

“Optimización de un sistema recombinante para el monitoreo in vivo de la transcripción de *M. tuberculosis*”

KEREN A. ESPINOZA HUERTAS

Mycobacterium tuberculosis

***Mycobacterium tuberculosis* una bacteria de interés biomédico.**

- El proceso de transcripción y la ARNP son de especial interés.

Complejidad de estudios *in vivo*

- Tiempo de duplicación: ~ 20 horas
- Envoltura celular compleja

Para el estudio de los principales procesos biológicos se utiliza sistemas *in vitro* o sistemas recombinantes.

La expresión heteróloga de la ARNP-Mtb esta basado plásmidos

- Variabilidad en el número de copias de los plásmidos entre distintas colonias.
- Estrés metabólico producto de la expresión de la polimerasa.

ARN polimerasa y Transcripción bacteriana

La ARNP de Mtb tiene 5 subunidades:

Genes → Subunidad

rpoA

α

rpoB

β

rpoC

β'

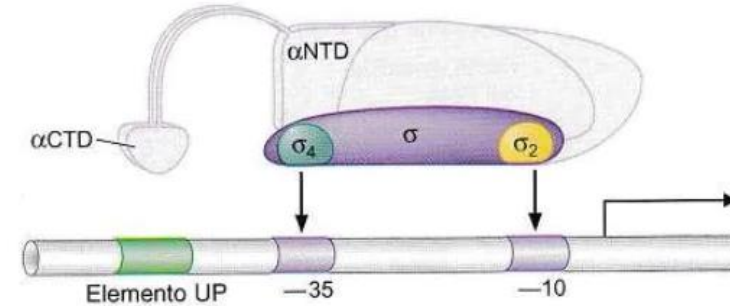
rpoZ

ω

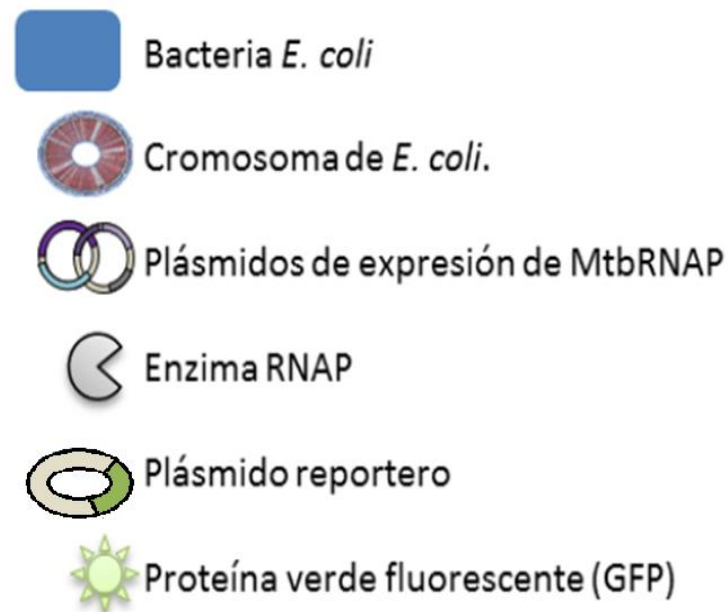
rpoD

σA

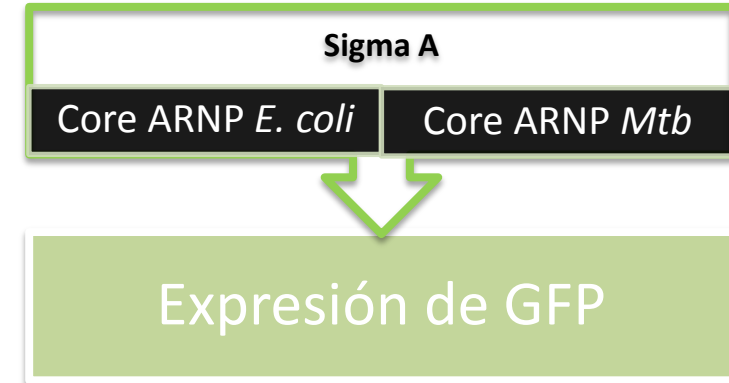
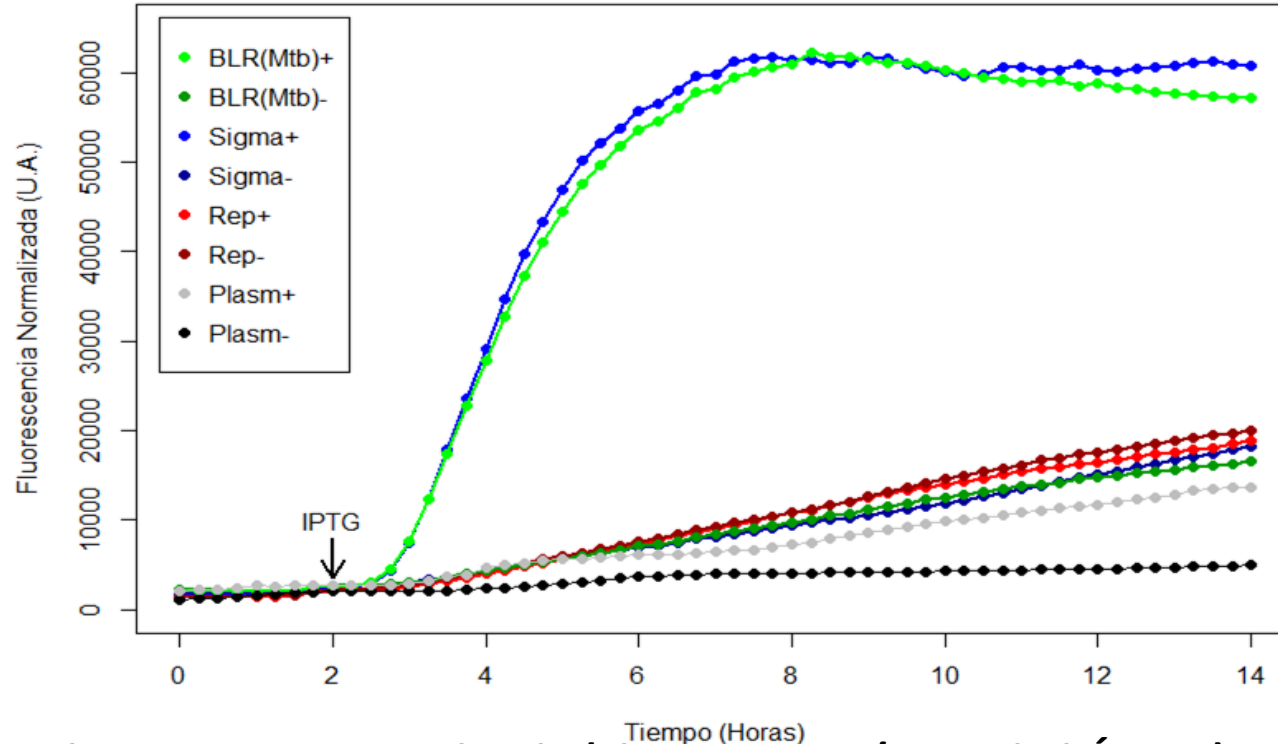
Core
ARNP



Reconocimiento del promotor



Inespecificidad en el sistema reportero



Fluorescencia normalizada (Fluorescencia/Densidad Óptica) en el tiempo.

