



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

---

**Tesis de doctorado**

**“Caracterización y análisis de los componentes  
involucrados en la regulación transcripcional de la  
síntesis de ácidos micólicos en micobacterias”**

Presentada por Lic. Yi-Ting Tsai

Rosario, Argentina  
-2017-

# **Caracterización y análisis de los componentes involucrados en la regulación transcripcional de la síntesis de ácidos micólicos en micobacterias**

Yi-Ting Tsai

Licenciada en Biotecnología-Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Fisiología y Genética de Actinomycetes del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), dependiente de CONICET y de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2012 y el 31 de marzo de 2017, bajo la dirección del Dr. Hugo Gramajo y la codirección de la Dra. Gabriela Gago.

Director Dr. Hugo Gramajo .....

Codirectora Dra. Gabriela Gago .....

Dra. Angeles Zorreguieta .....

Dra. Fabiana Bigi .....

Dr. Fernando C. Soncini .....

Defendida .....

**A las tres personas que más amo en el mundo:**  
*Papi, Mami y Ani*

## **AGRADECIMIENTOS**

Ha llegado el gran momento de expresar mis más profundos agradecimientos:

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Hugo Gramajo, por toda su dedicación y paciencia en estos cinco años de tesis doctoral, por la libertad otorgada a la hora del aprendizaje, por las enseñanzas impartidas, por todas las charlas que hemos compartido y por los consejos que me ha brindado en los momentos que más he necesitado, porque además de ser un gran jefe es una gran persona. A la Dra. Gabriela Gago, por haberme ayudado desde mis primeros días en el laboratorio, por transmitirme sus conocimientos, por los pequeños y grandes consejos y por el empuje de siempre. A ambos, mis más profundos sentimientos de gratitud y cariño.

A Ani, Lautu y Tato por su buena predisposición para ayudarme en el laboratorio, por la buena onda de siempre y por las grandes anécdotas científicas compartidas!

A los grandes amigos que me llevo del doctorado, Chichi, Simi, Santi, Gasti, Euge, Arielito, Cabru, Ber, Pablito, Papa, Tico, Ale, Martu y Tati. El doctorado no hubiese sido lo mismo sin ustedes! Gracias por todos los momentos compartidos dentro y fuera del lab (las grandes juntadas en la terraza del Gasti y en la isla del Cabru, las salidas, etc ), por las risas y lágrimas compartidas, por la contención y las charlas profundas, por los chistes internos y por el cariño desde el primer día que me incorporé al grupo. Gracias totales! Mi especial agradecimiento a Chichi y Gasti por ayudarme con la edición de la Tesis y por responder a mis dudas sin importar la hora, y a Euge por guiarme en el camino científico.

A los chicos que me recibieron en el laboratorio y a los que se fueron incorporando, Sony, Lau, Juli, Agos, Tomasito, Posh, Bar, Tuty, Delfi, gracias por los mates compartidos, por los abrazos y por su gran compañía.

A los chicos del piso 2 con los que tuve oportunidad de interactuar, gracias por recibirme siempre con una gran sonrisa y un gran abrazo y por compartir tantos momentos lindos.

A las chicas de la Facu, Solchus, Evi y Nana, porque estuvieron siempre tanto en

las buenas como en las malas. Gracias por sus palabras de aliento en mis momentos difíciles.

A Lilo, Vivi, Clau y Mar(s) no sólo por facilitarme el trabajo diario sino también por la gran amistad que hemos logrado entablar.

A toda persona del IBR que me ha dado una mano cuando he necesitado.

A mi gran familia de corazón y a mis amigos de toda la vida, gracias por sus dosis de alegría.

A mis abuelos, quienes a pesar de la distancia me hacen llegar su cariño y apoyo.

Y por último (y lo más importante), quiero agradecer a mis Padres porque sin ellos no hubiese podido llegar hasta aquí, porque son mi ejemplo de vida, porque me han enseñando que con esfuerzo y perseverancia nada es imposible. Gracias totales por su amor incondicional, por enseñarme lo que es importante en la vida, por la compañía y por ser mi gran refugio! Mi eterno agradecimiento a mi queridísima hermanita Anita, por acompañarme y bancarme sin quejas, por alentarme a continuar, por confiar profundamente en mí, por contenerme, por brindarme sus valiosos consejos y por todo su apoyo y amor incondicional. A ellos, va dedicado este trabajo.

Parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral fueron dados a conocer en dos publicaciones internacionales y en distintas presentaciones a congresos científicos, como se detalla a continuación:

### **Publicaciones**

- 1- **Tsai YT**, Salzman V, Cabruja M, Gago G and Gramajo H. "Role of long chain acyl-CoAs in the regulation of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria." **2017**. *Open Biology*. **7**:170087.
- 2- Cabruja M<sup>†</sup>, Mondino S<sup>†</sup>, **Tsai YT**<sup>†</sup>, Lara J<sup>†</sup>, Gramajo H and Gago G. "A conditional mutant of the fatty acid synthase unveils unexpected cross talks in mycobacterial lipid metabolism." **2017**. *Open Biology*. **7**:160277. <sup>†</sup> Co-autoría.

### **Publicación no incluida en esta Tesis**

Velappan AB, Charan Raja MR, Datta D, **Tsai YT**, Halloum I, Wan B, Kremer L, Gramajo H, Franzblau SG, Kar Mahapatra S, Debnath J. "Attenuation of *Mycobacterium* species through direct and macrophage mediated pathway by unsymmetrical diaryl urea." **2017**. *Eur J Med Chem*. 125:825-841.

### **Presentación a Congresos Internacionales**

- 1- **Tsai YT**, Salzman V, Gago G and Gramajo H. "Physiological Role of MabR in the regulation of mycolic acids biosynthesis in *Mycobacterium smegmatis*." VIII SLAMTB Meeting. XXIII ALAM Meeting. Rosario, Argentina. **2016**.
- 2- **Tsai YT**, Salzman V, Gago G and Gramajo H. "Understanding the physiological role of MabR in mycolic acid biosynthesis." VII SLAMTB Meeting. Canela, Brasil. **2014**.
- 3- Lara J, **Tsai YT**, Mondino S, Salzman V, Gago G and Gramajo H. "Regulatory network in mycobacteria: key role of long chain acyl-CoAs." 8th International Conference on Lipid Binding Proteins. La Plata, Argentina. **2013**.

- 4- **Tsai YT**, Salzman V, Gago G and Gramajo H. "Characterization of a transcriptional regulator of mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*." 137th Wellcome Trust Advanced Course "Molecular Basis of Bacterial Infection: Contemporary Research Approaches". Cambridge, Reino Unido. **2013**.

#### **Presentación a Congresos Nacionales**

- 1- **Tsai YT**, Mondino S, Cabruja M, Lara J, Gramajo H and Gago G. "Construction and analysis of a FAS I conditional mutant in *Mycobacterium smegmatis*." LI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB). Mar del Plata, Argentina. **2015**.
- 2- **Tsai YT**, Salzman V, Gago G and Gramajo H. "An insight into the physiological role of MabR in mycolic acid biosynthesis." L Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB). Rosario, Argentina. **2014**.
- 3- **Tsai YT**, Salzman V, Gago G and Gramajo H. "Characterization of a transcriptional regulator of mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*." IX Reunión de la Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE). Rosario, Argentina. **2013**.
- 4- Lara J, **Tsai YT**, Diacovich L, Gago G and Gramajo H. "Characterization of a transcriptional regulator of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria." XLVIII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB). Mendoza, Argentina. **2012**.

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1	TUBERCULOSIS .....	2
1.2	EL GÉNERO <i>MYCOBACTERIUM</i> .....	5
1.3	MICOBACTERIAS DE CRECIMIENTO RÁPIDO COMO MODELO DE ESTUDIO .....	6
1.4	ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA ENVOLTURA CELULAR MICOBACTERIANA .....	7
1.4.1	MEMBRANA PLASMÁTICA .....	9
1.4.2	PARED CELULAR.....	10
1.4.3	CÁPSULA.....	12
1.5	ROL DE LOS LÍPIDOS EN EL CICLO DE VIDA DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> .....	13
1.5.1	ROL DE LOS LÍPIDOS EN EL INGRESO DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> A LA CÉLULA HUÉSPED Y SU IMPLICANCIA EN LOS MECANISMOS FAGOCÍTICOS .....	13
1.5.2	ROL DE LOS LÍPIDOS EN LA MODULACIÓN DE LA MADURACIÓN DEL FAGOSOMA.....	14
1.5.3	ROL DE LOS LÍPIDOS EN LA BIOGÉNESIS DE LOS GRANULOMAS .....	15
1.6	METABOLISMO LIPÍDICO DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> DENTRO DEL HUÉSPED .....	17
1.7	BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN BACTERIAS .....	18
1.8	BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS Y ÁCIDOS MICÓLICOS EN LAS MICOBACTERIAS ....	21
1.8.1	SISTEMAS FAS MICOBACTERIANOS .....	21
1.8.2	COMPONENTES INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS MICÓLICOS EN LAS MICOBACTERIAS .....	24
1.9	REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN BACTERIAS .....	30
1.10	REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS Y ÁCIDOS MICÓLICOS EN LAS MICOBACTERIAS .....	36
1.10.1	CONTROL BIOQUÍMICO DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO LIPÍDICO .....	36

1.10.2 ANTECEDENTES SOBRE EL CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN EL METABOLISMO LIPÍDICO .....	37
---	----

## **2 MATERIALES Y MÉTODOS..... 42**

<b>2.1 CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS .....</b>	<b>43</b>
<b>2.2 MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO .....</b>	<b>47</b>
2.2.1 TRATAMIENTO DE <i>M. SMEGMATIS</i> CON ISONIAZIDA (INH) .....	50
<b>2.3 TRANSFORMACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS .....</b>	<b>51</b>
2.3.1 TRANSFORMACIÓN QUÍMICA DE <i>E. COLI</i> .....	51
2.3.2 ELECTROPORACIÓN DE <i>E. COLI</i> .....	51
2.3.3 TRANSFORMACIÓN DE <i>M. SMEGMATIS</i> POR ELECTROPORACIÓN .....	52
<b>2.4 MANIPULACIÓN DE ADN .....</b>	<b>52</b>
2.4.1 TRATAMIENTO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN .....	52
2.4.2 ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA .....	52
2.4.3 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA .....	53
2.4.4 SECUENCIACIÓN DE NUCLEÓTIDOS Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS .....	53
2.4.5 EXTRACCIÓN DE ADN .....	53
2.4.5.1 Extracción de ADN genómico de <i>M. smegmatis</i> .....	53
2.4.5.2 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .....	54
2.4.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	54
<b>2.5 CONTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS .....</b>	<b>55</b>
<b>2.6 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....</b>	<b>57</b>
2.6.1 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE MABR <sub>MS</sub> .....	57
2.6.2 DOSAJE DE PROTEÍNAS Y SDS-PAGE.....	58

