

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



CARACTERIZACION GENETICA Y EVALUACION  
DE LOS GENES DE FOSFOLIPASA C DE  
*Mycobacterium tuberculosis* COMO FACTOR DE  
VIRULENCIA EN UNA LINEA DE MACROFAGOS

POR

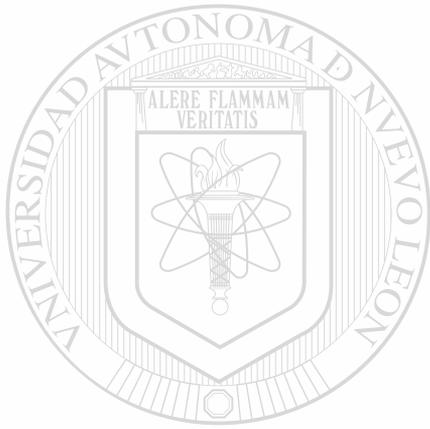
M. en C. Marco Alfredo Hernández Vera

TESIS

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en  
Microbiología

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.  
Mayo del 2003

MAHV



**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y EVALUACIÓN  
DE LOS GENES DE FOSFOLIPASA C DE  
*Mycobacterium tuberculosis* COMO FACTOR DE VIRULENCIA**

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD  
RC311  
.4  
.H4  
2003  
c.1

2003



1080124429



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



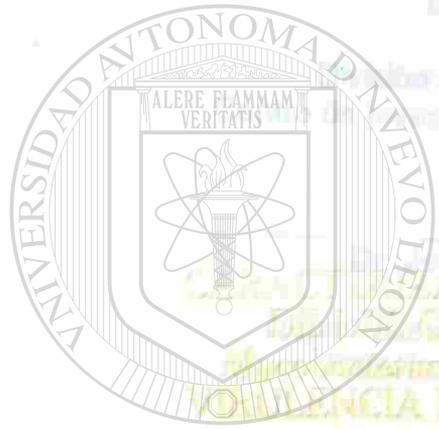
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y EVALUACIÓN DE LOS GENES DE  
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN *Staphylococcus aureus*  
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

17 JUN 2007  
N.  
H.H.  
2007

  
Dr. Lucio Vera Cabrera

Facultad de Ciencias Biológicas  
Laboratorio de Microbiología y Parasitología  
Carretera de San Nicolás de los Garza, N.L.  
C.P. 66460  
San Nicolás de los Garza, N.L.  
Dr. Javier Vargas Villarrani



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

  
Dr. Javier Vargas Villarrani  
Rector Vocal  
Carretera de San Nicolás de los Garza y Mulpozar  
Carretera de Investigación Biomédica del Noroeste, IMSS

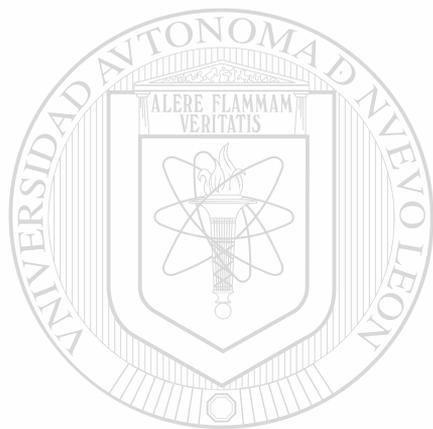
Como requisito parcial para obtener el Grado de  
**DOCTOR EN CIENCIAS** con Especialidad en  
**Microbiología**

  
Dra. María Julia Varela Star  
Subsecretaria de Investigación, Facultad de Ciencias Biológicas

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.  
Mayo del 2007



TD  
RC311  
.4  
.H4  
2003



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

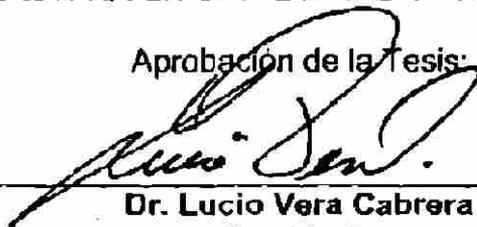
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



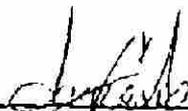
**CARACTERIZACION GENÉTICA Y EVALUACIÓN DE LOS GENES DE FOSFOLIPASA C DE *Mycobacterium tuberculosis* COMO FACTOR DE VIRULENCIA EN UNA LÍNEA DE MACRÓFAGOS**

Aprobación de la Tesis:



**Dr. Lucio Vera Cabrera**  
Presidente

Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica de la  
Facultad Medicina, UANL  
Servicio de Dermatología del Hospital Universitario "José Eleuterio González"



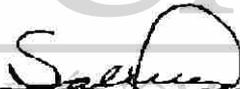
**Dr. Jorge Castro Garza**  
Secretario

División de Biología Celular y Molecular  
Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS



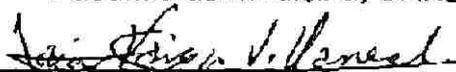
**Dr. José Santos García Alvarado**  
Primer Vocal

Departamento de Microbiología e Inmunología  
Facultad de Ciencias Biológicas UANL



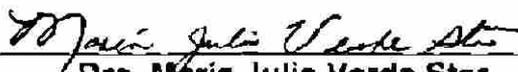
**Dr. Mario Cesar Salinas Garmona**  
Segundo Vocal

Departamento de Inmunología  
Facultad de Medicina, UANL



**Dr. Javier Vargas Villarreal**  
Tercer Vocal

División de Biología Celular y Molecular  
Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS



**Dra. María Julia Verde Star**

Subdirectora de Postgrado, Facultad de Ciencias Biológicas



COMITÉ DOCTORAL

LOS SUSCRITOS INTEGRANTES DEL COMITÉ DOCTORAL COMUNICAMOS QUE DESPUÉS DE HABER ANALIZADO Y REVISADO LA TESIS DOCTORAL DEL M.C. MARCO ALFREDO HERNÁNDEZ VERA, Y TOMANDO EN CUENTA LA OPINIÓN DEL COMITÉ DE TESIS RESPECTIVO DECIDIMOS APROBAR EL TRABAJO.

DAMOS FE

DR. LUIS J. GALÁN WONG \_\_\_\_\_

DRA. ADRIANA E. FLORES SUÁREZ \_\_\_\_\_

DR. JUAN MANUEL ALCOCER GZZ. \_\_\_\_\_

DR. CARLOS E. HERNÁNDEZ LUNA \_\_\_\_\_

DR. ROBERTO MENDOZA ALFARO \_\_\_\_\_

DR. JESÚS ANGEL DE LEÓN GZZ. \_\_\_\_\_

DR. RAHIM FOROUGBAKHCH P. \_\_\_\_\_

CD. UNIVERSITARIA, MAYO 22 DEL 2002.

**ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADO EN:**

En el Laboratorio Interdisciplinario de Investigación Dermatológica (LIID) perteneciente al Servicio de Dermatología del Hospital Universitario "José Eleuterio González" de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L.

En la División de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey N.L.

Y en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza N.L.

Bajo la Dirección del Dr. Lucio Vera Cabrera y la  
Co-Dirección del Dr. Jorge Castro Garza.

Para la realización de este trabajo de investigación y obtener el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Microbiología, se recibió los siguientes apoyos:

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**  
(PROYECTO CONACYT-28697-M)  
(Beca Crédito No. 153991)

**Universidad Autónoma de Nuevo León**  
Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica  
(PAICYT SA 484-00, UANL)

**Instituto Mexicano del Seguro Social**  
Fondo de Fomento a la Investigación-IMSS  
(IMSS-FP-2001/390)

## DEDICATORIA

Todo lo que la mente humana piense es factible de realizarlo, pero solo la dedicación, constancia, entrega y apoyo de la familia lo hace realidad.

El ejemplo es la mejor enseñanza para el logro de nuestras metas es por ello que quiero dedicar este trabajo a Alma, Elisa y Adrián quienes me impulsaron a que lograra su realización.



Gracias por todo su apoyo...

# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Lucio Vera Cabrera Director de mi tesis. Así como al Dr. Jorge Castro Garza quien fungió como Co-Director. También agradecer al Dr. José Santos García Alvarado , quien creyó en mi persona para realizar estudios de Doctorado, al Dr. Javier Vargas Villarreal por su apoyo en la realización de los ensayos enzimáticos y al Dr. Mario Cesar Salinas Carmona que forman parte del Comité de Tesis, por sus valiosas sugerencias en la revisión del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por el apoyo económico para la realización de mis estudios, a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo de beca para la estancia durante la investigación.

Al Dr. Oliverio Welsh L., Jefe del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina (UANL) y al Dr. Salvador Said-Fernández S., Director del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN-IMSS) por permitirme el uso de sus instalaciones y equipo de invaluable ayuda para el desarrollo de este estudio.

A Alma, Elisa y Adrián por su apoyo moral y comprensión que siempre me han brindado. Gracias a ustedes tres por permitirme usar su tiempo para realizar el presente trabajo y realizar una meta personal.

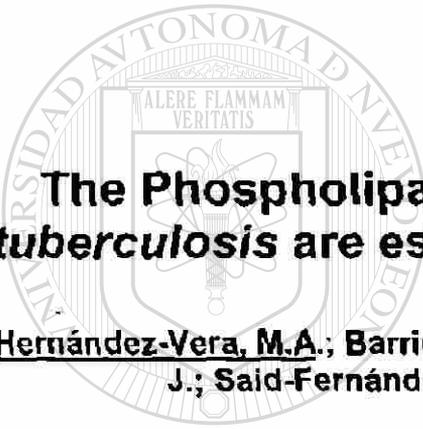
A todas las personas que contribuyeron de una forma u otra a la realización de este trabajo así como a mis compañeros de laboratorio, tanto en LIID como en el CIBIN , mis más sincero agradecimiento .

PUBLICACIONES PRODUCIDAS

**Phospholipase Region of *Mycobacterium tuberculosis* Is a Preferential locus for IS6110 Transposition**

Vera-Cabrera, L., Hernández-Vera, M.; Welsh, O.; Jonhson, W.  
and Castro-Garza, J.<sup>3</sup>

2001.. J. Clin. Microbiol. 39(10) 3499-3504



**The Phospholipase C Genes of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for citotoxicity on human macrophages**

Hernández-Vera, M.A.; Barrios-García, H.; Castro-Garza, J.; Vargas-Villarreal, J.; Said-Fernández, S.; Welsh, O. and Vera-Cabrera, L.

En prensa, 2003

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>1- ANTECEDENTES.....</b>	<b>6</b>
1.1- Características generales del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	6
1.2- Aspectos Clínicos y Epidemiológicos de la tuberculosis.....	8
1.3- Fosfolipasas Bacterianas.....	10
1.4- Fosfolipasas C en <i>M. tuberculosis</i> .....	13
1.5- Hipótesis.....	16
1.6- Objetivos.....	17
<b>2- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
2.1- Cepas Bacterianas de <i>M. tuberculosis</i> .....	18
2.2- Extracción del ADN Genómico.....	18
2.3- Cuantificación del ADN genómico de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> .....	20
2.4- Determinación del polimorfismo en la región de PLC.....	20
2.5- Síntesis de los oligonucleótidos iniciadores y el análisis de secuencia de los amplicones.....	21
2.6- Preparación de la sonda del brazo derecho de IS6110.....	23
2.7- Determinación de la clonalidad de las cepas en estudio.....	24
2.8- Preparación de los extractos celulares micobacterianos.....	25
2.9- Cuantificación de proteínas en los extractos celulares de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> .....	26
2.10- Detección de la actividad fosfolipásica del tipo C de cepas polimórficas de <i>M. tuberculosis</i> y de la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> .....	27
2.11- Cuantificación de la actividad de fosfolipasa C en el extracto de la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> con respecto al tiempo de	

incubación.....	29
2.12-Curva dosis respuesta de los extractos de las cepas polimórficas y la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> .....	29
2.11-Línea celular THP-1.....	30
2.14-Transformación de células THP-1 a macrófagos.....	31
2.15-Infección de la línea THP-1 con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y cepas polimórficas de <i>M. tuberculosis</i> .....	31
<b>3-RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
3.1-Análisis de los amplicones producidos por los iniciadores TB20-TB21....	33
3.2- Digestión con <i>PvuII</i> de los amplicones TB20-TB21 obtenidos de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> polimórficas para el locus <i>plcABC</i> .....	35
3.3-Análisis de RFLP para IS6110 en cepas de <i>M. tuberculosis</i> polimórficas que presentaron el mismo sitio de inserción.....	35
3.4-Concentración de proteínas en extractos celulares totales de las cepas polimórficas de <i>M. tuberculosis</i> .....	36
3.5-El extracto total de la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> presentó actividad de fosfolipasa C dependiente tanto del tiempo de incubación como de la dosis.....	36
3.6-Comparación de la actividad de fosfolipasa C de las cepas polimórficas y la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> .....	37
3.7-Capacidad citotóxica en la monocapa de macrófagos THP-1.....	38
<b>4-DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>5-CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>6-PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>50</b>
<b>7-BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.-** Oligonucleótidos utilizados para las PCR realizadas en el presente trabajo

**Tabla 2.-** Concentración de proteína total de extractos de cepas de *M. tuberculosis* polimórficas a la región de fosfolipasa C.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.-** Punto de hidrólisis de las diferentes fosfolipasas

**Figura 1a.-** Elemento móvil IS6110

**Figura 2.-** Mapa físico de los puntos de corte con la enzima *PvuII* en la región de fosfolipasa C de *M. tuberculosis*.

**Figura 3** Análisis por Southern blot de las cepas de *M. tuberculosis* polimórficas.

**Figura 4.-** Cuantificación de ADN por medio de estándares de masa.

**Figura 5.-** Placas de sílica gel después de ser eluidas con disolventes no polares.

**Figura 6.-** Relación de frente (Rf) de fosfatidilcolina en una cromatoplaaca.

**Figura 7.-** Amplicones de PCR con DNA genómico micobacteriano de cepas polimórficas para los genes de fosfolipasa C con iniciadores TB20 y TB21.

**Figura 8.-** Amplicones de menor tamaño al esperado en las cepas polimórficas para los genes de fosfolipasa C con iniciadores TB20 y TB21.

**Figura 9.-** Esquema de la duplicación de nucleótidos en el punto de inserción de IS6110.

**Figura 10.-** Fragmentos de la digestión con la enzima *PvuII* de los amplicones producidos con los iniciadores TB20/TB21 de cepas polimórficas de *M. tuberculosis*.

**Figura 10a.-** Localización de los elementos IS6110 insertados en la región de fosfolipasa C de las cepas de *M. tuberculosis* estudiadas en el presente trabajo

**Figura 11.-** Análisis por Southern blot de algunas de las cepas polimórficas que mostraron sitios de inserción idénticos

**Figura 12.-** Esquema que representa el segmento 103/162 del genoma de *M. tuberculosis* cepa H37Rv conteniendo los genes de fosfolipasa C.

**Figura 13.-** Fórmula de la fosfatidilcolina.

**Figura 14.-** Relación temporal de la actividad de fosfolipasa C en *M. tuberculosis* cepa H37Rv.

**Figura 15.-** La actividad de fosfolipasa C de *M. tuberculosis* es dependiente de la dosis.

**Figura 16.-** La actividad de fosfolipasa C en *M. tuberculosis* varía en función de los genes funcionales que codifican para esta enzima.

**Figura 17.-** Amplicones de la región del gen *plcD* en cepas de *M. tuberculosis* polimórficas.

**Figura 18.-** La ausencia de los genes *plc* inhiben el efecto citotóxico de *M. tuberculosis* a las 72 horas de infección en una monocapa de macrófagos THP-1.

**Figura 19.-** Efecto citotóxico en una monocapa de macrófagos de la línea THP-1 infectadas con cepas de *M. tuberculosis* a las 144 horas de infección.

**Figura 20.-** Una monocapa de macrófagos de la línea THP-1 a las 72 horas de infección con cepas de *M. tuberculosis* polimórficas.

**Figura 21.-** Modelo de recombinación homóloga para la pérdida de un segmento de la región de *plcA* y *plcB*.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

## ABREVIATURAS

A	Adenina
bd	Bidestilada
BAAR	Bacilos ácido alcohol resistentes
°C	Grados centigrados
C	Citosina
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil amonio
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNTP	Desoxinucleótido
DR	Repeticiones directas
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
DPM	Desintegraciones por minuto
g	Gramo
G	Guanina
HCl	Acido clorhídrico
h	Hora
Ins1,4,5P3	Inositol 1,4,5 trifosfato
kDa	Kilodalton
kpb	kilopares de bases
LIID	Lab. Interdisciplinario de Investigación Dermatológica
LMP	Agarosa de bajo punto de fusión (Low Melting Point)
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
μCi	Microcuries
μg	Microgramo
μL	Microlitro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar

MIRU	Unidades Micobacteriales Intercaladas Repetidas
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
ng	Nanogramo
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PGRS	Secuencias polimórficas ricas en GC
PPD	Derivado de proteína purificado
pH	Potencial de Hidrógeno
RFLP	Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SSC	Solución salina-citrato
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris (Hidroximetil-aminometano)
U	Unidad
v	Volts

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# CARACTERIZACION GENÉTICA Y EVALUACIÓN DE LOS GENES DE FOSFOLIPASA C DE *Mycobacterium tuberculosis* COMO FACTOR DE CRECIMIENTO INTRACELULAR EN UNA LÍNEA DE MACRÓFAGOS

## RESUMEN

La tuberculosis es causada principalmente por *M. tuberculosis*. En *M. tuberculosis* se han identificado tres genes arreglados en tandem que codifican para fosfolipasa C, los que han sido nombrados *plcA*, *plcB* y *plcC*. Enzimas de este tipo han sido demostradas como factor de virulencia en bacterias intracelulares por su capacidad de destrucción del fagolisosoma, y escape a los mecanismos de destrucción, sin embargo aún no se conoce su importancia en la patogenia de la tuberculosis. Aislados clínicos de *M. tuberculosis* presentan la presencia de variaciones en el patrón de RFLP de los genes *plcA* y *plcB* (Vera-Cabrera, et al, 1997. J. Clin. Microbiol. 35:1190-1195). En el presente trabajo se investigó el origen de este polimorfismo por análisis de secuencia de la región de fosfolipasa de doce aislados clínicos polimórficos. Mediante PCR larga se amplificó un fragmento de 5,131 pb que contiene los genes *plcA* y *plcB* completos y parte del gene *plcC*. Los aislados estudiados produjeron un amplicon de ≈1,400-pb más grande de lo esperado. El análisis de secuencia nucleotídica de los productos de PCR indicaron la presencia del elemento de inserción IS6110 insertado en cualquiera de los tres genes *plc*, siendo el gene *plcB* el de mayor incidencia (5 de 10 aislados). En dos cepas el elemento de inserción se encontró en el gene *plcA* en la misma posición nucleotídica. En todos los casos, IS6110 estaba insertado en la misma orientación. El alto índice de transposición en la región de fosfolipasa puede llevar a la excisión de fragmentos de ADN genómico por recombinación de elementos IS6110 cercanos como lo demuestra la existencia de dos cepas con una delección de 2,837-pb que incluye *plcA* y la mayor parte de *plcB*. El efecto de la transposición de IS6110 en la región de las fosfolipasas de cepas de *M. tuberculosis* con genotipos *plcA*::IS6110, *plcB*::IS6110, *plcC*::IS6110,  $\Delta$ *plcA-plcB* y  $\Delta$ *plcA-plcB-plcC* sobre la actividad enzimática y su capacidad citotóxica *in vitro* también fue estudiado. La actividad de fosfolipasa C se determinó usando como sustrato 1, 2 dipalmitoil-3-gliceril-fosfatidil-[<sup>3</sup>H]-colina. La separación del producto de hidrólisis se realizó por cromatografía de capa fina. La radioactividad correspondiente a cada compuesto se determinó en un contador de centelleo líquido. La actividad enzimática mostrada por las cepas de *M. tuberculosis* polimórficas presentó variaciones sin mostrar un decremento significativo. La cepa con la delección de 2,837-pb y la carente de la región de fosfolipasa ( $\Delta$ *plcA-plcB* y  $\Delta$ *plcA-plcB-plcC*, respectivamente), mostraron menor actividad enzimática de PLC. Para determinar la capacidad citotóxica se usaron células humanas de la línea THP-1 transformadas a macrófagos con forbol-12-miristato-13-acetato (6.25 pg/ml) en microplacas de 24 pozos. Los cultivos se infectaron con diferente multiplicidad de infección (MDI). La citotoxicidad se monitoreo por microscopía a las 24 h, 48 h y 72 h después de la infección. La citotoxicidad de las cepas polimórficas se vió disminuida. Esta citotoxicidad fue menor con las cepas carentes de los genes de PLC. Estos resultados confirman la importancia de las PLC para la virulencia de *M. tuberculosis*.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una infección bacteriana crónica causada por *Mycobacterium tuberculosis* y en menor porcentaje por *M. bovis*, la cual se caracteriza por la formación de granulomas en los tejidos. Se trata principalmente de una enfermedad pulmonar pero también puede afectar a otros órganos. Aunque esta enfermedad es bien conocida desde la antigüedad, con la aparición del SIDA, ha cambiado su epidemiología y existe una enorme preocupación en todo el mundo por su resurgimiento y por el incremento de resistencia a los fármacos utilizados para su tratamiento (Brosh et al., 2000). Aunque *M. tuberculosis* es uno de los patógenos humanos más importantes, poco se sabe acerca de sus factores de virulencia y de los mecanismos que le permiten resistir la destrucción por el hospedero y multiplicarse dentro de las células fagocíticas mononucleares.

*M. tuberculosis* posee una secuencia llamada *mtp40*, la cual es una región que es parte de un marco de lectura abierta que codifica para una fosfolipasa C (*plcA*). Este fragmento había sido utilizado en el diagnóstico de PCR para la identificación de *M. tuberculosis* (Sritharan et al., 1994; Weil et al., 1996). Parra et al., (Parra et al., 1991) sugirieron que las secuencias de DNA que codifican para *mtp40* son únicas para *M. tuberculosis* y que no están presentes en otras especies de Micobacterias. Leão et al., (Leão et al., 1995) describieron la clonación y caracterización del gene completo e identificaron un segundo marco de lectura abierto

(ORF) que son homólogos a los genes PLC de *P. aeruginosa*. Los extractos celulares conteniendo este gen clonado en un vector de expresión sobrexpresaron esta proteína y causaron beta hemólisis, sugiriendo una actividad de fosfolipasa (Leao *et al.*, 1995). Johansen *et al.*, (Johansen *et al.*, 1996) obtuvieron la secuencia completa del segundo marco de lectura denominado a estos genes como *plcA* y *plcB*. Estos genes micobacterianos están arreglados en la misma orientación separados por 191 pares de bases. Ambos genes fueron clonados en *M. smegmatis* y la actividad fosfolipasa de cada gen fue expresada. Utilizando los genes *plcA* y *plcB* como sondas bajo condiciones de moderada astringencia se identificaron secuencias homólogas de *M. bovis*, *M. bovis* BCG y *M. marinum*, pero no en otras especies de *Mycobacterium*. Los autores encontraron que extractos celulares de *M. tuberculosis* contienen actividad de fosfolipasa C (PLC) y de fosfolipasa D (PLD), pero esta actividad no la encontraron en sobrenadantes libres de células de estos microorganismos. Por estos resultados ellos asociaron la presencia de la actividad de PLC con las especies de *Mycobacterium* de mayor virulencia (Johansen *et al.*, 1996).

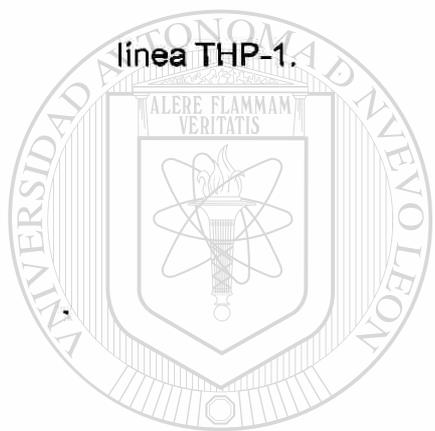
Vera-Cabrera *et al.*, (Vera-Cabrera *et al.*, 1997) estudiaron la distribución de *mtp40* por PCR utilizando una colección de aislados clínicos de *M. tuberculosis* y observaron que algunas de las cepas no producían el amplicon (Vera-Cabrera *et al.*, 1997). Con el fin de descartar la presencia de mutaciones o deleciones en los sitios de alineamiento de los iniciadores que explicaran estos resultados negativos, realizaron un

ensayo de Southern blot usando la enzima de restricción *PvuII* y como sonda un producto de PCR correspondiente al gene *plcA*. Observaron que tanto la cepa H37Rv como la H37Ra presentaron dos bandas: una de 0.75 kpb que corresponde a *plcA* y una banda de 2.1 kpb que corresponde a *plcB* y tiene una hibridación cruzada con la sonda para *plcA*. Algunas de las cepas analizadas presentaron variaciones de este patrón, presentando bandas extras o un cambio en el peso molecular de la banda correspondiente al gene *plcB* de 2.1 a 2.5 kpb, a estas cepas las agruparon en un grupo denominado D (Vera-Cabrera *et al.*, 1997). Otros de los aislados clínicos presentaron cambios en ambos genes o fueron negativos en el análisis de Southern blot.

Las fosfolipasas son importantes factores de virulencia en bacterias intracelulares como, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, el patógeno intracelular *Listeria monocytogenes* y el

patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa*. Además considerando que en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* existen diferencias importantes en esta región de PLC, en este trabajo se planteó estudiar la importancia de estas enzimas en la virulencia de *M. tuberculosis*. Analizamos la secuencia nucleotídica de un amplicon conteniendo los genes *plcA*, *plcB* y parte de *plcC* para determinar el origen del polimorfismo. Las cepas estudiadas presentaron un amplicon de 1,400-pb más grande que el esperado de 5,131-pb, y al realizar el análisis de la secuencia nucleotídica de los productos de PCR indicaron la presencia de elementos de inserción IS6110. Estos elementos fueron encontrados en la

misma dirección e interrumpiendo cualquiera de los tres genes de PLC de las cepas polimórficas de *M. tuberculosis*. El alto índice de transposición en la región de PLC puede llevar a la excisión de fragmentos de ADN genómico por recombinación homóloga de dos elementos IS6110 cercanos , como lo demuestra dos cepas con una delección de 2,837-pb, que incluye el gen *plcA* y parte del gen *plcB*. Esta interrupción, se manifestó en cambios de la actividad enzimática de las cepas y disminución del efecto citotóxico en una monocapa de macrófagos de la línea THP-1.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## 1.- ANTECEDENTES

### 1.1 Características generales del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Las especies *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *M. canetti* y *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto*, forman el grupo bacteriano denominado complejo *Mycobacterium tuberculosis* (Imaeda,1985; O'Reilly y Daborn,1995). Distinguir entre los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* es importante para realizar estudios epidemiológicos. La diferenciación entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* permite descartar casos producidos por *M. tuberculosis* resistentes a pirazinamida (*M. bovis* es resistente natural a esta droga), y para identificar animales infectados que actúen como reservorios y que por lo tanto constituyan un riesgo a la salud pública (Mahairas *et al.*,1996).