Imagen de la Tesis de R. Alarcón

Buscando la especificidad de la bacteria *E. coli* reportera ARNP-Mtb

Fusión de Sigma A con RbpA

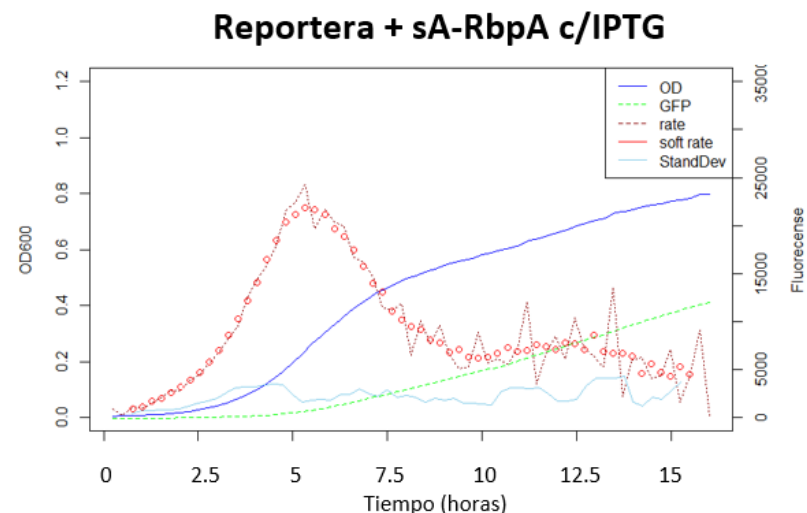
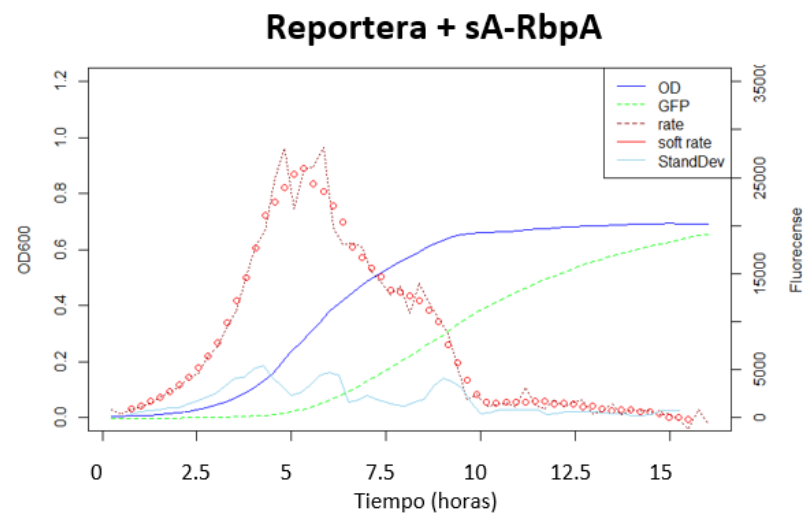
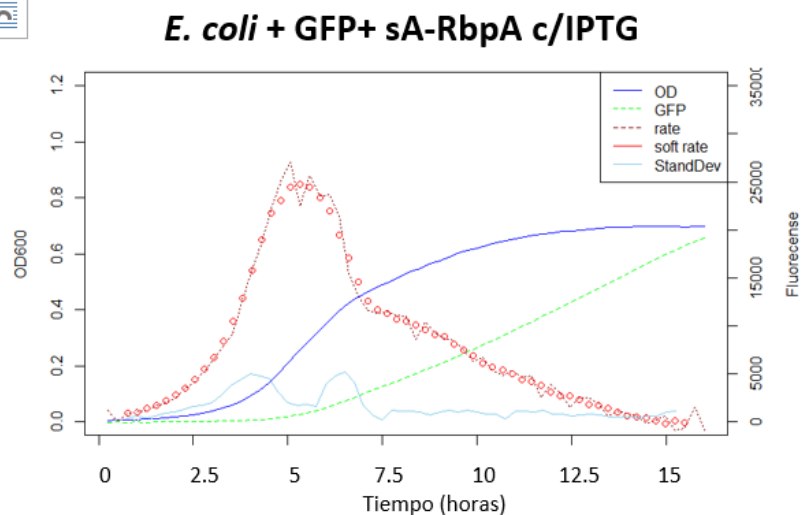
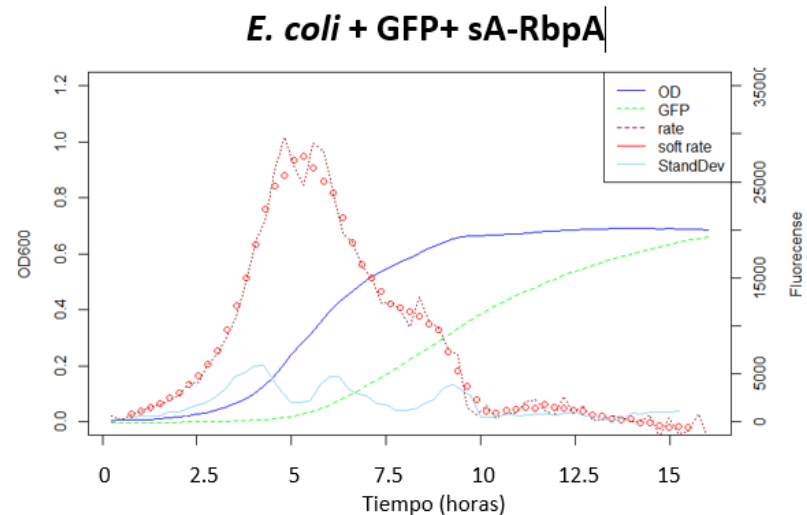
- Bacteria con los genes integrados para subunidades del core de Mtb + plásmido fusión