2.6.2.1	Análisis en <i>M. smegmatis</i> .....	58
2.6.3	TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT) .....	59
2.6.3.1	Inmunización con MabR <sub>MS</sub> y obtención de suero .....	59
2.6.3.2	Western blot con extractos proteicos de <i>M. smegmatis</i> .....	59
2.6.4	ENSAYOS DE B-GALACTOSIDASA .....	61
<b>2.7</b>	<b>MANIPULACIÓN DE ARN</b> .....	<b>62</b>
2.7.1	EXTRACCIÓN DE ARN DE <i>M. SMEGMATIS</i> .....	62
2.7.2	RETROTRANSCRIPCIÓN (SÍNTESIS DE ADNC) .....	63
2.7.3	PCR EN TIEMPO REAL (QRT-PCR).....	63
<b>2.8</b>	<b>ANÁLISIS DE LÍPIDOS</b> .....	<b>66</b>
2.8.1	ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS Y ÁCIDOS MICÓLICOS POR CROMATOGRFÍA EN CAPA DELGADA (TLC) .....	66
2.8.2	ANÁLISIS DE TRIACILGLICÉRIDOS (TAG) POR CROMATOGRFÍA EN CAPA DELGADA (TLC) .....	67
2.8.3	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR CROMATOGRFÍA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS) .....	67
2.8.4	ANÁLISIS DE LÍPIDOS TOTALES POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (HPLC-MS) .....	67
<b>2.9</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES FAS-I Y FAS-II UTILIZANDO ENSAYOS RADIOMÉTRICOS <i>IN VITRO</i> DE INCORPORACIÓN DE [2-<sup>14</sup>C] MALONIL-CoA.....</b>	<b>68</b>
<b>2.10</b>	<b>ANÁLISIS DE LA BIOSÍNTESIS DE MACROMOLÉCULAS</b> .....	<b>69</b>
<b>2.11</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>70</b>
<b>3</b>	<b><u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b> .....	<b>71</b>

<b>3.1</b>	<b>CAPÍTULO I. ESTUDIO DEL ROL FISIOLÓGICO DE MABR EN LA REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS MICÓLICOS EN <i>M. SMEGMATIS</i>.....</b>	<b>72</b>
3.1.1	OBJETIVO.....	76
3.1.2	RESULTADOS.....	76
3.1.2.1	Análisis de una cepa de <i>M. smegmatis</i> mutante condicional en <i>mabR</i> , inducible por acetamida .....	76
3.1.2.2	Construcción de una cepa de <i>M. smegmatis</i> mutante condicional en <i>mabR</i> , utilizando el sistema TetON.....	80
3.1.2.3	Caracterización de la cepa <i>mabR</i> cKD .....	85
3.1.2.4	MabR es un activador del operón <i>fasII</i> <i>in vivo</i> .....	87
3.1.2.5	La deficiencia de MabR impacta negativamente sobre la biosíntesis <i>de novo</i> de ácidos micólicos .....	90
3.1.2.6	La composición lipídica de <i>M. smegmatis</i> se encuentra globalmente afectada ante la presencia de cantidades sub-fisiológicas de MabR.....	95
3.1.3	DISCUSIÓN .....	101
<b>3.2</b>	<b>CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y GENÉTICA DE LOS ELEMENTOS CIS Y TRANS INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN <i>FASII</i>.....</b>	<b>107</b>
3.2.1	OBJETIVO.....	107
3.2.2	RESULTADOS.....	107
3.2.2.1	La activación del operón <i>fasII</i> ante el tratamiento con isoniazida es dependiente de MabR .....	107
3.2.2.2	Los acil-CoAs de cadena larga aumentan la afinidad de MabR por el promotor <i>fasII</i> promoviendo la activación del operón <i>fasII</i> <i>in vivo</i> .....	110
3.2.2.3	Elementos <i>cis</i> que participan en la regulación del operón <i>fasII</i> de <i>M. tuberculosis</i> .....	115
3.2.3	DISCUSIÓN .....	119

<b>3.3</b>	<b>CAPÍTULO III. IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE FAS-I SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO EN <i>M. SMEGMATIS</i></b>	<b>126</b>
3.3.1	OBJETIVO	128
3.3.2	RESULTADOS	128
3.3.2.1	Caracterización de la cepa <i>fas</i> cKD	128
3.3.2.2	Regulación coordinada de los sistemas FAS-I y FAS-II	131
3.3.2.3	Una expresión disminuída de <i>fas</i> impacta negativamente sobre la actividad FAS-I en <i>M. smegmatis</i>	135
3.3.2.4	Una caída abrupta de la actividad FAS-I impacta de manera diferencial sobre la biosíntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos y ácidos micólicos	139
3.3.2.5	La movilización de los triacilglicéridos provee de sustrato iniciador al sistema FAS-II para la biosíntesis de ácidos micólicos	142
3.3.3	DISCUSIÓN	146
<b>4</b>	<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>150</b>
<b>5</b>	<b><u>RESUMEN</u></b>	<b>153</b>
<b>6</b>	<b><u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	<b>156</b>

## ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACP	Proteína transportadora de acilos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AG	Arabinogalactano
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
Am	Apramicina
AM	Ácidos micólicos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATc	Anhidrotetraciclina
ATP	Trifosfato de adenosina
BCIP	Sal de toluidina 5-bromo-4-cloro-3'-indol fosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CD	Células dendríticas
CDP	Citidina difosfato
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CL	Cardiolipina
CoA	Coenzima A
DAG	Diacilglicerol
DAP	Diaminopimélico
DAT	Diacil-trehalosas
DNasa I	Desoxirribonucleasa I
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMB	Etambutol
ETH	Etionamida

FAMEs	Metilésteres de ácidos grasos
FAS	Sintasa de ácidos grasos
FM	Macrófagos espumosos
GC	Guanina y Citosina
GC-MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas
GPL	Glicopeptidolípidos
GroMM	Glicerol monomicolato
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
Hyg	Higromicina
ILI	Inclusiones lipídicas intracelulares
INH	Isoniazida
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
Kan	Kanamicina
LAM	Lipoarabinomanano
LB	Cuerpos lipídicos
LM	Lipomanano
LOS	Lipooligosacáridos
LTBI	Infección latente
MAMEs	Metilésteres de ácidos micólicos
Man-LAM	LAM con residuo de manosa terminal
MCV	Vacuola contenedora de <i>Mycobacterium</i>
MDR-TB	Tuberculosis multirresistente
MMDAG	Monomeromicolil diacilglicerol
MS-MS	Espectrometría de masas en tándem
NBT	Cloruro de nitroblue tetrazolium
ONPG	Orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAT	Pentacil-trehalosas
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PDIM	Tiocerol dimicocerosato
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Peptidoglicano
PGL	Glicolípidos fenólicos
PI	Fosfatidilinositol
PIM	Fosfatidilinositolmanósido
Pip	Pristinamicina
PKS	Policétido sintasa
PL	Fosfolípidos
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
p/v	Peso en volumen
PZN	Pirazinamida
qRT-PCR	PCR en tiempo real
RACE	Amplificación rápida de los extremos de ADNc
RIF	Rifampicina
RNasa	Ribonucleasa
RNA seq	Secuenciación del ARN
RT	Retrotranscripción
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SL	Sulfolípidos
Sp	Espectinomicina
SRI	Secuencias repetidas invertidas
STPK	Serina/treonina proteína quinasa
Str	Estreptomomicina
TAG	Triacilglicéridos
TB	Tuberculosis
TBHA	Hidróxido de terbutilamonio
TDM	Trehalosa dimicolato

TLC	Cromatografía en capa delgada
TLM	Tiolactomicina
TMM	Trehalosa monomicolato
TRC	Triclosan
Tris	N-tris- (hidroximetil) aminometano
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
UA	Unidades arbitrarias
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
v/v	Volumen en volumen
XDR-TB	Tuberculosis extremadamente resistente
XL-AM	Ácidos micólicos ultra/extra largos

# **1 INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas que más muertes provoca a nivel mundial. En el año 2015, se registraron alrededor de 10.4 millones de nuevos casos y 1.8 millones de muertes a causa de esta enfermedad [1]. Esta enfermedad infecciosa es causada por bacterias del género *Mycobacterium*, pertenecientes a un grupo genéticamente relacionado denominado complejo *Mycobacterium tuberculosis*. El agente etiológico más representativo de esta enfermedad es *Mycobacterium tuberculosis*, identificado por primera vez como una especie patógena por Robert Koch en 1882, de allí su denominación como bacilo de Koch [2]. La TB es predominantemente una enfermedad pulmonar (tuberculosis pulmonar) representando el 70% de los casos; sin embargo, *M. tuberculosis* puede diseminarse a otros órganos, incluyendo los nódulos linfáticos, huesos y meninges, provocando una enfermedad extrapulmonar (tuberculosis miliar o extrapulmonar) en 10-42% de los pacientes dependiendo de la edad, estado inmune y grupo étnico [3,4]. El contagio ocurre por vía aérea cuando un individuo enfermo de tuberculosis pulmonar expulsa bacterias a través de la tos, el estornudo o la salivación. Sólo con inhalar una pequeña cantidad de bacilos se puede contraer la infección. Sin embargo, no todos los sujetos infectados por el bacilo de la TB necesariamente desarrollan la enfermedad. El sistema inmunológico recluye los gérmenes que, aislados por una gruesa envoltura cérica, pueden permanecer en estado latente durante años. El riesgo de enfermar aumenta cuando el sistema inmunológico de la persona está debilitado. Las personas co-infectadas con el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) tienen muchas más probabilidades de enfermar de TB [1]. Por ende, una vez que el individuo es infectado con *M. tuberculosis*, pueden presentarse tres situaciones:

- 1) El microorganismo es eliminado por el individuo.
- 2) Desarrollo de TB activa.
- 3) El bacilo es reclutado dentro de una estructura pulmonar denominada granuloma donde persiste causando una Infección Latente (LTBI).