Los métodos clásicos para diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis* se basan en sus características fenotípicas, las cuales incluyen morfología de la colonia, tasa de crecimiento y propiedades bioquímicas distintivas. En medios de cultivo a base de huevo, *M. tuberculosis* tiene un crecimiento exuberante junto con una alta producción de niacina, mientras que *M. bovis* no produce la vitamina y su crecimiento es pobre en el mismo medio de cultivo (Mahairas *et al.*,1996). Existen análisis adicionales como la actividad de la enzima nitrasa, donde *M. tuberculosis* reduce los nitratos, mientras que *M. bovis* no. Otra prueba adicional para la diferenciación es la determinación de la resistencia natural a la pirazinamida en *M. bovis* (Imaeda, 1985).

Por otro lado, la utilización de algunos marcadores genéticos, como es la identificación de secuencias de inserción tales como IS6110, IS1081, y secuencias como las DR (repeticiones directas), MPTR (repeticiones directas polimórficas en tandem), PGRS (secuencias ricas en GC polimórficas) y MIRU (unidades micobacteriales repetidas intercaladas) han sido útiles para estudios epidemiológicos y para relacionar fuentes de infección.

Aunque *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* y *M. tuberculosis* están designadas como especies separadas, los estudios clásicos en taxonomía y estudios de sus ácidos nucleicos relacionan a todas ellas como variantes de una sola especie (Liébana y col. 1996; Moda et al., 1996), de las cuales solo se consideran patógenos importantes para el hombre *M. tuberculosis* y *M. bovis*.

*M. tuberculosis* es un parásito intracelular que se replica dentro de las células mononucleares encargadas de la fagocitosis del material extraño (King et al., 1993; McFadden, 1990; Castro-Garza et al., 2002). *M. tuberculosis* produce lesiones granulomatosas, principalmente en pulmón, aunque también se ha observado invasión a otros tejidos, tales como el aparato genitourinario, los riñones, el aparato digestivo y el sistema nervioso central (Hopewell, 1994).

*M. bovis* es el responsable de la tuberculosis en bovinos y otros animales salvajes. El grado de virulencia de *M. bovis* se muestra no solamente para los bovinos sino también hacia el hombre, aunque con *M. bovis* han sido reportados, solo un pequeño porcentaje de casos de tuberculosis humana (Huebner y Castro, 1995; Singer et al., 1997; Saunders, 1995). Reportes de problemas de tuberculosis en humanos por *M. bovis* indican que se tienen una

mayor frecuencia en países en vías de desarrollo, donde existe una alta prevalencia de tuberculosis en el ganado, el cual tiene una estrecha relación con la población humana y el consumo de leche sin pasteurización (Moda *et al.*, 1996). En los Estados Unidos de Norte América la proporción de casos de tuberculosis humana por *M. bovis* es del 0.1 hasta el 3%, del total de los casos reportados, sobre todo en la frontera con México (Huebner y Castro, 1995). En Egipto, las proporciones reportadas varían en el orden del 0.41 al 6% (Rook y Hernández-Pando, 1996).

## 1.2 Aspectos Clínicos y Epidemiológicos de la tuberculosis

*M. tuberculosis* se adquiere por vía respiratoria y pasa al tejido alveolar donde se establece como una infección primaria, que en el 90-95% de los casos permanece asintomática, y solo es reconocida por el desarrollo de una reacción de hipersensibilidad tardía a un filtrado de cultivo de *Mycobacterium*, conocido como PPD (derivado proteico purificado). En el 5-10% de los casos restantes se desarrolla una infección de evolución crónica que se caracteriza por la producción de tos, fiebre, pérdida de peso, producción de esputo purulento y en ocasiones hemoptisis (Hopewell, 1994). La tuberculosis pulmonar es una enfermedad tratable, sin embargo, se siguen produciendo un gran número de casos debido a diversos factores tales como la falta de accesibilidad a servicios de salud, la falta de instalaciones adecuadas para hacer un diagnóstico correcto oportuno, por la falta de continuidad del tratamiento y a la deficiencia de medicamentos en muchos casos. A nivel

mundial, la tuberculosis produce 3 millones de muertes y la aparición de aproximadamente 8 a 12 millones de casos nuevos por año; se considera que dos billones de personas en el mundo se encuentran infectadas con *M. tuberculosis*, y que esta cantidad se ha incrementado debido a la diseminación de cepas drogo resistentes y a la co-infección con el virus VIH-1. (Dolin *et al.*,1998 ;Kusner,2002; Penskivit *et al.*,2002; OMS, 2002).

A pesar de que *M. tuberculosis* fue uno de los primeros organismos patógenos descritos para el humano (Koch, 1882), hasta ahora no se han obtenido métodos adecuados para su control. El bacilo Calmette y Guerin (*M. bovis* BCG) se ha utilizado como vacuna contra la tuberculosis desde 1921 pero el rango de protección obtenida varía del 80 al 0% (Clemens *et al.*,1983;). Por lo que es importante dilucidar los mecanismos de patogénesis de este microorganismo para poder desarrollar nuevas y más adecuadas formas para su control.

Se han descrito algunos genes que se consideran factores de virulencia en *M. tuberculosis*, entre ellos están el gene *katG* que codifica para la enzima catalasa-peroxidasa (Stoeckle *et al.*,1993), el gene *erp* que codifica a una proteína repetitiva exportada (Wilson *et al.*,1998), el gene *acr* que codifica la proteína  $\alpha$ -cristalina que inhibe la capacidad para crecer en líneas celulares de macrófagos (Yuan *et al.*,1998). Por otro lado, una mutación en el principal factor sigma (J) causa menor virulencia en cepas del complejo *M. tuberculosis* (Collins *et al.*,1995), un simple punto de mutación en la región del gene *rpoV* que regula la expresión génica es responsable de la pérdida de virulencia en *M. bovis*, y miembros del complejo *M. tuberculosis* (Steyn *et al.*,2002). Algunos

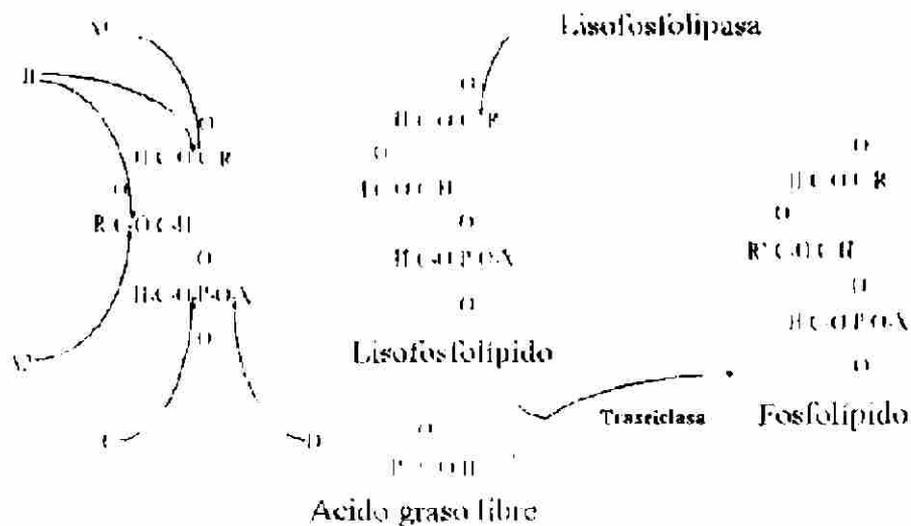
componentes lipídicos de la pared como el lipoarabinomano y los sulfolípidos tienen un papel en la modulación de la respuesta inmune y protegen al organismo de las defensas del hospedero (Chan *et al.*,1991). El gene *AhpC* (alkyl hydroxiperoxis reductasa) le confiere mayor resistencia a la isoniazida (Heym *et al.*,1997). Otros genes codifican proteínas relacionadas a hemoglobina que lo protegen contra el estrés oxidativo y el gene *hmp* que le confiere resistencia al estrés oxidativo o nitrosativo (Hu *et al.*,1999).

Otro factor a considerar son las fosfolipasas presentes en *M. tuberculosis*. Estas enzimas son un factor importante de virulencia en un gran número de bacterias incluyendo *Clostridium perfringens* (Ninomiya *et al.*,1994, Naylor *et al.*,1999), *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Titball *et al.*,1993), el patógeno intracelular *Listeria monocytogenes* (Schwarzer *et al.*,1998) y el patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* (Terada *et al.*,1999).

---

### 1.3- Fosfolipasas Bacterianas

Las fosfolipasas bacterianas comprenden un grupo diverso de proteínas que tienen un amplio espectro de efectos *in vivo* e *in vitro*; sus efectos van desde pequeñas alteraciones en la composición y función de la membrana celular hasta letalidad a bajas concentraciones (Songer,1997). A la fecha han sido descritas cinco tipos de fosfolipasas (PL), las cuales se clasifican dependiendo del punto de hidrólisis en el fosfolípido, como es mostrado en la siguiente figura:



**Figura 1.** Punto de hidrólisis de las diferentes fosfolipasas

La fosfolipasa que hidroliza el acyl-éster del carbono de la posición 1 del glicerol es designada fosfolipasa A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) y la que hidroliza el enlace en la posición 2 del glicerol se denomina fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Aquellas enzimas que hidrolizan el enlace fosfodiéster del lado del glicerol se llaman fosfolipasa C (PLC) y las que cortan el enlace fosfodiéster del lado polar se nombran fosfolipasas D (PLD) (Dennis, 1983). Las PLC se han clasificado en dos grupos de acuerdo al principal fosfolípido que hidrolizan: un grupo de PLC hidroliza específicamente al fosfatidilinositol, no requieren de cationes divalentes para su actividad, su pH óptimo es el neutro y tienen un peso molecular de alrededor de 29-kDa. El segundo grupo lo componen las PLC que tienen un amplio espectro para hidrolizar diferentes fosfolípidos, son dependientes de cationes, presentan también un pH óptimo neutro y su peso molecular es de alrededor de 23-kDa (Meij y Panagia, 1992).

Las PLC se han descrito como factores de virulencia debido a varias características tales como su capacidad destructiva tisular (Williamson y Titball,

1993), y a que actúan como factores de sobrevivencia y escape de los mecanismos fagocíticos (Songer, 1997). Un claro ejemplo ocurre en *Listeria monocytogenes*, un patógeno intracelular que posee dos PLC, una que degrada específicamente el fosfatidilinositol (FI-PLC ó PLC-A, codificada por el gen *plcA*) y una PLC de amplio espectro (FC ó PLC-B codificada por el gen *plcB*), que puede hidrolizar la mayoría de los fosfolípidos celulares. Su importancia en la virulencia de *L. monocytogenes* fue demostrada en un modelo en ratones con bacterias mutantes con delección en el marco de lectura (ORF) en cada una de las PLC y una mutante doble con pérdida de ambas PLC. El mutante sin el gen B (PLC-B) fue 20 veces menos virulento y perdió su capacidad de diseminarse de célula a célula, aunque no presentó un efecto medible en el escape de la vacuola primaria fagolisosómica. El mutante con inactivación de ambos genes (PLC-A y PLC-B) fue 500 veces menos virulento que la cepa original, presentando una notable disminución en su capacidad para escapar de la vacuola primaria, y en su capacidad de diseminarse de célula a célula (Smith *et al.*, 1995).

La actividad de PLC puede ser importante también para la generación de diacilglicerol (DAG), el cual es un producto de la hidrólisis de fosfolípidos que altera los procesos de señalización de la célula a través de la activación de la proteína cinasa C de la membrana celular (Songer, 1997; Martín, 1998). A nivel de la respuesta inflamatoria, esta reacción puede ser amplificadas a través de la producción de metabolitos del DAG, tales como los eicosinósidos, y también puede ser citotóxica o inducir apoptosis, como en el caso de la

fosfolipasa FLC-H de *P. aeruginosa* (Songer,1997 Costa, 1998; Ostroff et al.,1989).

#### 1.4- Fosfolipasas C en *Mycobacterium tuberculosis*

El gene que codifica para una de las fosfolipasas C de *M. tuberculosis* contiene la región *mtp40*. Dada la especificidad de esta secuencia se había utilizado en el diagnóstico por PCR para la identificación de *M. tuberculosis*, aunque existía controversia en cuanto a su distribución en *M. tuberculosis* (Liébana et al.,1996). La secuencia fue clonada originalmente en un fragmento *BamHI* de 3.1-kbp (Parra et al.,1991). Posteriormente, Leão y col. (Leão et al.,1995) obtuvieron la secuencia completa de este fragmento y reportaron el hallazgo de un marco de lectura abierto (ORF), de 1584-pb , y los primeros 1004-pb de un segundo ORF, estos autores no reportan actividad de PLC en *E. coli* recombinante, pero si detectaron actividad hemolítica al clonarlo en *E.coli*, sugiriendo que se codifican proteínas con actividad similar a las PLC. Hasta esa fecha la actividad de las PLC no había sido demostrada plenamente en *M. tuberculosis*.

Johansen et al., (Johansen et al.,1996) describieron el fragmento de *plcB* que faltaba y que tiene un total de 1563-pb, lo que codifica para un polipéptido de 521 aminoácidos, que presenta una homología del 75% con el gen *plcA*. Con la publicación de la secuencia completa del genoma de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (Cole et al.,1998), se identifica otro gen al lado de *plcB* en la posición 2351 del genoma, el cual se denominó *plcC*; y una cuarta

secuencia trunca denominada *plcD* situada en la posición 1755 del genoma (Cole *et al.*,1998). En la secuencia de la cepa de *M. tuberculosis* CDC1551 existen cuatro genes completos (*plcA*, *plcB*, *plcC* y *plcD*) para fosfolipasa C (Fleischmann *et al.*,2002). Estos genes codifican enzimas con el 30 al 40% de homología en la secuencia de aminoácidos con las fosfolipasas de *P. aeruginosa* y una homología entre ellas del 70% (Raynaud *et al.*,2002). Los genes *plcA*, *plcB* y *plcC* no están presentes en *M. bovis* y *M. bovis* BCG, a diferencia del gen *plcD* que si se encuentra presente (Gordon *et al.*,1999); por lo que la actividad enzimática detectada por Johansen *et al.*, (1996) en *M. bovis* podría ser dada por el gen *plcD*.

Vera-Cabrera *et al.* (Vera-Cabrera *et al.*,1997), al analizar la presencia de la secuencia *mtp40* en *M. tuberculosis* de aislamientos clínicos, encontraron que existían cepas que no amplificaban el fragmento *mtp40* por PCR. Para descartar que la falta de amplificación fuera debido a mutaciones puntuales o deleciones que interfirieran con un alineamiento adecuado de los iniciadores, realizaron ensayos de Southern blot utilizando como enzima de restricción *PvuII* y una sonda para el gen *mtp40* (*plcA*) (Vera-Cabrera *et al.*,1997). La sonda utilizada también hibridó con el gen *plcB* debido a la similitud entre estos dos genes. Tomando en cuenta los puntos de corte de la enzima *PvuII* en la región de fosfolipasa C, el mapa de restricción (Figura 2) indica la presencia de un fragmento de 0.75 y otro de 2.1 Kpb correspondientes a los genes *plcA* y *plcB* respectivamente. Vera-Cabrera *et al.*, (Vera-Cabrera *et al.*,1997) encontraron que la mayoría de las 140 cepas analizadas presentaban el patrón normal de 0.75 y 2.1 Kpb, sin embargo el 43% de las cepas mostraron

variación en su patrón, presentando bandas de hibridación adicionales de 0.6 o bien 1.2 kpb, y otras cepas presentaban bandas de 2.5 kpb en el lugar de la de 2.1 kpb.

En el grupo de cepas polimórficas a la región de fosfolipasa C denominado por Vera-Cabrera *et al.*, (Vera-Cabrera *et al.*, 1997) como grupo E, en donde no se presenta un patrón definido de bandas de hibridación cuando se utilizó una sonda para el gen *plcA* y en misma membrana con una sonda para el gen *plcB*, observaron diferencias importantes.

Dada la importancia de las fosfolipasas como factor de virulencia en bacterias intracelulares y que en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* existen diferencias importantes en la región de PLC, en este trabajo nos planteamos estudiar la importancia de estas enzimas en la virulencia de *M. tuberculosis*. En la presente tesis de doctorado analizamos las diferencias que se producen en diversas cepas de *M. tuberculosis* y que se reflejan en un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de la zona de fosfolipasa C. Además estudiar, si estas diferencias modifican la expresión del fenotipo en cuanto a la actividad enzimática de PLC y su capacidad citotóxica en macrófagos humanos.

## 1.5-Hipótesis

La presencia o ausencia de genes que codifican para fosfolipasa C se reflejará en un cambio de la actividad enzimática, y si los productos de estos genes son importantes en la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* podremos analizarlo por la capacidad de la bacteria para producir efecto citotóxico en macrófagos.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

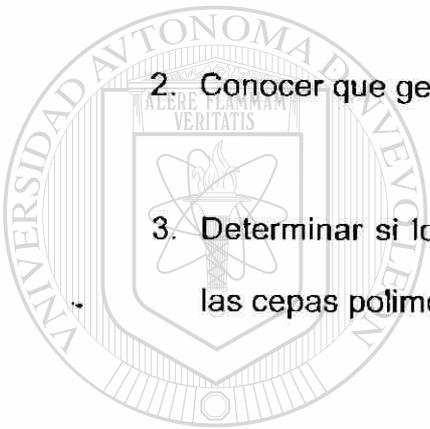
## 1.6- Objetivos

1. Identificar las variaciones en la región de *plc* de cepas de *M. tuberculosis* con polimorfismo.

2. Conocer que gen específico está alterado en las cepas polimórficas.

3. Determinar si los cambios genéticos en los genes de fosfolipasa C de las cepas polimórficas se refleja en la actividad enzimática.

4. Determinar si los cambios genéticos de estos genes altera la citotoxicidad de *M. tuberculosis*.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

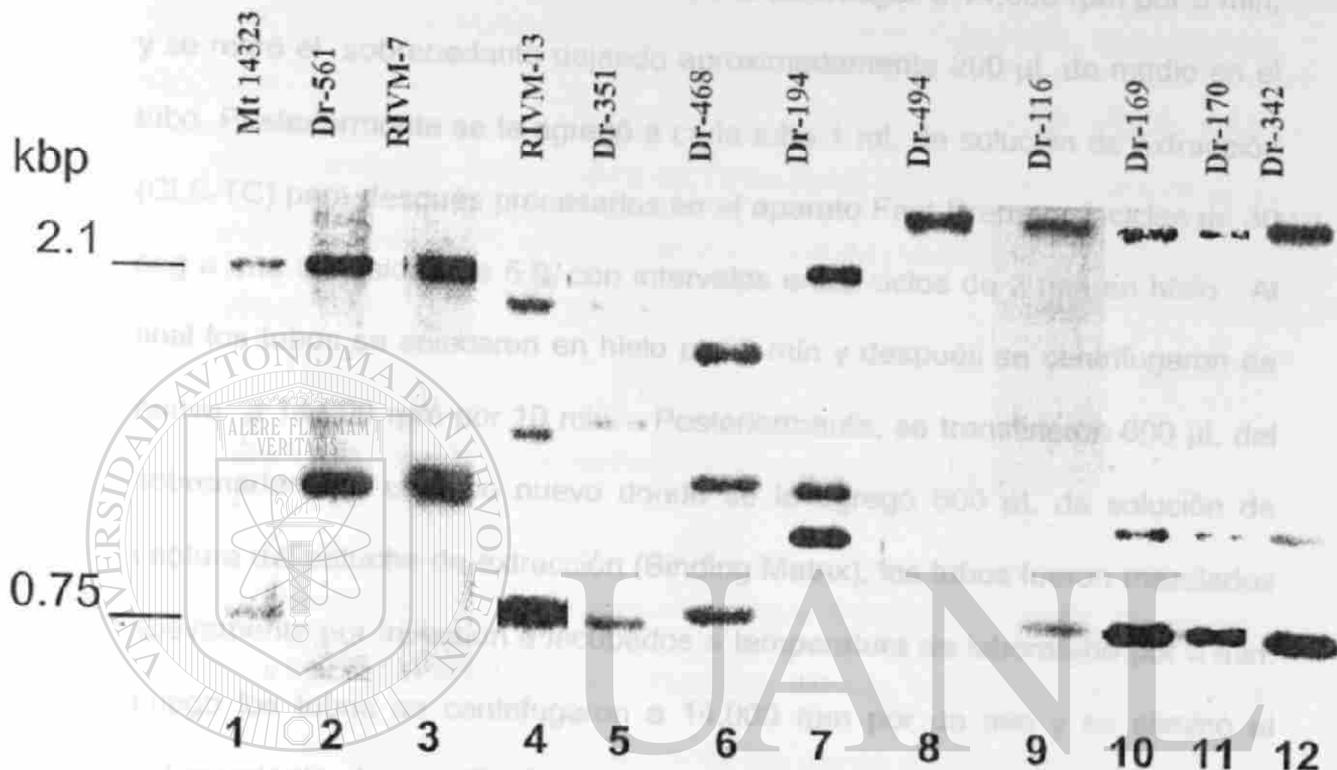
## 2.- MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Cepas Bacterianas de *M. tuberculosis*

La mayoría de las cepas usadas en este estudio fueron obtenidas del Laboratorio Nacional de Referencia para la Tuberculosis en Winnipeg, Canadá. Todas las cepas fueron identificadas como *M. tuberculosis* por métodos convencionales. Las cepas se mantuvieron almacenadas a -70°C en leche descremada y fueron subcultivadas en medio Middlebrook 7H9 (DIFCO Sparks, MD). Una característica de las cepas incluidas en el estudio fue el polimorfismo a la región de la fosfolipasa. La mayoría de las cepas mostraban un patrón de bandas distinto entre ellas en el análisis por Southern blot cuando se utilizó una sonda para el gene *plcA* y diferente al normal que presenta la cepa H37Rv *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 3b). El ADN genómico de dos cepas que fueron publicadas como cepas polimórficas en un estudio realizado por Kremer *et al.*, (1999), y que denominamos RIVM-7 y RIVM-13, fueron gentilmente donadas por la Dra. Kristin Kremer del Instituto Nacional de Salud Pública y Medio Ambiente en Bilthoven (RIVM), Holanda (Kremer *et al.*, 1999).

### 2.2 Extracción del ADN Genómico

Las bacterias se cultivaron en 5 mL de medio Middlebrook 7H9 (Gibco, Sparks, MD) por 14 días en incubación a 37°C. Después de la incubación, el cultivo se centrifugó (HermLe Z 2160 M, Hersteller Spintron Inc, Alemania) a



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**Figura 3.-Análisis por Southern blot de las cepas de *M. tuberculosis* estudiadas en este trabajo.** Las membranas con el ADN transferido se incubaron con una sonda de PCR preparada con los iniciadores PT1 y PT2, que amplifica una región de 396-pb cercana al extremo 3, del marco de lectura de *plcA*. Esta sonda reacciona con el fragmento de 0.75-kbp que contiene *plcA* y con el fragmento de 2.1 -kbp que corresponde a *plcB* y parte de *plcC*. Como control mostramos en el carril 1 la cepa de *M tuberculosis* 14323 que muestra el patrón normal observado en la mayoría de las cepas de *M. tuberculosis* (>80%).

14,000 rpm durante un min y el sedimento se transfirió a un tubo de plástico de 2.0 mL que contenía una esfera de cerámica y perlas de vidrio que son parte del estuche de extracción Fast DNA-Kit ( BIO101, Inc., Carlsbad, Ca ). El cultivo ya en el tubo de 2.0 mL se volvió a centrifugar a 14,000 rpm por 5 min, y se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 200  $\mu$ L de medio en el tubo. Posteriormente se le agregó a cada tubo 1 mL de solución de extracción (CLS-TC) para después procesarlos en el aparato Fast-Prep por 2 ciclos de 30 seg a una intensidad de 5.0, con intervalos entre ciclos de 2 min en hielo. Al final los tubos se colocaron en hielo por 5 min y después se centrifugaron de nuevo a 14,000 rpm por 10 min. Posteriormente, se transfirieron 600  $\mu$ L del sobrenadante a un tubo nuevo donde se le agregó 600  $\mu$ L de solución de captura del estuche de extracción (Binding Matrix), los tubos fueron mezclados suavemente por inversión e incubados a temperatura de laboratorio por 5 min. Luego los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm por un min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en 500  $\mu$ L de otra solución del estuche de extracción denominada SEWS-M y se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por un min para posteriormente eliminar el sobrenadante y centrifugar por otros 10 seg para remover todo el líquido residual. Para eluir el ADN de la matriz de unión, se resuspendió en 100  $\mu$ L de la solución DES del estuche de extracción y se dejó incubar por 3 min a temperatura de laboratorio; se centrifugó a 14,000 rpm por un min, y el sobrenadante obtenido (que contiene el ADN), fue guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su cuantificación y uso.

## 2.3 Cuantificación del ADN genómico de las cepas de

### *M. tuberculosis*

El ADN extraído se cuantificó por medio de comparación con estándares de masa (DNA Quantitation Standards Phage  $\lambda$  DNA, GibcoBRL, Gaithersburg, MD, EUA). Para ello se colocó 1  $\mu$ L de ADN de cada una de las cepas y 6  $\mu$ L de cada estándar de masa (figura 4), preparados de acuerdo al fabricante en un gel de agarosa al 1% y se visualizaron con bromuro de etidio (GibcoBRL, Piscataway, N.J. EUA).

