, 283-6.
- Mori T., Sakatani M., Yamagishi F., Takashima T., Kawabe Y., Nagao K., *et al.* 2004. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med*, 170, 59-64.
- Morley S.M., Beck J.S., Grange J.M., Brown R.A. and Kardjito T. 1987. The method of preparation of an antigen may influence the cellular reaction to it in skin tests for delayed hypersensitivity: comparison between responses to two different reagents prepared from *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol*, 69, 584-90.
- Mostowy S., Cousins D. and Behr M.A. 2004. Genomic interrogation of the dassie bacillus reveals it as a unique RD1 mutant within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Bacteriol*, 186, 104-9.
- Mostowy S., Cousins D., Brinkman J., Aranaz A. and Behr M.A. 2002. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis*, 186, 74-80.
- Mudd S., Yoshida A. and Koike M. 1958. Polyphosphate as accumulator of phosphorus and energy. *J Bacteriol*, 75, 224-35.
- Mukamolova G.V., Kaprelyants A.S., Young D.I., Young M. and Kell D.B. 1998. A bacterial cytokine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 8916-21.
- Mukamolova G.V., Murzin A.G., Salina E.G., Demina G.R., Kell D.B., Kaprelyants A.S., *et al.* 2006. Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Mol Microbiol*, 59, 84-98.
- Mukamolova G.V., Turapov O.A., Kazarian K., Telkov M., Kaprelyants A.S., Kell D.B., *et al.* 2002a. The rpf gene of *Micrococcus luteus* encodes an essential secreted growth factor. *Mol Microbiol*, 46, 611-21.
- Mukamolova G.V., Turapov O.A., Young D.I., Kaprelyants A.S., Kell D.B. and Young M. 2002b. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 46, 623-35.
- Muller G. and Zimmermann R. 1988. Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: energy requirements for membrane insertion. *Embo J*, 7, 639-48.
- Muller M. and Blobel G. 1984. In vitro translocation of bacterial proteins across the plasma membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 7421-5.
- Munder M., Eichmann K. and Modolell M. 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance:

- competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol*, 160, 5347-54.
- Munoz-Elias E.J. and McKinney J.D. 2006. Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cell Microbiol*, 8, 10-22.
- Munoz-Elias E.J., Timm J., Botha T., Chan W.T., Gomez J.E. and McKinney J.D. 2005. Replication dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* in chronically infected mice. *Infect Immun*, 73, 546-51.
- Murphy D.J. and Brown J.R. 2007. Identification of gene targets against dormant phase *Mycobacterium tuberculosis* infections. *BMC Infect Dis*, 7, 84.
- Murphy D.J. and Brown J.R. 2008. Novel drug target strategies against *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Microbiol*, 11, 422-7.
- Murphy H.N., Stewart G.R., Mischenko V.V., Apt A.S., Harris R., McAlister M.S., et al. 2005. The OtsAB pathway is essential for trehalose biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 280, 14524-9.
- Mustafa A.S., Cockle P.J., Shaban F., Hewinson R.G. and Vordermeier H.M. 2002. Immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* RD1 region gene products in infected cattle. *Clin Exp Immunol*, 130, 37-42.
- Mustafa A.S., Shaban F.A., Abal A.T., Al-Attiyah R., Wiker H.G., Lundin K.E., et al. 2000. Identification and HLA restriction of naturally derived Th1-cell epitopes from the secreted *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B recognized by antigen-specific human CD4(+) T-cell lines. *Infect Immun*, 68, 3933-40.
- Muttucumaru D.G., Roberts G., Hinds J., Stabler R.A. and Parish T. 2004. Gene expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* in a non-replicating state. *Tuberculosis (Edinb)*, 84, 239-46.
- Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-65.
- Nagata S. and Golstein P. 1995. The Fas death factor. *Science*, 267, 1449-56.
- Nathan C. and Shiloh M.U. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8841-8.
- Nathan C.F., Murray H.W., Wiebe M.E. and Ruben B.Y. 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med*, 158, 670-89.
- Nau G.J., Richmond J.F., Schlesinger A., Jennings E.G., Lander E.S. and Young R.A. 2002. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 1503-8.
- Nemeth J., Winkler H.M., Zwick R.H., Rumetshofer R., Schenk P., Burghuber O.C., et al. 2009. Recruitment of *Mycobacterium tuberculosis* specific CD4⁺ T cells to the site of infection for diagnosis of active tuberculosis. *J Intern Med*, 265, 163-8.
- Niederweis M., Ehrh S., Heinz C., Klocker U., Karosi S., Swiderek K.M., et al. 1999. Cloning of the *mspA* gene encoding a porin from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol*, 33, 933-45.
- Nishiyama K., Hanada M. and Tokuda H. 1994. Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *Embo J*, 13, 3272-7.

- Nishiyama K., Mizushima S. and Tokuda H. 1993. A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Embo J*, 12, 3409-15.
- Nogueira N. and Cohn Z.A. 1978. Trypanosoma cruzi: in vitro induction of macrophage microbicidal activity. *J Exp Med*, 148, 288-300.
- Noss E.H., Pai R.K., Sellati T.J., Radolf J.D., Belisle J., Golenbock D.T., *et al.* 2001. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 167, 910-8.
- Nouwen N. and Driessen A.J. 2002. SecDFyajC forms a heterotetrameric complex with YidC. *Mol Microbiol*, 44, 1397-405.
- Nowak E., Panjikar S., Konarev P., Svergun D.I. and Tucker P.A. 2006. The structural basis of signal transduction for the response regulator PrrA from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem*, 281, 9659-66.
- Nunn P., Williams B., Floyd K., Dye C., Elzinga G. and Raviglione M. 2005. Tuberculosis control in the era of HIV. *Nat Rev Immunol*, 5, 819-26.
- Oddo M., Renno T., Attinger A., Bakker T., MacDonald H.R. and Meylan P.R. 1998. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 160, 5448-54.
- Oettinger T., Holm A., Mtoni I.M., Andersen A.B. and Hasloov K. 1995. Mapping of the delayed-type hypersensitivity-inducing epitope of secreted protein MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 63, 4613-8.
- Ohno H., Zhu G., Mohan V.P., Chu D., Kohno S., Jacobs W.R., Jr., *et al.* 2003. The effects of reactive nitrogen intermediates on gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol*, 5, 637-48.
- Ojha A.K., Mukherjee T.K. and Chatterji D. 2000. High intracellular level of guanosine tetraphosphate in *Mycobacterium smegmatis* changes the morphology of the bacterium. *Infect Immun*, 68, 4084-91.
- O'Sullivan M.P., O'Leary S., Kelly D.M. and Keane J. 2007. A caspase-independent pathway mediates macrophage cell death in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun*, 75, 1984-93.
- Ouellet H., Ouellet Y., Richard C., Labarre M., Wittenberg B., Wittenberg J., *et al.* 2002. Truncated hemoglobin HbN protects *Mycobacterium bovis* from nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 5902-7.
- Page A.L. and Parsot C. 2002. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol Microbiol*, 46, 1-11.
- Pai M., Riley L.W. and Colford J.M., Jr. 2004. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*, 4, 761-76.
- Pai R.K., Convery M., Hamilton T.A., Boom W.H. and Harding C.V. 2003. Inhibition of IFN-gamma-induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for immune evasion. *J Immunol*, 171, 175-84.
- Pais T.F. and Appelberg R. 2000. Macrophage control of mycobacterial growth induced by picolinic acid is dependent on host cell apoptosis. *J Immunol*, 164, 389-97.