En una LTBI, el microorganismo permanece viable pero el individuo infectado no presenta ningún síntoma de la enfermedad. Sin embargo, cuando el sistema inmune

del huésped se deprime, la bacteria en estado de dormancia puede reactivarse causando una infección activa. La LTBI es uno de los obstáculos más grandes contra el control y la erradicación de la TB [5].

El tratamiento de la TB activa involucra un régimen con cuatro drogas de primera línea: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZN) y etambutol (EMB), alcanzándose un 90% de recuperación en los pacientes bajo tratamiento. El proceso es prolongado, el cual abarca un mínimo de seis meses dividido en dos fases: una fase intensiva inicial de dos meses con las cuatro drogas, necesaria para matar los bacilos en división activa, seguida por una fase de continuación de cuatro meses con INH y RIF para asegurar que los bacilos persistentes también sean eliminados.

Durante la segunda mitad del siglo XX se pensó que la TB estaba controlada; sin embargo, la aparición en 1981 del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) causado por el VIH, la intensificación de las migraciones masivas y las condiciones de pobreza en muchos países subdesarrollados (principalmente en Asia y África) fueron generando un terreno propicio para el resurgimiento de enfermedades que se creían en retroceso, como la TB. Como consecuencia del incremento en el número de casos de personas infectadas, en 1993 la Organización Mundial de la Salud declaró a esta enfermedad como una emergencia de la salud pública a nivel mundial. El control de la epidemia de TB se vio dificultada por la falta de una vacuna efectiva, de diagnósticos rápidos y eficaces y fundamentalmente por la emergencia de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiples drogas. Es por eso que surge la necesidad de desarrollar vacunas nuevas y más efectivas para combatir la TB.

La TB fármaco-resistente aparece principalmente como consecuencia del incumplimiento efectivo del tratamiento. La TB multirresistente (MDR-TB) es una forma de TB resistente a por lo menos dos de las drogas más importantes utilizadas para el tratamiento de esta enfermedad, INH y RIF [6]. En el año 2006 se han reportado casos de pacientes infectados con cepas de TB extensamente resistente (XDR-TB), que presentaban resistencias adicionales a dos de las drogas de segunda línea más efectivas: las fluoroquinolonas, y a al menos una de las tres drogas inyectables, amikacina, kanamicina o capreomicina. En años más recientes se han

detectado, en distintos países, casos de TB con patrones de resistencia aún más amplios [7–9]. La aparición de estas formas resistentes de TB representa una de las amenazas más importantes para el control de esta enfermedad a nivel mundial. En la mayoría de los casos, se recomienda un tratamiento de veinte meses y requiere de la administración diaria de drogas más costosas, más tóxicas y menos efectivas que aquellas usadas para tratar las formas susceptibles de TB. A su vez, los pacientes infectados que no cumplen adecuadamente con el tratamiento, se vuelven portadores crónicos y diseminan cepas resistentes en su familia y comunidad.

En la República Argentina se notifican alrededor de 13.000 nuevos casos cada año. La pobreza, la marginalidad y el hacinamiento que experimenta gran parte de la población constituyen un obstáculo en la lucha contra esta enfermedad, no sólo a nivel nacional sino también internacional.

La habilidad de *M. tuberculosis* de persistir bajo la forma de una infección asintomática por largos períodos de tiempo es un tema central en la biología de la enfermedad. Como consecuencia de ello, aún curando clínicamente al paciente, no se logra erradicar completamente al bacilo. En esta etapa, la mayoría de las bacterias están en un estado de dormancia, no replicativo y con baja actividad metabólica, y sólo una pequeña población se encuentra en división activa [10]. Entre las causas de su persistencia se encuentra la propia naturaleza del proceso infectivo, que genera la ocupación de numerosas cavidades en el huésped con un gran número de bacilos. La resistencia fenotípica del estado dormante representa uno de los mayores problemas para las quimioterapias y la capacidad limitada del sistema inmune de eliminar los bacilos presentes en las lesiones luego del tratamiento. Se considera que durante la infección latente, el uso de INH reduce el riesgo de reactivación, ya que actúa sobre las bacterias en división activa; mientras que la RIF colabora en la eliminación de la subpoblación en estado de dormancia [11].

La resistencia intrínseca de *M. tuberculosis* a muchos quimioterapéuticos está relacionada con la barrera de impermeabilidad que le proporciona su compleja pared celular [12]. En la actualidad se están realizando numerosos esfuerzos para desarrollar drogas que bloqueen la transición entre los distintos estados activos y

dormantes, o que sean particularmente efectivos en la eliminación de esta población de bacilos, de manera tal que sirvan como antibióticos o adyuvantes que aumenten la eficacia del tratamiento.

La TB podría ser controlada mediante una mejor prevención de la infección, la interrupción de su progreso a enfermedad activa y la detección y aplicación del tratamiento en forma más rápida. Para acelerar el proceso se requiere de una mayor intervención junto al desarrollo y la implementación de nuevas drogas, vacunas y herramientas de diagnóstico.

## **1.2 El género *Mycobacterium***

El género *Mycobacterium* contiene más de 120 especies reconocidas hasta el momento, muchas de ellas descritas en los últimos años, incluyendo principalmente organismos patógenos de humanos y animales [13]. Dentro del taxón *Actinomycetes*, la familia *Mycobacteriaceae* forma un grupo monofilético con las familias *Corynebacteriaceae* y *Nocardiaceae*, el cual contiene a todos los organismos productores de ácidos micólicos, siendo el género *Mycobacterium* el más extensamente estudiado por su implicancia médica [14]. Filogenéticamente, los miembros de este grupo pertenecen al dominio *Bacteria*, con alto contenido en G+C en su ADN, desde 53% para algunas especies de *Corynebacterium* hasta 70% para especies de *Nocardia*. Las micobacterias presentan un contenido de G+C cercano al 65%.

Las micobacterias son actinomicetes aerobios, ácido-alcohol resistente como consecuencia de su compleja pared celular rica en lípidos, que forman bacilos rectos o ligeramente curvos. La separación del género *Mycobacterium* en dos grupos principales en función de la velocidad de crecimiento de sus especies, constituye la base de la taxonomía micobacteriana. A pesar de no respetar exactamente esta división, la mayoría de las especies de crecimiento lento (tiempo de duplicación de ~24 h) están asociadas o son las causantes de enfermedades en humanos o animales. En consecuencia, la mayoría de las especies de crecimiento rápido (tiempo de

duplicación de ~3 h), las cuales son comúnmente saprófitas de vida libre, son consideradas no patógenas. Sin embargo, este escenario no debería conducir a una subestimación de la patogenicidad de estas micobacterias, especialmente en huéspedes inmunocomprometidos como aquellos infectados con el VIH [15].

*M. tuberculosis* forma un complejo junto con otras especies, caracterizado por la alta conservación de sus genomas [16]. El complejo *M. tuberculosis* comprende varias especies: *M. tuberculosis*, el agente causal de la mayor parte de los casos de TB humana; *M. africanum*, responsable de la TB humana en África sub-Sahariana; *M. microti*, el agente causal de la TB en el ratón de campo; *M. bovis*, capaz de infectar una amplia variedad de especies de mamíferos incluyendo humanos; y *M. canettii*, una variante raramente encontrada pero capaz de infectar humanos [17]. Otras especies patógenas son *M. leprae*, agente causal de lepra, una enfermedad granulomatosa crónica de la piel y nervios periféricos [18] y *M. ulcerans*, que provoca la aparición de úlceras en la piel conocidas como úlceras de Buruli [19].

### **1.3 Micobacterias de crecimiento rápido como modelo de estudio**

Los análisis genéticos en *M. tuberculosis* quedaron retrasados durante muchos años respecto a los estudios realizados en otros procariontes debido a su crecimiento lento, el requerimiento de altos niveles de bioseguridad para su manipulación, su tendencia a formar grumos y a la falta de sistemas eficientes para la transferencia de genes. En un principio, las funciones de los genes de *M. tuberculosis* se estudiaron en *Escherichia coli* [20–22] y *Streptomyces lividans* [23] porque existían sistemas de clonado de ADN recombinante eficientes para estos microorganismos. Si bien estos estudios sirvieron para definir las funciones enzimáticas, un análisis detallado de la regulación génica requiere que los genes micobacterianos sean estudiados en especies más cercanas como hospedadores [24].

A diferencia de *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* es una especie de crecimiento rápido, fácilmente cultivable en medios sintéticos o complejos en los cuales forma colonias visibles en un período de tres a cinco días. Aunque *M. smegmatis* fue inicialmente aislada de exudados de chancros luéticos en 1884, y de secreciones

genitales en 1885, posteriormente no ha sido nunca recuperada a partir de esas mismas fuentes. Se ha aislado del suelo y del agua, considerándose un microorganismo ambiental, por lo que es clasificada como una micobacteria no patógena. La baja eficiencia de transformación con plásmidos de la cepa de *M. smegmatis* silvestre fue superada mediante el aislamiento de una cepa mutante con alta eficiencia de transformación, denominada mc<sup>2</sup>155 [25]. Se ha postulado que ésta propiedad se debería a ciertas diferencias en la composición de la estructura de la pared de esta mutante [26]. Esta cepa, cuyo genoma se encuentra secuenciado, se ha convertido en un microorganismo modelo para el estudio de la función de los genes micobacterianos.