## 2.4 Determinación del polimorfismo en la región de PLC

Para determinar los cambios genéticos que conducen al polimorfismo en la región de las fosfolipasas de las cepas en estudio, se diseñaron un par de iniciadores localizados 1000-pb fuera de los genes *plcA* y *plcB*, los cuales se muestran en la Tabla 1. El diseño de los iniciadores solo contempló los genes *plcA* y *plcB* ya que en el momento en que fueron diseñados todavía no se conocía que existiera el gen *plcC*. El tamaño esperado para el amplicon fue de 5,131 pb. El ensayo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con 100 ng de ADN genómico en un termociclador PTC-200 (MJ Research, Watertown, Massachusetts, EUA) utilizando el sistema de XL P R Kit, de Perkin Elmer (Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, New Jersey, EUA) en un volumen de reacción de 50  $\mu$ L, con las siguientes condiciones: 94°C por 2 min, seguidos por 10 ciclos de 94°C por 15 seg, 60°C por 30 min y



**Figura 2.-** Mapa físico de los puntos de corte con *PvuII* en la región de fosfolipasa C en *M. tuberculosis*. Las flechas en 2.1 y 0.75-kpb, indican los fragmentos del patrón normal de bandas que hibridizan con la sonda para el gene *plcA*. Los sitios de restricción son tomados del segmento 103/162 del genoma de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. (Cole y col. 1998)

68°C por 4 min. Enseguida se dio una segunda ronda de 20 ciclos a temperaturas de: 94°C por 15 seg, 60°C por 30 seg y 68°C por 4 minutos, añadiendo a este paso 20 seg en cada ciclo. Al final se aplicó un paso de extensión a 68°C por 10 min. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (L.M.P. Agarosa, Life Technologies, Grand Island, N.Y. EUA) de bajo punto de fusión. Después de la electroforesis, se localizaron las bandas del producto amplificado y fueron cortadas para su purificación. El fragmento de gel conteniendo el producto amplificado fue cortado y puesto en un tubo eppendorf de 1.5 mL donde se le agregó 10 µL de amortiguador de captura por cada 10 mg de gel cortado. Para la purificación, los tubos se pusieron a baño maría a una temperatura de 60°C por 10 min. El contenido de los tubos se aplicó a las columnas del estuche de purificación (DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, N.J. EUA) en un tubo nuevo y centrifugados a 14,000 rpm por 30 seg. Posteriormente se les agregó 500 µL de una solución de lavado contenida en el estuche de purificación y se volvieron a centrifugar a 14,000 rpm por 30 seg. Por último, la columna se pasó a tubos nuevos de 1.5 mL y se le agregó 30 µL de agua milliQ para recuperar el amplicon purificado después de centrifugar a 14,000 rpm por un min. Los amplicones purificados se refrigeraron a 4°C hasta su secuenciación.

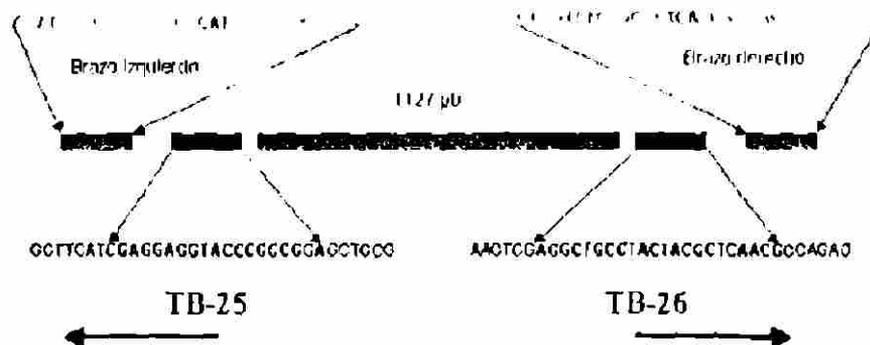
## **2.5 Síntesis de los oligonucleótidos iniciadores y análisis de secuencia de los amplicones**

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio fueron preparados en un sintetizador 392 DNA-RNA (Applied Biosystems, Foster City, Cal. EUA) mediante el método estándar de la fosforoamidita. La secuencia de los productos de PCR fue determinada con el sistema de secuenciación Prism Dye Terminator (Applied Biosystems) en un secuenciador automático ABI377 en el DNA core facility del Federal Laboratories for Health, en Winnipeg, Canadá.

Quando se realizó la secuenciación del amplicon de una de las cepas del estudio, la secuencia de uno de los extremos del amplicon TB20-TB21 correspondía a la de un elemento IS6110. Con la finalidad de que el análisis fuera más simple, se diseñaron otros iniciadores denominados TB25 y el TB26 (Operon Technologies, Inc. Alameda, CA. EUA), situados en la posición 90-71 y posición 1272-1293 de la secuencia de inserción IS6110, respectivamente (Thierry *et al.*, 1990) (Tabla1). Estos iniciadores se alinean a una región cercana al final del elemento IS6110 y están dirigidos hacia fuera del elemento, por lo que al realizar esta amplificación se detectó el sitio exacto de inserción con una sola corrida, como se muestra en la siguiente figura:

Figura 1a

Localización de los iniciadores TB-25 y TB-26 en la posición 71-90-pb y 1272-1293-pb de la secuencia del elemento móvil IS6110 de *Mycobacterium tuberculosis* (Thierry y col, 1990)



**Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para las PCR realizadas en el presente trabajo.**

INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO ESPERADO (pb)
PT1*	5'- CAA CGC GCC GTC GGT GG-3'	391
PT2*	5'- CCC CCC ACG GCA CCG C-3'	
INS1**	5' - CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC-3'	243
INS2**	5' - CGT AGG CGT CGG TGA CAA A-3'	
TB20***	5' - CGC AGC AAC CTT ATC AAG T-3'	5131
TB21***	5'- GTG ATT GTC GGC GAA ATG AAG T-3'	
TB25***	5' - CTC CGG CGG GTA CCT CCT CG-3'	Final brazo lzq. /S6110
TB26***	5' - AGG CTG CCT ACT ACG CTC AAC G-3'	Final brazo Der. /S6110

\* Del Portillo y col., 1991

\*\*\* El presente estudio

\*\* Van Embden y col., 1993

## 2.6 Preparación de la sonda del brazo derecho de IS6110.

La sonda utilizada fue amplificada por PCR con los iniciadores INS1 y INS2 (Tabla 1) en un volumen de reacción de 50  $\mu\text{L}$ . Estos iniciadores amplifican un fragmento de 243-pb del brazo derecho de IS6110. El amplicón obtenido se corrió por electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 1% a 60 volts por 40 min. Después de identificar la banda de 243-pb, esta fue cortada del gel y depositada en un tubo eppendorf de 1.5 mL para ser purificada mediante el kit de purificación (DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech Inc.) Piscataway, N.J. EUA) siguiendo el mismo procedimiento explicado ya en el punto 2.4. Su cuantificación se realizó por comparación con estándares de masa (DNA Quantitation Standards Phage  $\lambda$  DNA, GibcoBRL, Gaithersburg, MD. EUA) en un gel de agarosa al 1% ( GibcoBRL, Grand Island, N.Y. EUA). Para el marcaje de la sonda se colocaron 6  $\mu\text{L}$  del amplicón (100 ng/ $\mu\text{L}$ ) en tubo de 1.5 mL eppendorff. Al tubo se le agregaron 44  $\mu\text{L}$  de agua miliQ estéril y se centrifugo a 14,000 rpm por 30 seg en una centrifuga 5417 Eppendorf (Brinkmann Instruments, Inc. Westbury, NY. EUA). El tubo se calentó hasta ebullición durante 5 min para desnaturalizar el amplicon. Después de este tiempo el tubo se pasó a hielo inmediatamente para conservar las cadenas del ADN abiertas, y se dejó ahí por 5 min. El tubo se centrifugó otra vez por 30 seg, se le agregaron 50  $\mu\text{L}$  del reactivo de marcaje (peroxidasa) y se mezcló vigorosamente. Se le agregaron 50  $\mu\text{L}$  de glutaraldehido, se mezcló bien y se centrifugó brevemente en la microcentrifuga para coleccionar el contenido en el

fondo del tubo. Después se incubó a 37° C por 10 min. La sonda marcada se agregó a los tubos de hibridación como se menciona enseguida.

## 2.7 Determinación de la clonalidad de las cepas en estudio

Para determinar el origen clonal de las cepas se utilizaron 2 µg de ADN genómico que fueron digeridos con 5U de la enzima *PvuII* (Stratagene, la Jolla, Cal. EUA) por 4 h a 37°C. La separación electroforética de los fragmentos digeridos se realizó en un gel de agarosa al 0.8% a 30 Volts durante toda la noche. Al día siguiente el gel se sumergió en HCl 0.25 M por un tiempo de 10 min con agitación suave y constante. El exceso de HCl 0.25 M se eliminó mediante lavados con agua bidestilada. Posteriormente el gel se colocó en un recipiente conteniendo NaOH 0.25 M y se incubó por 30 min con agitación constante. Después de los lavados del gel, el ADN, fue transferido a una membrana de nylon usando el sistema turboblotter (Schleicher & Schuell, Keene, NH. EUA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para pre-hibridar, la membrana se humedeció con SSC 2X (citrate de Na<sub>3</sub> al 0.3 M, NaCl al 3M con pH 7.0) y se colocó en una malla. La membrana y la malla se colocaron en un tubo de hibridación en donde se agregaron 80 mL de SSC 2X para pegar la malla a la pared del tubo de hibridación y después se retiró el SSC 2X. Se añadieron 10 mL de solución de hibridación precalentada y el tubo se colocó en el horno a 42°C cuidando que no se formarán burbujas. Después de una hora de incubación se agregó la sonda (ver la preparación en el punto 2.6), para lo cual se tomaron 0.5 mL de solución de hibridación y se mezcló con

la sonda, la mezcla se agregó al se fondo del tubo de hibridación sin tocar el filtro, se lavó la puntilla en la solución de hibridación 1 ó 2 veces. La membrana se incubó toda la noche a 42°C en un horno de hibridación Autoblot (Bellco, Glass. Inc, Vineland, N.J. EUA), con la sonda marcada con peroxidasa de acuerdo al estuche ECL (ECL, Amersham, LIFE SCIENCE, Buckinghamshire, Inglaterra). La hibridación, lavado y el revelado de las membranas se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

## 2.8 Preparación de los extractos celulares micobacterianos

Las cepas de *M. tuberculosis* fueron sembradas en tubos con 5 mL de medio Middlebrook 7H9 (DIFCO, Sparks, MD. EUA) enriquecido con OADC (Becton Dickinson and Co. Sparks, MD. EUA) y glicerol e incubadas por 14 días a 37°C. los cultivos se cosecharon por centrifugación a 3,000 g por 15 min y se concentraron para lograr una masa de aproximadamente 800 mg (peso húmedo); los cultivos fueron irradiados con rayos gamma por espacio de 48 h en un aparato Gammacell 3000 (Elan, Nordion, International Inc., Kanata, Ontario, Canadá). Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 14,000 rpm (HermLe Z 160 M), y los botones celulares fueron lavados dos veces con 1 mL de PBS con 0.5 % Tritón X-100 y pasados a tubos de 1.5 mL para luego ser centrifugados a 14,000 rpm por 5 min y resuspendidos en 1 mL de un cóctel de inhibidor de proteasas libre de EDTA (Ac. Ethylenediamino tetracético) (Roche, Mannheim, Alemania ) disuelto en TBS 100 mM, pH 7.4, con 0.5 % Tritón X-100. Cada suspensión bacteriana se transfirió a tubos BioPulverizer

(Q-BIOgene, Carlsbad, CA, EUA) con tapa azul y se sometieron a 2 ciclos de 45 seg cada uno a una intensidad de 6 en un aparato FastPrep, FP120 (Bio101, SAVANT), con intervalos de 2 min cada uno, en los cuales las muestras se colocaron en hielo. Los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm por 8 min y el sobrenadante se repartió en alícuotas de 200  $\mu$ L que se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

## **2.9 Cuantificación de proteínas en los extractos celulares de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis***

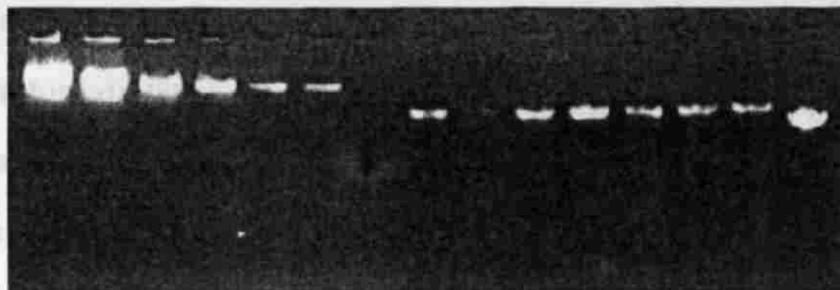
La concentración de proteínas en los extractos biológicos de las diferentes cepas polimórficas usadas en este trabajo y de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (usada como control) fue determinada mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951), el cual se realizó de la siguiente manera: en tubos de ensayo de 13 x 100 mm se colocaron 0.2 mL de las muestras que contenían entre 6 y 14  $\mu$ g de proteínas totales más 1 mL de reactivo C (1 mL de tartrato de sodio y potasio al 1% y sulfato de cobre al 0.5%, diluido en 50 mL de carbonato de sodio 2% en hidróxido de sodio al 0.1 N). Las muestras fueron agitadas con un vórtex e incubadas por 10 min a temperatura ambiente; después de este tiempo, a cada tubo se le añadió 0.1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1N, diluido en HCl 1 N; los tubos se agitaron inmediatamente después con un vórtex, y las muestras se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se determinó la densidad óptica de cada muestra a 750 nm ( $\text{DO}_{750}$ ) en un espectrofotómetro Zeiss, modelo PMQ III

(Jena, Alemania). La cantidad de proteínas de las muestras de las diferentes cepas de *M. tuberculosis* se calculó mediante la interpolación de los datos en una curva estándar de seroalbúmina bovina fracción V (Sigma Chem. Co. S L. M. EUA). La curva estándar fue calculada para cada una de las determinaciones realizadas.

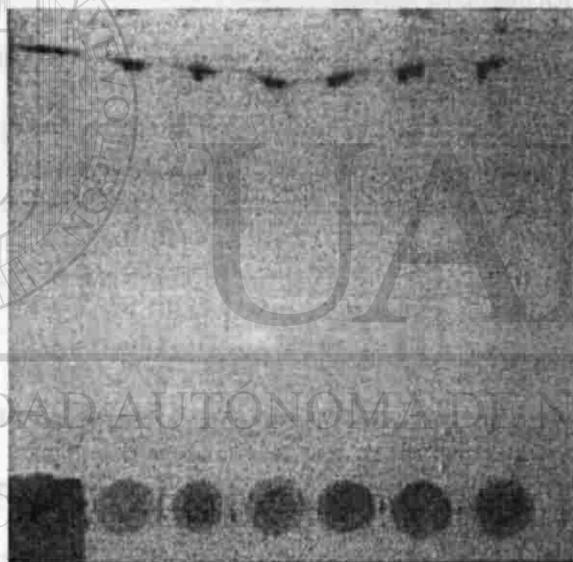
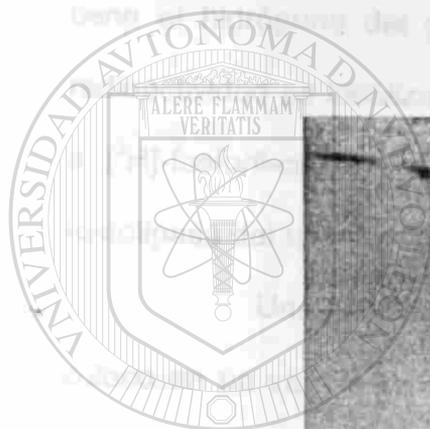
#### **2.10 Detección de la actividad fosfolipásica del tipo C de cepas polimórficas de *M. tuberculosis* y de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis***

Para la detección de la actividad de PLC en los extractos celulares de las cepas polimórficas de *M. tuberculosis* y la cepa H37Rv, se utilizó un método de radioensayo que consistió en lo siguiente: para cada cepa polimórfica y la H37Rv se mezclaron en tubos de borosilicato de 15 x 15 mm (Bellco Glass Inc. Vineland, NJ. EUA), 10  $\mu$ L de la mezcla de ensayo 2X (Tris-base, pH 7.5;  $\text{CaCl}_2$  5 mM; Tritón X 100 0.4%; y 1.5  $\mu$ Ci/mL de 1,2 dipalmitoil [colina-metil- $^3\text{H}$ ]-fosfatidilcolina ([ $^3\text{H}$ ]-FC; que contenía 62 Ci/mmol) y 10  $\mu$ L del extracto celular total de cada cepa. Se ensayaron tiempos variables de incubación y concentraciones diferentes de proteínas (según el ensayo). Al final de la incubación los tubos se pasaron a un baño con hielo para después aplicar cada mezcla de reacción en las placas cromatográficas de sílica gel (Wathman de borosilicato, 100 x 100 x 1 mm, Bellco Glass Inc. EUA) y se les aplicó calor para secar las muestras. Las muestras se eluyeron en las cromatoplacas con una mezcla de disolventes para lípidos polares (cloroforno, ácido acético,

(metanol, agua; 10.6, 2.5, 1, 0.5 mL). Una vez que las fracciones alcanzaron la  
 parte  
 tiempo  
 con ve  
 purific  
 (Figura 5).



**Figura 4.- Cuantificación de ADN por medio de estándares de masa.** En la parte izquierda se encuentran los estándares de masa de una concentración de 500, 250, 125, 63, 31 y 15 ng/6 µl. A la derecha se encuentra el AND extraído de las cepas polimórficas a la región de PLC.



**Figura 5.- Placa de sílica gel después de ser eluída con disolventes no polares.** La placa fue eluída con una mezcla de Cloroformo, ácido acético, metanol y agua (10.6, 2.5, 1 y 0.5 v/v). Las marcas de la parte inferior corresponden al fosfatidil-<sup>3</sup>H]-colina que representa el sustrato hidrolizado por la fosfolipasa C. Estas marcas son reveladas con vapores de yodo.

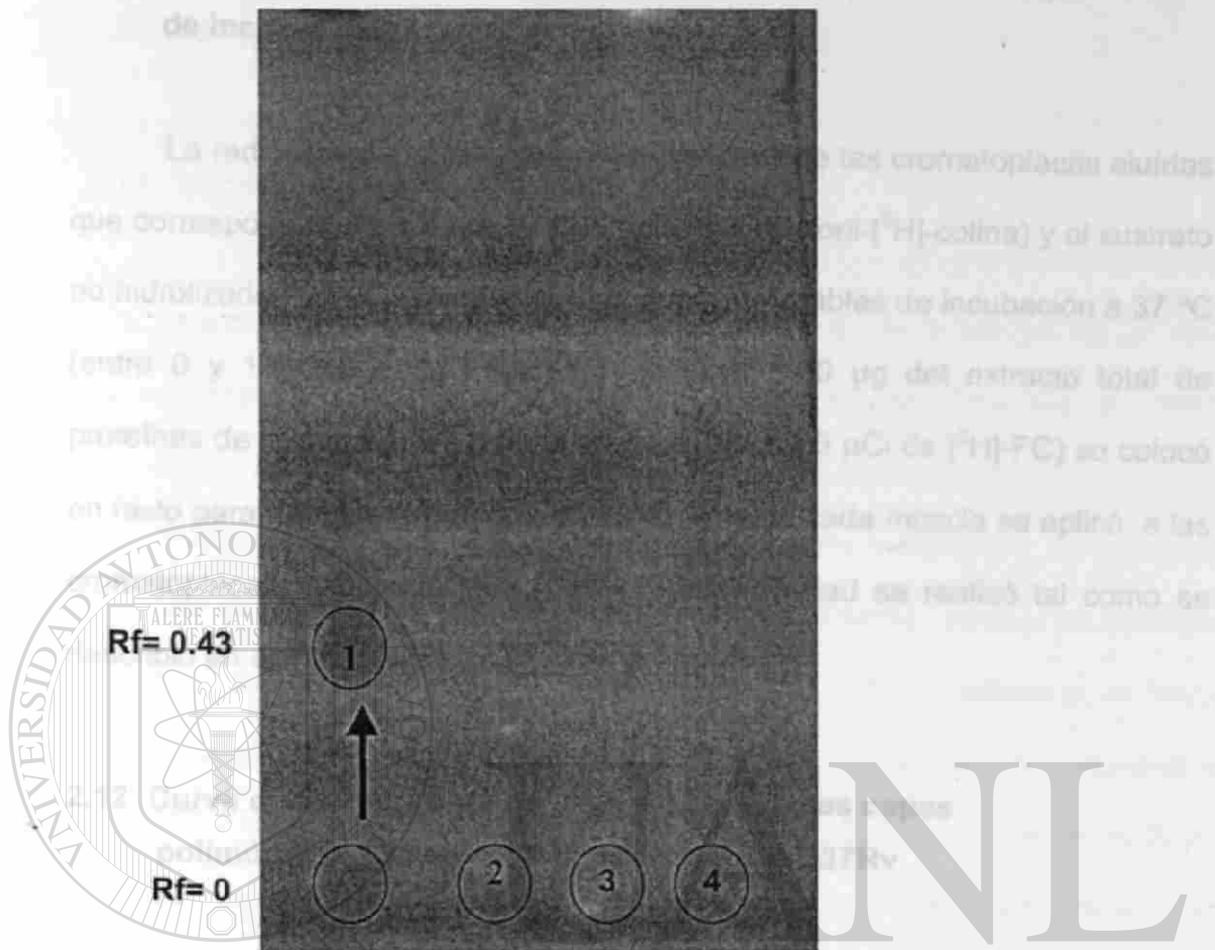
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS 1000 TR.

metanol, agua; 10.6, 2.5, 1, 0.5 mL). Una vez que los disolventes alcanzaron la parte superior de las placas, estas se retiraron de la cámara y se secaron a temperatura de laboratorio para después colocarlas en una cámara saturada con vapores de yodo, con lo cual las manchas lipídicas se revelaron como puntos amarillos o cafés sobre el fondo blanco de la placa (Figura 5). Finalmente, la mancha lipídica correspondiente a la [<sup>3</sup>H]-fosforilcolina fue raspada. Esta mancha se sitúa en el punto de aplicación en la cromatoplaque, teniendo un R<sub>f</sub> = 0.0, mientras que la [<sup>3</sup>H]-FC migra con un R<sub>f</sub> = 0.43 (Figura 6). El sustrato utilizado (1,2 dipalmitoil [colina-metil-<sup>3</sup>H]-fosfatidil)colina, [<sup>3</sup>H]-FC) tiene el hidrógeno del grupo metilo de la colina substituido por tritio. Si la radioactividad se localizaba en las manchas cromatográficas correspondientes a [<sup>3</sup>H]-fosforil-colina y no en 1,2-dipalmitoil-glicerol, la enzima sería una fosfolipasa del tipo C específicamente.

Una vez raspadas, la silica gel correspondiente a cada mancha se colocó en un vial de borosilicato de 20 mL conteniendo 5 mL de cóctel para centelleo líquido (2,5-difeniloxasole PPO al 6%; 2,2'-p-fenilen-bis-5-feniloxasole al 0.6% en 1 lit de tolueno). La cuantificación de la radioactividad se realizó en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Tri-Carb, Packard, modelo 1600 TR, Canberra, EUA) a una eficiencia para el tritio del 47.56%.

2.14 Cuantificación de la actividad de fosfolipasa C en el extracto de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* con respecto al tiempo de incubación.



**Figura 6.-** Relación de frente (Rf) de fosfatidilcolina en una cromatopla. En la placa cromatográfica de silica gel, en el carril 1, 20  $\mu$ L de Fosfatidil colina [1 mg/mL], carril 2, 20  $\mu$ L de Fosforil colina [1 $\mu$ g/mL], carril 3, 5  $\mu$ L de Colina [20ng/mL] y en el carril 4, 10  $\mu$ L de Glicero Fosforil Colina [5mg/mL]. Los disolventes utilizados fueron: Cloroformo:metanol: Ac. Acético: agua (10:6:2.5:1 y 0.5 v/v)) y revelada por saturación de vapores de Yodo.

Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* polimórficas con sus respectivos genotipos que se utilizaron fueron las siguientes: Dr-554 (hspA:158110), Dr-342 (pncB:156110), Dr-465 (pncC:156110), Dr-425 (hspA-

## **2.11 Cuantificación de la actividad de fosfolipasa C en el extracto de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* con respecto al tiempo de incubación**

La radioactividad presente en las manchas de las cromatoplasmas eluidas que corresponden a los productos de hidrólisis (fosforil-[<sup>3</sup>H]-colina) y al sustrato no hidrolizado [<sup>3</sup>H]-FC, se determinó a tiempos variables de incubación a 37 °C (entre 0 y 150 min). La mezcla de ensayo (160 µg del extracto total de proteínas de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv y 1.5 µCi de [<sup>3</sup>H]-FC) se colocó en hielo para detener la reacción y posteriormente cada mezcla se aplicó a las cromatoplasmas. La cuantificación de la radioactividad se realizó tal como se describió en el inciso 2.10.

## **2.12 Curva dosis respuesta de los extractos de las cepas polimórficas y la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv**

La actividad de fosfolipasa tipo C de los extractos de las cepas polimórficas y la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv se determinó usando 10 µL de la mezcla de ensayo con concentraciones de 0 a 160 µg de proteína total de cada extracto. Los tubos se agitaron por 15 seg en un vórtex, se incubaron a 37 °C por 150 min, y se cuantificó la radioactividad.

Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* polimórficas con sus respectivos genotipos que se utilizaron fueron las siguientes: Dr-651 (*plcA*:IS6110), Dr-342 (*plcB*:IS6110), Dr-468 (*plcC*:IS6110), Dr-426 ( $\Delta$ *plcA*-

*plcB*), y Dr-689 ( $\Delta plcA-plcB-plcC$ ) y como control se utilizó la cepa *M. tuberculosis* H37Rv que posee un locus PLC intacto.

### 2.13 Línea celular THP-1

La línea celular THP-1 proviene originalmente de la sangre de un niño de un año de edad con leucemia monocítica aguda (Tsuchiya S, 1980, Tsuyoshi y col.1998). Esta línea celular es inducida a transformarse en células con características de macrófagos en presencia de acetato de 12-forbol-13-miristato (PMA) (Asseffa A, 1993) y ha sido ampliamente utilizada en estudios de interacción con *M. tuberculosis* (Shattock *et al.*,1993; Friedland *et al.*,1993; Zhang *et al.*,1993; Lee y Horwitz, 1995; Tchou-Wong *et al.*,1999; Agranff *et al.*,1999; Kusner y Adams, 2000; Miller y Shinnick, 2000; Armitige *et al.*,2000; Lopez y col,2003 Riendeau y Kornfeld, 2003). El mantenimiento de la línea celular se realizó en medio RPMI 1640 (No. cat. Gibco BRL, Grand Island, N.Y.) con 2 mM L-glutamina, 1.5 g de bicarbonato de sodio, 4.4 g de glucosa, 1.0 mM piruvato de sodio, 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol y 10% de Suero bovino fetal (SFB). Los cultivos se incubaron a 37°C por 4 días en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y se sembraron cada 4 días con una densidad de inóculo de 3.5 X10<sup>5</sup> células / mL.

## 2.14 Transformación de células THP-1 a macrófagos

Para transformar las células THP-1 en macrófagos, los cultivos se crecieron en ausencia de piruvato de sodio por 4 pases en las mismas condiciones de cultivo mencionadas anteriormente. Al final del cuarto pase, los cultivos se lavaron con medio completo precalentado a 37°C y la densidad celular se ajustó a  $5 \times 10^5$  células por mL en medio RPMI + 10% SFB. Luego, se distribuyó 1 mL por pozo en microplacas de 24 pozos (Costar, Corning Sc. Products, Acton, MA, EUA). A cada pozo se le adicionó 1  $\mu$ L de acetato de 12-forbol-13-miristato ( CALBIOCHEM, Biosciences, Inc, La Jolla, CA, EUA) a una concentración final de 6.25 ng/mL y las microplacas se incubaron a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub>. Cada 48 h se realizó un cambio de medio, luego del segundo cambio las células estaban listas para ser infectadas.