- Pal P.G. and Horwitz M.A. 1992. Immunization with extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis* induces cell-mediated immune responses and substantial protective immunity in a guinea pig model of pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*, 60, 4781-92.
- Pallen M.J. 2002. The ESAT-6/WXG100 superfamily -- and a new Gram-positive secretion system? *Trends Microbiol*, 10, 209-12.
- Pang X., Samten B., Cao G., Wang X., Tvinnereim A.R., Chen X.L., et al. 2013. MprAB Regulates the espA Operon in *Mycobacterium tuberculosis* and Modulates ESX-1 Function and Host Cytokine Response. *J Bacteriol*, 195, 66-75.
- Parish T., Smith D.A., Roberts G., Betts J. and Stoker N.G. 2003a. The *senX3-regX3* two-component regulatory system of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence. *Microbiology*, 149, 1423-35.
- Parish T., Smith D.A., Kendall S., Casali N., Bancroft G.J. and Stoker N.G. 2003b. Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 71, 1134-40.
- Park H.D., Guinn K.M., Harrell M.I., Liao R., Voskuil M.I., Tompa M., et al. 2003a. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 48, 833-43.
- Park J.S., Tamayo M.H., Gonzalez-Juarrero M., Orme I.M. and Ordway D.J. 2006. Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *J Leukoc Biol*, 79, 80-6.
- Park S.W., Hwang E.H., Park H., Kim J.A., Heo J., Lee K.H., et al. 2003b. Growth of mycobacteria on carbon monoxide and methanol. *J Bacteriol*, 185, 142-7.
- Park Y.K., Bai G.H. and Kim S.J. 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the western pacific region. *J Clin Microbiol*, 38, 191-7.
- Parkinson J.S. and Kofoed E.C. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet*, 26, 71-112.
- Patel N.R., Zhu J., Tachado S.D., Zhang J., Wan Z., Saukkonen J., et al. 2007. HIV impairs TNF-alpha mediated macrophage apoptotic response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*, 179, 6973-80.
- Pathania R., Navani N.K., Rajamohan G. and Dikshit K.L. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* hemoglobin HbO associates with membranes and stimulates cellular respiration of recombinant *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 277, 15293-302.
- Pedersen M.K., Hoiby E.A., Froholm L.O., Hasseltvedt V., Lermark G. and Caugant D.A. 2004. Systemic pneumococcal disease in Norway 1995-2001: capsular serotypes and antimicrobial resistance. *Epidemiol Infect*, 132, 167-75.
- Pepin C.A. and Wood H.G. 1986. Polyphosphate glucokinase from *Propionibacterium shermanii*. Kinetics and demonstration that the mechanism involves both processive and nonprocessive type reactions. *J Biol Chem*, 261, 4476-80.
- Perez E., Samper S., Bordas Y., Guilhot C., Gicquel B. and Martin C. 2001. An essential role for phoP in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol Microbiol*, 41, 179-87.

- Pesole G., Bozzetti M.P., Lanave C., Preparata G. and Saccone C. 1991. Glutamine synthetase gene evolution: a good molecular clock. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 522-6.
- Peterson C.N., Mandel M.J. and Silhavy T.J. 2005. *Escherichia coli* starvation diets: essential nutrients weigh in distinctly. *J Bacteriol*, 187, 7549-53.
- Pfeiffer S., Gorren A.C., Schmidt K., Werner E.R., Hansert B., Bohle D.S., *et al.* 1997. Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry. *J Biol Chem*, 272, 3465-70.
- Placido R., Mancino G., Amendola A., Mariani F., Vendetti S., Piacentini M., *et al.* 1997. Apoptosis of human monocytes/macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Pathol*, 181, 31-8.
- Plummer T.H., Jr., Tarentino A.L. and Hauer C.R. 1995. Novel, specific O-glycosylation of secreted *Flavobacterium meningosepticum* proteins. Asp-Ser and Asp-Thr-Thr consensus sites. *J Biol Chem*, 270, 13192-6.
- Pogliano J.A. and Beckwith J. 1994. SecD and SecE facilitate protein export in *Escherichia coli*. *Embo J*, 13, 554-61.
- Pollock J.M. and Andersen P. 1997. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with *Mycobacterium bovis* in cattle. *Infect Immun*, 65, 2587-92.
- Pollock J.M., McNair J., Bassett H., Cassidy J.P., Costello E., Aggerbeck H., *et al.* 2003. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *J Clin Microbiol*, 41, 1856-60.
- Poole R.K. and Hughes M.N. 2000. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Mol Microbiol*, 36, 775-83.
- Posey J.E., Shinnick T.M. and Quinn F.D. 2006. Characterization of the twin-arginine translocase secretion system of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*, 188, 1332-40.
- Pottumarthy S., Wells V.C. and Morris A.J. 2000. A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol*, 38, 2227-31.
- Primm T.P., Andersen S.J., Mizrahi V., Avarbock D., Rubin H. and Barry C.E., 3rd 2000. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J Bacteriol*, 182, 4889-98.
- Pugsley A.P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev*, 57, 50-108.
- Pym A.S., Brodin P., Majlessi L., Brosch R., Demangel C., Williams A., *et al.* 2003. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med*, 9, 533-9.
- Rachman H., Strong M., Ulrichs T., Grode L., Schuchhardt J., Mollenkopf H., *et al.* 2006. Unique transcriptome signature of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*, 74, 1233-42.
- Raes G., De Baetselier P., Noel W., Beschin A., Brombacher F. and Hassanzadeh Gh G. 2002. Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol*, 71, 597-602.