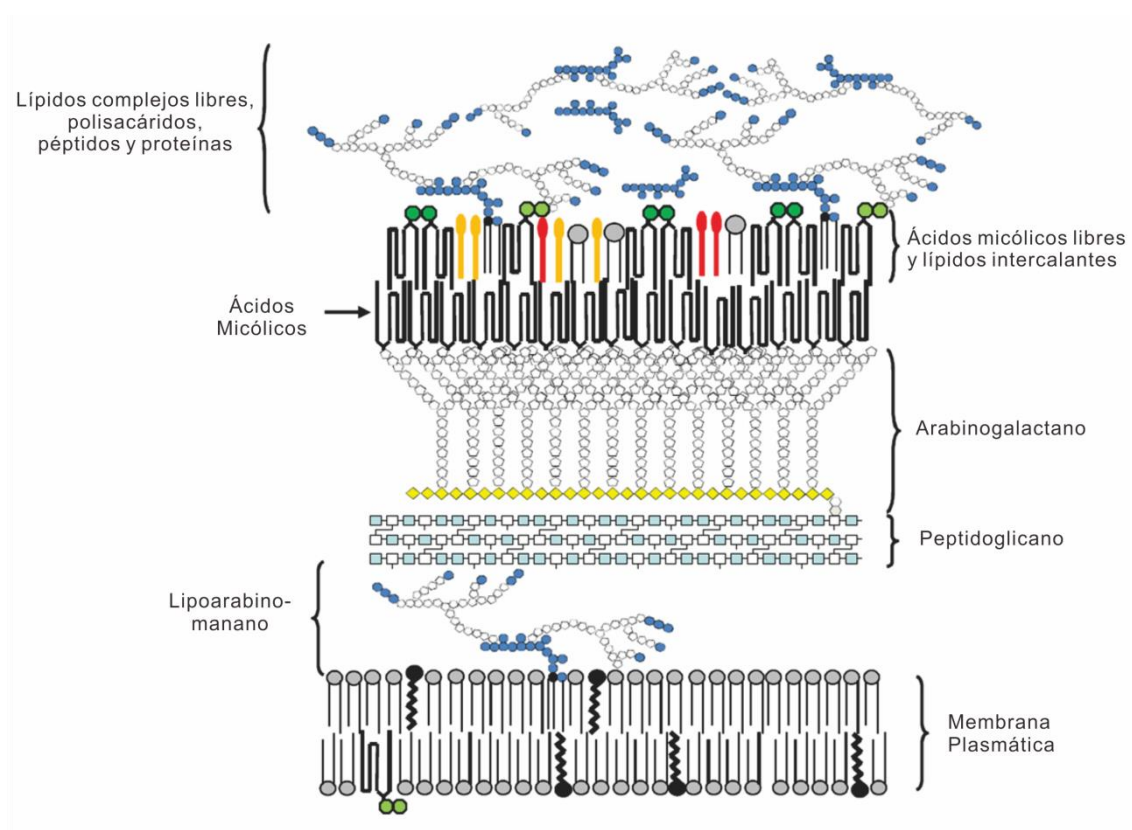
#### **1.4 Estructura y función de la envoltura celular micobacteriana**

Las micobacterias son relativamente resistentes al desecamiento y al tratamiento con álcali y numerosos desinfectantes químicos, dificultando en consecuencia la prevención de la transmisión de *M. tuberculosis* en espacios comunes. Esta resistencia intrínseca general, y en particular a la mayoría de los antibióticos y agentes quimioterapéuticos, se debe a la presencia de una inusual envoltura celular, rica en polisacáridos y lípidos complejos [12]. La elevada impermeabilidad resulta, por un lado debido a la ineficiencia de las porinas micobacterianas de permitir la permeación de solutos hidrofílicos y su existencia en baja concentración [27] y por otro lado, al anormal grosor de la envoltura celular y su baja fluidez, lo cual repercute directamente en la permeación de compuestos hidrofóbicos. La contribución de la envoltura celular en el proceso infeccioso y la persistencia de *M. tuberculosis* se refleja en la capacidad de algunos complejos lipídicos asociados a la pared de actuar en la modulación de la respuesta inmune del huésped y presentar propiedades antigénicas [28–30]. A su vez, numerosas drogas utilizadas actualmente en el tratamiento contra la TB, como INH, etionamida (ETH), tiolactomicina (TLM), triclosán (TRC) y EMB, están dirigidas a inhibir el proceso biosintético de componentes esenciales de la pared celular de las micobacterias, como ser los ácidos micólicos y otros componentes de la envoltura celular [31–36], demostrando la importancia de esta estructura particular en la

patogénesis y persistencia de *M. tuberculosis*.

El contenido lipídico de la envoltura celular de las micobacterias representa hasta un 40% de su peso seco [37], siendo responsable de su crecimiento agrumado en medio líquido y de sus propiedades de tinción ácido-alcohol resistente. En la Figura 1 se muestra un diagrama de la envoltura celular micobacteriana, compuesta por una membrana plasmática, similar a la presente en otras bacterias, rodeada por una compleja pared rica en carbohidratos y lípidos, la cual a su vez se encuentra envuelta por una estructura denominada cápsula, rica en polisacáridos y proteínas [37,38].

La pared celular micobacteriana está compuesta por el peptidoglicano (PG) unido covalentemente por unión fosfodiéster al heteropolisacárido arabinogalactano (AG), el cual a su vez se encuentra esterificado a través de su extremo no reductor a los ácidos micólicos (AM), ácidos grasos  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxilados de cadena larga ( $C_{70}$ - $C_{90}$ ). Este complejo conocido como complejo AM-AG-PG es el núcleo esencial de la pared celular micobacteriana [39]. Muchos de los fármacos utilizados para combatir las micobacterias se dirigen al complejo AM-AG-PG. Los AM no sólo forman parte de la pared celular sino también de la cara interna de la cápsula, la cual posee una cara externa rica en glicolípidos, polisacáridos, lipoglicanos y proteínas unidas de manera no covalente (Figura 1).



**Figura 1. Representación esquemática de la envoltura celular de *M. tuberculosis*.** Las trehalosas mono y dimicolatos se encuentran representadas con hexágonos verdes claros y oscuros, respectivamente; los cilindros rojos representan los tiocerol dimiocerosatos y los amarillos, sulfolípidos, diaciltrehalosas y poliactiltrehalosas. Los cuadrados celestes son los N-Acetilglucosamina y los blancos, N-Acilmurámico. Figura adaptada de Daffé *et al*/2014 [38].

### 1.4.1 Membrana plasmática

Los fosfolípidos de la membrana plasmática de las micobacterias son derivados del ácido fosfatídico e incluye especies como por ejemplo fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol (por ejemplo, cardiolipina; CL), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidil-*myo*-inositol (PI) y sus manósidos (PIMs). Los PIMs son exclusivos de actinomicetes, siendo componentes principales de la membrana plasmática de las micobacterias y la base lipídica del lipoarabinomano (LAM) y lipomano (LM), extensiones multiglicosiladas de los PIMs. Como consecuencia de la presencia de estos carbohidratos, la bicapa lipídica presenta una apariencia asimétrica por microscopía electrónica, sugiriendo que los PIMs se ubican preferentemente en la

cara externa de la misma [12]. La fosfatidilserina se encuentra presente en cantidades mínimas mientras que la fosfatidilcolina aparentemente no es producida por las micobacterias.

Los fosfolípidos de las micobacterias se componen mayoritariamente de ácido palmítico (C<sub>16:0</sub>), ácido oleico (C<sub>18:1</sub>) y ácido tuberculoesteárico (C<sub>19</sub>) [38].

#### 1.4.2 Pared Celular

El principal componente estructural de la pared celular de las micobacterias es el complejo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (AM-AG-PG), una macromolécula compuesta por tres elementos unidos covalentemente: peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos (AM), y que define la forma y el tamaño de las micobacterias [39].

**PG.** La estructura del peptidoglicano presenta algunas variaciones respecto a la de la mayoría de las eubacterias. Los residuos de ácido murámico están N-glicosilados y N-acetilados a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de las bacterias donde únicamente se encuentran N-acetilados. Además, aproximadamente un 25% de los entrecruzamientos en las cadenas laterales peptídicas del PG en *M. smegmatis* (y otras micobacterias) ocurre entre dos residuos de ácido diaminopimélico (DAP), mientras que el 75% restante ocurre entre un residuo de éste y D-alanina. El grado de entrecruzamiento del PG en las micobacterias es del 75% mientras que en *E. coli* el entrecruzamiento es del 25-50%. Finalmente, los residuos de L-glutamato y DAP se encuentran amidados en el PG micobacteriano. Aún se desconoce la significancia biológica de estas modificaciones. Se postula que la unión entre dos DAP incrementaría la rigidez del PG, otorgándole mayor resistencia ante condiciones de estrés y la acción de la lisozima. La amidación de L-glutamato y DAP podría actuar en la regulación del grado de entrecruzamiento de la pared, incrementando la resistencia a la acción hidrolítica de endopeptidasas específicas. La introducción del grupo N-glicolil en el ácido murámico podría estar aportando más energía a la unión, reforzando así los enlaces en el PG. Una cepa de *M. smegmatis* carente de la enzima modificadora que introduce el grupo N-glicolil en el ácido murámico presenta una

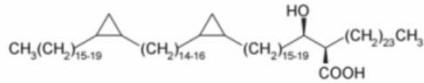
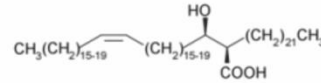
sensibilidad incrementada hacia la acción de la lisozima [39].

**AG.** AG es el polisacárido mayoritario de la pared celular micobacteriana. Es de vital importancia para la integridad de la pared y para el anclaje de los ácidos micólicos al PG. Éste es un heteropolisacárido complejo que consta de una cadena lineal formada por residuos de D-galactofuranosa, al cual se unen a su vez dos o tres cadenas laterales de arabinano, estas últimas compuestas por residuos de D-arabinofuranosil. En las dos terceras partes de los extremos no reductores disponibles de estas unidades de arabinano, se ubican los ácidos micólicos en grupos de cuatro [40].

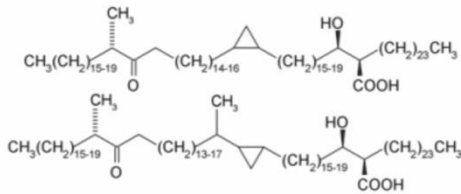
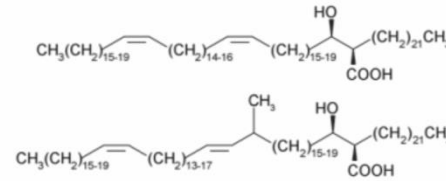
**AM.** Los ácidos micólicos son ácidos grasos  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxilados muy largos, formados por una cadena carbonada principal, conocida como ácido meromicólico, y una cadena lateral  $\alpha$ . Estos ácidos grasos ( $C_{70}$ - $C_{90}$ ) y sus cadenas laterales  $\alpha$  ( $C_{22}$ - $C_{26}$ ) eran considerados los ácidos grasos más largos de la naturaleza. Sin embargo, recientemente fueron descubiertos en el género *Segniliparus* y en ciertas especies micobacterianas, los ácidos micólicos ultra/extra largos (XL-AM), los cuales pasaron a ser los ácidos grasos más largos conocidos hasta el momento [41,42].