Fusión de Sigma A con la subunidad β'

La fusión es incapaz de unirse al core de la ARNP de *E. coli*.

Especificidad de la proteína fusión por el core de Mtb

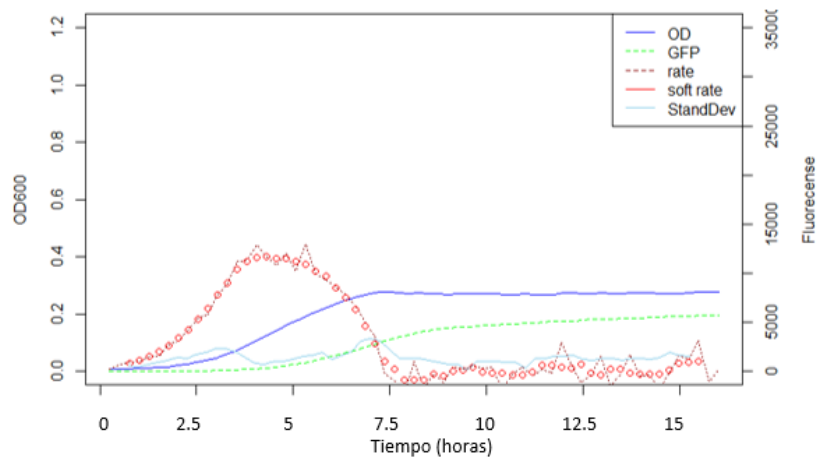
Expresión de GFP debido a la ARNP de *E. coli*