- Raja A., Uma Devi K.R., Ramalingam B. and Brennan P.J. 2002. Immunoglobulin G, A, and M responses in serum and circulating immune complexes elicited by the 16-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9, 308-12.
- Ramakrishnan L., Federspiel N.A. and Falkow S. 2000. Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. *Science*, 288, 1436-9.
- Raman S., Hazra R., Dascher C.C. and Husson R.N. 2004. Transcription regulation by the *Mycobacterium tuberculosis* alternative sigma factor SigD and its role in virulence. *J Bacteriol*, 186, 6605-16.
- Randall L.L. and Hardy S.J. 1977. Synthesis of exported proteins by membrane-bound polysomes from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 75, 43-53.
- Randall L.L. and Hardy S.J. 1984. Export of protein in bacteria. *Microbiol Rev*, 48, 290-8.
- Rao S.P., Ogata K. and Catanzaro A. 1993. *Mycobacterium avium*-M. *intracellulare* binds to the integrin receptor alpha v beta 3 on human monocytes and monocyte-derived macrophages. *Infect Immun*, 61, 663-70.
- Ravagnani A., Finan C.L. and Young M. 2005. A novel firmicute protein family related to the actinobacterial resuscitation-promoting factors by non-orthologous domain displacement. *BMC Genomics*, 6, 39.
- Ravn P., Demissie A., Eguale T., Wondwosson H., Lein D., Amoudy H.A., *et al.* 1999. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*, 179, 637-45.
- Ravn P., Munk M.E., Andersen A.B., Lundgren B., Nielsen L.N., Lillebaek T., *et al.* 2004. Reactivation of tuberculosis during immunosuppressive treatment in a patient with a positive QuantiFERON-RD1 test. *Scand J Infect Dis*, 36, 499-501.
- Reddy V.M. and Kumar B. 2000. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human respiratory epithelial cells. *J Infect Dis*, 181, 1189-93.
- Reed S.G., Coler R.N., Dalemans W., Tan E.V., DeLa Cruz E.C., Basaraba R.J., *et al.* 2009. Defined tuberculosis vaccine, Mtb72F/AS02A, evidence of protection in cynomolgus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 2301-6.
- Reinhold B.B., Hauer C.R., Plummer T.H. and Reinhold V.N. 1995. Detailed structural analysis of a novel, specific O-linked glycan from the prokaryote *Flavobacterium meningosepticum*. *J Biol Chem*, 270, 13197-203.
- Renshaw P.S., Lightbody K.L., Veverka V., Muskett F.W., Kelly G., Frenkiel T.A., *et al.* 2005. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *Embo J*, 24, 2491-8.
- Renshaw P.S., Panagiotidou P., Whelan A., Gordon S.V., Hewinson R.G., Williamson R.A., *et al.* 2002. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6*CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence. *J Biol Chem*, 277, 21598-603.
- Rickman L., Saldanha J.W., Hunt D.M., Hoar D.N., Colston M.J., Millar J.B., *et al.* 2004. A two-component signal transduction system with a PAS domain-

- containing sensor is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 314, 259-67.
- Rickman L., Scott C., Hunt D.M., Hutchinson T., Menendez M.C., Whalan R., *et al.* 2005. A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence in mice and controls transcription of the *rpfA* gene coding for a resuscitation promoting factor. *Mol Microbiol*, 56, 1274-86.
- Riendeau C.J. and Kornfeld H. 2003. THP-1 cell apoptosis in response to Mycobacterial infection. *Infect Immun*, 71, 254-9.
- Rifat D., Bishai W.R. and Karakousis P.C. 2009. Phosphate depletion: a novel trigger for *Mycobacterium tuberculosis* persistence. *J Infect Dis*, 200, 1126-35.
- Ro Y.T., Eom C.Y., Song T., Cho J.W. and Kim Y.M. 1997. Dihydroxyacetone synthase from a methanol-utilizing carboxydobacterium, *Acinetobacter* sp. strain JC1 DSM 3803. *J Bacteriol*, 179, 6041-7.
- Roach S.K. and Schorey J.S. 2002. Differential regulation of the mitogen-activated protein kinases by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria. *Infect Immun*, 70, 3040-52.
- Rodrigue A., Chanal A., Beck K., Muller M. and Wu L.F. 1999. Co-translocation of a periplasmic enzyme complex by a hitchhiker mechanism through the bacterial *tat* pathway. *J Biol Chem*, 274, 13223-8.
- Rodrigues S., E M.d.D.O., Rosales R., FNJ S. and Amaku M. 2008. Comparison of three decontamination methods for *Mycobacterium bovis* isolation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 241-244.
- Rodriguez G.M., Voskuil M.I., Gold B., Schoolnik G.K. and Smith I. 2002. *ideR*, An essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of *IdeR* in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infect Immun*, 70, 3371-81.
- Rohde K.H., Abramovitch R.B. and Russell D.G. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues. *Cell Host Microbe*, 2, 352-64.
- Romain F., Horn C., Pescher P., Namane A., Riviere M., Puzo G., *et al.* 1999. Deglycosylation of the 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit in vivo or in vitro cellular immune responses. *Infect Immun*, 67, 5567-72.
- Rook G.A., Taverne J., Leveton C. and Steele J. 1987. The role of gamma-interferon, vitamin D3 metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunology*, 62, 229-34.
- Rosch J. and Caparon M. 2004. A microdomain for protein secretion in Gram-positive bacteria. *Science*, 304, 1513-5.
- Rosenkrands I., Slayden R.A., Crawford J., Aagaard C., Barry C.E., 3rd and Andersen P. 2002. Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *J Bacteriol*, 184, 3485-91.
- Rosenkrands I., Weldingh K., Jacobsen S., Hansen C.V., Florio W., Gianetri I., *et al.* 2000. Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by

- two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis*, 21, 935-48.
- Ross B.C., Raios K., Jackson K. and Dwyer B. 1992. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol*, 30, 942-6.
- Roupie V., Romano M., Zhang L., Korf H., Lin M.Y., Franken K.L., *et al.* 2007. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. *Infect Immun*, 75, 941-9.
- Ruiz N., Falcone B., Kahne D. and Silhavy T.J. 2005. Chemical conditionality: a genetic strategy to probe organelle assembly. *Cell*, 121, 307-17.
- Russell D.G., Barry C.E., 3rd and Flynn J.L. 2010. Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us. *Science*, 328, 852-6.
- Sable S.B., Verma I., Behera D. and Khuller G.K. 2005. Human immune recognition-based multicomponent subunit vaccines against tuberculosis. *Eur Respir J*, 25, 902-10.
- Sagara K., Matsuyama S. and Mizushima S. 1994. SecF stabilizes SecD and SecY, components of the protein translocation machinery of the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *J Bacteriol*, 176, 4111-6.
- Saint-Joanis B., Demangel C., Jackson M., Brodin P., Marsollier L., Boshoff H., *et al.* 2006. Inactivation of Rv2525c, a substrate of the twin arginine translocation (Tat) system of *Mycobacterium tuberculosis*, increases beta-lactam susceptibility and virulence. *J Bacteriol*, 188, 6669-79.
- Salgame P., Abrams J.S., Clayberger C., Goldstein H., Convit J., Modlin R.L., *et al.* 1991. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*, 254, 279-82.
- Salihi H.M., Aliyu M.H., Ratard R. and Pierre-Louis B.J. 2003. Characteristics associated with reported sputum culture conversion in the era of re-emergent *Mycobacterium tuberculosis* in the State of North Carolina, 1993-1998. *Int J Tuberc Lung Dis*, 7, 1070-6.
- Sambrook J. and Russell D.W. 2006. *The condensed protocols from Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F., Nicklen S. and Chase AR. 1977. DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74(12): 5463-5468.
- Sankaran K. and Wu H.C. 1994. Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglyceryl moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem*, 269, 19701-6.
- Santini C.L., Ize B., Chanal A., Muller M., Giordano G. and Wu L.F. 1998. A novel sec-independent periplasmic protein translocation pathway in *Escherichia coli*. *Embo J*, 17, 101-12.
- Sargent F., Berks B.C. and Palmer T. 2006. Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. *FEMS Microbiol Lett*, 254, 198-207.