## 2.15 Infección de la línea THP-1 con *Mycobacterium tuberculosis*

### H37Rv y cepas polimórficas de *Mycobacterium tuberculosis*

Después del segundo cambio de medio en los cultivos celulares, los cultivos celulares se infectaron con la cepa control *M. tuberculosis* H37Rv y con la cepa *M. tuberculosis* DR-689 (genotipo  $\Delta$ plcA-plcB-plcC), ambas a una multiplicidad de infección de 0.1 (10 células:1 bacteria). Como control negativo se dejaron algunos pozos sin infectar. Las placas se incubaron por 72 h a una temperatura de 37°C, con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A las 24 h de incubación, 3 pozos de cada grupo se les retiró el medio y se les agregó 1 mL

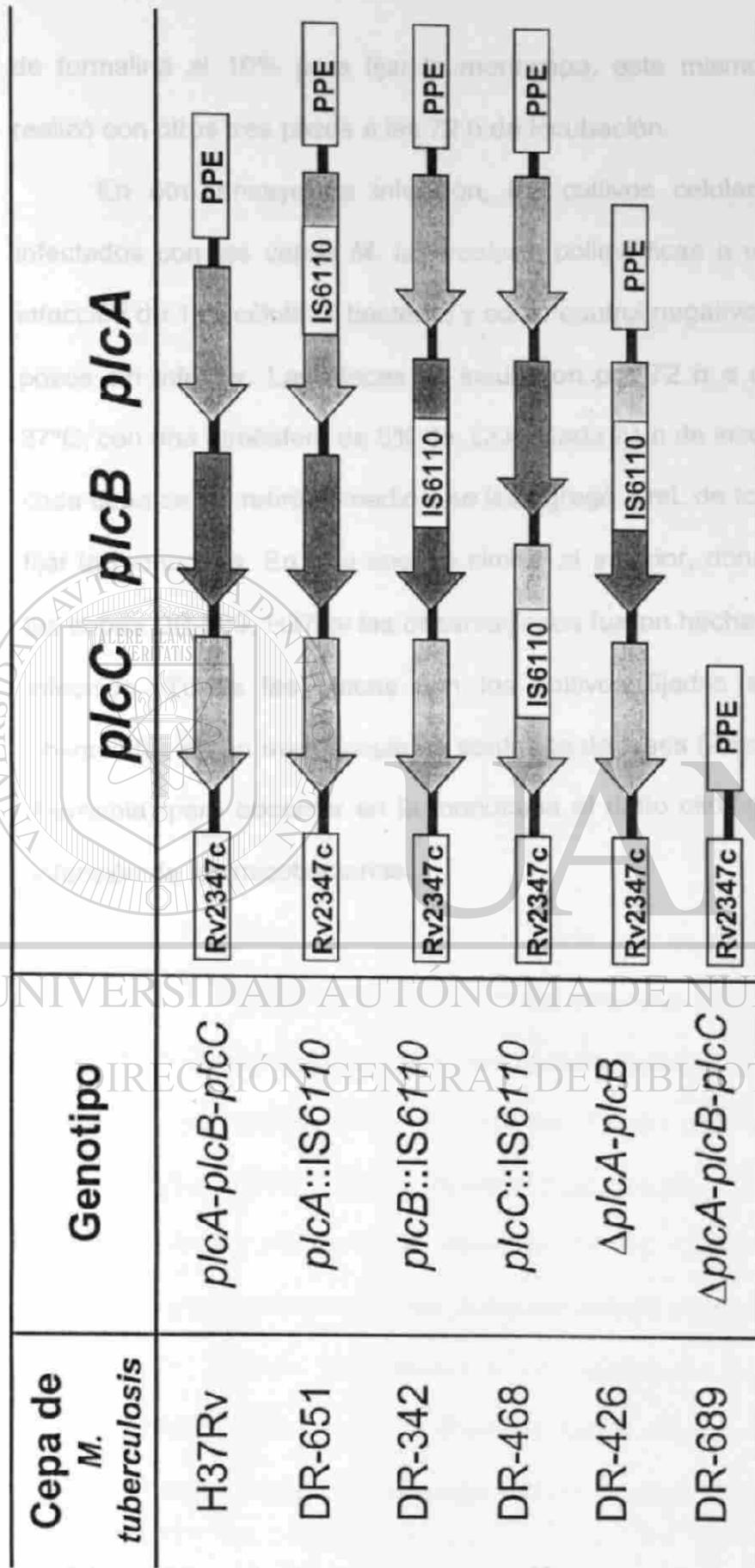
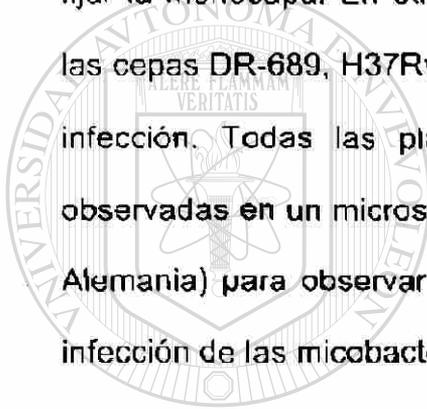


Figura 12.- Esquema que representa al segmento 103/162 del genoma de *M. tuberculosis* cepa H37Rv, conteniendo los genes de PLC y los cambios ocurridos en las cepas polimórficas (Cole y col. 1998)

de formalina al 10% para fijar la monocapa, este mismo procedimiento se realizó con otros tres pozos a las 72 h de incubación.

En otro ensayo de infección, los cultivos celulares THP-1 fueron infectados con las cepas *M. tuberculosis* polimórficas a una multiplicidad de infección de 1 (1 célula: 1 bacteria) y como control negativo se dejaron algunos pozos sin infectar. Las placas se incubaron por 72 h a una temperatura de 37°C, con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Cada 24 h de incubación, 3 pozos de cada cepa se les retiró el medio y se les agregó 1 mL de formalina al 10% para fijar la monocapa. En otro ensayo similar al anterior, donde solo se utilizaron las cepas DR-689, H37Rv las observaciones fueron hechas hasta las 144 h de infección. Todas las placas con los cultivos fijados en formalina fueron observadas en un microscopio de contraste de fases (Zeiss, Axiovert 25, Jena, Alemania) para observar en la monocapa el daño citológico producido por la infección de las micobacterias.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



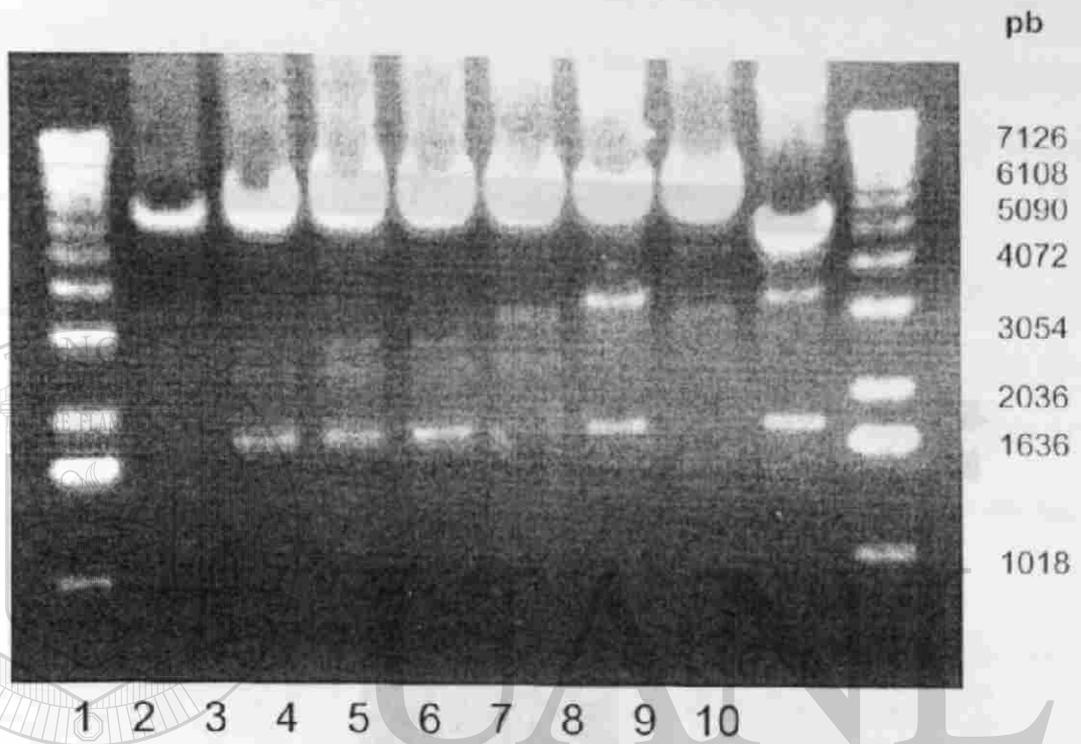
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

### 3.- RESULTADOS

#### 3.1 Análisis de los amplicones producidos por los iniciadores TB20-TB21

Al realizar PCR larga del ADN genómico de las cepas polimórficas con los iniciadores TB20-TB21, que amplifican la región comprendiendo los genes *plcA* y *plcB* completos y parte de *plcC*, se observó la presencia de amplicones más grandes que los producidos por la cepa *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 7); dos cepas presentaron un amplicon menor al esperado (Figura 8). Algunas bandas de menor intensidad también fueron visualizadas en los geles de agarosa junto con los productos principales. Al secuenciar algunas de estas bandas de baja intensidad, se observó que correspondían a sitios internos de la secuencia menos específicos que permitían el alineamiento de los iniciadores.

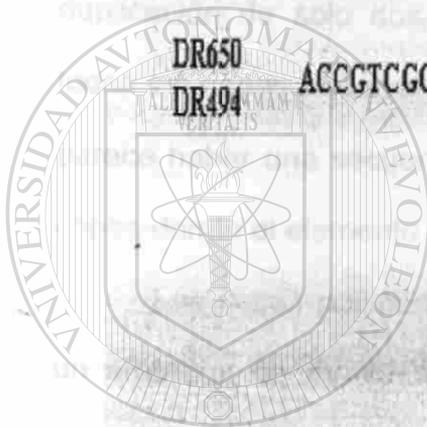
Los amplicones se comenzaron a secuenciar utilizando los iniciadores TB20 y TB21. En uno de los extremos del amplicon TB20-TB21 de una de las cepas, se encontró una secuencia que no pertenecía a los genes de fosfolipasa y que al ser analizada con el sistema BLAST del National Center for Biotechnology Information (<http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) resultó la secuencia de un elemento de inserción IS6110. Dado que el aumento de tamaño de los demás amplicones podía ser debido a este mismo fenómeno, se continuó el análisis de secuenciación utilizando los iniciadores que denominamos TB25 y el TB26 (Tabla1). Estos iniciadores se alinean a una región cercana al final del elemento IS6110 y están dirigidos hacia fuera del



**Figura 7.- Amplicones de PCR larga obtenidos con los iniciadores TB20 y TB21 a partir de ADN genómico microbiano de cepas polimórficas para los genes de fosfolipasa C. Carriles: 1 y 10, marcadores de 1-kb (Gibco); 2, Cepa RIVM-7; 3, Cepa Dr-169; 4, Cepa Dr-170; 5, Cepa Dr-342; 6, Cepa Dr-351; 7, Cepa Dr-561; 8, Cepa Dr-468; 9, *M. tuberculosis* H37Rv.**

elementos de los genes que al realizar esta amplificación se pueda detectar el  
 ado de inserción de una copia copia (ver Figura 1a) En todos los cepas del  
 aumento de tamaño del amplicon TB20-TB21 evidenciaron elementos IS6110.  
 En la Figura 106 se describen las variaciones y la localización del punto de  
 transcripción de los elementos de inserción en el ADN genómico bacteriano.

IR<sub>R</sub> IS6110 IR<sub>L</sub>



DR650

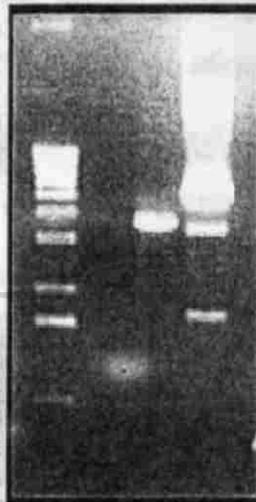
DR494

ACCGTCGCGT

CGGCGACGCG

*plcB* 20569-

*plcA* 23406



M DR650 DR494 H37Rv

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

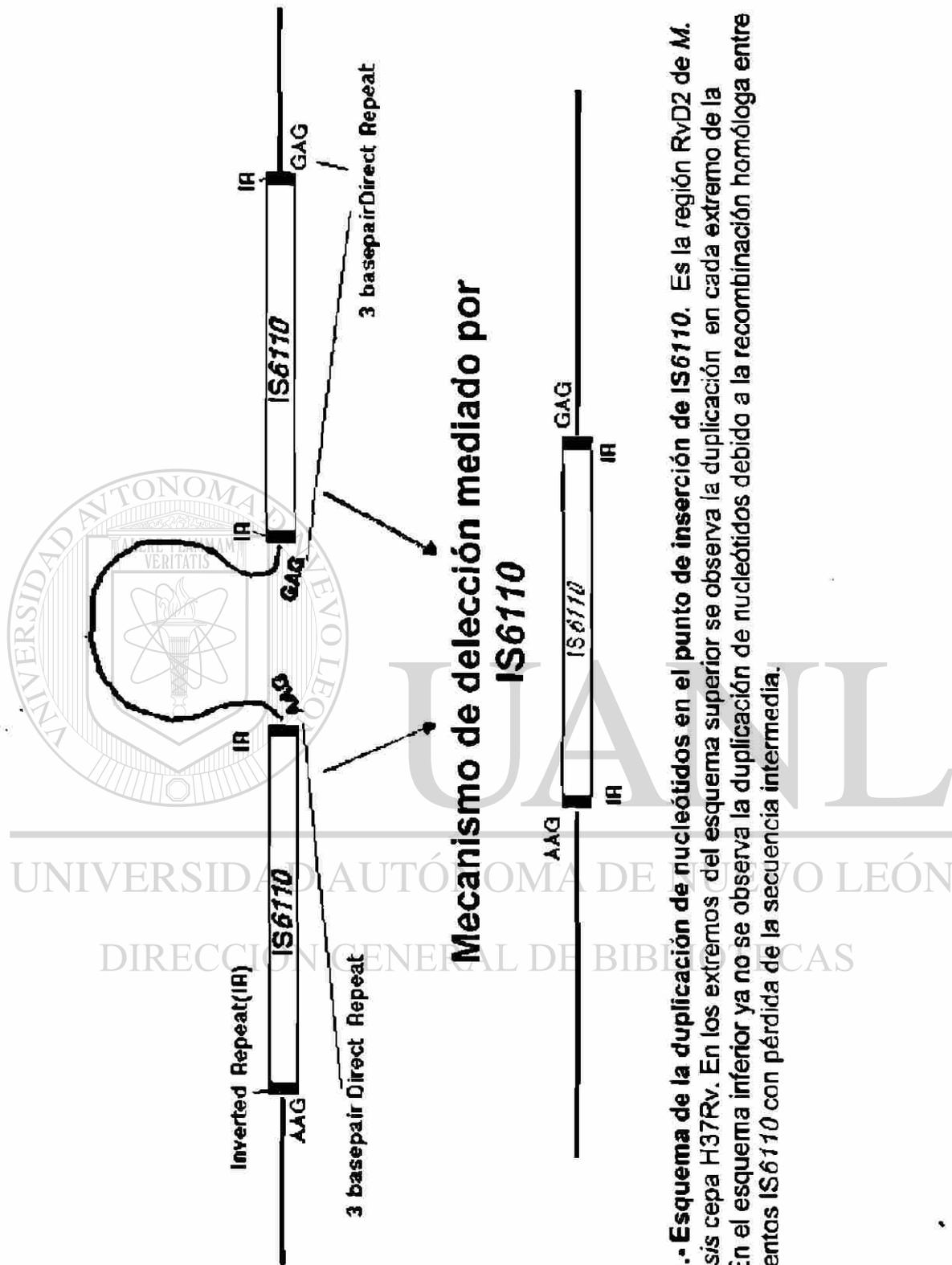
®

**Figura 8.-** Amplicones de menor tamaño al esperado en las cepas de *M. tuberculosis* polimórficas para los genes de fosfolipasa C con iniciadores TB20 y TB21. En el análisis de secuenciación mostraron un elemento IS6110 insertado y una pérdida de 2.8-kpb.

elemento, de tal forma que al realizar esta amplificación se puede detectar el sitio de inserción en una sola corrida (ver Figura 1a) En todos las cepas con aumento de tamaño del amplicon TB20-TB21 encontramos elementos IS6110. En la Figura 10a se describen las secuencias y la localización del punto de transposición de los elementos de inserción en el ADN genómico bacteriano, en el cual se observa la duplicación de 3 o 4 nucleótidos típica de estos mecanismos de integración (Figura 9).

En el caso de la cepa de *M. tuberculosis* RIVM-7, observamos la duplicación de solo dos nucleótidos. Al alinear las secuencias laterales de todas las cepas observamos que en el brazo izquierdo de la inserción IS6110 parece haber una secuencia consenso SSNNNS (S = C ó G), excepto en las cepas donde el elemento está insertado en *plcB*.

Las cepas polimórficas de *M. tuberculosis* Dr-494 y Dr-426 produjeron un amplicon de menor tamaño que el esperado (Figura 8). El análisis de secuencia reveló que la secuencia repetida imperfecta del lado derecho de IS6110 estaba anclada en el nucleótido 20569 que corresponde al gene *plcB* y que el lado izquierdo se encontraba en el nucleótido 23406 correspondiente al gene *plcA* de la región de fosolipasa, perdiéndose por tal motivo un fragmento de 2837-pb. En los extremos de IS6110 no se observaron la duplicación de los nucleótidos.



**Figura 9.- Esquema de la duplicación de nucleótidos en el punto de inserción de IS6110.** Es la región RvD2 de *M. tuberculosis* cepa H37Rv. En los extremos del esquema superior se observa la duplicación en cada extremo de la IS6110. En el esquema inferior ya no se observa la duplicación de nucleótidos debido a la recombinación homóloga entre dos elementos IS6110 con pérdida de la secuencia intermedia.

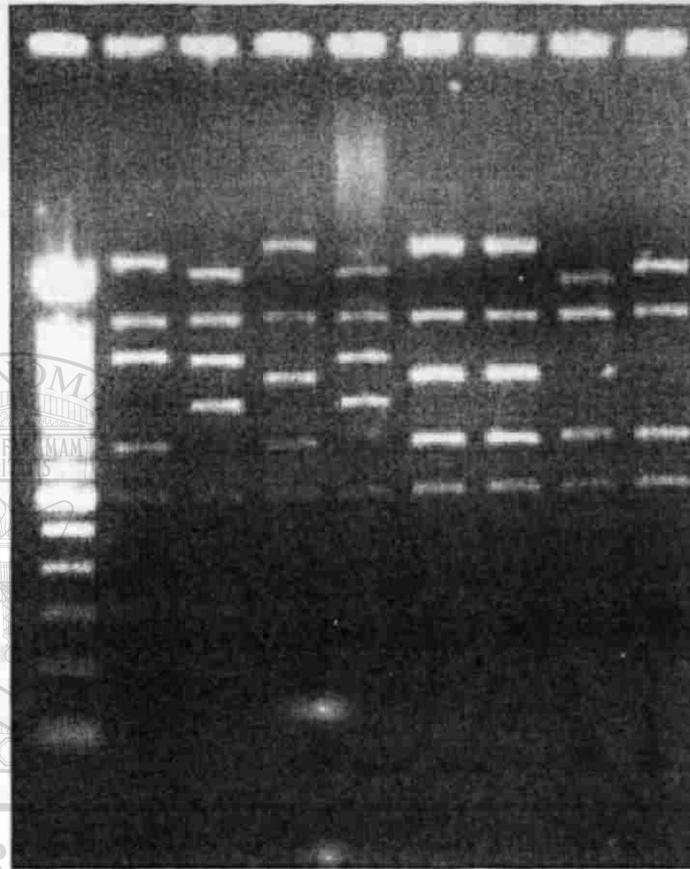
### **3.2 Digestión con *PvuII* de los amplicones TB20-TB21 obtenidos de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* polimórficas para el locus *plcABC***

Para confirmar que los cambios en los patrones observados en los análisis de Southern blot se debían únicamente a la inserción del elemento IS6110, se realizó la purificación de los amplicones y posteriormente fueron digeridos con la enzima de restricción *PvuII*. La figura 10 muestra el mapa con los cambios posibles así como la separación por electroforesis en un gel de agarosa a 1 % de los amplicones digeridos. En todos los casos, se observó concordancia entre los fragmentos esperados y los obtenidos.

### **3.3 Análisis de RFLP para IS6110 en cepas de *M. tuberculosis* polimórficas que presentaron el mismo sitio de inserción**

Al observar que los sitios de inserción del elemento IS6110 se repetían entre algunas cepas polimórficas, y para descartar de que esta selección del mismo sitio de inserción pudiera ser debido a que las cepas utilizadas tuvieran un mismo origen, se analizó el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para IS6110 en aquellas cepas que mostraron sitios inserción idénticos. En la Figura 11, se presentan cuatro cepas de *M. tuberculosis* analizadas por este método; en el lado izquierdo, se muestra el análisis por Southern blot de dos cepas aisladas en la provincia de Columbia Británica, Canadá, que muestran nueve bandas similares y 6 bandas

9 8 7 6 5 4 3 2 1



pb

1891

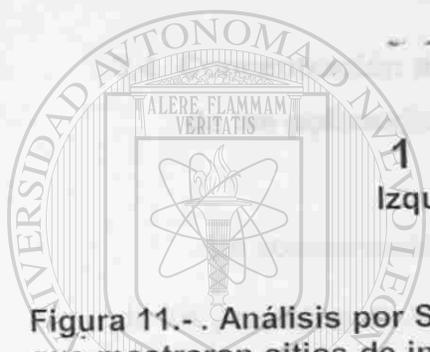
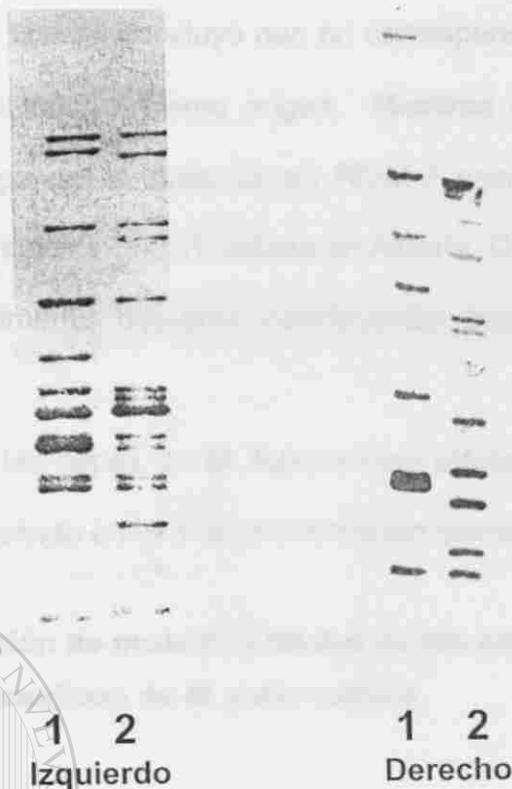
1475

751

580

305

**Figura 10.- Digestión amplicones con la enzima *PvuII* producidos por PCR con los iniciadores TB20 y TB21 . La digestión es separada por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. En el carril 1, cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, carril 2, marcador de peso molecular de 100-pb (Gibco), los carriles del 2 al 8, son cepas de *M. tuberculosis* polimórficas que corresponden a DR-468, DR-170, DR-342, RIVM-7, DR-169, DR-561 y DR-352, respectivamente.**



**Figura 11.- Análisis por Southern blot de algunas de las cepas polimórficas que mostraron sitios de inserción idénticos.** Las membranas se incubaron con una sonda para el brazo derecho de la secuencia de inserción IS6110. Lado izquierdo, Carril 1, Dr-169, carril 2, Dr-170. Lado derecho, carril 1, Dr-561, y carril 2, RIVM-7.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

diferentes, por lo que se concluyó que no corresponden a la misma cepa pero pueden haber tenido un mismo origen. Mientras en el lado derecho de la Figura 11, la cepa de *M. tuberculosis* RIVM-7 proveniente de Mongolia y la cepa de *M. tuberculosis* Dr-561 aislada en Alberta, Canadá muestran un patrón de bandas totalmente diferente concluyendo que estas cepas no tienen relación clonal.

En todas las cepas de *M. tuberculosis* analizadas, el elemento IS6110 se encontró insertado en la misma orientación como lo muestra la figura 10a.

### **3.4 Concentración de proteínas totales en los extractos celulares de las polimórficas de *M. tuberculosis***

La concentración de proteína total que se obtuvo de los extractos totales de los genotipos de *M. tuberculosis* se encuentra en la Tabla 2.

### **3.5- El extracto total de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv presentó actividad de fosfolipasa C. dependiente tanto del tiempo de incubación como de la dosis**

Al incubar a 37°C las muestras por tiempos variables con 160 µg de proteínas totales, se observó que la liberación de fosforil-<sup>3</sup>H]-colina (medido por las desintegraciones por minuto del sustrato radioactivo, dpm) se incrementó en función del tiempo de incubación, entre 0 y 150 min. Lo que sugirió que la actividad presente en el extracto total de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv correspondía a la actividad de una fosfolipasa del tipo C



**Figura 10a.- Localización de los elementos IS6110 insertados en la región de fosfolipasa C de las cepas de *M. tuberculosis* polimórficas estudiadas en el presente trabajo. Se observa la duplicación de nucleótidos en los extremos. En las cepas DR-494 y DR-426, no se observa la duplicación de nucleótidos en el punto de inserción del elemento IS6110, estas cepas tienen una pérdida de su secuencia de 2.8-kpb**

Cepas de <i>M. tuberculosis</i>	Genotipo	Concentración de proteína total $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
H37Rv	<i>plcA-plcB-plcC</i>	7.44
DR-651	<i>plcA::IS6110</i>	5.45
DR-342	<i>plcB::IS6110</i>	7.92
DR-468	<i>plcC::IS6110</i>	7.93
DR-426	$\Delta\textit{plcA-plcB}$	9.8
DR-689	$\Delta\textit{plcA-plcB-plcC}$	9.82

Tabla 2.- Concentración de proteína total en extractos celulares de cepas de *M. tuberculosis* polimórficas.