Cada especie tiene una composición característica de ácidos micólicos y esta distinción ha sido empleada para la identificación y clasificación de las distintas especies de *Mycobacterium* [43]. En la Figura 2 se muestra un esquema de los ácidos micólicos encontrados en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.

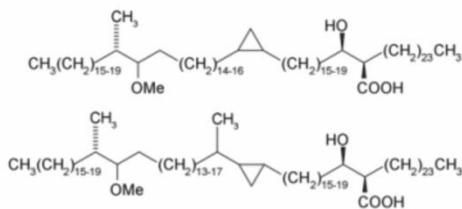
Estos ácidos grasos son los determinantes primarios de la baja permeabilidad de la pared celular micobacteriana y son responsables de características distintivas de las micobacterias, incluyendo la resistencia a daños químicos, resistencia a deshidratación, resistencia intrínseca a numerosas drogas, virulencia [44–46], tinción ácido-alcohol resistente [47] y la habilidad de persistir en el hospedador [28,46,48,49].

*M. tuberculosis**M. smegmatis* $\alpha$ -micolatos $\alpha'$ -micolatos

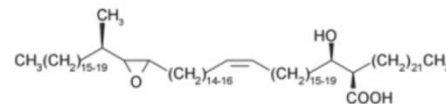
## cetomicolatos

 $\alpha$ -micolatos

## metoximicolatos



## epoximicolatos



**Figura 2. Estructura de los principales ácidos micólicos de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.** Los ácidos micólicos son ácidos grasos  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxilados que tienen una cadena carbonada larga (ácido meromícólico) con una cadena lateral más corta de ácido graso en la posición  $\alpha$ . Adaptado de Brown *et al* 2009 [50].

### 1.4.3 Cápsula.

En la cápsula de las micobacterias, existe una gran variedad de lípidos de estructuras inusuales en forma de lípidos libres que no forman parte del polímero de PG-AG unidos covalentemente con AM, pero que están asociados a éste y que se han denominado lípidos extraíbles. Las principales clases incluyen lipooligosacáridos (LOS), glicopeptidolípidos (GPL), glicolípidos fenólicos (PGL), ceras como el tiocerosol dimicocerosato (PDIM), trehalosas aciladas como diacil- y pentacil-trehalosas (DAT y PAT) y la trehalosa dimicolato (TDM), y sulfolípidos (SL). Cada especie micobacteriana presenta clases y variantes características [12]. En *M. tuberculosis* los lípidos mejor

caracterizados incluyen los PDIM, SL y trehalosas aciladas, que cumplen funciones en eventos de señalización, en la patogénesis y en la modulación de la respuesta inmune [51]. La TDM representa el lípido extraíble más abundante, granulogénico y significativamente tóxico de la envoltura celular de *M. tuberculosis* [52].

## **1.5 Rol de los lípidos en el ciclo de vida de *M. tuberculosis***

Se cree que la alta capacidad de *M. tuberculosis* de persistir dentro del huésped se debe a los mecanismos que ha desarrollado para regular eficientemente su homeostasis lipídica y la del huésped [53,54]. Este microorganismo modula su interacción con el sistema inmune receptor a través de modificaciones cuali- y cuantitativas en el contenido lipídico de su pared celular y la producción de moléculas moduladoras de la inmunidad, tales como ESAT-6 y CFP10, las cuales son secretadas al medio [55].

### **1.5.1 Rol de los lípidos en el ingreso de *M. tuberculosis* a la célula huésped y su implicancia en los mecanismos fagocíticos**

Numerosos estudios han demostrado la relevancia de los lípidos tanto de *M. tuberculosis* como de la célula huésped en la mediación de sus interacciones y en los eventos tempranos de fagocitosis [30,56,57]. La entrada de *M. tuberculosis* en el macrófago se produce a través de la fagocitosis mediada por receptores y los componentes más relevantes en este proceso son los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) [58], que son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) presentes en los macrófagos y las células dendríticas (CD). Este reconocimiento permite la internalización de los bacilos y a su vez dispara las cascadas de señalización específicas de lípidos que modulan diferencialmente la respuesta inmune del huésped [58,59]. Los PAMPs que pueden actuar como ligandos en este caso son por ejemplo LAM, LAM con residuo de manosa terminal (Man-LAM), PIM y TDM.

### 1.5.2 Rol de los lípidos en la modulación de la maduración del fagosoma

Una vez fagocitadas, las micobacterias pueden ser eliminadas por la maquinaria lisosomal de la célula receptora; o bien evadir la defensa del huésped a través de la modulación de las rutas endocíticas del receptor [60,61]. Los lípidos de la envoltura celular, como por ejemplo Man-LAM, TDM y PDIM, desempeñan un rol importante tanto en la fagocitosis como en la mediación del tráfico intracelular y la detención de la maduración vacuolar inducida por *M. tuberculosis* (Figura 3) [56]. Se ha visto que la mayor parte de los bacilos salvajes de *M. tuberculosis* se encuentran contenidos en fagosomas no acídicos, mientras que las cepas mutantes deficientes en la producción de PDIM se encuentran principalmente en los fagosomas acídicos, demostrando así la relevancia de PDIM en el arresto de la acidificación del fagosoma [62]. Se encontró a su vez que estas mutantes presentan un fenotipo atenuado para la sobrevivencia intracelular. Tanto la producción como el transporte de PDIM al espacio extracelular son necesarias para la secreción coordinada de ESAT-6, la permeabilización fagosomal y la producción del interferón tipo I por parte del macrófago [63].

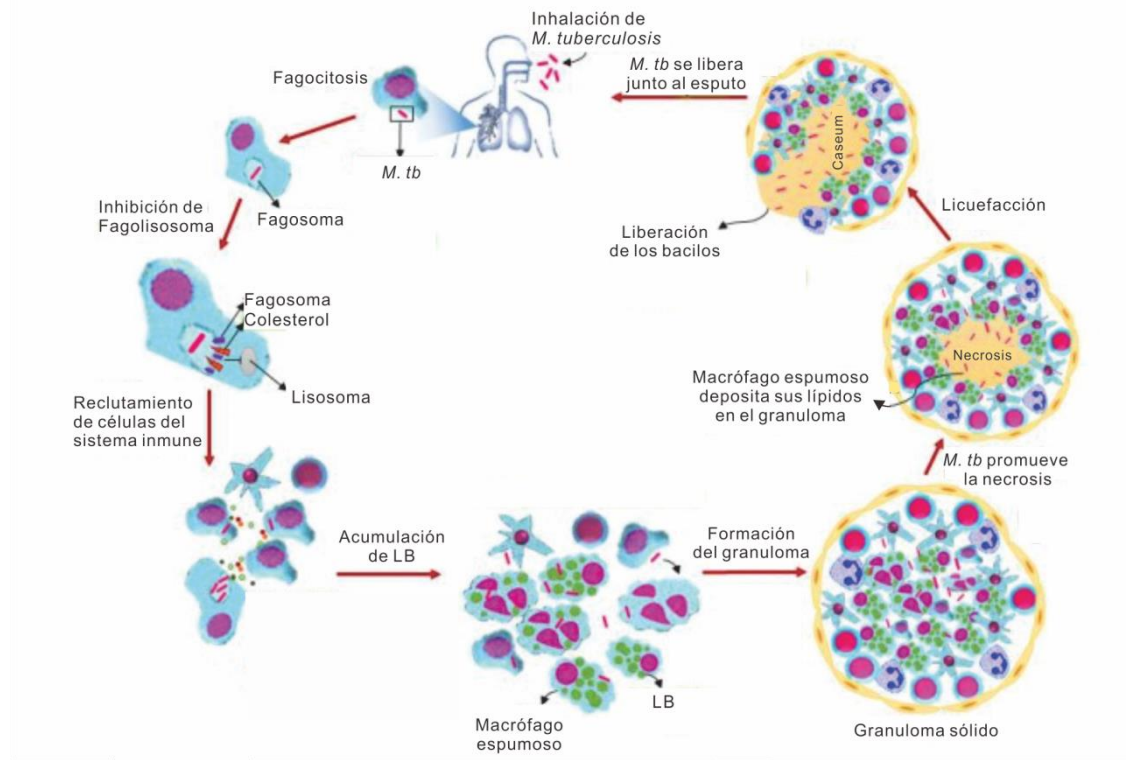
A través de la caracterización de una mutante en el represor transcripcional Rv3167c de *M. tuberculosis*, se pudo demostrar que un aumento en los niveles de PDIM no sólo se correlaciona con una mayor capacidad de *M. tuberculosis* para escapar del fagosoma, sino también para inducir la necrosis de la célula huésped, atribuyendo de esta manera una nueva función a PDIM en la modulación de la interacción patógeno-huésped [64].

Por su parte, se ha visto que la TDM también modula el proceso de maduración de los fagosomas, pero aún queda por dilucidar su mecanismo de acción [65]. Recientemente, se ha visto que partículas recubiertas con TDM y opsonizadas con IgG podrían estar reclutando Mincle y FcγRIIB para inducir señales que retrasen la maduración de los fagosomas mediada por FcγR [66].

