

## BM-11

**LOS GENES *parA*, *parB* Y *jag* DE *Mycobacterium bovis* BCG Y *Mycobacterium smegmatis*:  
ANÁLISIS MOLECULAR DE SUS SITIOS PROMOTORES**

Rivera-Gutierrez Sandra,<sup>2</sup> Casart Yveth,<sup>1</sup> Salazar Leiria,<sup>1</sup> González-y-Merchand Jorge Alberto.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Estructural. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela, <sup>2</sup> Escuela Nacional de Ciencias biológicas, IPN, México D. F. Proyecto apoyado por CONACyT, registro SEP-2004-C01-46404; Comunidad Económica Europea, INCO ICA4-CT-2002-10063 y SIP, IPN No. 20050470.

**Palabras clave:** Ciclo celular, *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG, extensión del iniciador.

**Introducción:** La tuberculosis es una de las principales causas de muerte en el mundo; se estima que aproximadamente el 95% de los casos nuevos de tuberculosis se producen en los países en desarrollo.<sup>2</sup> El ciclo de división celular en las micobacterias se ha dividido en tres etapas: 1) síntesis de pared celular, se lleva a cabo la formación del septo, 2) síntesis de ADN micobacterial, se lleva la replicación de ADN de forma bidireccional y 3) síntesis de los componentes citoplasmático de la micobacteria. Una vez terminados dichos procesos se lleva a cabo la separación de la célula para dar origen a dos células hijas.<sup>1</sup> En las diferentes bacterias hasta el momento estudiadas los genes *parA* y *parB* se encuentran organizados en un operón y se autorregulan, ambas proteínas se unen a *parS*, estos genes, entre otros son importantes para que se lleve a cabo la replicación y segregación de cromosoma.<sup>3</sup>

Dentro del ciclo celular de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, y *M. smegmatis*, se encuentran involucrados, entre otros, los genes *parA*, *parB* y *jag*. Debido a la anterior, el objetivo del presente trabajo fue analizar a nivel molecular los promotores de los genes *parA*, *parB* y *jag* para cada una de las dos cepas en estudio.

**Metodología:** Se trabajó con las cepas de *M. bovis* BCG y *M. smegmatis*. Se realizó la extracción de ADN genómico, y se amplificaron por PCR diferentes fragmentos de la región de promotores de los genes *parA*, *parB* y *jag*; dichos fragmentos se clonaron en el vector pCRII, y se realizó la transformación de células de *E. coli* interferón  $\alpha$  (INF $\alpha$ ). Se realizó la extracción del ADN plasmídico mediante lisis alcalina. Para determinar el número y los sitios de inicio de la transcripción se realizó la extracción de ARN total de cada una de las cepas y posteriormente se realizó la técnica de extensión del iniciador.

**Resultados:** Se logró la amplificación de dos fragmentos para cada cepa de las posibles regiones de promotores de los genes *parA*, *parB* y *jag* (840pb y 1860pb para *M. smegmatis* y de 1100pb y 1700pb para *M. bovis* BCG), posteriormente se logró clonar los diferentes fragmentos de la región de promotores en el vector pCRII. Por secuenciación se comprobó que los fragmentos clonados en dichos vectores pertenecían al ADN de cada una de las cepas en estudio. Se obtuvieron 12 clonas recombinantes de *M. smegmatis* y 7 clonas recombinantes de *M. bovis* BCG; todas ellas contenían el inserto adecuado. Mediante la técnica de extensión del iniciador se encontraron los sitios de inicio de la transcripción de los tres genes en estudio de *M. bovis* BCG y *M. smegmatis*, en el cuadro 1 se resume lo encontrado para dichos promotores.

**Cuadro 1.** Secuencias consenso de las cajas -10 y -35 encontradas para los promotores encontrados en este estudio y grupo al cual pertenece dichos promotores.

Promotor	Tsp	-35	distancia 1	-10	distan- cia 2	Grupo
<i>M. smegmatis</i>						
P <sub>jag</sub>	G (-51)	CGCCGA	18	CGGGAG	10	D
P <sub>parA</sub>	A (-196)	TTCCTT	18	CTCCCG	20	D
P <sub>parB</sub>	G (-75)	TCGACG	16	CGAGCG	9	D
<i>M. bovis</i> BCG						
P1 <sub>jag</sub>	A (-48)	AAACGT	16	CAGCCG	3	D
P1 <sub>jag</sub>	G (-90)	AGCGGC	18	CGGCC	11	D
P <sub>parA</sub>	G (-107)	TGTGAT	21	TGTCAG	4	D
P1 <sub>parB</sub>	G (-81)	TGCGCA	20	CGCCGG	11	D
P2 <sub>parB</sub>	G (-257)	GCTACA	20	TACGAT	4	A

Distancia 1: Indica la distancia que existe entre las cajas -10 y -35.

Distancia 2: indica la distancia entre el sitio de inicio de la transcripción y la caja -10.

Grupo A: -35 T<sub>81</sub>T<sub>72</sub>G<sub>78</sub>A<sub>50</sub>C<sub>61</sub>W<sub>64</sub> y -10 T<sub>80</sub>A<sub>90</sub>T<sub>39</sub>A<sub>43</sub>M<sub>71</sub>T<sub>86</sub>.

Grupo D: -35 T<sub>90</sub>G<sub>50</sub>S<sub>80</sub>C<sub>50</sub>S<sub>90</sub>T<sub>30</sub> y -10 C<sub>90</sub>R<sub>70</sub>C<sub>50</sub>C<sub>50</sub>M<sub>70</sub>S<sub>90</sub>

Donde R: A o G

S: C o G

M: A o C y

W: A o T.

**Conclusión:** Los genes *parA*, *parB* y *jag* de *M. smegmatis* tienen un sólo Tsp. Para *M. bovis* BCG, los genes *jag* y *parB* tienen dos Tsp y el gen *parA* presenta sólo uno.

#### REFERENCIAS

- Colston M J, Cox RA. *Mycobacterial growth and dormancy*. En: Ratledge C, Dale J. (Eds). Mycobacterial molecular biology and virulence. United Kingdom: Blackwell. Science 1999. p. 198-219.
- Kaufmann SH. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nature Med* 2000; 6: 955-958.
- Suertes JA, Funnell BE. The DNA binding domains of ParB and the architecture of the plasmid partition complex. *J Biol Chem* 2001; 257: 12385-12394.