(Figura 14). No se detectó radioactividad en las regiones correspondientes a 1,2-dipalmitoil-glicerol ni a las regiones intermedias entre las manchas cromatográficas. En las curvas dosis-respuesta la radioactividad en las manchas correspondientes a fosforil-[<sup>3</sup>H]-colina se incrementaron proporcionalmente con concentraciones crecientes de las proteínas totales de la cepa H37Rv (Figura 15), donde las dpm correspondieron a 4,770 con 160 µg de proteínas totales.

### 3.6 Comparación de la actividad de fosfolipasa C de las cepas polimórficas y la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*

En este trabajo se utilizaron varias cepas de *M. tuberculosis* polimórficas que presentaron interrupciones en los genes de fosfolipasa C, las cuales son mostradas en la siguiente tabla:

Cepa de <i>M. tuberculosis</i>	Genotipo	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>	<i>plcC</i>
H37Rv	<i>plcA-plcB-plcC</i>	+	+	+
DR-561	<i>plcA::IS6110</i>	-	+	+
DR-342	<i>plcB::IS6110</i>	+	-	+
DR-582	<i>plcC::IS6110</i>	+	+	-
DR-426	$\Delta$ <i>plcA-plcB</i>	-	-	+
DR-689	$\Delta$ <i>plcA-plcB-plcC</i>	-	-	-

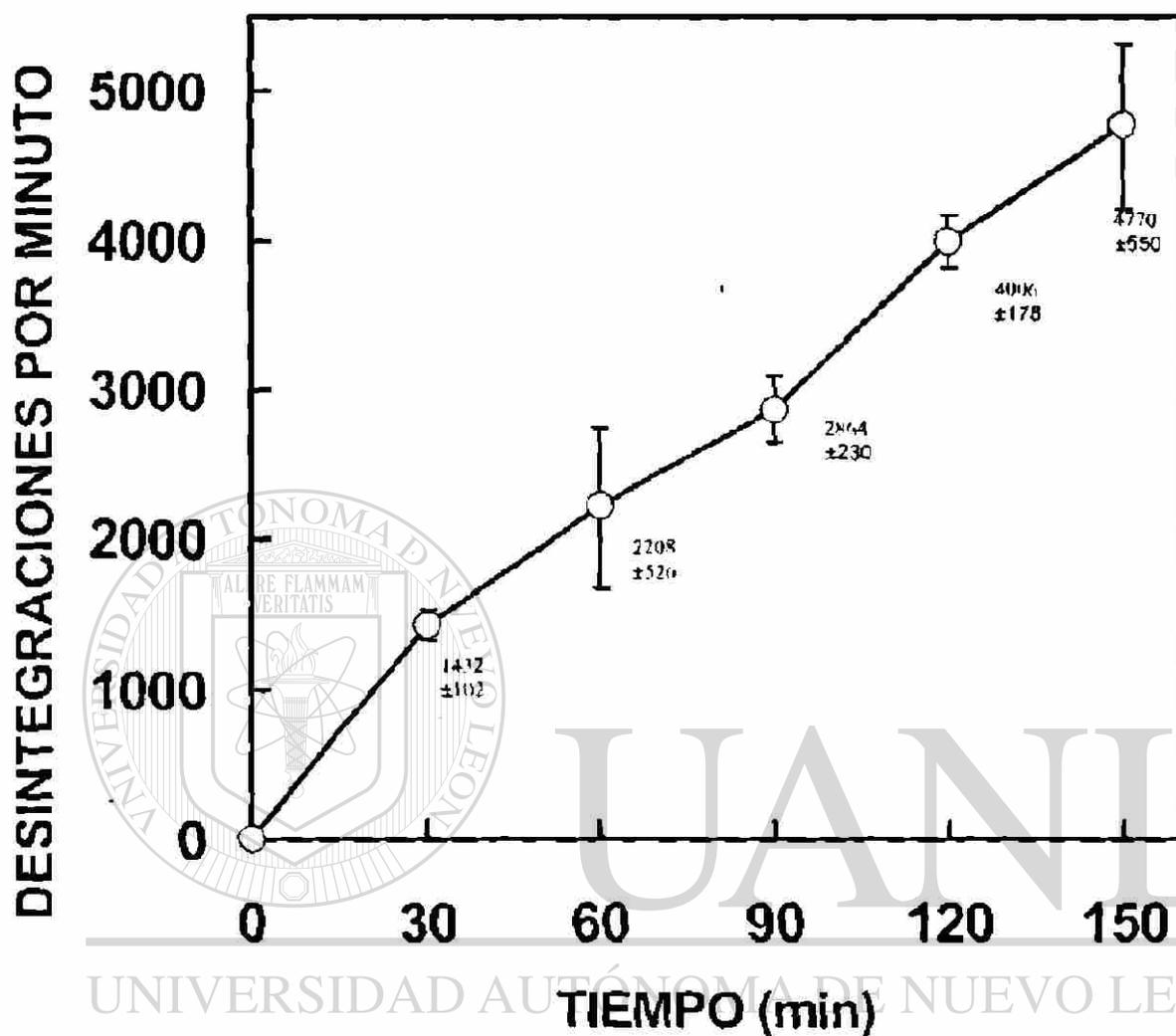


Figura 14. Relación temporal de la actividad de fosfolipasa de *M. tuberculosis* cepa H37Rv. Extractos totales de *M. tuberculosis* con una concentración de 160 mg/mL fueron mezcladas con 1,2 dipalmitoil-3-gliceril-fosfatidil- $^3\text{H}$ -colina e incubadas por tiempos variables. Luego de la incubación, la radiactividad presente en las manchas correspondiente al producto de hidrólisis, la fosfatidil- $^3\text{H}$ -colina, fue cuantificada en un espectrofotómetro de centelleo liquido y determinada como desintegraciones por min.

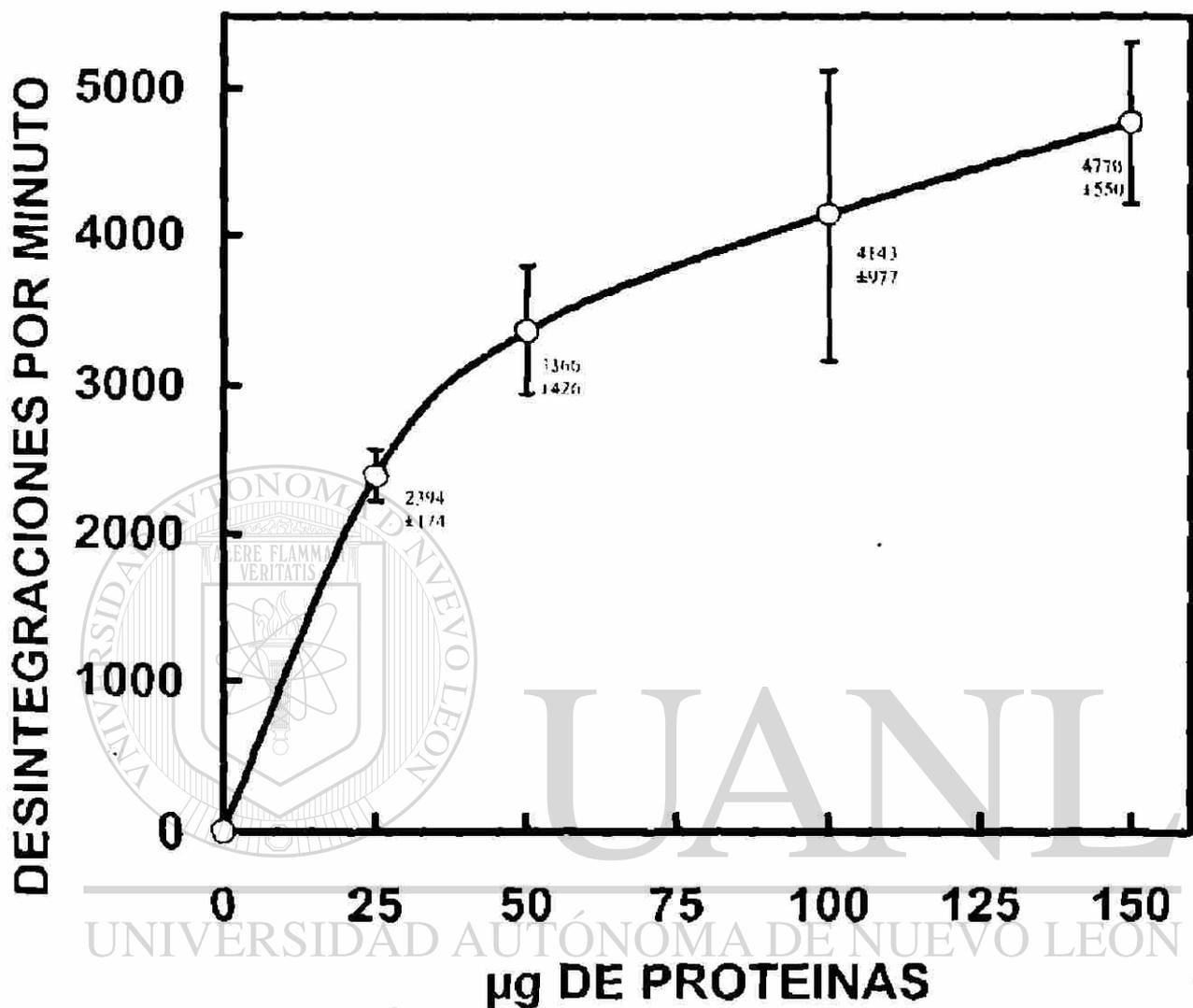
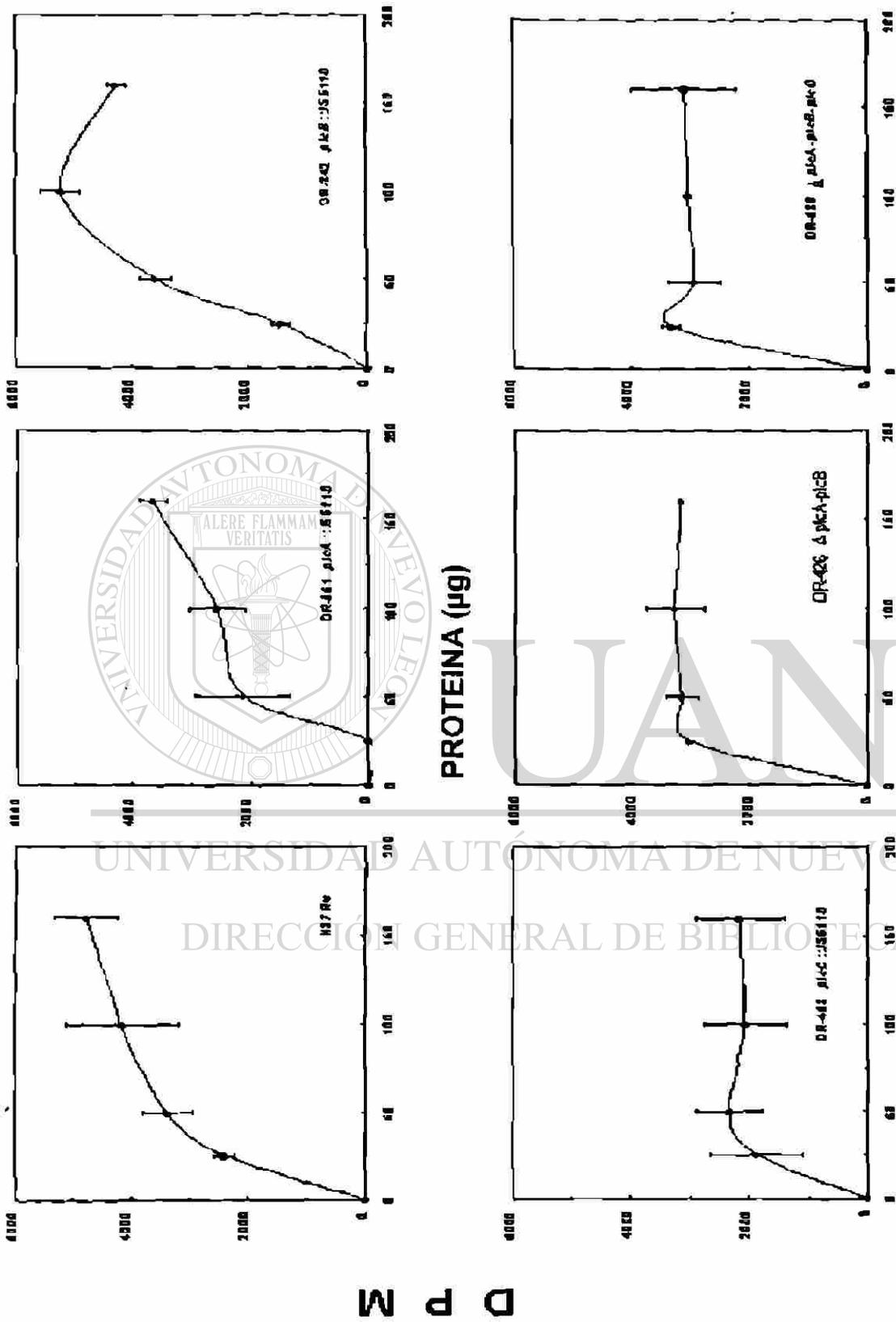


Figura 15. La actividad de fosfolipasa C de *M. tuberculosis* es dependiente de la dosis. Determinamos la actividad enzimática de los extractos micobacterianos usando cantidades variables de proteína total a un tiempo de incubación de 150 min.

Se encontró que todas las cepas polimórficas presentaron actividad de fosfolipasa del tipo C (Figura 16), mostrando variaciones con respecto a la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. La cepa de *M. tuberculosis* DR-651 presenta un período lag (0-25 µg) en que no existe liberación de radioactividad en la mancha correspondiente a fosforil- $^3\text{H}$ -colina, después de este periodo las dpm encontradas presentaron una tendencia sigmoide alcanzando la máxima actividad de 3,543 dpm cuando se utilizó 160 µg de proteínas totales, valor muy cercano al máximo encontrado en la cepa H37Rv (Figura 15). La cepa de *M. tuberculosis* DR-342 presentó un incremento lineal desde 0 hasta 100 µg de proteínas totales; a un mayor aumento de proteína (160 µg) se observó que las dpm disminuyen un 18 % con respecto al máximo (Figura 16). Con las cepas de *M. tuberculosis* DR-468, DR-426 y DR-689 se encontró que estas presentaron su máxima actividad a los 25 µg de proteínas totales, alcanzando 1,872, 3,009 y 3,256 dpm respectivamente (Figura 16). Se observó que a mayores aumentos de proteína en estas cepas no incrementaron la acumulación de radioactividad en las manchas correspondientes a fosforil- $^3\text{H}$ -colina.

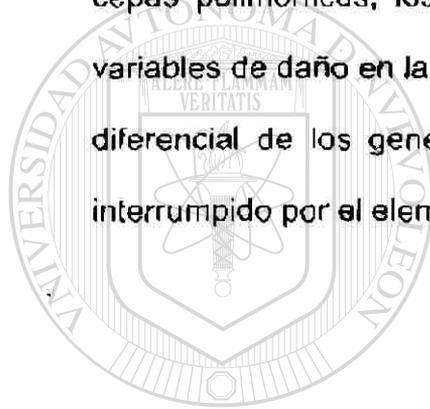
### 3.7 Capacidad citotóxica en la monocapa de macrófagos THP-1

El ensayo para observar la capacidad citotóxica de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv y la cepa de *M. tuberculosis* DR689, carente en forma natural de los genes de fosfolipasa C ( $\Delta\text{plcA-plcB-plcC}$ ), fue realizado en placas de 24 pozos a una multiplicidad de infección de 0.1 (10 célula:1 bacterias) y se



**Figura 16.- La actividad de fosfolipasa C en *M. tuberculosis* varía en función de los genes funcionales que codifican para esta enzima. La actividad enzimática se determinó en las mismas condiciones para todas las cepas utilizando cantidades variables de proteína de los extractos bacterianos e incubadas a 150 min.**

observaron microscópicamente cada 24 h. La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv utilizada como control produjo daño celular desde las 24 h de incubación, mientras que la cepa DR689 no causó el efecto a ese mismo tiempo (Figura 18). La citotoxicidad observada en la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv sugiere que los genes de fosfolipasa contribuyen al daño de los cultivos celulares. Aunque a las 144 h de infección de la monocapa (a la multiplicidad 1:1), se observa un daño similar por las dos cepas de *M. tuberculosis* (Figura 19). Mientras que en el ensayo de infección donde se utilizaron el resto de las cepas polimórficas, los efectos citotóxicos de cada cepa muestran grados variables de daño en la monocapa de macrófagos, sugiriendo una participación diferencial de los genes de PLC que depende del gene que se encuentra interrumpido por el elemento IS6110 (Figura 20).



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

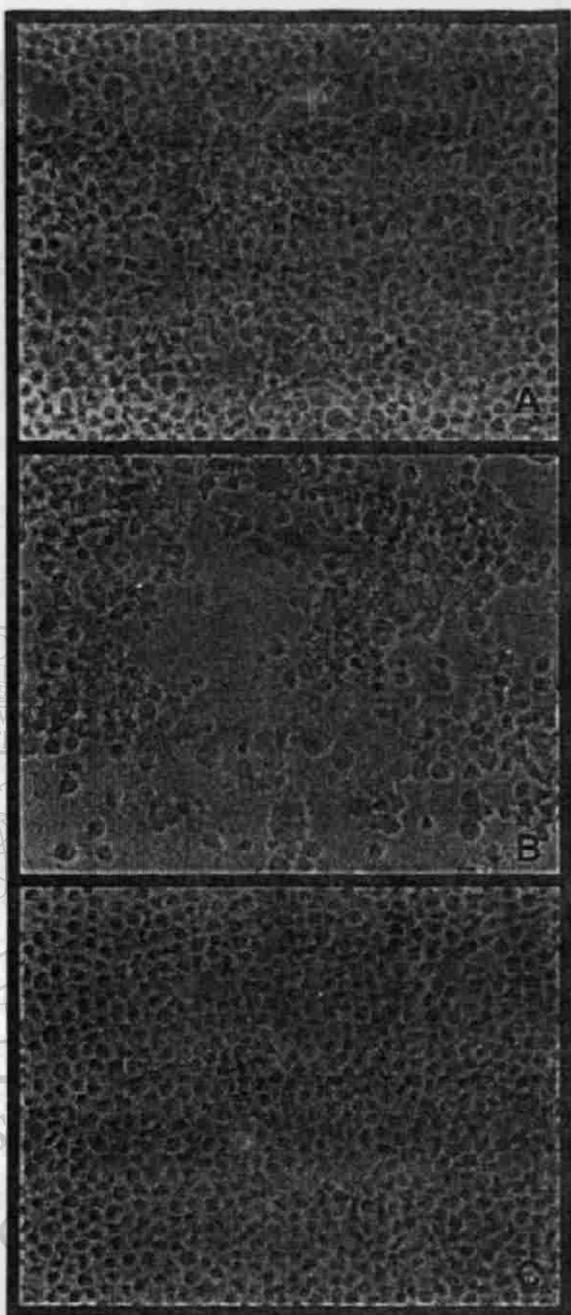
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

NL

NUEVO LEÓN

®

LIOTECAS



**Figura 18.** La ausencia de los genes *plc* inhiben el efecto citotóxico de *M. tuberculosis*. Células de la línea THP-1 fueron infectadas con *M. tuberculosis* con una multiplicidad de infección de 1:10 (bacteria:célula). Las fotos corresponden a cultivos con 72 h de incubación observados por microscopía de contraste de fases. (A) Células control sin infectar; (B) Células infectadas con la cepa H37Rv; (C) células infectadas con la cepa 689 ( $\Delta plcA-plcB-plcC$ ). Amplificación 250 X.

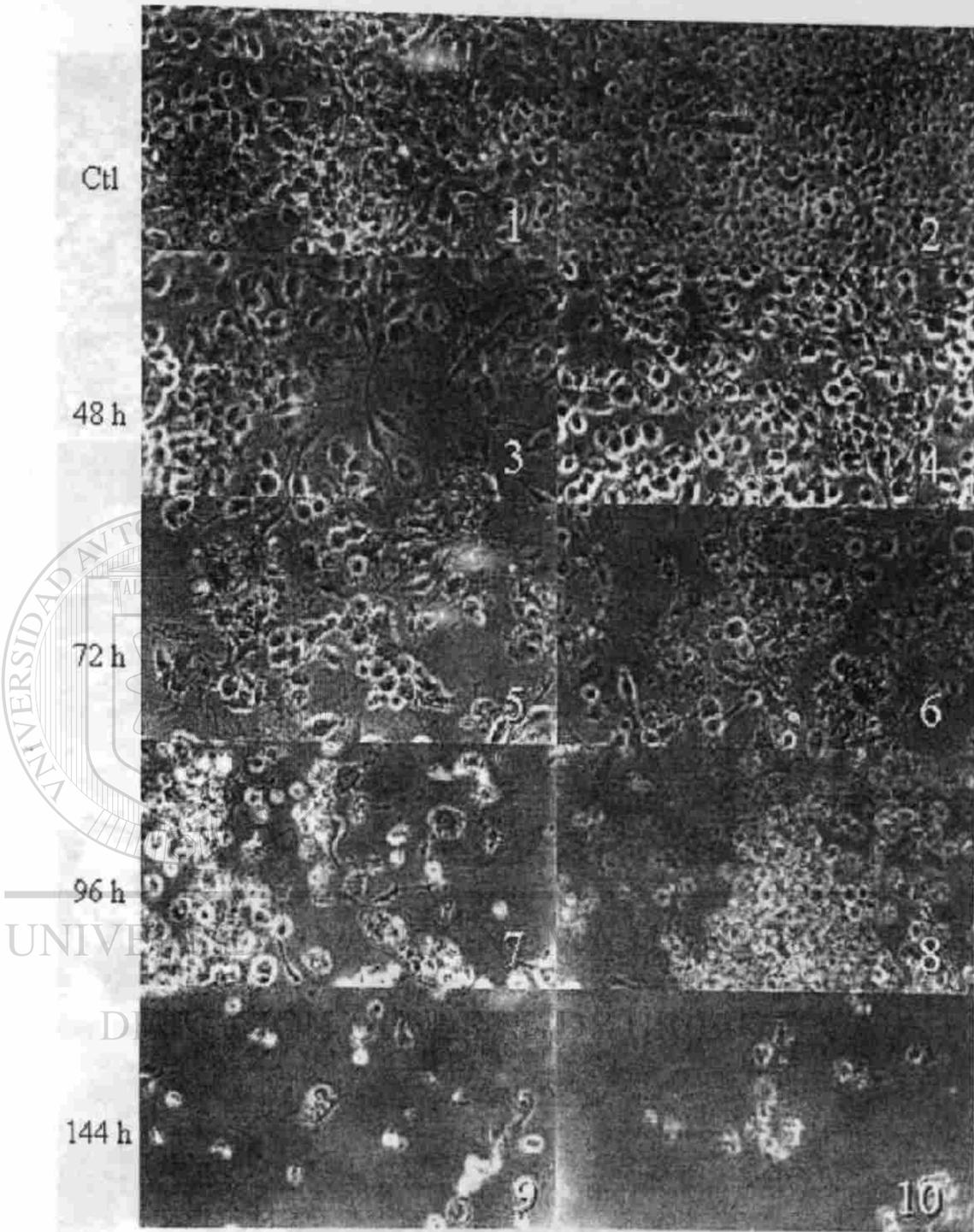
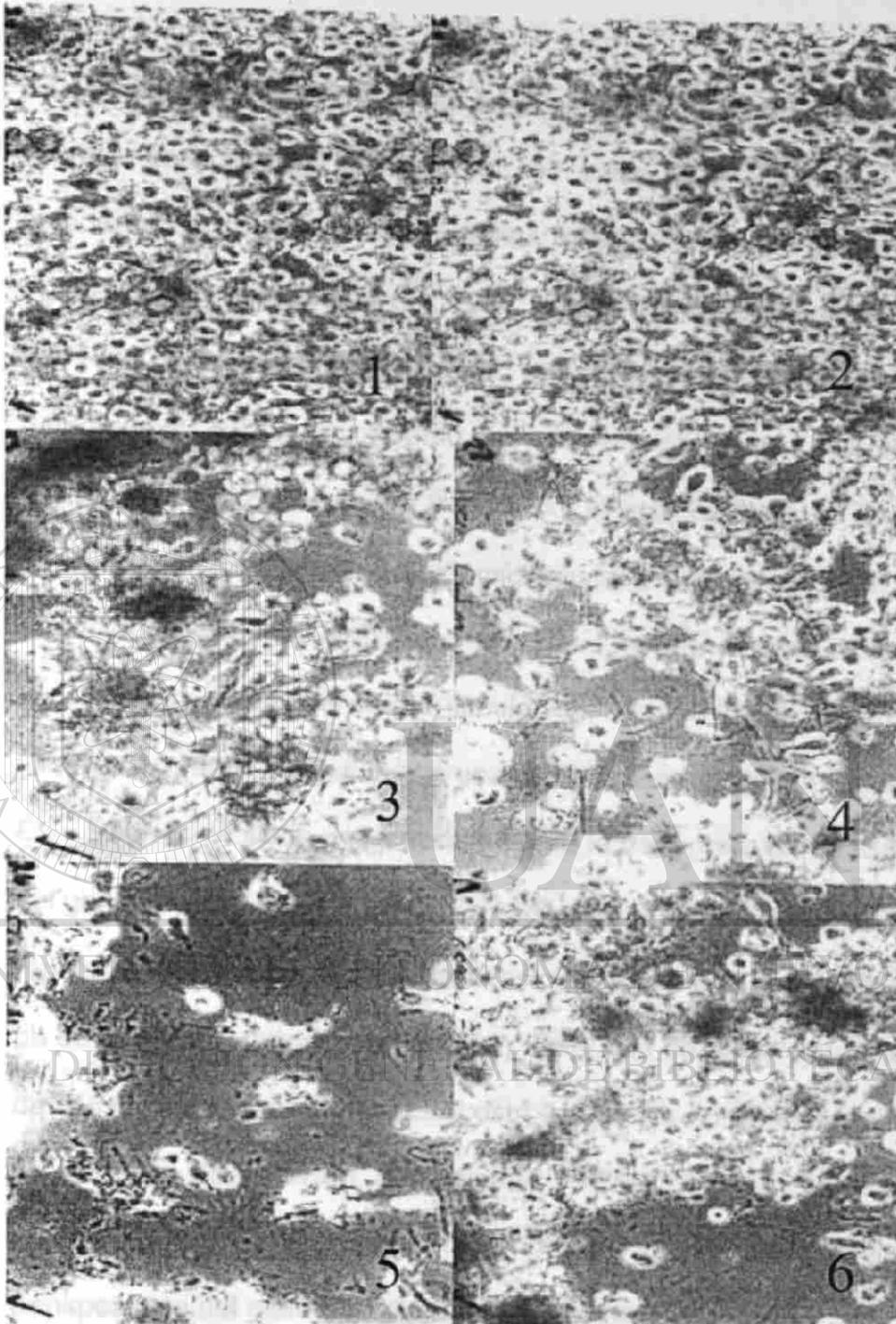


Figura 19.- Células de la línea THP-1 infectadas con *M. tuberculosis* a una multiplicidad de infección 1:1 ( bacteria: célula). Las fotos corresponden a cultivos de 48, 72, 92 y 144 horas de incubación. Fotos 1 y 2 células control sin infectar. Fotos 3,5,7y 9 células infectadas con la cepa H37Rv. Fotos 4,6,8 y 10 células infectadas con la cepa DR-689.