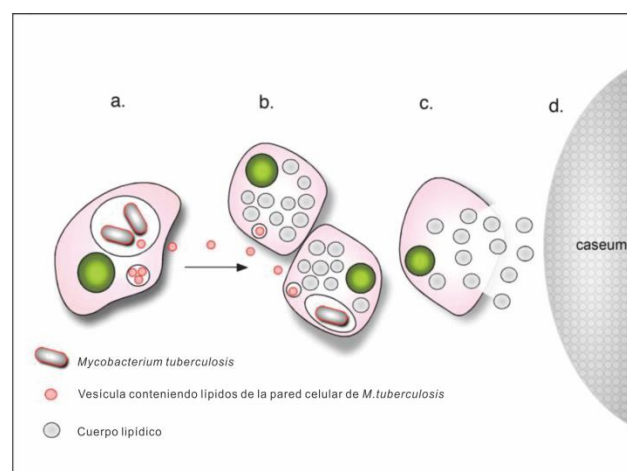
### 1.5.3 Rol de los lípidos en la biogénesis de los granulomas

La vacuola contenedora de *Mycobacterium* (MCV) encierra fracciones lipídicas de la envoltura celular micobacteriana [67], las cuales pueden ser traficadas hacia fuera de la MCV para asociarse con diversas organelas intracelulares, siendo así uno de los posibles mecanismos por los cuales *Mycobacterium* podría afectar a su entorno dentro de los focos de infección [68]. Estos lípidos también han sido encontrados extracelularmente en pequeñas vesículas, siendo capaces de inducir la producción de citoquinas proinflamatorias en los macrófagos, contribuyendo así a la respuesta granulomatosa (Figura 4) [69].

*M. tuberculosis* puede sobrevivir y crecer lentamente dentro de las vacuolas, o bien puede escaparse de las MCVs y migrar hacia el citosol induciendo un mecanismo no apoptótico [70], el cual favorece el crecimiento micobacteriano y el reclutamiento de fagocitos adicionales, conduciendo finalmente a la propagación de la infección. Los agregados de *M.tuberculosis* también pueden ser internalizados directamente al citosol de los macrófagos, donde pueden replicarse activamente y matar al huésped. Las células muertas llenas de bacterias activas pueden ser fagocitadas por otros macrófagos, desencadenando una cascada de muerte celular; ésta podría ser la dinámica de la necrosis y la proliferación bacteriana en los granulomas pulmonares de la TB activa [71].



**Figura 3. Rol de los lípidos en el ciclo de vida de *M. tuberculosis*.** *M. tuberculosis* es capaz de modular el metabolismo lipídico del huésped promoviendo una alta acumulación de lípidos neutros en forma de cuerpos lipídicos. LB, cuerpos lipídicos. Figura adaptada de Aguilar-Ayala *et al* 2016 [55]



**Figura 4. Modelo propuesto para la acumulación del caseum y la progresión del granuloma.** **A.** *M. tuberculosis* intracelular sintetiza y libera componentes de su pared celular dentro de la célula huésped. Estos lípidos se acumulan en vesículas que pueden ser liberadas de la célula. **B.** Debido a la liberación de

estas vesículas, tanto los macrófagos infectados como los no infectados están expuestos a los ácidos micólicos de la pared celular y son inducidos a formar células espumosas. **C.** Estas células mueren a través de un proceso necrótico inflamatorio y liberan sus gotas de lípidos al medio extracelular dentro del granuloma. **D.** El granuloma humano es una estructura cerrada y aislada, debido a la cápsula fibrótica. Esta característica conduce a la acumulación de restos necróticos como caseum. Figura adaptada de Russell *et al* 2009 [72].

## **1.6 Metabolismo lipídico de *M. tuberculosis* dentro del huésped**

Dado que el entorno nutricional dentro del macrófago, la CD o el granuloma es sumamente limitado, *M. tuberculosis* ha desarrollado diversas rutas metabólicas específicas para poder utilizar los nutrientes derivados del huésped [73]. Se sabe que tanto las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno como la tensión de oxígeno variable que *M. tuberculosis* encuentra durante el proceso infeccioso, impactan en la composición lipídica de la envoltura [74]. Se ha demostrado que *M. tuberculosis* utiliza diferentes fuentes de carbono en las distintas etapas de la infección [75–78], siendo los lípidos del huésped su principal fuente de carbono. Más aún, los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* son inducidos a convertirse en macrófagos espumosos (FM) por la acumulación de cuerpos lipídicos (LB) que contienen principalmente ésteres de colesterol y TAG. La formación de FM es una clara consecuencia de la modulación del metabolismo lipídico del huésped por parte de la bacteria, la cual promueve una alta acumulación de lípidos neutros (Figura 3) [79,80]. Dentro de los FM, los fagosomas que contienen a la bacteria van envolviendo y engullendo progresivamente los LB, que luego sirven de nutrientes para el microorganismo [81]. Bajo estas condiciones, *M. tuberculosis* experimenta importantes cambios fisiológicos, resultando en la acumulación de triacilglicéridos (TAG) dentro de las llamadas inclusiones lipídicas intracitosólicas (ILI) y un crecimiento reducido con una menor actividad metabólica y una mayor resistencia a los antibióticos; éstas son a su vez, características distintivas de los bacilos persistentes y no divisorios [77].

Posteriormente, el estudio de las mutantes en el sistema de transporte de colesterol Mce4 proporcionó las primeras evidencias de la importancia del colesterol en el proceso infeccioso y en la persistencia crónica dentro de los pulmones de animales

infectados y el crecimiento dentro de los macrófagos activados por IFN- $\gamma$  [78]. A su vez, las cepas mutantes en el metabolismo del colesterol mostraron serios defectos en el crecimiento intracelular, denotando el rol crucial que desempeña el colesterol en la infección [82]. Sin embargo, se ha demostrado *in vitro* que *M. tuberculosis* metaboliza el colesterol en forma conjunta con otras fuentes de carbono, como ser los ácidos grasos [83]. Este catabolismo simultáneo del colesterol y los ácidos grasos le permite a la bacteria contenida en el macrófago superar la presión metabólica generada a raíz del catabolismo del colesterol, ya que al utilizar los ácidos grasos provenientes del huésped se genera un aumento en el contenido intracelular de acetil-CoA y eso le permite derivar los propionil-CoAs, productos del catabolismo del colesterol, hacia la síntesis de lípidos metil ramificados [73,78]. Los ácidos grasos del huésped pueden ser internalizados hacia el citosol de la bacteria por difusión y activados por acción de FACL6, una acil CoA sintetasa capaz de convertir ácidos grasos en sus derivados de CoA [84] o bien pueden ser transportados por el complejo Mce1 al interior celular [85].

Además de utilizar los ácidos grasos provenientes del huésped, *M. tuberculosis* es capaz de sintetizar ácidos grasos *de novo*, siendo este metabolismo central para la sobrevivencia de las micobacterias, ya que además de ser sustrato para la síntesis de los fosfolípidos de la membrana plasmática, son también precursores para la síntesis de los ácidos micólicos, fundamentales para la arquitectura celular y la patogenicidad de este microorganismo. Aún queda por dilucidar si la fuente exógena de ácidos grasos podría compensar la falta de biosíntesis *de novo* de ácidos grasos en las micobacterias.

## **1.7 Biosíntesis de ácidos grasos en bacterias**

La biosíntesis de ácidos grasos es el primer paso en la formación de lípidos de membrana, y representa un aspecto vital en la fisiología bacteriana. Este proceso esencial en bacterias es llevado a cabo por el sistema de sintasa de ácidos grasos (FAS) de tipo II.

Las FAS son clasificadas en base a la estructura proteica como de tipo I o tipo II. Las FAS de tipo I consisten en una proteína multifuncional, que contiene en una única

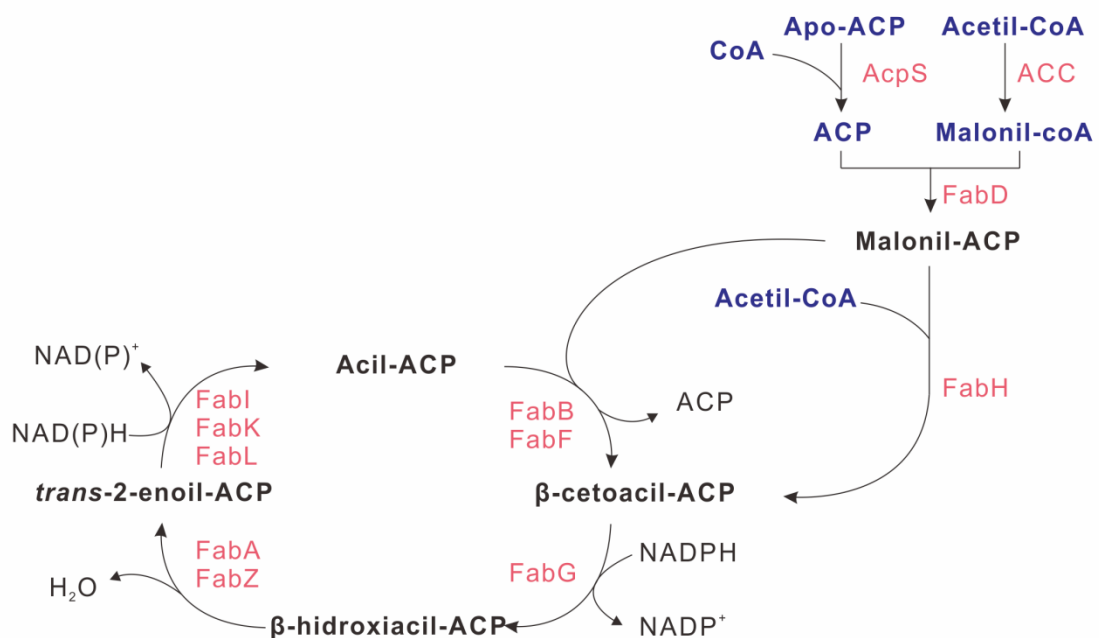
cadena polipeptídica las distintas actividades catalíticas de la secuencia de reacción, como dominios funcionales discretos. Estas enzimas se encuentran típicamente en el citoplasma de organismos eucariotas y excepcionalmente en el subgrupo productor de ácidos micólicos de los actinomicetes [86]. Las FAS de tipo II constituyen un sistema disociado formado por proteínas independientes altamente conservadas, codificadas por una serie de genes individuales. Este sistema se encuentra presente en bacterias así como también en organelas de ascendencia procariota (cloroplastos y mitocondrias), donde catalizan la síntesis de ácidos grasos *de novo* [87]. Los únicos organismos procariontes que utilizan el sistema FAS de tipo I y no de tipo II para la síntesis de ácidos grasos *de novo* son aquellos productores de ácidos micólicos de la rama de los *Actinomycetales*, dentro de los cuales se encuentran las micobacterias [88–90].