- Sargent F., Bogsch E.G., Stanley N.R., Wexler M., Robinson C., Berks B.C., *et al.* 1998. Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *Embo J*, 17, 3640-50.
- Sasseti C.M., Boyd D.H. and Rubin E.J. 2001. Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12712-7.
- Sasseti C.M., Boyd D.H. and Rubin E.J. 2003. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol*, 48, 77-84.
- Saunders N.J., Moxon E.R. and Gravenor M.B. 2003. Mutation rates: estimating phase variation rates when fitness differences are present and their impact on population structure. *Microbiology*, 149, 485-95.
- Scanga C.A., Mohan V.P., Yu K., Joseph H., Tanaka K., Chan J., *et al.* 2000. Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. *J Exp Med*, 192, 347-58.
- Schatz G. and Dobberstein B. 1996. Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, 271, 1519-26.
- Schmidt M.G., Rollo E.E., Grodberg J. and Oliver D.B. 1988. Nucleotide sequence of the *secA* gene and *secA*(Ts) mutations preventing protein export in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 170, 3404-14.
- Schmitt M.P., Predich M., Doukhan L., Smith I. and Holmes R.K. 1995. Characterization of an iron-dependent regulatory protein (IdeR) of *Mycobacterium tuberculosis* as a functional homolog of the diphtheria toxin repressor (DtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect Immun*, 63, 4284-9.
- Schnappinger D., Ehrt S., Voskuil M.I., Liu Y., Mangan J.A., Monahan I.M., *et al.* 2003. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J Exp Med*, 198, 693-704.
- Schneewind O., Mihaylova-Petkov D. and Model P. 1993. Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. *Embo J*, 12, 4803-11.
- Schnell D.J. and Hebert D.N. 2003. Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell*, 112, 491-505.
- Schoel B., Gulle H. and Kaufmann S.H. 1992. Heterogeneity of the repertoire of T cells of tuberculosis patients and healthy contacts to *Mycobacterium tuberculosis* antigens separated by high-resolution techniques. *Infect Immun*, 60, 1717-20.
- Schorey J.S., Li Q., McCourt D.W., Bong-Mastek M., Clark-Curtiss J.E., Ratliff T.L., *et al.* 1995. A *Mycobacterium leprae* gene encoding a fibronectin binding protein is used for efficient invasion of epithelial cells and Schwann cells. *Infect Immun*, 63, 2652-7.
- Schultz S.C., Shields G.C. and Steitz T.A. 1991. Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees. *Science*, 253, 1001-7.
- Schurdell M.S., Woodbury G.M. and McCleary W.R. 2007. Genetic evidence suggests that the intergenic region between *pstA* and *pstB* plays a role in the regulation of *rpoS* translation during phosphate limitation. *J Bacteriol*, 189, 1150-3.

- Schwander S.K., Torres M., Sada E., Carranza C., Ramos E., Tary-Lehmann M., *et al.* 1998. Enhanced responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*, 178, 1434-45.
- Scotti P.A., Urbanus M.L., Brunner J., de Gier J.W., von Heijne G., van der Does C., *et al.* 2000. YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *Embo J*, 19, 542-9.
- Sedlak T.W., Oltvai Z.N., Yang E., Wang K., Boise L.H., Thompson C.B., *et al.* 1995. Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7834-8.
- Segal W. and Bloch H. 1956. Biochemical differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* grown in vivo and in vitro. *J Bacteriol*, 72, 132-41.
- Seki M., Honda I., Fujita I., Yano I., Yamamoto S. and Koyama A. 2009. Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine*, 27, 1710-6.
- Sevarino K.A. and Poyton R.O. 1980. Mitochondrial membrane biogenesis: identification of a precursor to yeast cytochrome c oxidase subunit II, an integral polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 142-6.
- Sharma V., Arockiasamy A., Ronning D.R., Savva C.G., Holzenburg A., Braunstein M., *et al.* 2003. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* SecA, a preprotein translocating ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2243-8.
- Shenoy A.R., Sivakumar K., Krupa A., Srinivasan N. and Visweswariah S.S. 2004. A survey of nucleotide cyclases in actinobacteria: unique domain organization and expansion of the class III cyclase family in *Mycobacterium tuberculosis*. *Comp Funct Genomics*, 5, 17-38.
- Shenoy A.R., Srinivas A., Mahalingam M. and Visweswariah S.S. 2005. An adenyl cyclase pseudogene in *Mycobacterium tuberculosis* has a functional ortholog in *Mycobacterium avium*. *Biochimie*, 87, 557-63.
- Shepard C.C., Van Landingham R. and Walker L.L. 1976. Immunity to *Mycobacterium leprae* infections in mice stimulated by *M. leprae*, BCG, and graft-versus-host reactions. *Infect Immun*, 14, 919-28.
- Sherman D.R., Voskuil M., Schnappinger D., Liao R., Harrell M.I. and Schoolnik G.K. 2001. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha -crystallin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 7534-9.
- Shi L., Jung Y.J., Tyagi S., Gennaro M.L. and North R.J. 2003. Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a *Mycobacterium tuberculosis* transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 241-6.
- Shi L., Sohaskey C.D., Kana B.D., Dawes S., North R.J., Mizrahi V., *et al.* 2005. Changes in energy metabolism of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lung and under in vitro conditions affecting aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 15629-34.
- Shiozuka K., Tani K., Mizushima S. and Tokuda H. 1990. The proton motive force lowers the level of ATP required for the in vitro translocation of a secretory protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 265, 18843-7.