2 h de incubación por microscopía.  
 a una amplificación de 250x.



**Figura 20.-** Células de la línea THP-1 infectadas con *M. tuberculosis* a un multiplicidad de infección 1:1 (bacterias: células). Las fotografías 1 y 2 corresponden a las células control sin infectar, las fotos 3, 4, 5 y 6 corresponden a las cepas DR-342, DR-494, H37Rv y Dr-689, respectivamente. Observadas a las 72 h de incubación por microscopía, a una ampliación de 250X.

#### 4.- DISCUSIÓN

El elemento IS6110 de *M. tuberculosis* pertenece al grupo de elementos móviles descritos en *Escherichia coli* como IS3, los cuales tienen como característica una secuencia repetida imperfecta de 28-pb en sus extremos (Thierry *et al.*, 1990; Otal *et al.*, 1991; Lewis, 1996). El elemento IS6110, mide 1361-pb, y es la secuencia de inserción mejor caracterizada de *M. tuberculosis*. Existe un diverso número de copias en las cepas de este microorganismo que varía de 0 a 25, por lo cual es utilizada como un sistema de tipificación para estudios epidemiológicos (Van Embden *et al.*, 1993).

Aunque se considera que IS6110 se inserta al azar, es raro encontrarlo en el primer cuarto del mapa circular de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole *et al.*, 1998), lo cual indica una cierta selección de sus sitios de inserción. Existen también sitios preferenciales para la transposición de IS6110 a lo largo del genoma, uno de ellos es el locus DR, el cual está compuesto de secuencias repetidas directas de 36-pb separadas por segmentos no repetitivos de 36 - 41-pb de longitud (Hermans *et al.*, 1991). Otro sitio de alta frecuencia de inserción de IS6110 es el locus *ipl*, el cual está localizado en un elemento semejante a un elemento de inserción, denominado IS1547 (Fang y Forbes, 1997). El sitio DK1 también ha sido reportado como un sitio seleccionado para la transposición del elemento IS6110 (Fomukong *et al.*, 1997).

Los elementos IS6110 encontrados en el presente trabajo se encuentran distribuidos en la región de los genes de PLC. Posiblemente esta distribución no es completamente al azar en este locus; al parecer existen sitios

preferenciales para la inserción de IS6110 en la región de fosfolipasas, como lo son las posiciones 20569 en el gen *plcB* y 22124 del gen *plcA* encontradas en el presente trabajo. En las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv existe un elemento IS6110 interrumpiendo al gene *plcD* de fosfolipasa (Brosch.,1999). Otras cepas de *M. tuberculosis* también presentan un elemento de inserción en el gene *plcD* en la misma posición (Sampson *et al.*,1999). Estos datos parecen apoyar la idea de que existen secuencias altamente atractivas dentro de los genes *plc* para los elementos de inserción, convirtiendo esta zona en un sitio preferencial. Es necesario hacer un estudio con un gran número de cepas conteniendo elementos IS6110 para determinar si existe una secuencia consenso involucrada en la transposición de IS6110 en los genes *plc*.

Los elementos transponibles IS6110 han sido propuestos como responsables en la evolución del genoma de *M. tuberculosis*, actuando como agentes de mutaciones adaptativas (Ho *et al.*,2000). Se ha observado que cambios en el medio ambiente, como la reducción en la tensión de oxígeno

puede estimular la transposición de este elemento, provocando re-arreglos del genoma (Ghanekar *et al.*,1999). Una situación semejante puede darse en los granulomas, donde existe una reducción de oxígeno, cambios de pH y limitaciones de nutrientes, favoreciendo las condiciones para la transposición del elemento IS6110 (Ghanekar *et al.*,1999; Brosch *et al.*,2000; Li *et al.*,2002). La transposición del elemento IS6110 dentro de regiones que codifican proteínas es más común (64%) de lo que se sugería (Sampson *et al.*,1999). El impacto de IS6110, en el fenotipo de *M. tuberculosis* depende del sitio donde se inserte y se ha observado sobre todo en genes con aparente redundancia

funcional, lo que indicaría que genes con varias copias pueden compensar las pérdidas naturales creadas por la inserción de IS6110 en alguno de ellos. Por ejemplo, la familia de genes denominados PE y la familia de genes PPE (genes que codifican proteínas ricas en glicina y alanina que se expresan en la superficie extracelular), están dispersos en múltiples copias en todo el genoma y son una fuente importante de variación debido a que son considerados antígenos potenciales para la inmunidad del huésped (Fleischmann et al.,2002).

Durante la transposición del elemento IS6110 tres o cuatro pares de bases de la secuencia de ADN en los sitios de inserción se duplican por mecanismos de reparación y llenado del espacio producido por este evento (Spielmann-Ryser et al.,1991) lo cual es típico de este fenómeno. En la cepa de *M. tuberculosis* RIVM7 no se observó esta repetición de nucleótidos en los extremos del elemento IS6110; en su lugar se encontró la duplicación de dos nucleótidos en uno de los extremos. La ausencia de secuencias repetidas a los lados de la inserción del IS6110 es indicativa de una recombinación mediada por estos elementos (Mahillon y Chandler. 1998), lo cual produce la supresión de la región entre los dos elementos. En el caso de la cepa de *M. tuberculosis* RIVM7 no existe tal supresión, lo que indica la posible existencia de otros mecanismos de reparación ó de transposición.

Se ha reportado que la transposición de IS6110 en sitios de alta preferencia tales como el locus *ipf* produce la pérdida de fragmentos de ADN vecinos por recombinación homóloga de dos elementos IS6110 adyacentes y orientados en la misma dirección como lo propusieron Fang y col. (Fang et

*al.*,1998). También se encontró que la pérdida de varias regiones de *M. tuberculosis* H37Rv, tales como RvD2, RvD3 y RvD5 con tamaños que van de 0.8- a 4-kpb son debidas a la escisión de fragmentos de ADN por la transposición de IS6110 (Brosch *et al.*,1999; Ho *et al.*,2000; Lari N *et al.*,2001; Brondi *et al.*,2002). En un estudio previo (Vera-Cabrera *et al.*,1997), observaron que algunas cepas no hibridaron con las sondas para los genes *plcA* y *plcB* y en el presente trabajo confirmamos la ausencia parcial o total de dichos genes en estas cepas. La pérdida de parte de los genes de *plc* por recombinación homóloga puede explicar la ausencia de genes en algunas cepas de *M. tuberculosis* descritas por otros autores (Weil *et al.*,1996) (Figura 21).

Las secuencias nucleotídicas en los genes de fosfolipasa C para atraer la transposición de IS6110. Esto también se apoya por la presencia de otro gen para fosfolipasa C (*plcD*) en la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*,1998) que se encuentra interrumpido por un elemento IS6110. La co-

existencia de dos elementos IS6110 en dos genes de fosfolipasa C contiguos o en genes vecinos como los de la familia PE/PPE, que también atraen elementos IS6110 (Sampson *et al.*,1999), o los genes que codifican para la cutinasa, podrían dar origen a una escisión con la consecuente pérdida de las secuencias de los genes de fosfolipasa C.

En el presente estudio observamos en dos de las cepas una escisión de un fragmento de 2.8-kpb perteneciente a la secuencia de los genes de fosfolipasa C. Este proceso pudo haberse producido por recombinación homóloga de dos elementos IS6110 (Figura 21) dado que, como se mencionó

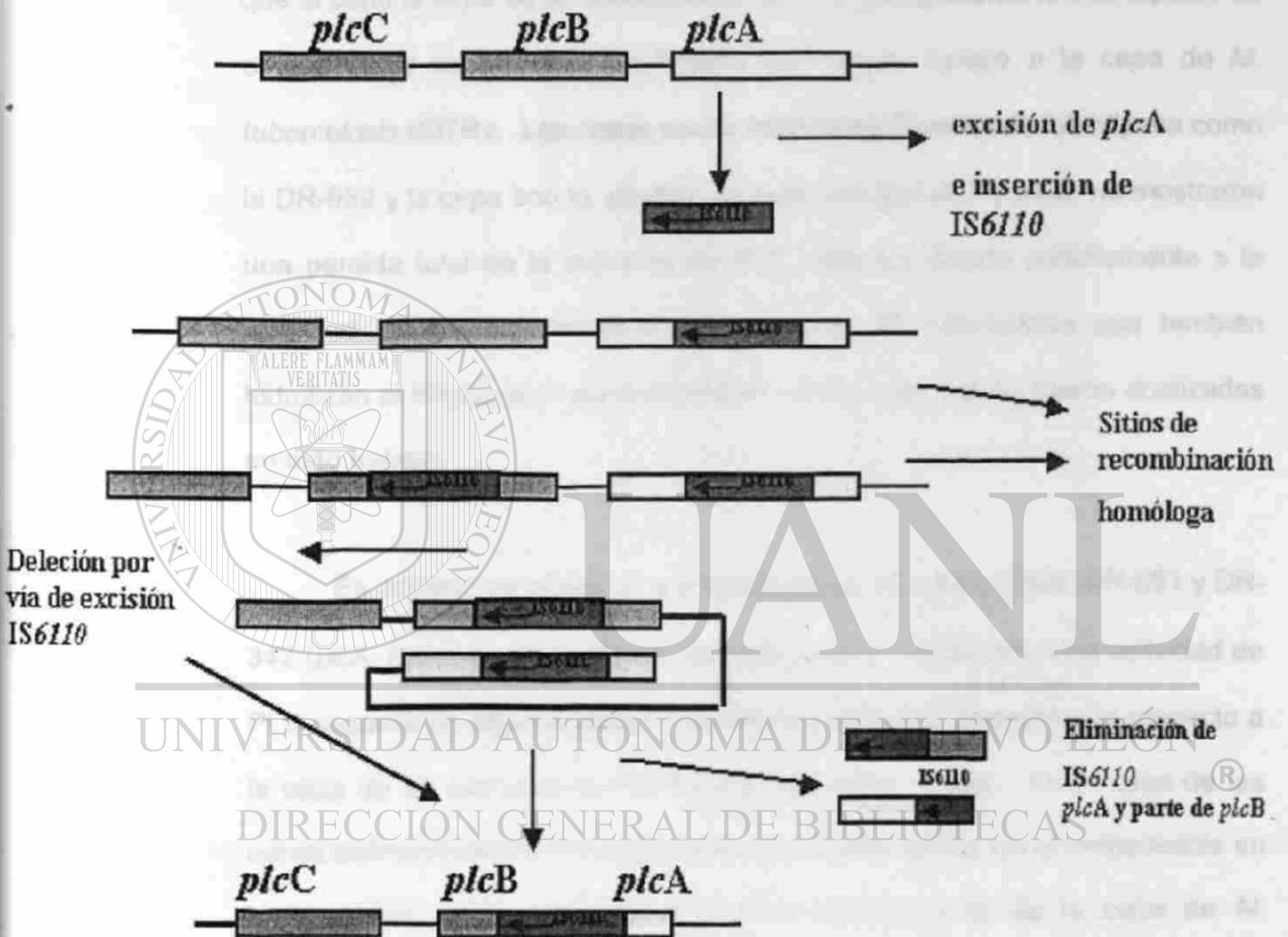
anteriormente, el elemento IS6110 presente en estas cepas no tiene repetidos directos en sus extremos, y esto es una evidencia de recombinación entre elementos de inserción (Mahillon y Chandler, 1998; Ho *et al.*, 2000). Es posible que la transposición de elementos IS6110 contribuya a la movilización de estos genes produciendo cepas de *M. tuberculosis* sin genes *plc*, o cepas con solo fragmentos de los genes o bien, cepas con secuencias extras producidas por duplicación, como es el caso de las cepas pertenecientes al grupo C reportado previamente por Vera-Cabrera *et al.*, (Vera-Cabrera *et al.*, 1997)

Por otro lado, los cambios en el patrón de IS6110 ocurren cada 1 ó 2 años (Cave *et al.*, 1994; Daley *et al.*, 1992), en este trabajo se observó que en cepas de *M. tuberculosis* relacionadas, los cambios son mínimos en los patrones RFLP para IS6110 pero cambios radicales o la pérdida completa de los genes de fosfolipasa también han sido observados (Vera-Cabrera *et al.*, 1997).

El elemento IS6110 podría estar involucrado también en la pérdida de la virulencia de la cepa de *M. tuberculosis* H37Ra durante su cultivo en laboratorio (Lari *et al.*, 2001), ya que la transposición de IS6110 podría ser estimulada por condiciones microaeróbicas, y los cambios son más rápidos en ciertas áreas del genoma, particularmente en aquellas donde se encuentran varios elementos IS6110 separados por distancias pequeñas (Ghanekar *et al.*, 1999).

En el presente trabajo, las cepas polimórficas con genotipos *plcA::IS6110*, *plcB::IS6110*, *plcC::IS6110*, *plcA-plcB* y *plcA-plcB-plcC* expresaron diferencias en actividad enzimática con respecto a la cepa control

**MODELO DE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA EN  
LOS GENES DE PLC**



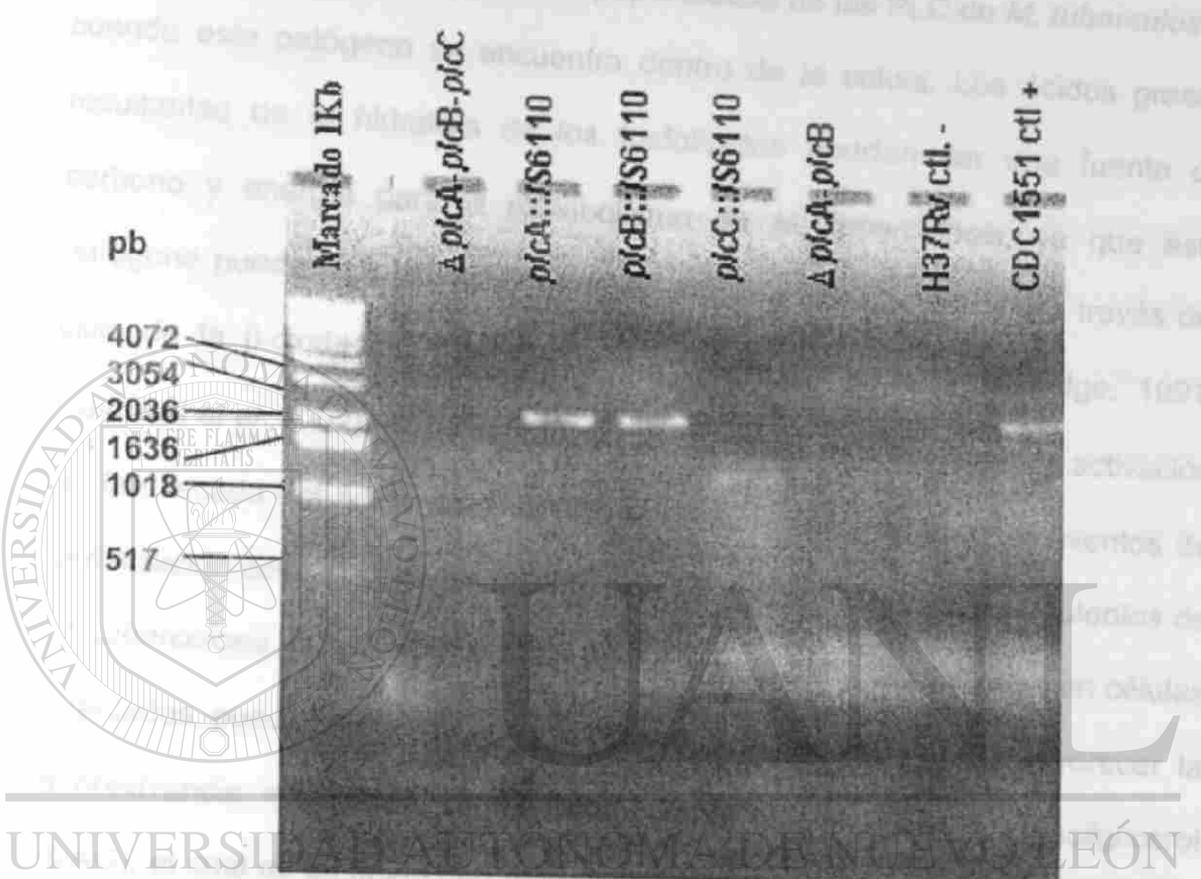
**Figura 21.- Modelo de recombinación homóloga para la pérdida de un segmento de la región de *plcA* y *plcB* de *M. tuberculosis***

de *M. tuberculosis* H37Rv. En la cepa de *M. tuberculosis* con genotipo *plcA-plcB* se observa un comportamiento similar a la cepa de *M. tuberculosis* carente de los tres genes de fosfolipasa C (*plcA-plcB-plcC*), presentando una actividad menor con respecto a la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv; mientras que la cepa la cepa de *M. tuberculosis* DR-342 que presenta la interrupción en el gen *plcB*, su actividad enzimática fue mayor, incluso a la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. Las cepas con la falta de los 3 genes de fosfolipasa como la DR-689 y la cepa con la pérdida de parte del gen *plcA* y *plcB*, no mostraron una pérdida total de la actividad de PLC, esto fue debido posiblemente a la actividad de otras fosfolipasas presentes en *M. tuberculosis* que también hidrolizan el mismo sustrato (fosforil-<sup>3</sup>H]-colina) pero que no fueron analizadas en este trabajo.

Es interesante observar que las cepas de *M. tuberculosis* DR-651 y DR-342 (*plcA::IS6110* y *plcB::IS6110* respectivamente) mostraron una actividad de

PLC superior en algunas de las concentraciones de la proteína con respecto a la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv utilizada como control. En el caso de las cepas polimórficas DR-651 y DR-342 el gen *plcD* podría ser el responsable en la expresión de la actividad enzimática superior a la de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, ya que estas cepas poseen este gene de PLC, mientras que la H37Rv no lo tiene.

El principal componente de la membrana celular son los fosfolípidos, los cuales son hidrolizados por las fosfolipasas ocasionando una serie de efectos en la célula. Los efectos resultantes pudieran contribuir en el proceso de



**Figura 17.- Amplicones de la región del gene *plcD* de cepas de *M. tuberculosis* polimórficas.**

infección por *M. tuberculosis* ya que la membrana celular es la primera barrera contra su invasión y al ser hidrolizados estos fosfolípidos, facilitaría la entrada del patógeno a la célula o proveer a la bacteria de nutrientes.

No está bien determinado el papel exacto de las PLC de *M. tuberculosis*, cuando este patógeno se encuentra dentro de la célula. Los ácidos grasos resultantes de la hidrólisis de los fosfolípidos podrían ser una fuente de carbono y energía para el metabolismo de *M. tuberculosis*, ya que este patógeno puede usar los ácidos grasos como fuente de carbono a través del ciclo de la  $\beta$ -oxidación y la vía del glyoxylato (Wheeler y Rattedge, 1991; Raynaud *et al.*, 2002). Por otro lado, las fosfolipasas intervienen en la activación de la cascada del ácido araquidónico e inositol para intervenir en eventos de señalización celular, como es la inhibición de apoptosis por cepas virulentas de *M. tuberculosis* (Miao, 1997). La presencia de fosfolipasa exógena en células infectadas puede desbalancear los procesos de señalización y favorecer la sobrevivencia intracelular de *M. tuberculosis* al generarse 1,2-diacilglicerol (DAG), el cual es un lípido que actúa como segundo mensajero para transmitir señales intracelulares para TNF y IL-1 (Schutze, 1994).

En nuestros ensayos de infección de monocapa de macrófagos THP-1 con la cepa de *M. tuberculosis* DR-689 (con genotipo *plcA-plcB-plcC*), la cual carece de los genes de PLC en forma natural, no se observó efecto citotóxico a las 72 h después de infectar a los macrófagos a una multiplicidad de infección de 0.1, esto indica que estos genes son importantes para la citotoxicidad de *M. tuberculosis* en macrófagos humanos.

En las cepas con elemento IS6110 insertado en los genes *plcA*, *plcB* ó *plcC* también se observa una reducción del efecto citotóxico a las 72 h de infección al compararse con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv.

Los hallazgos de este estudio indican que los genes de *plc* pueden tener importancia como factor de virulencia para *M. tuberculosis*, y la transposición dentro de un ORF de *plc* por el elemento móvil IS6110 representa una forma de perder la funcionalidad del gene, o la pérdida del gene en sí al ocurrir una recombinación. La pérdida en las secuencias nucleotídicas, como se observó en la cepa DR-426 repercutió en la reducción de la actividad enzimática. Estos cambios pueden ser experimentados por *M. tuberculosis* modificando su fenotipo y por tanto la eficiencia para entrar a los macrófagos (Li *et al.*, 2002).

Los resultados apoyan fuertemente la importancia de PLC en la patogénesis de *M. tuberculosis*, sin embargo, con cepas como la DR-689 carente del locus completo de *plc* (*plcA-plcB-plcC*) que fue aislada de un caso de tuberculosis en un paciente con enfermedad clínica, sugiere un papel no primordial de estas enzimas como factores de virulencia y además apoya que la virulencia de *M. tuberculosis* depende de varios factores.

Se puede plantear que la cepa carente de los genes de *plc* pudiera haber sufrido la pérdida de la secuencia de la región de PLC por la transposición de IS6110 al multiplicarse dentro de las células infectadas del paciente, ya que las condiciones microaeróbicas pueden estimular y producir estos cambios, en particular en aquellas zonas donde se encuentran varios elementos IS6110 separados por distancias pequeñas (Ghanekar *et al.*, 1999),

y al parecer la región de PLC es una zona de atracción para el IS6110.

Se ha publicado que cepas de *M. tuberculosis* con un mayor número de deleciones en su genoma muestran reducción en la virulencia, ya que las cavitaciones pulmonares en los pacientes infectados con estas cepas son menores que en aquellos pacientes infectados con cepas donde el genoma esta integro o con pocos genes eliminados (Kato-Maeda *et al.*,2001).

La falta de daño celular en la monocapa de macrófagos THP-1 a las 72 h después de la infección por la cepa *M. tuberculosis* carente de los genes de *plc*, podría ser debido a que en esta cepa, además de los genes de PLC pudieran faltar otras secuencias nucleotídicas que contribuyen como factores importantes junto a los genes *plc* para causar citotoxicidad como la observada en la infección con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.

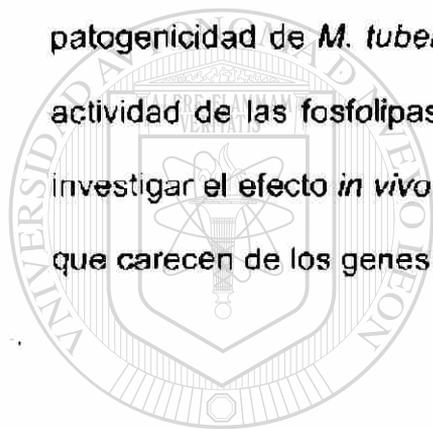
La cepa de *M. tuberculosis* carente del locus de *plc*, como la descrita en este trabajo, constituye un excelente modelo para estudiar la contribución de estas enzimas en la patogenia de *M. tuberculosis*. Mediante la utilización de técnicas modernas de comparación genómica, será posible identificar otros genes de *M. tuberculosis* que contribuyan en el desarrollo de la enfermedad clínica.

## 5.- CONCLUSIONES

1. El polimorfismo observado en la región de fosfolipasa C en *M. tuberculosis* esta dado por la transposición del elemento móvil IS6110
2. El IS6110 se encuentra insertado en la misma dirección en cualquiera de los tres genes de fosfolipasa C, y puede estar implicado en la pérdida de secuencias debido a una recombinación homologa entre dos elementos cercanos
3. La región de PLC es una zona de alta frecuencia (hot spot) para la transposición de elementos de inserción IS6110
4. La interrupción de los genes PLC, por la secuencia de inserción IS6110, se manifiesta en cambios de la actividad enzimática de fosfolipasa C ®
5. Los genes que codifican a la enzima fosfolipasa C en *M. tuberculosis* son importante para producir daño citológico en macrófagos *in vitro*

## 6.-PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

Existen cepas que carecen de los genes *p1c* o que se encuentran suprimidos de manera natural y que han sido analizadas en este trabajo de investigación mostrando un efecto citotóxico disminuido sobre macrófagos de la línea THP-1 comparadas con la cepa H37Rv, sugiriendo que posiblemente en estas cepas existen otros genes suprimidos que contribuyen a la patogenicidad de *M. tuberculosis* o que existen otros genes asociados con la actividad de las fosfolipasas. Por lo tanto una perspectiva de este trabajo es investigar el efecto *in vivo* e *in vitro* de la virulencia en cepas de *M. tuberculosis* que carecen de los genes de fosfolipasa C.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## 7.- BIBLIOGRAFIA

**Agranoff D, Monahan IM, Mangan JA, Butcher PD, Krishna S.** 1999. *Mycobacterium tuberculosis* expresses a novel pH-dependent divalent cation transporter belonging to the Nramp family. *J Exp Med.* 190:717-24.

**Armitige LY, Jagannath C, Wanger AR, Norris SJ.** 2000. Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. *Infect Immun.* 68:767-78.

**Assefa A, Dickson LA, Mohla S, and Bremner TA.** 1993. Phorbol myristate acetate-differentiated THP-1 cells display increased levels of MHC class I and class II mRNA and interferon-gamma-inducible tumoricidal activity. *Onco Res.* 5: 11-18.

**Behr, MA., M.A. Wilson, W.P. Gul, H. Salamon, G.K. Schoolnik, S.Rane, and P.M. Small.** 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarrays. *Science.* 284:1520-1523.

**Brodin P, Eiglmeier K, Marmiesse M, Billault A, Garnier T, Niemann S, Cole ST, Brosch R.** 2002. Bacterial Artificial Chromosome-Based Comparative Genomic Analysis Identifies *Mycobacterium microti* as a Natural ESAT-6 Deletion Mutant. *Infect Immun.* 70:5568-78.

**Brosh, R., W.J. Philip, E. Stavropoulos, M.J. Coiston, S.T. Cole, and S.V. Gordon.** 1999. Genomic analysis reveals variation between *Mycobacterium tuberculosis* H37RV and the attenuated *M. tuberculosis* H37Ra strain. *Infect. Immun.* 67:5768-5774.