A pesar de las diferencias en las estructuras moleculares de las distintas sintasas de ácidos grasos (FAS), el mecanismo de reacción de la síntesis *de novo* de ácidos grasos es esencialmente el mismo en todos los sistemas biológicos; y en bacterias, las enzimas involucradas y los pasos metabólicos han sido caracterizados utilizando *E. coli* como modelo de estudio.

Una característica clave en la biosíntesis de ácidos grasos llevada a cabo por la FAS de tipo II consiste en que los intermediarios acilados, de carácter hidrofóbico, son transferidos de una enzima a la siguiente por una proteína transportadora de acilos altamente ácida denominada ACP [91].

El proceso de la biosíntesis de ácidos grasos comienza con la carboxilación de acetil-CoA mediada por una acetil-CoA carboxilasa (ACC), para dar malonil-CoA. El residuo malonato luego es transferido a la proteína transportadora de acilos (ACP) por la malonil-CoA:ACP transacilasa (FabD) para dar lugar a malonil-ACP. El primer paso del ciclo de elongación consiste en la condensación de malonil-ACP con acetil-CoA, catalizada por la  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa III (FabH). Los pasos posteriores de elongación, que determinan la adición sucesiva de dos unidades de carbono hasta sintetizar un ácido graso  $C_{16-18}$ , son catalizados por una  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa (FabB-FabF). El  $\beta$ -cetoéster resultante, es reducido a un  $\beta$ -hidroxiacil-ACP por una

$\beta$ -cetoacil-ACP reductasa (FabG), seguida de la eliminación de una molécula de agua mediada por una  $\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa (FabA-FabZ). La reducción final del intermediario *trans*-2-enoil-ACP es catalizada por una enoil reductasa (FabI-FabK-FabL), dando como producto acil-ACPs saturados, que serán los sustratos de una nueva ronda de elongación [92,93] (Figura 5). La ruta biosintética de los ácidos grasos termina con la transferencia de las cadenas de acilo unidas al ACP por parte de sistemas de aciltransferasas. En general, se transfiere a moléculas derivadas del glicerol para formar lípidos de membrana.



**Figura 5. Biosíntesis de ácidos grasos en el modelo bacteriano *E. coli*.** El proceso biosintético comienza con la conversión de malonil-CoA a malonil-ACP catalizada por una malonil transacilasa (FabD) y la posterior condensación de una unidad de malonil-ACP con acetil-CoA por acción de FabH. La elongación de ácidos grasos consiste de 4 etapas. Cada ciclo de elongación introduce 2 unidades de carbono y es iniciado por la condensación de acil-ACP con una nueva unidad de malonil-ACP por una de las enzimas condensantes, FabB o FabF; este producto es posteriormente reducido por una  $\beta$ -cetoacil-ACP reductasa dependiente de NADPH, FabG. El  $\beta$ -hidroxiacil-ACP resultante es deshidratado por FabZ para dar lugar al *trans*-2-enoil-ACP. El ciclo concluye con la reducción del enoil-ACP a acil-ACP por acción de FabI. Figura adaptada de Marrakchi *et al* 2002 [91].

## **1.8 Biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos en las micobacterias**

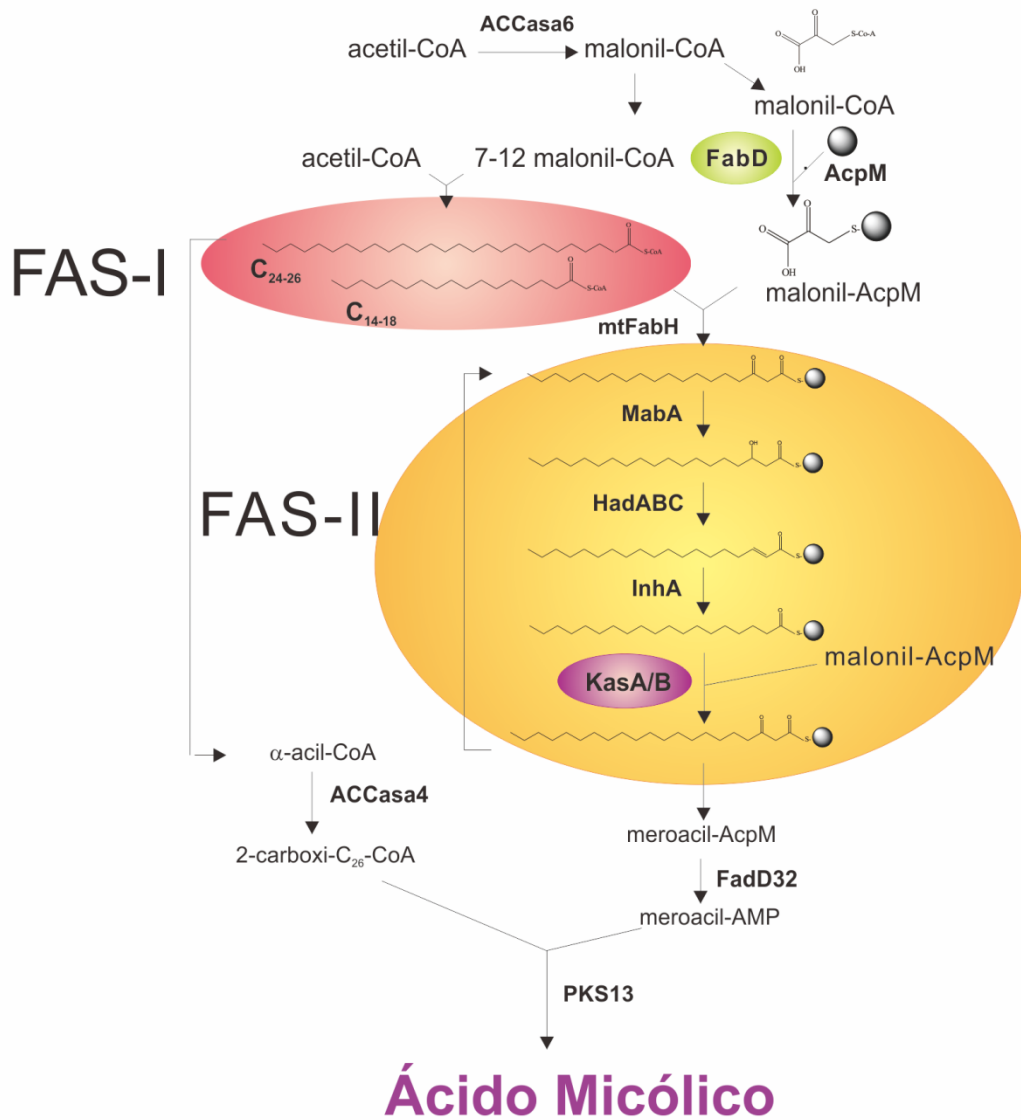
### **1.8.1 Sistemas FAS micobacterianos**

Las micobacterias son procariotas inusuales dado que poseen los dos tipos de sistemas FAS: FAS-I y FAS-II, los cuales son esenciales para la supervivencia de la bacteria y actúan de manera concertada para la biosíntesis de ácidos micólicos (Figura 6) [94]. La multienzima bacteriana FAS-I es la responsable de catalizar la síntesis *de novo* de acil-CoAs de cadena mediana y larga, los cuales son utilizados posteriormente para la síntesis de ácidos micólicos, fosfolípidos de membrana, triacilglicéridos de reserva y en micobacterias patógenas, son además sustratos para la síntesis de ácidos grasos multimetil ramificados (PDIM, TDM, entre otros) [86]. Si bien la organización estructural de esta proteína micobacteriana en principio no presenta diferencias con la observada para otros sistemas FAS-I presentes en hongos y eucariotas superiores, ciertas propiedades parecerían ser únicas. Entre las más importantes se incluyen el comportamiento bimodal de esta enzima en la producción de acil-CoAs de distinta longitud de cadena, la estimulación debido a ciertos polisacáridos micobacterianos y su capacidad de funcionar como elongasa, catalizando la elongación de palmitoil-CoA [95,96]. Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre en levaduras, la actividad 4'-fosfopanteteinil transferasa encargada de activar el dominio ACP del sistema FAS-I se encuentra codificada por un gen separado (*acpS*) [86]. A su vez, la multienzima bacteriana se diferencia de otras conocidas en utilizar diferentes reductores, NADPH y NADH, para sus pasos de cetoacil- y enoil-reducción, respectivamente [95].

Numerosos experimentos bioquímicos han demostrado que la síntesis mediada por FAS-I tiene un comportamiento bimodal *in vitro*, produciendo dos clases de acil-CoAs: C<sub>16-18</sub>-CoAs y C<sub>24-26</sub>-CoAs [88,89,95]. En presencia de O-acilpolisacáridos micobacterianos, estas enzimas aumentarían la producción de C<sub>16-18</sub>-CoA, y la velocidad de síntesis de ácidos grasos en general. Esto se debería a la capacidad de los azúcares de formar un complejo selectivo con estos ácidos grasos, resultando en una regulación por remoción del producto final. Por otro lado, en ausencia de estos

polisacáridos se produciría como forma predominante  $C_{26}$ -CoA en *M. tuberculosis* y  $C_{24}$ -CoA en *M. smegmatis* [95,97]. Esta bimodalidad de FAS-I no sería solamente una propiedad intrínseca de la proteína, sino que estaría determinada también por factores externos que influirían en el proceso de elongación. Esto fue demostrado *in vivo* cuando, al intercambiar la enzima FAS-I de *M. smegmatis* por la de *M. tuberculosis*, se encontró que ésta produce principalmente  $C_{24}$ -S-enzima y no  $C_{26}$ -S enzima, como se esperaba. Esto sugeriría que existen complejas interacciones entre FAS-I y FAS-II, y posiblemente otros elementos aún no dilucidados [98]. Por otro lado, si bien se ha sugerido que el sistema FAS-I *in vitro* funcionaría como *de novo* sintasa y elongasa; en las micobacterias patógenas, las cuales posiblemente deriven la mayoría de sus ácidos grasos del huésped, tanto en el proceso infeccioso como en la fase de dormancia [54,84], el mismo actuaría principalmente como elongasa convirtiendo los ácidos grasos del huésped en productos  $C_{24-26}$  [96].