- Shleeva M., Mukamolova G.V., Young M., Williams H.D. and Kaprelyants A.S. 2004. Formation of 'non-culturable' cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. *Microbiology*, 150, 1687-97.
- Siegele D.A. and Kolter R. 1992. Life after log. *J Bacteriol*, 174, 345-8.
- Sieling P.A., Chatterjee D., Porcelli S.A., Prigozy T.I., Mazzaccaro R.J., Soriano T., et al. 1995. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science*, 269, 227-30.
- Sieling P.A., Torrelles J.B., Stenger S., Chung W., Burdick A.E., Rea T.H., et al. 2005. The human CD1-restricted T cell repertoire is limited to cross-reactive antigens: implications for host responses against immunologically related pathogens. *J Immunol*, 174, 2637-44.
- Silveira H., Ordway D., Dockrell H., Jackson M. and Ventura F. 1997. Cell-mediated immune responses to mycobacterial antigens in patients with pulmonary tuberculosis and HIV infection. *Clin Exp Immunol*, 110, 26-34.
- Simeone R., Bobard A., Lippmann J., Bitter W., Majlessi L., Brosch R., et al. 2012. Phagosomal rupture by *Mycobacterium tuberculosis* results in toxicity and host cell death. *PLoS Pathog*, 8, e1002507.
- Simon S.M., Blobel G. and Zimmerberg J. 1989. Large aqueous channels in membrane vesicles derived from the rough endoplasmic reticulum of canine pancreas or the plasma membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 6176-80.
- Singh A., Guidry L., Narasimhulu K.V., Mai D., Trombley J., Redding K.E., et al. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 responds to O₂ and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 11562-7.
- Singh A., Gupta R., Vishwakarma R.A., Narayanan P.R., Paramasivan C.N., Ramanathan V.D., et al. 2005a. Requirement of the mymA operon for appropriate cell wall ultrastructure and persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in the spleens of guinea pigs. *J Bacteriol*, 187, 4173-86.
- Singh A., Mai D., Kumar A. and Steyn A.J. 2006. Dissecting virulence pathways of *Mycobacterium tuberculosis* through protein-protein association. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 11346-51.
- Singh B., Singh G., Trajkovic V. and Sharma P. 2003. Intracellular expression of *Mycobacterium tuberculosis*-specific 10-kDa antigen down-regulates macrophage B7.1 expression and nitric oxide release. *Clin Exp Immunol*, 134, 70-7.
- Singh R.K., Kefala G., Janowski R., Mueller-Dieckmann C., von Kries J.P. and Weiss M.S. 2005b. The high-resolution structure of LeuB (Rv2995c) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol*, 346, 1-11.
- Sinha S.C., Wetterer M., Sprang S.R., Schultz J.E. and Linder J.U. 2005. Origin of asymmetry in adenylyl cyclases: structures of *Mycobacterium tuberculosis* Rv1900c. *Embo J*, 24, 663-73.
- Sirakova T.D., Thirumala A.K., Dubey V.S., Sprecher H. and Kolattukudy P.E. 2001. The *Mycobacterium tuberculosis* pks2 gene encodes the synthase for the

- hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis. *J Biol Chem*, 276, 16833-9.
- Sismeiro O., Trotot P., Biville F., Vivares C. and Danchin A. 1998. *Aeromonas hydrophila* adenylyl cyclase 2: a new class of adenylyl cyclases with thermophilic properties and sequence similarities to proteins from hyperthermophilic archaeobacteria. *J Bacteriol*, 180, 3339-44.
- Skeiky Y.A., Alderson M.R., Ovendale P.J., Guderian J.A., Brandt L., Dillon D.C., *et al.* 2004. Differential immune responses and protective efficacy induced by components of a tuberculosis polyprotein vaccine, Mtb72F, delivered as naked DNA or recombinant protein. *J Immunol*, 172, 7618-28.
- Skjot R.L., Brock I., Arend S.M., Munk M.E., Theisen M., Ottenhoff T.H., *et al.* 2002. Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and TB12.9, which constitute a subfamily of the *esat-6* gene family. *Infect Immun*, 70, 5446-53.
- Skjot R.L., Oettinger T., Rosenkrands I., Ravn P., Brock I., Jacobsen S., *et al.* 2000. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect Immun*, 68, 214-20.
- Slonczewski J.L., Rosen B.P., Alger J.R. and Macnab R.M. 1981. pH homeostasis in *Escherichia coli*: measurement by ³¹P nuclear magnetic resonance of methylphosphonate and phosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 6271-5.
- Sly L.M., Hingley-Wilson S.M., Reiner N.E. and McMaster W.R. 2003. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol*, 170, 430-7.
- Smeulders M.J., Keer J., Speight R.A. and Williams H.D. 1999. Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. *J Bacteriol*, 181, 270-83.
- Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*, 16, 463-96.
- Smith N.H. and Clifton-Hadley R. 2008. Bovine TB: don't get rid of the cat because the mice have gone. *Nature*, 456, 700.
- Smith W.P., Tai P.C., Thompson R.C. and Davis B.D. 1977. Extracellular labeling of nascent polypeptides traversing the membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 2830-4.
- Snapp E.L., Reinhart G.A., Bogert B.A., Lippincott-Schwartz J. and Hegde R.S. 2004. The organization of engaged and quiescent translocons in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Biol*, 164, 997-1007.
- Sohaskey C.D. and Wayne L.G. 2003. Role of narK2X and narGHJI in hypoxic upregulation of nitrate reduction by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 185, 7247-56.
- Sola-Landa A., Moura R.S. and Martin J.F. 2003. The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 6133-8.
- Sonnenberg M.G. and Belisle J.T. 1997. Definition of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis,

- N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infect Immun*, 65, 4515-24.
- Sonnenberg P., Glynn J.R., Fielding K., Murray J., Godfrey-Faussett P. and Shearer S. 2005. How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. *J Infect Dis*, 191, 150-8.
- Sorensen A.L., Nagai S., Houen G., Andersen P. and Andersen A.B. 1995. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 63, 1710-7.
- Sreevatsan S., Pan X., Stockbauer K.E., Connell N.D., Kreiswirth B.N., Whittam T.S., et al. 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9869-74.
- Sritharan V., Ratledge C. and Wheeler P.R. 1987. Effect of homoserine on growth of *Mycobacterium smegmatis*: inhibition of glutamate transport by homoserine. *J Gen Microbiol*, 133, 2781-5.
- Sritharan V., Wheeler P.R. and Ratledge C. 1989. Metabolism of aspartate in *Mycobacterium smegmatis*. *Eur J Biochem*, 180, 587-93.
- Stamm L.M., Morisaki J.H., Gao L.Y., Jeng R.L., McDonald K.L., Roth R., et al. 2003. *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *J Exp Med*, 198, 1361-8.
- Stanley N.R., Palmer T. and Berks B.C. 2000. The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 275, 11591-6.
- Stanley S.A., Johndrow J.E., Manzanillo P. and Cox J.S. 2007. The Type I IFN response to infection with *Mycobacterium tuberculosis* requires ESX-1-mediated secretion and contributes to pathogenesis. *J Immunol*, 178, 3143-52.
- Stanley S.A., Raghavan S., Hwang W.W. and Cox J.S. 2003. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13001-6.
- Stenger S., Hanson D.A., Teitelbaum R., Dewan P., Niazi K.R., Froelich C.J., et al. 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*, 282, 121-5.
- Stevanin T.M., Ioannidis N., Mills C.E., Kim S.O., Hughes M.N. and Poole R.K. 2000. Flavohemoglobin Hmp affords inducible protection for *Escherichia coli* respiration, catalyzed by cytochromes bo' or bd, from nitric oxide. *J Biol Chem*, 275, 35868-75.
- Stewart G.R., Wilkinson K.A., Newton S.M., Sullivan S.M., Neyrolles O., Wain J.R., et al. 2005. Effect of deletion or overexpression of the 19-kilodalton lipoprotein Rv3763 on the innate response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 73, 6831-7.
- Steyn A.J., Collins D.M., Hondalus M.K., Jacobs W.R., Jr., Kawakami R.P. and Bloom B.R. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for in vivo growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3147-52.