**Brosh R., S. V. Gordon, K. Eiglemer, T. Garnier, F. Tekaiia, E. Yeramian, S. T. Cole.** 2000. Genomics, Biology, and Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. In *Molecular Genetics of Mycobacteria*, 2000. Edited by Hatfull G. F., W. R. Jacobs Jr. ASM Press. Pp. 19-36.

**Castro-Garza J., C. H. King, E. Swords and F. D. Quinn.** 2002. Demonstration of spread by *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in A549 epithelial cell monolayers. *FEMS microbiology letters.* 212:145-149.

**Cave, M.D., K.D. Eisenach, G. Templeton, M. Salfinger, G. Mazurek, J.H. Bates, and J.T. Crawford.** 1994. Stability of DNA fingerprint patterns produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin Microbiol.* 32: 262-266.

**Chan, J., X. D. Fan, S. W. Hunter, P. J. Brennan, and B. R. Bloom.** 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect. Immun.* **59**:1755-1761.

**Clemens, J. D., J.H. Jackie, J. H. Chuong, A. R. Feinstein.** 1983. The BCG controversy: a methodological and statistical reappraisal. *JAMA* **249**:2362.

**Cole, S.T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. BarryIII, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devun, T.Feltwell, S. Genties, N. Hamun, Holroyd, T. Hornsby, K. Jageis, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A.Quail, M.A. Rajandream, J. Rogers, 8. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R.Squares, S. Squares, J.E. Suiston, K. Taylor, 8. Whitehead and B.G. Barrel.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* **393**:537-544.

**Collins, D. M., R. P. Kwakami, G. W. de Lisle, L. Pascopella, B. R. Bloom, and W. R. Jacobs, Jr.** 1995. Mutation of the principal sigma factor causes loss of virulence in a strain of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**:8036-8040.

**Costa L. G.** 1998. Signal Transduction in environmental Neurotoxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**:21-43.

**Daley, C.L., P.M. Small, G.F. Schecter, G.K. Schoolnik, R.A., McAdam, W.R. Jacobs, Jr., and P.C. Hopewell.** 1992. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med.* **326**:231-235.

**Dennis E.** 1983. Phospholipases. en: *The enzymes.* Ed Boyer, P. Academic Press, New York, **16**:307-353.

**Dolin, P., C. Dye, M. Raviglione and A. Kochi.** 1998. Current status of the global tuberculosis epidemic. *Whats new in Nature.* [www.nature.com](http://www.nature.com)

**Fang, Z. and K.J. Forbes.** 1997. A *Mycobacterium tuberculosis* 1S6110 preferential locus (*ipl*) for insertion into the genome. *J. Clin. Microbiol.* **35**:479-481.

**Fang, Z., N. Morrison, B. Watt, C. Doig, and K.J. Forbes.** 1998. 1S6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Bacteriol.* **180**: 2102-2109.

Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, DeBoy R, Dodson R, Gwinn M, Haft D, Hickey E, Kolonay JF, Nelson WC, Umayam LA, Ermolaeva M, Salzberg SL, Delcher A, Utterback T, Weidman J, Khouri H, Gill J, Mikula A, Bishai W, Jacobs Jr WR Jr, Venter JC, Fraser CM. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol.* **184**:5479-90.

Fomukong, N., M. Beggs, H El Hajj, G. Templeton, K. Eisenach, and M.D. Cave. 1997. Differences in the prevalence of 1S6110 insertion sites in *Mycobacterium tuberculosis* strains: low and high copy number of 1S6110. *Tuber Lung Dis.* **78**:109-116.

Friedland JS, Shattock RJ, Griffin GE. 1993. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* or particulate stimuli by human monocytic cells induces equivalent monocyte chemotactic protein-1 gene expression. *Cytokine.* **5**:150-6.

Ghanekar, K., A. McBride, O. Dellagostin, S. Thorne, R. Mooney, and J. McFadden. 1999. Stimulation of transposition of the *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence 1S6110 by exposure to a microaerobic environment. *Mol. Microbiol.* **33**:982-993.

Gordon SV, Heym B, Parkhill J, Barrell B, Cole ST. 1999. New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology,* **145**:881-892.

Hermans, P.W., D. van Soolingen, E.M. Bik, P.E. de Haas, J.W. Dale, and J.D. van Embden. 1991. Insertion element 1S987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* **59**:2695-2705.

Heym, B., E. Stavropoulos, N. Honoré, P. Domonech, B. Saint-Joanis, T. M. Wilson, D. M. Collins, M.J. Colston, and S. T. Cole. 1997. Effects of overexpression of the alkyl hydroxiperoxide reductase AhpC on the virulence and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* **65**:1395-1401.

Ho, T.B.L., B.D. Robertson, G.M. Taylor, R. J. Shaw and D. B. Young. 2000. Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* genomes reveals frequent deletions in a 20 kb variable region in clinical isolates. *Yeast;* **17**:272-282.

Hopewell, P.R. 1994. Overview of clinical tuberculosis. *In* Bloom BR Ed. *Tuberculosis pathogenesis, protection and control.* Washington D.C.: ASM Press.: 25.

Hu, Y., P.D. butcher, J. A. Mangan, M. A. Rajandream, and A. R. Coates. 1999. Regulation of *hmp* gene transcription in *Mycobacterium tuberculosis*: effects of oxygen limitation and nitrosative and oxidative stress. *J. Bacteriol.* **181**:3486-3493.

Huebner R., and K. G. Castro. 1995. The Changing face of Tuberculosis. *Annu. Rev. Med.* **46**:47-55

Imaeda, T. 1985. Deoxyribonucleic acid relatedness among selected strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium*.

Johansen, K.A., R.E. Gul, and M.L.Vasil. 1996. Biochemical and molecular analysis of phospholipase C and phospholipase D activity in *Mycobacteria*. *Infect. Immun.* **64**:3259-3266.

Kato-Maeda, M, J. T. Rhee, T. R. Gingeras, H. Salamon, J. Drenkow, N. Smittipat and P. Samll. 2001. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Research*, **11**:547-554.

King C. H., S. Mundayoor, J. T. Crawford and T. M. Shinnick. 1993. Expression of Contact-Dependent Cytolytic Activity by *Mycobacterium tuberculosis* and Isolation of the Genomic Locus That Encodes the Activity. *infection and Immunity*, **61**:2708-2712.

Koch R. 1882. Die aetiologie der tuberculose. *Berliner Klin Wochenschr.* **19**:221.

Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martin C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakrus MA, Musser JM, van Embden JD. 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol.* **37**:2607-18.

Kusner D. and J. Adams. 2000. ATP-Induced killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human macrophages requires phospholipase D. *J. Immunology*, **164**: 379-388.

Lari N, Rindi L, Garzelli C. 2001. Identification of one insertion site of IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra and analysis of the RvD2 deletion in *M. tuberculosis* clinical isolates. *J Med Microbiol.* **50**:805-11.

Leao, S.C., C.L. Rocha, L.A. Murillo, C.A. Parra and M.E. Patarroyo. 1995. A species-specific nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a protein that exhibits hemolytic activity when expressed in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**:4301-4306.

**Lee BY, Horwitz MA.** 1995. Identification of macrophage and stress-induced proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest.* **96**:245-9.

**Li, Yong-jun; Mary Petrofsky and Luiz E. Bermudez.** 202. *Mycobacterium tuberculosis* uptake recipient host macrophages is influenced by environmental conditions in the granuloma of infectious individual and is associated with impaired production of interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha. *Infection and Immunity.* **70**: 6223-6230.

**Liébana, E., A. Aranaz, B. Francis and D. Cousins.** 1996. Assessment of genetic markers for species differentiation within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J. clinical Microbiology,* **34**: 933-938.

**Lopez M, Sly LM, Lu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE.** 2003. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J Immunol* **170**:2409-16.

**Lowry, O. H., Rosebrough, N.S. Farr A.L. Randall, R.J.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.* **183**: 265-275.

**Mahairas G. G., P. J. Sabo, M. J. Hickey, D. C. Singh y C. K. Stover.** 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J. Bacteriol.* **178**:1274-1282.

**Mahillon, J. and M. Chandler.** 1998. Insertion Sequences. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **62**: 725-774.

**Martin, T. F. J.** 1998. Phosphoinositide lipids as Signaling Molecules: Common Themes for Signal Transduction, cytoskeletal regulation, and Membrane Trafficking. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biolo.* **14**:231-264.

**McFadden J. Runze and P. Sechurn.** 1990. DNA probes for detection and identification. In: *molecular biology of the mycobacteria.* Surrey University Press. Academic Press, London. Pp139-172.

**Meij and Panagia.** 1992. The substrate specificity of phosphoinositide-phospholipase C in rat heart sarcolemma. *Mol Cell Biochem.* **116**: 27-31.

**Miao JY, Kaji K, Hayashi H, Araki S.** 1997. Suppression of apoptosis by inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in vascular endothelial cells. *Endothelium.* **4**:231-239.

**Miller, B.H., and T.M. Shinnick.** 2000. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* genes involved in resistance to killing by human macrophages. *Infect. Immun.* **68**:387-390.

**Moda, G., C.J. Daborn, J.M. Grange, O. Casivi.** 1996. The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*. *Tubercle and Lung Disease*, **77**: 103-108.

**Naylor, C. E., M. Jepson, D. T. Crane, R. W. Titball, J. Miller, A. K. Basak, and B. Bolgiano.** 1999. Characterization of the calcium-binding C-terminal domain of *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *J. Mol. Biol.* **294**:757-770.

**Ninomiya, M., O. Matsushita, J. Minami, H. Sakamoto, M. Nakano, and A. Okabe.** 1994. Role of alpha-toxin in *Clostridium perfringens* infection determined by using recombinants of *C. perfringens* and *Bacillus subtilis* *Infect. Immun.* **62**:5032-5039.

**O'Reilly, L.M. and C.J. Daborn.** 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuberc. Lung. Dis.* **76**:1-46.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud. Hoja de datos No. 104. Revisada abril del 2002. <http://www.who.int/home page/>

**Ostroft, R.M., B. Wretling, and M.L. Vasil.** 1989. Mutations in the hemolytic-phospholipase C operon result in decreased virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 grown under phosphate-limiting conditions. *Infect. Immun.* **57**:1369-1373.

**Otal, I., C. Martín, V. Vincent-Levy-Frebault, D. Thierry and B. Gicquel.** 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as epidemiological marker in tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **29**:1252-1254.

**Parra, CA., L.P. Londoño, P. Del Portillo and M.E. Patarroyo.** 1991. Isolation, characterization, and molecular cloning of a specific *Mycobacterium tuberculosis* antigen gene: identification of a species-specific sequence. *Infect. Immun.* **59**:3411-3417.

**Raynaud, C. Guilhot, J. Rauzier, Y. Bordat, V. Pelicic, R. Managanelli, I. Smith, B. Gicquel and M. Jackson.** 2002. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology.* **45**:203-217.

**Riendeau CJ, Kornfeld H.** 2003. THP-1 cell apoptosis in response to *Mycobacterial* infection. *Infect Immun.* **71**:254-259.

**Rook G. A. and R. Hernández-Pando.** 1996. The Pathogenesis of Tuberculosis. *Annu. Rev. Microbiology.* **50**:259-284.

**Sampson, S.L., R. M. Warren, M. Richardson, G.D. van der Spuy, P.D. Helden.** 1999. Disruption of coding regions by IS6110 insertion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle and Lung Disease*. **79**:349-359.

**Schutze S, Machleidt T, Kronke M.** 1998. The role of diacylglycerol and ceramide in tumor necrosis factor and interleukin-1 signal transduction. *J Leukoc Biol*. **56**:533-541.

**Schwarzer, N., R. Nöst, J. Seybold, S. K. Parida, O. Fuhrmann, M. Krull, R. Schmidt, R. Newton, S. Hippenstiel, E. Domann, T. Chakraborty, and N. Suttorp.** 1998. Two distinct phospholipases of *Listeria monocytogenes* induce ceramide generation, nuclear factor- $\kappa$ B activation and E-selectin expression in human endothelial cells. *J. Immunol*. **161**:3010-3018.

**Shattock RJ, Friedland JS, Griffin GE.** 1993. Modulation of HIV transcription in and release from human monocytic cells following phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Virol*. **144**:7-12.

**Smith, G.A., H. Marquis, S. Jones, N.C. Johnston, D.A. Portnoy, and D.H Goldfine.** 1995. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect. Immun*. **63**:4231-4237.

**Songer, J .G.** 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol*. **5**:156.

**Sritharan V., J. V. Iralu, R. H. Barker Jr.** 1994. Comparison of genus and species- specific probes for PCR detection of micobacterial infection. *Mol. Cell. Probes* **8**:409-413.

**Spielmann-Ryser, J., M. Moser, P. Kast, and H. Weber.** 1991. Factors determining the frequency of plasmid cointegrate formation mediated by insertion sequence 183 from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet*. **226**: 441-118.

**Steyn AJ, Collins DM, Hondalus MK, Jacobs WR Jr, Kawakami RP, Bloom BR.** 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.

**Stoeckle MY, Guan L, Riegler N, Weitzman I, Kreiswirth B, Kornblum J, Laraque F, Riley LW.** 1993. Catalase-peroxidase gene sequences in isoniazid-sensitive and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from New York City. *J Infect Dis* ;**168**:1063-1065.

**Tchou-Wong KM, Tanabe O, Chi C, Yie TA, Rom WN.** 1999. Activation of NF-kappaB in *Mycobacterium tuberculosis*-induced interleukin-2 receptor expression in mononuclear phagocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* **159**:1323-1329.

**Terada, L. S., K. A. Johansen, S. Nowbar, A. I. Vasil, and M. L. Vasil.** 1999. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect. Immun.* **67**:2371-2376.

**Thierry, D, A. Brisson-Noel, V. Vincent-Levy-Frebault, S. Nguyen, J.L.Guesdon and B. Gicquel.** 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, 1S6110, and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 2668-2673.

**Thierry, D., M.D. Cave, K.D. Eisenach, J.T. Crawford, J.H. Bates, B. Gicquel and J.L. Guesdon.** 1990. 1S6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic. Acids Res.* **18**:188.

**Titball, Richard W.** 1993. Bacterial Phospholipases c . *Microbiological Reviews.* **57**: 341-366.

**Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K.** 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* **26** 171-176.

**Van Embden, J.D.A., M.D. Cave, J.T. Crawford, J.W. Dale, K.D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T.M. Shinnick, and P. Small.** 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* **31**:406-409.

**Vera-Cabrera, L., S.T. Howard, A.Laszlo, and W.M. Johnson.** 1997. Analysis of genetic polymorphism in the phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1190-1195.

**Weeler and Ratledge.** 1991. Phospholipase activity of *Mycobacterium leprae* harvested from experimentally infected armadillo tissue. *Infect Immun.* **59**:2781-2789.

**Weil, A., B.B. Plykatis, W-R. Butier, C.L. Woodley, and T.M. Shinnick.** 1996. The *mtp40* gene is not present in all strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2309-2311.

**Williamson, E.D., and R.W. Titball.** 1993. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine.* **11**:1253-1258.

**Wilson, T. M., G. W. de Lisle, and D. M. Collins.** 1995. Effect of *inhA* and *katG* on isoniazide resistance and virulence of *Mycobacterium bovis*. *Mol. Microbiol.* **15**: 1009-1015.

**Yuan, Y., D. D. Crane, R. M. Simpson, Y. Q. Zhu, M. J. Hickey, D. R. Sherman, and C. E. Barry.** 1998. The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:9578-9583.

**Zhang Y, Doerfler M, Lee TC, Guillemin B, Rom WN.** 1993. Mechanisms of stimulation of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha by *Mycobacterium tuberculosis* components. *J Clin Invest.* **90**:2076-2083.

**Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, and Tada K.** 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* **26**:171-176.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## Phospholipase Region of *Mycobacterium tuberculosis* Is a Preferential Locus for IS6110 Transposition

LUCIO VERA-CABRERA,<sup>1\*</sup> MARCO A. HERNÁNDEZ-VERA,<sup>1</sup> OLIVERIO WELSH,<sup>1</sup>  
WENDY M. JOHNSON,<sup>2</sup> AND JORGE CASTRO-GARZA<sup>3</sup>

*Servicio de Dermatología, Hospital Universitario "José E. González,"<sup>1</sup> and Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS,<sup>2</sup> Monterrey, México, and Federal Laboratories for Health Canada, Winnipeg, Canada<sup>3</sup>*

Received 10 November 2000/Returned for modification 17 February 2001/Accepted 27 July 2001

Enzymes with phospholipase C activity in *Mycobacterium tuberculosis* have been recently described. The three genes encoding these proteins, *plcA*, *plcB*, and *plcC*, are located at position 2351 of the genomic map of *M. tuberculosis* H37Rv and are arranged in tandem. We have previously described the presence of variations in the restriction fragment length polymorphism patterns of the *plcA* and *plcB* genes in *M. tuberculosis* clinical isolates. In the present work we investigated the origin of this polymorphism by sequence analysis of the phospholipase-encoding regions of 11 polymorphic *M. tuberculosis* clinical isolates. To do so, a long-PCR assay was used to amplify a 5,131-bp fragment that contains the *plcA* and *plcB* genes and part of the *plcC* gene. In the *M. tuberculosis* strains studied the production of an amplicon ~1,400 bp larger than anticipated was observed. Sequence analysis of the PCR products indicated the presence of a foreign sequence that corresponded to an IS6110 element. We observed insertion elements in the *plcA*, *plcB*, and *plcC* genes. One site in *plcB* had the highest incidence of transposition (5 out of 11 strains). In two strains the insertion element was found in *plcA* in the same nucleotide position. In all the cases, IS6110 was transposed in the same direction. The high level of transposition in the phospholipase region can lead to the excision of fragments of genomic DNA by recombination of neighboring IS6110 elements, as demonstrated by finding the deletion, in two strains, of a 2,837-bp fragment that included *plcA* and most of *plcB*. This can explain the negative results obtained by some authors when detecting the *mip40* sequence (*plcA*) by PCR. Given the high polymorphism in this region, the use of the *mip40* sequence as a genetic marker for *M. tuberculosis sensu stricto* is very restricted.

The *mip40* gene was first described as a 402-bp open reading frame (ORF) encoding a 13.8-kDa specific protein of *Mycobacterium tuberculosis* (21). This gene was cloned in a 3.1-kbp *Bam*HI fragment, and, after sequencing the whole insert, Leão et al. noted the presence of an ORF of 1,170 bp and the beginning of another (15). Johansen et al. (13) completely sequenced the second ORF, and they also demonstrated in vitro that these genes encode phospholipase C activities. They named the ORFs *mipA* and *mipB*. The sequence called *nup40* actually constitutes only a part of the *mipA* gene. After the whole *M. tuberculosis* H37Rv genome was sequenced, two more phospholipase genes were described: an ORF beside *mipB* and another related sequence at position 1755 of the genome, located beside an IS6110 element (4). From this point on these genes were designated *plc* (phospholipase C) genes; the three ORFs arranged in tandem were called *plcA*, *plcB*, and *plcC*, and the fragment at position 1755 in *M. tuberculosis* H37Rv was called *plcD*. We use this nomenclature in the present work.

Since there have been conflicting results concerning the presence of the *mip40* sequence in the *M. tuberculosis* complex, we previously studied its distribution within a collection of *M. tuberculosis* clinical isolates. PCR amplification of the *mip40* region revealed that some strains were negative for this sequence (28). To rule out the presence of mutations or dele-

tions in the primer annealing sites that cause a false-negative result, we carried out Southern blot assays using the *Pvu*II enzyme and a PCR product corresponding to *mip40* as a probe. We observed that *M. tuberculosis* H37Rv and H37Ra presented two bands: one of 0.75 kbp, which we demonstrated to correspond to *plcA*, and one of 2.1 kbp that corresponds to *plcB* and that cross-reacts with the probe for *mip40* (which is part of *plcA*). We also found strains presenting variations of this pattern, showing extra bands or a shift in the molecular weight of the band corresponding to the *plcB* gene from 2.1 to 2.5 kbp (28). Some other clinical isolates presented changes in both bands or were negative in the Southern blot analysis.

To explain the changes in the restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns, in this work we studied by long PCR the phospholipase-encoding regions of selected strains followed by sequence analysis of the amplicons.

### MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains.** Most of the *M. tuberculosis* strains used in this study were obtained from the National Reference Centre for Tuberculosis of the Laboratories for Health Canada (Winnipeg, Canada) and were identified by conventional methods. All the strains were maintained at -70°C in skim milk and subcultured on Löwenstein-Jensen medium when needed. DNA samples from two strains, which we named RIVM-7 and RIVM-13 were kindly donated by Kristin Kremer from the National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands (14).

**Genomic-DNA extraction.** The mycobacteria were heat killed at 85°C for 30 min, and the DNA was extracted in accordance with a technique using cetyltrimethylammonium bromide-NaCl (31). The DNA was suspended in Tris-EDTA buffer, quantified, and stored at 4°C until use.

**Southern blot assay.** For Southern blotting of clinical isolates, 2 µg of genomic DNA was digested with 5 U of *Pvu*II (28) for 4 h at 37°C. The electrophoretic

\* Corresponding author. Mailing address: Servicio de Dermatología, Hospital Universitario "José E. González," Madero y Gonzalitos, Col. Miras Centro, Monterrey, N.L., México. Phone: 011(528) 348-4383. Fax: 011(528) 348-4417. E-mail: luvera\_99@yahoo.com.

TABLE 1. Oligonucleotide primers used in this work

Primer	Sequence	Nucleotides
TB20	5' CGC AGC AAC ACC CTT ATC AAG T	19275-19296 <sup>a</sup>
TB21	5' GTG ATT GTC GGC GAA ATG AAG T	24406-24385 <sup>a</sup>
TB25	5' CTC CGG CGG GTA CCT CCT CG	90-71 <sup>b</sup>
TB26	5' AGG CTG CCT ACT ACG CTC AAC G	1272-1293 <sup>b</sup>
INS-1	5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC	633-652 <sup>c</sup>
INS-2	5' CGT AGG CGT CGG TGA CAA A	876-858 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Sequence MTCY98, accession no. Z83860.

<sup>b</sup> Sequence accession no. X17348.

<sup>c</sup> Reference 25.

separation of the digested fragments was done in a 20- by 25-cm 0.8% agarose gel by applying 30 V overnight. After electrophoresis, the DNA samples were transferred to a nylon membrane using the TurboBlotter system (Schleicher & Schuell, Keene, N.H.) in accordance with the manufacturer's directions. The blot was prehybridized and then probed overnight at 42°C with peroxidase-labeled amplicons prepared with the enhanced chemiluminescence kit (ECL; Amersham, Arlington Heights, Ill.). Hybridization, washing, and development of the filters were performed according to the manufacturer's instructions.

As a probe we used a PCR product with primers PT1 and PT2, which amplify a region of *plcA* (6). To determine the phylogenetic relationships among some of the studied strains that presented identical insertions, we incubated the blots with a PCR probe derived from primers INS-1 and INS-2, which amplify a fragment of 243 bp in the *IS6110* right arm.

**Synthesis of oligonucleotide primers and sequence analysis of the amplicons.** The oligonucleotides used in this study (Table 1) were prepared on a 392 DNA-RNA synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) utilizing the standard phosphoramidite method. The sequences of the PCR products were determined with the Prism Dye Terminator sequencing kit (Applied Biosystems) in an ABI 377 automated sequencer.

**Long-PCR assay.** To determine the genetic changes that lead to the polymorphism in the phospholipase region, we designed a pair of primers located 1,000 bp outwards of the *plcA* or *plcB* genes, which we called TB20 and TB21, respectively (Table 1). The predicted size of the amplicon was 5,131 bp. The PCR assay was carried out with 100 ng of genomic DNA in a PTC-200 thermocycler (MJ Research, Watertown, Mass.) by utilizing PCR assay kit XL (Perkin-Elmer) under the following conditions: 94°C for 2 min and 10 cycles of 94°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 68°C for 4 min. A second round of 20 cycles was carried out at 94°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 68°C for 4 min, adding 20 s every cycle. A final extension step at 68°C for 10 min was performed. The PCR products were applied to a 0.8% low-melting-point agarose gel, and after the electrophoresis the gel slices containing the bands were excised and purified utilizing the Gene-Clean III (BIO 101, Inc., Vista, Calif.) kit. The DNA was quantified spectrophotometrically and stored at 4°C.

## RESULTS

**Southern blot analysis with PT1 and PT2.** The Southern blot patterns of the strains with the *plcA* probe used in this study are presented in Fig. 1. According to the restriction map of the region (not shown), the 0.75-kbp band corresponds to the *plcA* gene; the 2.1-kbp band corresponds to *plcB* and part of *plcC*. In Fig. 1, we observe that strains in lanes 4 to 6 and 8 to 12 lack the 2.1-kbp band corresponding to *plcB*; instead they have bands of different sizes. Strains in lanes 2, 3, 7, and 8 lack the 0.75-kbp band that corresponds to the *plcA* gene. Strains 9 to 12 present identical RFLP patterns, with a band of 2.5 kbp instead of the normal *plcB* band of 2.1 kbp, as well as another band of about 1.0 kbp and the 0.75-kbp band. By using a probe for *plcB* we observed that the 2.5-kbp band corresponds to this gene (data not shown). The strain in lane 8 presents only a band of about 2.8 kbp. As a control (lane 1) we used the *M. tuberculosis* 14323 strain, kindly donated by J. D. A. van Embden, which is used worldwide as a control for *IS6110* studies.

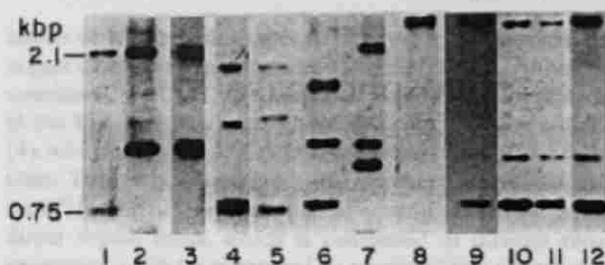


FIG. 1. Southern blot analysis of the *M. tuberculosis* strains studied in this work. The blots were incubated with a PCR probe, prepared with primers PT1 and PT2 as described before (28), that amplifies a 396-bp region near the 3' end of the *plcA* ORF. Lanes: 1, *M. tuberculosis* strain 14323; 2, Dr-561; 3, RIVM-7; 4, RIVM-13; 5, Dr-351; 6, Dr-468; 7, Dr-194; 8, Dr-494; 9, Dr-116; 10, Dr-169; 11, Dr-170; 12, Dr-342.