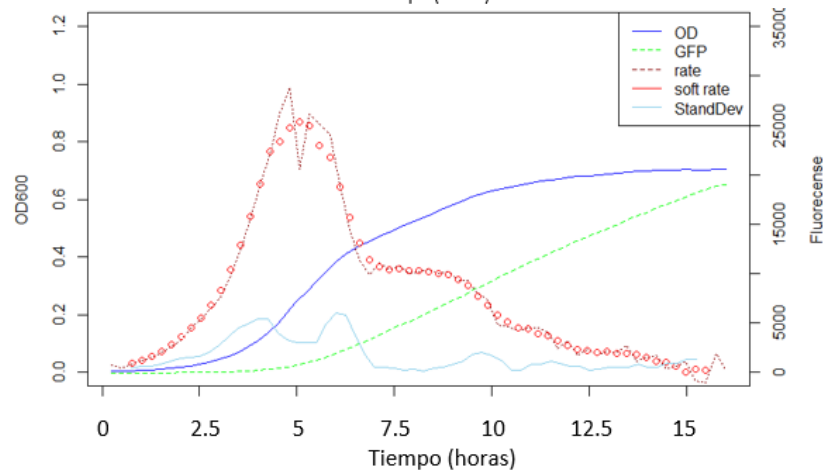
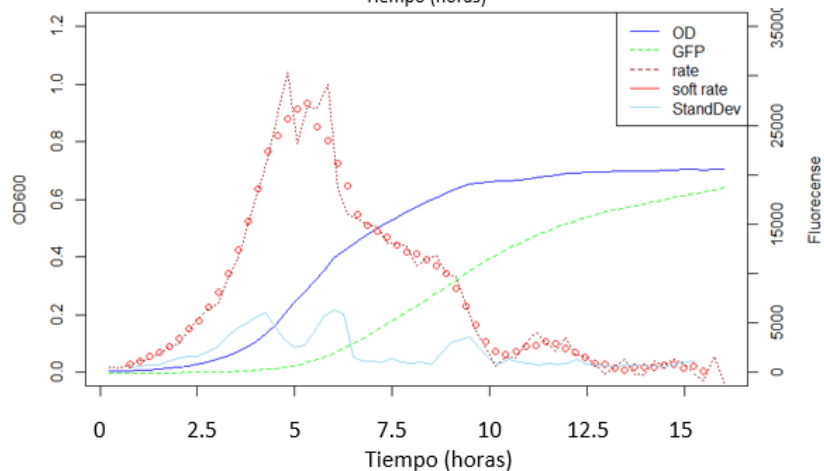
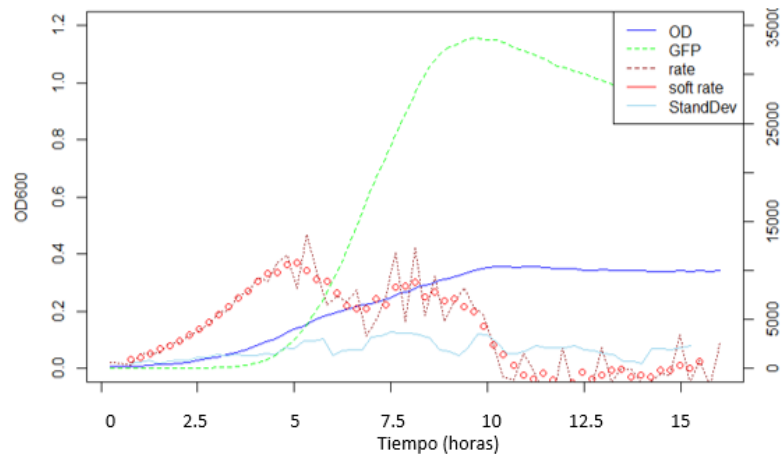
**Resultados
de la
reportera
fusión sA-
RbpA**

Resultados de la reportera fusión sA- β'

Reportera fusión sA- β'



Reportera fusión sA- β' c/IPTG



Conclusiones

- La fusión de las subunidades β' y σA no impide la actividad de la ARNP de *M. tuberculosis*.
- La fusión de las subunidades β' y σA evita la interacción de este último con el core de la ARNP de *E. coli*.

AGRADECIMIENTOS

- ASESOR: Dr. Daniel Guerra Giraldez
- Equipo del laboratorio de Moléculas individuales
- **BECA FONDECYT-BANCO MUNDIAL DEL DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA VIDA (08-2018-FONDECYT-BM-E033)**