- Sturgill-Koszycki S., Schlesinger P.H., Chakraborty P., Haddix P.L., Collins H.L., Fok A.K., *et al.* 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*, 263, 678-81.
- Sunahara R.K., Beuve A., Tesmer J.J., Sprang S.R., Garbers D.L. and Gilman A.G. 1998. Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J Biol Chem*, 273, 16332-8.
- Sureka K., Dey S., Datta P., Singh A.K., Dasgupta A., Rodrigue S., *et al.* 2007. Polyphosphate kinase is involved in stress-induced mprAB-sigE-rel signalling in mycobacteria. *Mol Microbiol*, 65, 261-76.
- Susstrunk U., Pidoux J., Taubert S., Ullmann A. and Thompson C.J. 1998. Pleiotropic effects of cAMP on germination, antibiotic biosynthesis and morphological development in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol*, 30, 33-46.
- Taggart E.W., Hill H.R., Ruegner R.G. and Litwin C.M. 2006. Evaluation of an in vitro assay for interferon gamma production in response to the *Mycobacterium tuberculosis*-synthesized peptide antigens ESAT-6 and CFP-10 and the PPD skin test. *Am J Clin Pathol*, 125, 467-73.
- Takayama K., Wang C. and Besra G.S. 2005. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*, 18, 81-101.
- Talaat A.M., Lyons R., Howard S.T. and Johnston S.A. 2004. The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4602-7.
- Tang Y.J., Shui W., Myers S., Feng X., Bertozzi C. and Keasling J.D. 2009. Central metabolism in *Mycobacterium smegmatis* during the transition from O₂-rich to O₂-poor conditions as studied by isotopomer-assisted metabolite analysis. *Biotechnol Lett*, 31, 1233-40.
- Tavares R.C., Salgado J., Moreira V.B., Ferreira M.A., Mello F.C., Leung J.W., *et al.* 2007. Interferon gamma response to combinations 38 kDa/CFP-10, 38 kDa/MPT-64, ESAT-6/MPT-64 and ESAT-6/CFP-10, each related to a single recombinant protein of *Mycobacterium tuberculosis* in individuals from tuberculosis endemic areas. *Microbiol Immunol*, 51, 289-96.
- Taylor B.L. and Zhulin I.B. 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63, 479-506.
- Taylor C.M., Beresford M., Epton H.A., Sigeo D.C., Shama G., Andrew P.W., *et al.* 2002. *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence. *J Bacteriol*, 184, 621-8.
- Tchilian E.Z., Desel C., Forbes E.K., Bandermann S., Sander C.R., Hill A.V., *et al.* 2009. Immunogenicity and protective efficacy of prime-boost regimens with recombinant (delta)ureC hly+ *Mycobacterium bovis* BCG and modified vaccinia virus ankara expressing *M. tuberculosis* antigen 85A against murine tuberculosis. *Infect Immun*, 77, 622-31.
- Tekaia F., Gordon S.V., Garnier T., Brosch R., Barrell B.G. and Cole S.T. 1999. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. *Tuber Lung Dis*, 79, 329-42.

- Tesmer J.J., Sunahara R.K., Gilman A.G. and Sprang S.R. 1997. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S. *Science*, 278, 1907-16.
- Tesmer J.J., Sunahara R.K., Johnson R.A., Gosselin G., Gilman A.G. and Sprang S.R. 1999. Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science*, 285, 756-60.
- Thomas J.D., Daniel R.A., Errington J. and Robinson C. 2001. Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 39, 47-53.
- Thompson J.F. and Landy A. 1988. Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles: applications to lambda site-specific recombination complexes. *Nucleic Acids Res*, 16, 9687-705.
- Thornberry N.A. and Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*, 281, 1312-6.
- Timm J., Post F.A., Bekker L.G., Walther G.B., Wainwright H.C., Manganello R., et al. 2003. Differential expression of iron-, carbon-, and oxygen-responsive mycobacterial genes in the lungs of chronically infected mice and tuberculosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14321-6.
- Tjalsma H., Bolhuis A., Jongbloed J.D., Bron S. and van Dijk J.M. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 515-47.
- Tobian A.A., Potter N.S., Ramachandra L., Pai R.K., Convery M., Boom W.H., et al. 2003. Alternate class I MHC antigen processing is inhibited by Toll-like receptor signaling pathogen-associated molecular patterns: *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein, CpG DNA, and lipopolysaccharide. *J Immunol*, 171, 1413-22.
- Tokunaga H. and Wu H.C. 1984. Studies on the modification and processing of prolipoprotein in *Escherichia coli*. Effects of structural alterations in prolipoprotein on its maturation in wild type and lpp mutants. *J Biol Chem*, 259, 6098-104.
- Tokunaga M., Loranger J.M., Wolfe P.B. and Wu H.C. 1982. Prolipoprotein signal peptidase in *Escherichia coli* is distinct from the M13 procoat protein signal peptidase. *J Biol Chem*, 257, 9922-5.
- Tonjum T., Welty D.B., Jantzen E. and Small P.L. 1998. Differentiation of *Mycobacterium ulcerans*, *M. marinum*, and *M. haemophilum*: mapping of their relationships to *M. tuberculosis* by fatty acid profile analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S rRNA gene sequence analysis. *J Clin Microbiol*, 36, 918-25.
- Trias J., Jarlier V. and Benz R. 1992. Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science*, 258, 1479-81.
- Tseng T.T., Tyler B.M. and Setubal J.C. 2009. Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol*, 9 Suppl 1, S2.
- Tsukamura M. and Tsukamura J. 1965. Differentiation of Mycobacteria by Utilization of Nitrite as Sole Nitrogen Source. *J Bacteriol*, 89, 1442.