**Sequencing analysis of the TB20-TB21 amplicons.** When amplifying genomic DNA from the polymorphic clinical isolates with primers TB20 and TB21, we observed the presence of amplicons bigger than those produced by control strain *M. tuberculosis* H37Rv (Fig. 2). Other bands of less intensity were also observed. After sequencing analysis of some of these bands we concluded that they corresponded to less-specific annealing sites for the primers. First, we did the sequencing analysis with primers TB20 and TB21 and observed in one strain an *IS6110* element at the end of an amplicon produced with TB20 and TB21 (TB20-TB21 amplicon). To simplify the analysis, we then performed the sequencing analysis using primers TB25 and TB26, which anneal to a region close to the end of the *IS6110* sequence. These primers are directed outward in such way that, when performing the sequencing PCR, we could detect the insertion site in one run.

In Fig. 3 we describe the sequences at the junction between the insertion elements and the genomic-mycobacterial DNA. We observed the duplication of three or four nucleotides at the site of the transposition. Interestingly in strain RIVM-7 there is only the duplication of two nucleotides and the duplicated nucleotides remained on one side of *IS6110*. These results were confirmed by preparing the amplicons and performing the sequencing analysis in duplicate.



FIG. 2. Long-PCR assay of mycobacterial genomic DNA from polymorphic strains for the phospholipase genes with primers TB20 and TB21. Lanes: 1 and 10, 1-kb ladder (Gibco); 2, RIVM-7; 3, Dr-169; 4, Dr-170; 5, Dr-342; 6, Dr-351; 7, Dr-561; 8, Dr-468; 9, *M. tuberculosis* H37Rv.

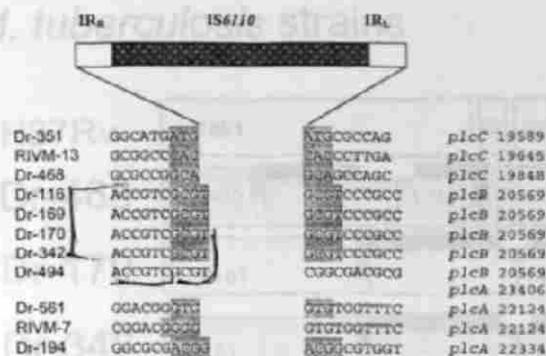


FIG. 3. Locations of the IS6110 elements inserted in the phospholipase regions of the *M. tuberculosis* strains studied in this work. At the right are positions of the insertion elements in the phospholipase locus. Shaded boxes, duplicated nucleotides. The nucleotide numbers are taken from GenBank sequence MCTY 98 (accession no. Z83860). For comparison purposes, sequence data from strain Dr-194, which have been published before, are shown (28). IR<sub>R</sub> and IR<sub>L</sub>, right and left imperfect repeats, respectively.

Instead of producing an amplicon bigger than that from *M. tuberculosis* H37Rv with TB20 and TB21, a smaller PCR fragment was obtained in strains Dr-494 and Dr-426. By sequencing analysis we observed, in both strains, that the right imperfect repeat of IS6110 was anchored on nucleotide 20569 (*plcB* gene) and that the left repeat was anchored on nucleotide 23406 (*plcA*), with the loss of a 2,837-bp fragment (Fig. 3). Interestingly no direct repeats were found at the ends of the IS6110 elements. These sequence analysis findings were corroborated by digestion of the TB20-TB21 amplicon with *PvuII* (data not shown), as mentioned below.

To confirm that the changes in the Southern blot patterns are only due to the insertion of the IS6110 element, we gel purified the amplicons and digested them with *PvuII*. In Fig. 4 we show the map with the predicted changes as well as the electrophoretic separation of the digested amplicons. In all the cases there was concordance between the expected and the obtained fragments.

Since one explanation of the selection of the same insertion site could be that the strains actually belong to the same clone, we analyzed the RFLPs for IS6110 in those strains showing identical insertion sites. In Fig. 5A we show the Southern blot analysis of two of the most closely related strains. Both are isolates from British Columbia, Canada, and present nine similar bands. It is possible they have the same ancestor. On the other hand, although strain RIVM-7 from Mongolia and strain Dr-561 from Alberta, Canada (Fig. 5B), have the IS6110 element inserted in the same nucleotide position in *plcA*, they seem to be unrelated.

In all the strains studied in this work we found the IS6110 elements transposed in the same direction.

## DISCUSSION

IS6110 has a 1,361-bp sequence with a 28-bp imperfect repeat at the ends (25, 26). This insertion element belongs to the IS3 family of mobile elements and is widely distributed in the *M. tuberculosis* complex members. IS6110 polymorphism is currently used as a genetic target to differentiate individual

clones of *M. tuberculosis*, because they can contain from 0 to 25 copies distributed in the entire genome (20, 27). Although it is considered that IS6110 transposes randomly, it is rarely found in the first quarter of the *M. tuberculosis* H37Rv circular map (4), which indicates a certain form of selection of the insertion sites. This is demonstrated also by the observation of "hot spots" for IS6110 transposition in several sites. The first is the direct repeat locus, which is composed of directly repeated sequences of 36 bp separated by nonrepetitive segments of 36 to 41 bp (12). Other high-frequency locations of IS6110 are the *ipl* locus, which is itself located in an insertion element-like element, IS1547 (7), and the DK1 site (10).

In this work we found IS6110 elements distributed along the phospholipase region; however this distribution was not random. It seems likely that even in the phospholipase genes there are preferential sites for the IS6110 insertion, such as nucleotides 20569 and 22124. In *M. tuberculosis* H37Rv and H37Ra there is an IS6110 interruption of the *plcD* gene (2), and other *M. tuberculosis* strains demonstrate similar insertion elements at the identical position (22). These data support the idea that there are hot spots, which exist in the *M. tuberculosis* genome and within the phospholipase genes specifically, that attract IS6110 insertion elements. Only by doing a study involving a great number of strains bearing IS6110 elements can we determine if there are consensus sequences within the phospholipase genes that stimulate IS6110 transposition.

During transposition, 3 or 4 bp of the DNA sequence at the insertion site is duplicated by the repair and filling mechanisms of the nick produced during this event (24). In the amplicon derived from RIVM-7 DNA, we did not observe direct repeats at the ends of the IS6110 element; instead we observed the duplication of two nucleotides in one of the sides. The absence of flanking direct repeats can be an indication of recombination mediated by insertion elements (16), which usually produces the deletion of the region between the elements. For RIVM-7 there was not such a deletion, which indicates the possible existence of other reparation or transposition mechanisms.

IS6110 transposition in high-preference sites such as the *ipl* locus has been found to produce the excision of neighboring DNA fragments (8, 9), possibly by homologous recombination between two adjacent IS6110 elements oriented in the same direction, as proposed by Fang et al. (9). Several regions of *M. tuberculosis* H37Rv (RvD2, RvD3, and RvD5 regions), ranging in size from 0.8 to 4 kbp (2), have also been attributed to DNA excised during IS6110 transposition. In a previous study (28) we observed that some strains did not hybridize with the probes for *plcA* and *plcB*. The excision of part of the phospholipase genes by IS6110 recombination can explain the lack of these genes in some *M. tuberculosis* strains described by us and others (29). Although initially the *mip40* sequence inside *plcA* was considered to exist only in *M. tuberculosis*, and thus was used to identify *M. tuberculosis sensu stricto*, it appears that these genes are very mobile and unstable, and this may restrict their clinical use as genetic markers.

Our data suggest that the phospholipase genes seem to attract IS6110 transposition. Thus the presence of an IS6110 element in two phospholipase genes at a time or in nearby genes (such as the neighboring cutinase or PE or PPE gene, all of which have also been found to attract IS6110 elements) (22)

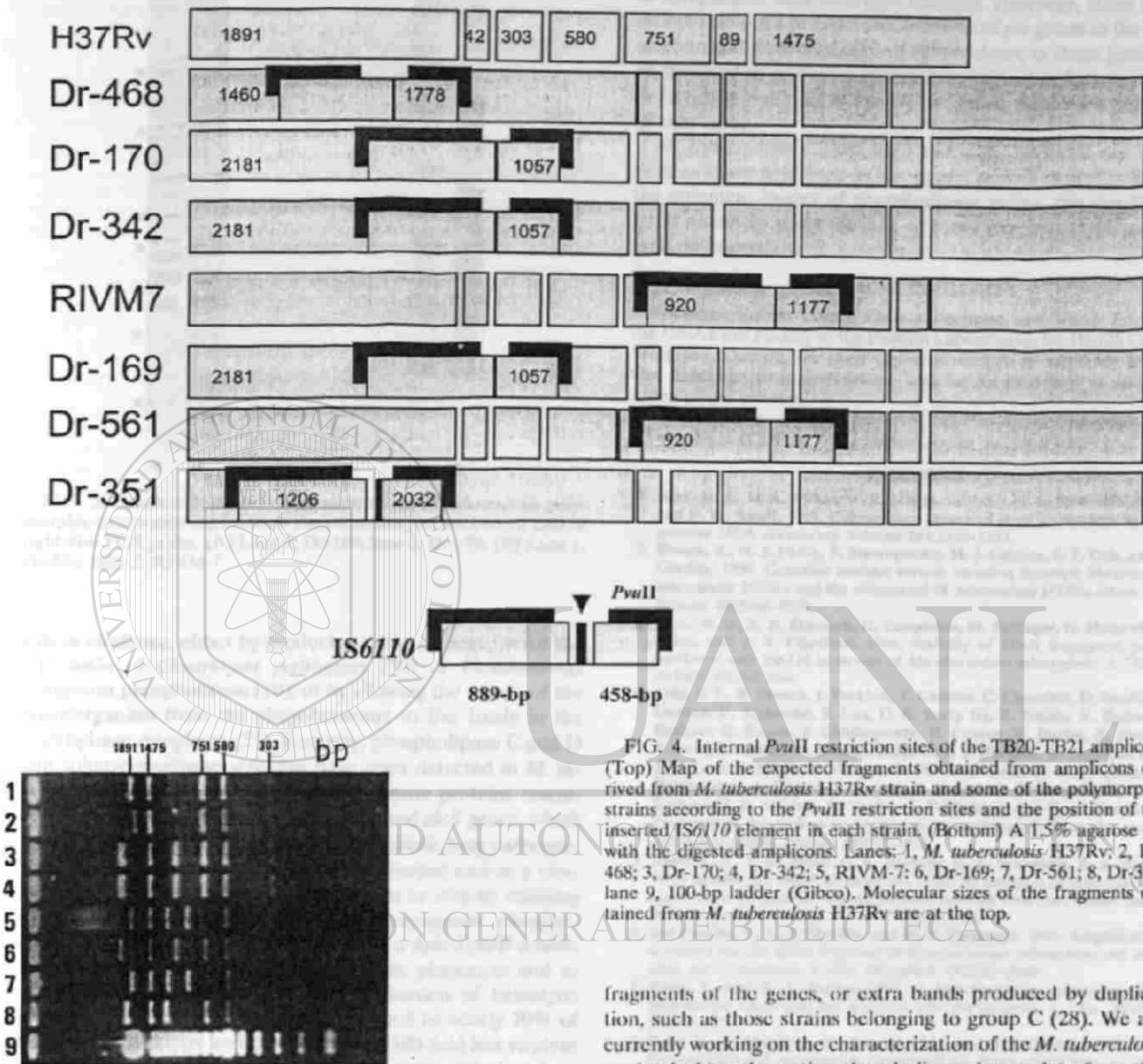
*M. tuberculosis* strains

FIG. 4. Internal *PvuII* restriction sites of the TB20-TB21 amplicon. (Top) Map of the expected fragments obtained from amplicons derived from *M. tuberculosis* H37Rv strain and some of the polymorphic strains according to the *PvuII* restriction sites and the position of the inserted *IS6110* element in each strain. (Bottom) A 1.5% agarose gel with the digested amplicons. Lanes: 1, *M. tuberculosis* H37Rv; 2, Dr-468; 3, Dr-170; 4, Dr-342; 5, RIVM-7; 6, Dr-169; 7, Dr-561; 8, Dr-351; lane 9, 100-bp ladder (Gibco). Molecular sizes of the fragments obtained from *M. tuberculosis* H37Rv are at the top.

can produce excision and may lead to the loss of phospholipase sequences and, ultimately, function. This is also supported by the presence in *M. tuberculosis* H37Rv of a phospholipase gene (*plcD*) (4) that is interrupted by an *IS6110* element. In the present study, two strains of *M. tuberculosis* were observed to produce 2.8-kbp excision fragments of the phospholipase genes. This could have been due to recombination of two *IS6110* elements since, as mentioned above, *IS6110* did not present direct repeats, and this is evidence of recombination between IS elements (16). It is possible that transposition of *IS6110* elements mediates the mobilization or duplication of these genes, producing strains with no phospholipase genes,

fragments of the genes, or extra bands produced by duplication, such as those strains belonging to group C (28). We are currently working on the characterization of the *M. tuberculosis* strains lacking the entire phospholipase locus; data from this work can help us to explain the mechanisms of the loss of DNA in this region.

The change in sequence divergence has been found useful in establishing and calibrating molecular clocks. Changes in the *IS6110* pattern have been observed to occur over 1 or 2 years (3, 5). We observed in related *M. tuberculosis* strains minimal changes in the *IS6110* patterns but radical changes in or the complete loss of the phospholipase genes (28). It is possible that environmental (11) or culture conditions may rapidly induce these changes in certain genomic areas, particularly in those where there are several *IS6110* elements separated by small distances.

It has been claimed that phospholipases play an important

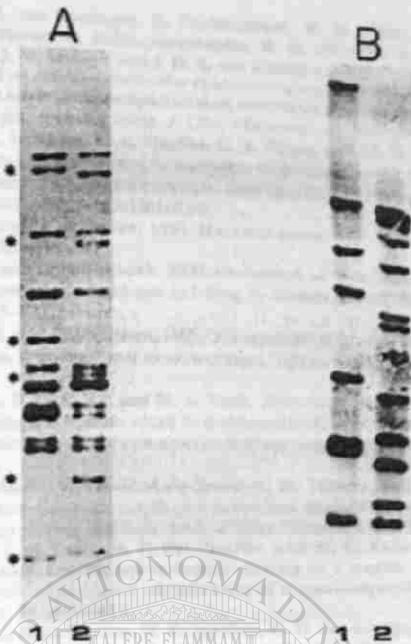


FIG. 5. Southern blot analysis of some of the *M. tuberculosis* polymorphic strains showing identical insertion sites probed with an IS6110 right-arm PCR probe. (A) Lane 1, Dr-169; lane 2, Dr-170. (B) Lane 1, Dr-561; lane 2, RIVM-7.

role in virulence, either by producing tissue damage, as for the alpha toxin of *Clostridium perfringens* (30) or *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase (19), or by allowing the escape of the microorganism from the phagolysosome to live freely in the macrophage cytoplasm (23). Recently, phospholipase C and D and sphingomyelinase activities have been detected in *M. tuberculosis* (13). *M. tuberculosis* phospholipase proteins resemble those encoded by *P. aeruginosa* *plcH* and *plcS* genes, which contribute to the virulence of this opportunistic lung pathogen. The phospholipase role in intracellular survival and as a virulence factor has been probed in vitro and in vivo by studying the effect of deletions of *Listeria monocytogenes* phospholipases encoded by *plcA* and *plcB*. Indeed a  $\Delta$ *plcA-plcB* double mutant lost its ability to escape from the phagocyte and to spread from cell to cell (23). The production of hemolytic plaques of this microorganism was reduced to nearly 70% of that for the wild type and the mutant was 500-fold less virulent than wild-type bacteria in mice, which suggests a role for phospholipases as a virulence factor. It is possible that the *M. tuberculosis* cluster comprising *plcA*, *plcB*, and *plcC* can have a similar role in pathogenesis. It is important to note that *M. bovis* lacks this cluster of genes (1). The clinical diseases produced by *M. tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* are indistinguishable. However, it has been observed that *M. bovis* has a decreased ability to reactivate and spread from person to person (18). Since phospholipase activity in other microorganisms has an important role in their virulence, it is possible that this activity confers to *M. tuberculosis* the ability to survive intracellularly in macrophages and therefore to grow and spread to other cells or tissues.

Recently, Miller and Shinnick (17) reported that *Mycobacterium smegmatis* cells complemented with PCR-generated

*plcA* and *plcB* genes from *M. tuberculosis* did not show an increased rate of intracellular survival in THP-1 macrophages in comparison with wild-type bacteria. However, these results do not rule out a possible involvement of *plc* genes in the whole mechanism of pathogenesis of tuberculosis, as these genes may be involved in processes interacting with other factors present in *M. tuberculosis* but not in *M. smegmatis*, which is a limitation of that assay.

*M. tuberculosis* strains with naturally knocked out genes, such as those described in this paper, as well as strains lacking the complete cluster of phospholipase genes, can constitute a good model to study the role of these enzymes in *M. tuberculosis* pathogenesis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

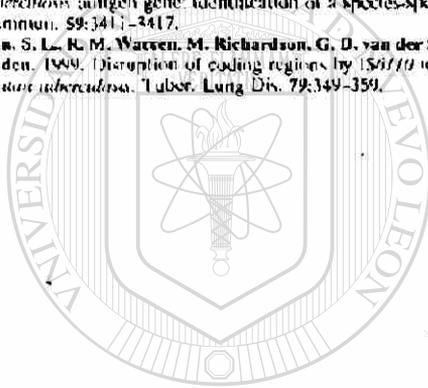
We thank Robert Vogrig, Claude Ouellette, and Shaun Tyler from the DNA Core Facility of the Federal Laboratories for Health Canada, Winnipeg, Canada, for their expert assistance in sequence analysis. Our thanks go to Juan Antonio Luna for his kind help in the preparation of the artwork.

This study was supported in part by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, grant no. 28697-M.

#### REFERENCES

- Behr, M. A., M. A. Wilson, W. P. Gill, H. Salamon, G. K. Schoolnik, S. Rane, and P. M. Small. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284:1520-1523.
- Brosch, R., W. J. Philip, E. Stavropoulos, M. J. Colston, S. T. Cole, and S. V. Gordon. 1999. Genomic analysis reveals variation between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the attenuated *M. tuberculosis* H37Ra strain. *Infect. Immun.* 67:5768-5774.
- Cave, M. D., K. D. Eisenach, G. Templeton, M. Sullinger, G. Mnzurek, J. H. Bates, and J. T. Crawford. 1994. Stability of DNA fingerprint patterns produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 32:262-266.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eigmeier, S. Gas, C. E. Barry III, F. Tekala, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Mouie, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Barrel. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537-544.
- Daley, C. L., P. M. Small, G. F. Schecter, G. K. Schoolnik, R. A. McAdam, W. R. Jacobs, Jr., and P. C. Hopewell. 1992. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med.* 326:231-235.
- Del Portillo, P., L. A. Murillo, and M. E. Patarroyo. 1991. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:2163-2168.
- Fang, Z., and K. J. Forbes. 1997. A *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 preferential locus (*ipl*) for insertion into the genome. *J. Clin. Microbiol.* 35:479-481.
- Fang, Z., N. Morrison, B. Watt, C. Doig, and K. J. Forbes. 1998. IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *J. Bacteriol.* 180:2102-2109.
- Fang, Z., C. Doig, D. T. Kenna, N. Smitipat, P. Palittapongarnpim, B. Watt, and K. J. Forbes. 1999. IS6110-mediated deletions of wild-type chromosomes of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 181:1014-1020.
- Funnkong, N., M. Beggs, H. El Hajj, G. Templeton, K. Eisenach, and M. D. Cave. 1998. Differences in the prevalence of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium tuberculosis* strains: low and high copy number of IS6110. 78:109-116.
- Ghanekar, K., A. McBride, O. Dellagostin, S. Thorne, R. Mooney, and J. McFadden. 1999. Stimulation of transposition of the *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence IS6110 by exposure to a microaerobic environment. *Mol. Microbiol.* 33:982-993.
- Hermans, P. W., D. van Soolingen, E. M. Bik, P. E. de Haas, J. W. Dale, and J. D. van Embden. 1991. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovis* BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Infect. Immun.* 59:2695-2705.
- Johansen, K. A., R. E. Gill, and M. L. Vasil. 1996. Biochemical and molecular analysis of phospholipase C and phospholipase D activity in mycobacteria. *Infect. Immun.* 64:3259-3266.

14. Kremer, K., R. van Soolingen, R. Frothingham, W. H. Haas, P. W. M. Hermans, C. Mouton, P. Imhoff-Paraparitiu, R. H. Plikaytis, L. W. Riley, M. A. Yubrus, J. M. Musser, and J. H. A. van Embden. 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* 37:2617-2618.
15. Leão, S. C., C. L. Rocha, L. A. Murillo, C. A. Parra, and M. E. Palurroya. 1995. A species-specific nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a protein that exhibits hemolytic activity when expressed in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63:4301-4306.
16. Mathison, J., and M. Chandler. 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:725-774.
17. Miller, B. H., and T. M. Shinnick. 2001. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* genes involved in resistance to killing by human macrophages. *Infect. Immun.* 68:387-390.
18. O'Reilly, L. M., and C. J. Daborn. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tuber. Lung Dis.* 76(Suppl. 1):1-46.
19. Ostroff, R. M., B. Wretling, and M. L. Yasil. 1989. Mutations in the hemolytic-phospholipase C operon result in decreased virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 grown under phosphate-limiting conditions. *Infect. Immun.* 57:1369-1373.
20. Ojal, I., C. Martín, V. Vincent-Ley-Frebault, D. Thierry, and B. Gicquel. 1991. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as epidemiological marker in tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:1252-1254.
21. Parra, C. A., L. P. Londoño, P. Del Portillo, and M. E. Palurroya. 1991. Isolation, characterization, and molecular cloning of a specific *Mycobacterium tuberculosis* antigen gene: identification of a species-specific sequence. *Infect. Immun.* 59:3411-3417.
22. Sampson, S. L., R. M. Warren, M. Richardson, G. D. van der Spuy, and P. D. van Helden. 1989. Disruption of coding regions by IS6110 insertion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber. Lung Dis.* 70:349-359.
23. Smith, G. A., H. Marquis, S. Jones, N. C. Johnston, D. A. Parfitt, and D. H. Goldfine. 1995. The two distinct phospholipase C of *Legionella pneumophila* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 63:4231-4237.
24. Spielmann-Hoyer, J., M. Meiser, F. Kahl, and G. Weber. 1991. Factors determining the frequency of plasmid cointegrate formation mediated by insertion sequence ISJ from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 226:441-444.
25. Thierry, D., M. U. Cave, K. D. Eisenach, J. T. Crawford, J. H. Bates, B. Gicquel, and J. L. Guendon. 1990. IS6110, an IS-like element of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Nucleic Acids Res.* 18:188.
26. Thierry, D., A. Briand-Nuel, V. Vincent-Ley-Frebault, S. Nauyen, J. L. Guendon, and B. Gicquel. 1991. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 29:2668-2673.
27. van Embden, J. D. A., M. D. Cave, J. T. Crawford, J. W. Date, K. U. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T. M. Shinnick, and P. Small. 1993. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J. Clin. Microbiol.* 31:406-409.
28. Vera-Cabrera, L., S. T. Howard, A. Laszlo, and W. M. Johnson. 1997. Analysis of genetic polymorphism in the phospholipase region of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 35:1190-1195.
29. Weil, A., D. B. Plikaytis, W. R. Butler, C. L. Woodley, and T. M. Shinnick. 1996. The *map40* gene is not present in all strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 34:2309-2311.
30. Williamson, E. D., and H. W. Tiddell. 1993. A genetically engineered vaccine against the alpha-toxin of *Clostridium perfringens* protects mice against experimental gas gangrene. *Vaccine* 11:1253-1258.
31. Wilsut, K. 1991. Preparation of genomic DNA from bacteria, p. 24.1-24.2. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology*, vol. 1. Wiley-Interscience, New York, N.Y.



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# **Phospholipase C Genes are Essential for *Mycobacterium tuberculosis* Cytotoxicity to Human Macrophages.**

MARCO A. HERNÁNDEZ-VERA<sup>1,2,3</sup>, JORGE CASTRO-GARZA<sup>2†</sup>, HUGO BARRIOS-GARCÍA<sup>2</sup>, JAVIER VARGAS-VILLARREAL<sup>2</sup>, SALVADOR SAID-FERNÁNDEZ<sup>2,3</sup>, OLIVERIO WELSH<sup>1</sup>, LUCIO VERA-CABRERA<sup>1†</sup>.

<sup>1</sup>Servicio de Dermatología, Hospital Universitario "José E. González", Monterrey, N.L., <sup>2</sup>División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L., México, <sup>4</sup>.

Running title: Phospholipase C is important for MTB macrophage cytotoxicity

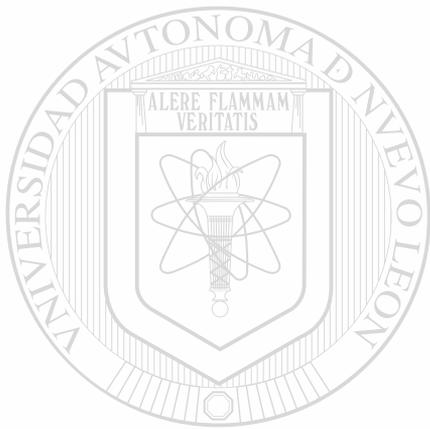
\*These authors provided an equal contribution to this work.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

\*Corresponding author: Dr. Lucio Vera-Cabrera  
Servicio de Dermatología,  
Hospital Universitario  
"José E. González",  
Madero y Gonzalitos  
Col. Mitras Centro  
Monterrey, N.L.,  
México  
Tel: 011(528) 348-0383  
Fax: 011(528) 348-4407  
e-mail: luvera\_99@yahoo.com

## ABSTRACT

*Mycobacterium tuberculosis* phospholipase C genes are encoded by three genes arranged in tandem, starting at position 2351 of the *M. tuberculosis* strain H37Rv genome and named *plcA*, *plcB* and *plcC* respectively. In a previous publication (24), we described that preferential insertion of IS6110 elements in any of these three genes produces polymorphism at this region. We found three isolates with deletions in this region produced by homologous recombination of two nearby elements; two strains had an identical deletion of *plcA* and most of *plcB* whereas another showed the loss of the complete phospholipase C (PLC) locus. In the present work we studied the effect of the disruption or loss of any of the *plc* genes on enzyme activity and the ability of these *M. tuberculosis* strains to elicit cytotoxicity using human macrophage monolayers. We observed that isolates having the inactivated *plc* genes did not show any significant decrease in enzyme activity; whereas the *plcA-plcB* and *plcA-plcB-plcC* strains demonstrated a lower PLC activity. The cytotoxicity for human macrophages (THP-1) was also decreased, and, remarkably, the *M. tuberculosis*  $\Delta$ *plcA-plcB-plcC* strain produced a limited toxicity to macrophage monolayers. These results confirm the importance of PLC for *M. tuberculosis* virulence.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