- Tuckman D., Donnelly R.J., Zhao F.X., Jacobs W.R., Jr. and Connell N.D. 1997. Interruption of the phosphoglucose isomerase gene results in glucose auxotrophy in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol*, 179, 2724-30.
- Tufariello J.M., Jacobs W.R., Jr. and Chan J. 2004. Individual *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth in vitro and in vivo. *Infect Immun*, 72, 515-26.
- Tufariello J.M., Mi K., Xu J., Manabe Y.C., Kesavan A.K., Drumm J., et al. 2006. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor Rv1009 gene results in delayed reactivation from chronic tuberculosis. *Infect Immun*, 74, 2985-95.
- Tullius M.V., Harth G. and Horwitz M.A. 2001. High extracellular levels of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase and superoxide dismutase in actively growing cultures are due to high expression and extracellular stability rather than to a protein-specific export mechanism. *Infect Immun*, 69, 6348-63.
- Turner J., Frank A.A. and Orme I.M. 2002. Old mice express a transient early resistance to pulmonary tuberculosis that is mediated by CD8 T cells. *Infect Immun*, 70, 4628-37.
- Typas A., Becker G. and Hengge R. 2007. The molecular basis of selective promoter activation by the sigmaS subunit of RNA polymerase. *Mol Microbiol*, 63, 1296-306.
- Ulrichs T., Munk M.E., Mollenkopf H., Behr-Perst S., Colangeli R., Gennaro M.L., et al. 1998. Differential T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* ESAT6 in tuberculosis patients and healthy donors. *Eur J Immunol*, 28, 3949-58.
- Vale R.D. 2000. AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol*, 150, F13-9.
- van Delden C., Comte R. and Bally A.M. 2001. Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 183, 5376-84.
- van der Wel N., Hava D., Houben D., Fluitsma D., van Zon M., Pierson J., et al. 2007. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*, 129, 1287-98.
- van der Wolk J.P., de Wit J.G. and Driessen A.J. 1997. The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *Embo J*, 16, 7297-304.
- van Pinxteren L.A., Ravn P., Agger E.M., Pollock J. and Andersen P. 2000. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7, 155-60.
- Van Soolingen D. 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med*, 249, 1-26.
- Vekemans J., Lienhardt C., Sillah J.S., Wheeler J.G., Lahai G.P., Doherty M.T., et al. 2001. Tuberculosis contacts but not patients have higher gamma interferon responses to ESAT-6 than do community controls in The Gambia. *Infect Immun*, 69, 6554-7.

- Velmurugan K., Chen B., Miller J.L., Azogue S., Gurses S., Hsu T., *et al.* 2007. *Mycobacterium tuberculosis* *nuoG* is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. *PLoS Pathog*, 3, e110.
- Verbon A., Kuijper S., Jansen H.M., Speelman P. and Kolk A.H. 1990. Antigens in culture supernatant of *Mycobacterium tuberculosis*: epitopes defined by monoclonal and human antibodies. *J Gen Microbiol*, 136, 955-64.
- Via L.E., Curcic R., Mudd M.H., Dhandayuthapani S., Ulmer R.J. and Deretic V. 1996. Elements of signal transduction in *Mycobacterium tuberculosis*: in vitro phosphorylation and in vivo expression of the response regulator MtrA. *J Bacteriol*, 178, 3314-21.
- Via L.E., Deretic D., Ulmer R.J., Hibler N.S., Huber L.A. and Deretic V. 1997. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem*, 272, 13326-31.
- Vordermeier H.M., Brown J., Cockle P.J., Franken W.P., Drijfhout J.W., Arend S.M., *et al.* 2007. Assessment of cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* and *M. kansasii* ESAT-6 and CFP-10 at the T-cell epitope level. *Clin Vaccine Immunol*, 14, 1203-9.
- Vordermeier H.M., Cockle P.C., Whelan A., Rhodes S., Palmer N., Bakker D., *et al.* 1999. Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6, 675-82.
- Vordermeier H.M., Simsova M., Wilkinson K.A., Wilkinson R.J., Hewinson R.G., Sebo P., *et al.* 2004. Recognition of mycobacterial antigens delivered by genetically detoxified *Bordetella pertussis* adenylate cyclase by T cells from cattle with bovine tuberculosis. *Infect Immun*, 72, 6255-61.
- Vordermeier H.M., Villarreal-Ramos B., Cockle P.J., McAulay M., Rhodes S.G., Thacker T., *et al.* 2009. Viral booster vaccines improve *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against bovine tuberculosis. *Infect Immun*, 77, 3364-73.
- Vordermeier H.M., Whelan A., Cockle P.J., Farrant L., Palmer N. and Hewinson R.G. 2001. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8, 571-8.
- Vordermeier M., Whelan A.O. and Hewinson R.G. 2003. Recognition of mycobacterial epitopes by T cells across mammalian species and use of a program that predicts human HLA-DR binding peptides to predict bovine epitopes. *Infect Immun*, 71, 1980-7.
- Voskuil M.I. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during environmental conditions associated with latency. *Tuberculosis (Edinb)*, 84, 138-43.
- Voskuil M.I., Schnappinger D., Visconti K.C., Harrell M.I., Dolganov G.M., Sherman D.R., *et al.* 2003. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J Exp Med*, 198, 705-13.
- Voulhoux R., Bos M.P., Geurtsen J., Mols M. and Tommassen J. 2003. Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science*, 299, 262-5.

- Walter P. and Blobel G. 1981a. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol*, 91, 557-61.
- Walter P. and Blobel G. 1981b. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*, 91, 551-6.
- Walter P., Ibrahimi I. and Blobel G. 1981. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*, 91, 545-50.
- Walton T.A. and Sousa M.C. 2004. Crystal structure of Skp, a prefoldin-like chaperone that protects soluble and membrane proteins from aggregation. *Mol Cell*, 15, 367-74.
- Wards B.J., de Lisle G.W. and Collins D.M. 2000. An *esat6* knockout mutant of *Mycobacterium bovis* produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis vaccine. *Tuber Lung Dis*, 80, 185-9.
- Waters W.R., Nonnecke B.J., Palmer M.V., Robbe-Austermann S., Bannantine J.P., Stabel J.R., *et al.* 2004b. Use of recombinant ESAT-6:CFP-10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11, 729-35.
- Waters W.R., Palmer M.V., Bannantine J.P., Whipple D.L., Greenwald R., Esfandiari J., *et al.* 2004a. Antigen recognition by serum antibodies in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11, 849-55.
- Waters W.R., Palmer M.V., Thacker T.C., Payeur J.B., Harris N.B., Minion F.C., *et al.* 2006. Immune responses to defined antigens of *Mycobacterium bovis* in cattle experimentally infected with *Mycobacterium kansasii*. *Clin Vaccine Immunol*, 13, 611-9.
- Way S.S. and Wilson C.B. 2005. The *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 homologue in *Listeria monocytogenes* is dispensable for growth in vitro and in vivo. *Infect Immun*, 73, 6151-3.
- Wayne L.G. and Hayes L.G. 1996. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun*, 64, 2062-9.
- Wayne L.G. and Lin K.Y. 1982. Glyoxylate metabolism and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to survival under anaerobic conditions. *Infect Immun*, 37, 1042-9.
- Wedlock D.N., Aldwell F.E., Collins D.M., de Lisle G.W., Wilson T. and Buddle B.M. 1999. Immune responses induced in cattle by virulent and attenuated *Mycobacterium bovis* strains: correlation of delayed-type hypersensitivity with ability of strains to grow in macrophages. *Infect Immun*, 67, 2172-7.
- Weiner J.H., Bilous P.T., Shaw G.M., Lubitz S.P., Frost L., Thomas G.H., *et al.* 1998. A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins. *Cell*, 93, 93-101.

- Weinrich Olsen A., van Pinxteren L.A., Meng Okkels L., Birk Rasmussen P. and Andersen P. 2001. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and esat-6. *Infect Immun*, 69, 2773-8.
- Weiss J.B., Ray P.H. and Bassford P.J., Jr. 1988. Purified secB protein of *Escherichia coli* retards folding and promotes membrane translocation of the maltose-binding protein in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 8978-82.
- Welin A., Eklund D., Stendahl O. and Lerm M. 2011. Human macrophages infected with a high burden of ESAT-6-expressing *M. tuberculosis* undergo caspase-1- and cathepsin B-independent necrosis. *PLoS One*, 6, e20302.
- Weng G., Li J., Dingus J., Hildebrandt J.D., Weinstein H. and Iyengar R. 1996. G-beta subunit interacts with a peptide encoding region 956-982 of adenylyl cyclase 2. Cross-linking of the peptide to free G-beta-gamma but not the heterotrimer. *J Biol Chem*, 271, 26445-8.
- Whelan K.T., Pathan A.A., Sander C.R., Fletcher H.A., Poulton I., Alder N.C., et al. 2009. Safety and immunogenicity of boosting BCG vaccinated subjects with BCG: comparison with boosting with a new TB vaccine, MVA85A. *PLoS ONE*, 4, e5934.
- White-Ziegler C.A., Angus Hill M.L., Braaten B.A., van der Woude M.W. and Low D.A. 1998. Thermoregulation of *Escherichia coli* pap transcription: H-NS is a temperature-dependent DNA methylation blocking factor. *Mol Microbiol*, 28, 1121-37.
- White-Ziegler C.A., Villapakkam A., Ronaszeki K. and Young S. 2000. H-NS controls pap and daa fimbrial transcription in *Escherichia coli* in response to multiple environmental cues. *J Bacteriol*, 182, 6391-400.
- Wickner W. 1980. Assembly of proteins into membranes. *Science*, 210, 861-8.
- Wickner W. and Schekman R. 2005. Protein translocation across biological membranes. *Science*, 310, 1452-6.
- Wiker H.G., Wilson M.A. and Schoolnik G.K. 2000. Extracytoplasmic proteins of *Mycobacterium tuberculosis* - mature secreted proteins often start with aspartic acid and proline. *Microbiology*, 146 (Pt 7), 1525-33.
- Wilkinson K.A., Newton S.M., Stewart G.R., Martineau A.R., Patel J., Sullivan S.M., et al. 2009. Genetic determination of the effect of post-translational modification on the innate immune response to the 19 kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Microbiol*, 9, 93.
- Williams B.G. and Dye C. 2003. Antiretroviral drugs for tuberculosis control in the era of HIV/AIDS. *Science*, 301, 1535-7.
- Wilson S.M., Goss S. and Drobniowski F. 1998. Evaluation of strategies for molecular fingerprinting for use in the routine work of a *Mycobacterium* reference unit. *J Clin Microbiol*, 36, 3385-8.
- Winau F., Weber S., Sad S., de Diego J., Hoops S.L., Breiden B., et al. 2006. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity*, 24, 105-17.
- Wittenberg J.B., Bolognesi M., Wittenberg B.A. and Guertin M. 2002. Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. *J Biol Chem*, 277, 871-4.

- Wu-Hsieh B., Zlotnik A. and Howard D.H. 1984. T-cell hybridoma-produced lymphokine that activates macrophages to suppress intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. *Infect Immun*, 43, 380-5.
- Xiang J., Chao D.T. and Korsmeyer S.J. 1996. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14559-63.
- Yadav M., Roach S.K. and Schorey J.S. 2004. Increased mitogen-activated protein kinase activity and TNF-alpha production associated with *Mycobacterium smegmatis*- but not *Mycobacterium avium*-infected macrophages requires prolonged stimulation of the calmodulin/calmodulin kinase and cyclic AMP/protein kinase A pathways. *J Immunol*, 172, 5588-97.
- Yamada H., Matsuyama S., Tokuda H. and Mizushima S. 1989. A high concentration of SecA allows proton motive force-independent translocation of a model secretory protein into *Escherichia coli* membrane vesicles. *J Biol Chem*, 264, 18577-81.
- Yamada Y., Saito H., Tomioka H. and Jidoi J. 1987. Susceptibility of micro-organisms to active oxygen species: sensitivity to the xanthine-oxidase-mediated antimicrobial system. *J Gen Microbiol*, 133, 2007-14.
- Yamamura M., Uyemura K., Deans R.J., Weinberg K., Rea T.H., Bloom B.R., *et al.* 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*, 254, 277-9.
- Yan S.Z., Huang Z.H., Shaw R.S. and Tang W.J. 1997. The conserved asparagine and arginine are essential for catalysis of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, 272, 12342-9.
- Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., *et al.* 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 275, 1129-32.
- Young H.A. 2006. Unraveling the pros and cons of interferon-gamma gene regulation. *Immunity*, 24, 506-7.
- Yuan Y., Crane D.D. and Barry C.E., 3rd 1996. Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol*, 178, 4484-92.
- Yuan Y., Lee R.E., Besra G.S., Belisle J.T. and Barry C.E., 3rd 1995. Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 6630-4.
- Yuan Y., Mead D., Schroeder B.G., Zhu Y. and Barry C.E., 3rd 1998. The biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. Enzymatic methyl(ene) transfer to acyl carrier protein bound meromycolic acid in vitro. *J Biol Chem*, 273, 21282-90.
- Yuan Y., Zhu Y., Crane D.D. and Barry C.E., 3rd 1998. The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 29, 1449-58.
- Zager E.M. and McNerney R. 2008. Multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infect Dis*, 8, 10.
- Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Decaudin D., Macho A., Hirsch T., *et al.* 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation

- of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med*, 182, 367-77.
- Zhao W., Schorey J.S., Groger R., Allen P.M., Brown E.J. and Ratliff T.L. 1999. Characterization of the fibronectin binding motif for a unique mycobacterial fibronectin attachment protein, FAP. *J Biol Chem*, 274, 4521-6.
- Zheng L., Fisher G., Miller R.E., Peschon J., Lynch D.H. and Lenardo M.J. 1995. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature*, 377, 348-51.
- Zlotnik A. and Crowle A.J. 1982. Lymphokine-induced mycobacteriostatic activity in mouse pleural macrophages. *Infect Immun*, 37, 786-93.
- Zvi A., Ariel N., Fulkerson J., Sadoff J.C. and Shafferman A. 2008. Whole genome identification of *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates by comprehensive data mining and bioinformatic analyses. *BMC Med Genomics*, 1, 18.