Las micobacterias poseen también un sistema disociado FAS-II, dependiente de ACP [99]. Éste se diferencia únicamente de las sintasas de tipo II encontradas en otras bacterias, en su incapacidad de realizar la síntesis *de novo* de ácidos grasos. En cambio, elonga acil-CoAs de cadena media ( $C_{16-18}$ ) hasta obtener cadenas aciladas muy largas ( $C_{50-60}$ ) que dan lugar a la cadena meromíclica del ácido micólico.



**Figura 6. Biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos.** La síntesis de ácidos grasos es un proceso que está finamente regulado mediante la interacción de dos sistemas de sintasas de ácidos grasos (FAS-I y FAS-II) que se encuentran involucrados en la biosíntesis tanto de los ácidos grasos de membrana como de algunos de los principales componentes lipídicos de la pared celular, como los ácidos micólicos. Se ha demostrado que estos últimos son esenciales tanto para la viabilidad como para la patogenicidad de *Mycobacterium tuberculosis*.

### 1.8.2 Componentes involucrados en la biosíntesis de ácidos micólicos en las micobacterias

La biosíntesis de ácidos micólicos en las micobacterias es iniciada por la enzima FAS-I que cataliza la síntesis *de novo* de acil-CoAs de cadena mediana, utilizando acetil-CoA y malonil-CoA como sustratos para generar en primer lugar, butiril-S-enzima. Las elongaciones subsiguientes mediadas por FAS-I incorporan dos unidades de carbono por ciclo, dando como productos C<sub>16</sub>- y C<sub>18</sub>-S-enzima, los cuales son convertidos a sus derivados acil-CoA para ser utilizados en diversas rutas metabólicas. Por otro lado, FAS-I, dado su carácter bimodal, es capaz de continuar con la elongación del palmitoil-CoA para dar lugar en *M. tuberculosis*, por ejemplo, a C<sub>26</sub>-S-enzima que sería liberado como C<sub>26</sub>-CoA, y posteriormente activado mediante una acil-CoA carboxilasa de cadena larga [100] para su condensación con el ácido meromicólico, mediada por la policétido sintasa Pks13, convirtiéndose así en la cadena  $\alpha$ -alquilo del ácido micólico (Figura 6) [94,101].

Está propuesto que el C<sub>16-18</sub>-CoA es el punto de partida donde el sistema FAS-II reemplaza al FAS-I y continúa la síntesis de los ácidos grasos de cadena larga que luego darán lugar al ácido meromicólico. En *M. tuberculosis*, los sistemas FAS del tipo I y II están conectados por una enzima condensante clave, la  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa III o mtFabH. Esta enzima cataliza la condensación decarboxilativa de malonil-ACP con los acil-CoAs producidos por FAS-I [102]. El producto de esta condensación, un  $\beta$ -cetoacil-ACP de cadena mediana, es el sustrato inicial del sistema FAS-II. Estudios bioquímicos llevados a cabo en presencia de malonil-ACP muestran que mtFabH puede utilizar un rango de C<sub>12-20</sub>-CoAs como sustrato, lo cual resulta consistente con los estudios estructurales realizados por Scarsdale y colaboradores [103], los cuales diferencian a esta enzima de las FabH de otros sistemas FAS-II, que típicamente usan como sustrato C<sub>2-6</sub>-CoAs [103,104].

Luego de esta primera condensación mediada por mtFabH, ocurren los pasos de cetereducción, mediada por la  $\beta$ -cetoacil-ACP reductasa MabA [105], deshidratación mediada por las hidroxil-acil-ACP deshidratasas HadABC [106] y la enoil-reducción final mediada por la enoil-ACP reductasa InhA. Posteriormente, KasA y KasB catalizan

la condensación del acil-ACP naciente con otra unidad de malonil-ACP, para que se repita nuevamente el ciclo de FAS-II [107–109]. El producto final del sistema FAS-II es un ácido graso de cadena muy larga denominado ácido meromicólico, el cual es activado por una acil-AMP ligasa antes de ser condensado finalmente por la Pks13 para dar el AM maduro (Figura 6).

El mecanismo general de la síntesis de ácidos grasos es común a todas las bacterias, contando con la participación de cuatro tipos de enzimas que actúan de manera secuencial:  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa,  $\beta$ -cetoacil-ACP reductasa, hidroxil-acil deshidratasa y enoil-ACP reductasa; y los genes que codifican para las enzimas involucradas en cada uno de los pasos están generalmente conservados. En las micobacterias, el sistema FAS-I se encuentra codificado por el gen *fas* que forma parte del operón bicistrónico *fas-acpS* [110], siendo *acpS* el gen que codifica para la enzima responsable de la modificación postraducciona (fosfopanteteinilación) necesaria para la activación del dominio ACP presente en FAS-I. Los genes que codifican para las enzimas del sistema FAS-II se ubican en diferentes regiones del cromosoma, organizados en tres unidades independientes. La primera está formada por los genes *fabD-acpM-kasA-kasB* (operón *fasII*); la segunda está compuesta por dos genes, *mabA-inhA*; y la tercera cuenta con tres genes, *hadA, hadB, hadC*, que a su vez pueden formar parte de un operón que incluye genes involucrados en la traducción y que son conjuntamente reprimidos ante situaciones de hambreado [106,111,112] (Tabla 1).

El primer gen del operón *fasII* codifica para la malonil-CoA:ACP transacilasa FabD [113] y el segundo codifica para la ACP micobacteriana (AcpM), involucrada en el transporte de la cadena acilo creciente de un sitio activo a otro dentro del sistema FAS-II durante la síntesis del ácido graso. Esta proteína es convertida a su forma activa holo-AcpM por la Fosfopanteteiniltransferasa PptT, la cual cataliza la transferencia de un grupo 4-fosfopanteteína de la coenzima A (CoA) a la apo-ACP [114]. AcpM es una ACP inusual en lo que respecta a su tamaño en comparación con la proteína ACP de *E. coli*; consiste en un polipéptido de mayor longitud el cual se diferencia de las ACPs bacterianas por presentar una extensión en su extremo

carboxilo terminal. Mediante el secuestro de la cadena acilada hidrofóbica del solvente, esta característica adicional podría tener un rol importante en la transferencia del ácido meromícólico en crecimiento, a los diferentes centros del sistema enzimático FAS-II [113,115].

**Tabla 1. Genes y enzimas de los sistemas FAS-I y FAS-II en micobacterias**

Operón putativo	Gen	Actividad enzimática
<b><i>fas-acpS</i></b>	<i>fas</i>	Sintasa de ácidos grasos
	<i>acpS</i>	Fosfopanteteiniltransferasa
<b><i>fabD-acpM-kasA-kasB</i></b>	<i>fabD</i>	Malonil-CoA:ACP transacilasa
	<i>acpM</i>	Proteína transportadora de acilos
	<i>kasA</i>	$\beta$ -cetoacil-ACP sintasa
	<i>kasB</i>	$\beta$ -cetoacil-ACP sintasa
<b><i>mabA-inhA</i></b>	<i>mabA</i>	$\beta$ -cetoacil-ACP reductasa
	<i>inhA</i>	Enoil-ACP reductasa
<b><i>hadA-hadB-hadC</i></b>	<i>hadA, hadB</i>	Hidroxil-acil deshidratasa
	<i>hadB, hadC</i>	Hidroxil-acil deshidratasa

Los pasos de elongación del sistema FAS-II que siguen a continuación de la reacción de condensación dependiente de FabH son llevados a cabo por las  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasas codificadas por los genes *kasA* y *kasB*, del operón *fasII*. Las proteínas KasA y KasB de *M. tuberculosis* tienen un 67% de identidad y ambas enzimas catalizan la condensación de acil-AcpM con malonil-AcpM, elongando la cadena del meromicolato en dos átomos de carbono [107]. Las dos enzimas tienen distinta especificidad de sustrato, esto sugiere que cumplen roles diferentes en el proceso de elongación. En base a estudios *in vitro* se propuso que KasA estaría implicada en la elongación inicial de los micolatos, que serían luego extendidos por KasB hasta su longitud final [108,109]. Las estructuras cristalográficas de estas enzimas son consistentes con la especificidad de sustrato propuesta [107,116]. Esta

hipótesis a su vez fue confirmada *in vivo* analizando cepas mutantes en el gen *kasB* de *M. marinum* y *M. tuberculosis*. En estas, los ácidos micólicos presentan pequeños cambios en su longitud y composición, lo que determina no sólo una marcada alteración en la permeabilidad de la envoltura celular de estas micobacterias sino también la pérdida de su característica de tinción ácido-alcohol resistente. Por otro lado, la cepa de *M. tuberculosis* mutante en *kasB* es incapaz de provocar una enfermedad activa en ratones, pudiendo persistir en estos durante 600 días. Cabe destacar que ninguna de estas anormalidades pudo ser complementada por la sobreexpresión de *kasA*; demostrando que a pesar de ser altamente homólogas, ambas enzimas no presentan funciones redundantes [47,117]. Por otro lado, a diferencia de KasB, KasA es un componente esencial del sistema FAS-II cuya ausencia lleva a la lisis celular. Para caracterizar esta proteína, se construyó una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en *kasA* la cual presentó una disminución en los niveles de  $\alpha$ - y epoxi-micolatos, y una acumulación de  $\alpha'$ -micolatos ante la presencia de cantidades sub-fisiológicas de esta enzima. Nuevamente, múltiples copias de KasB no pudieron complementar la disminución en los niveles de KasA en esta cepa, confirmando el rol diferencial que presentan durante la vía de síntesis de la cadena de meromicolato [118].

Las reductasas del sistema FAS-II están codificadas por los genes *mabA* e *inhA*, ubicados en la misma región cromosómica de *M. tuberculosis* formando un operón en esta especie [31]. MabA codifica para una  $\beta$ -cetoacil-ACP reductasa que a diferencia de otras cetoacil reductasas, presenta preferencia por sustratos de cadena larga consistente con su rol en la biosíntesis de ácidos micólicos [119]. El gen *inhA* codifica para la proteína que cataliza la trans-2-enoil-ACP reducción, con preferencia por sustratos largos [120] y fue identificado como blanco de acción de INH y ETH en *M. tuberculosis* [31,121].

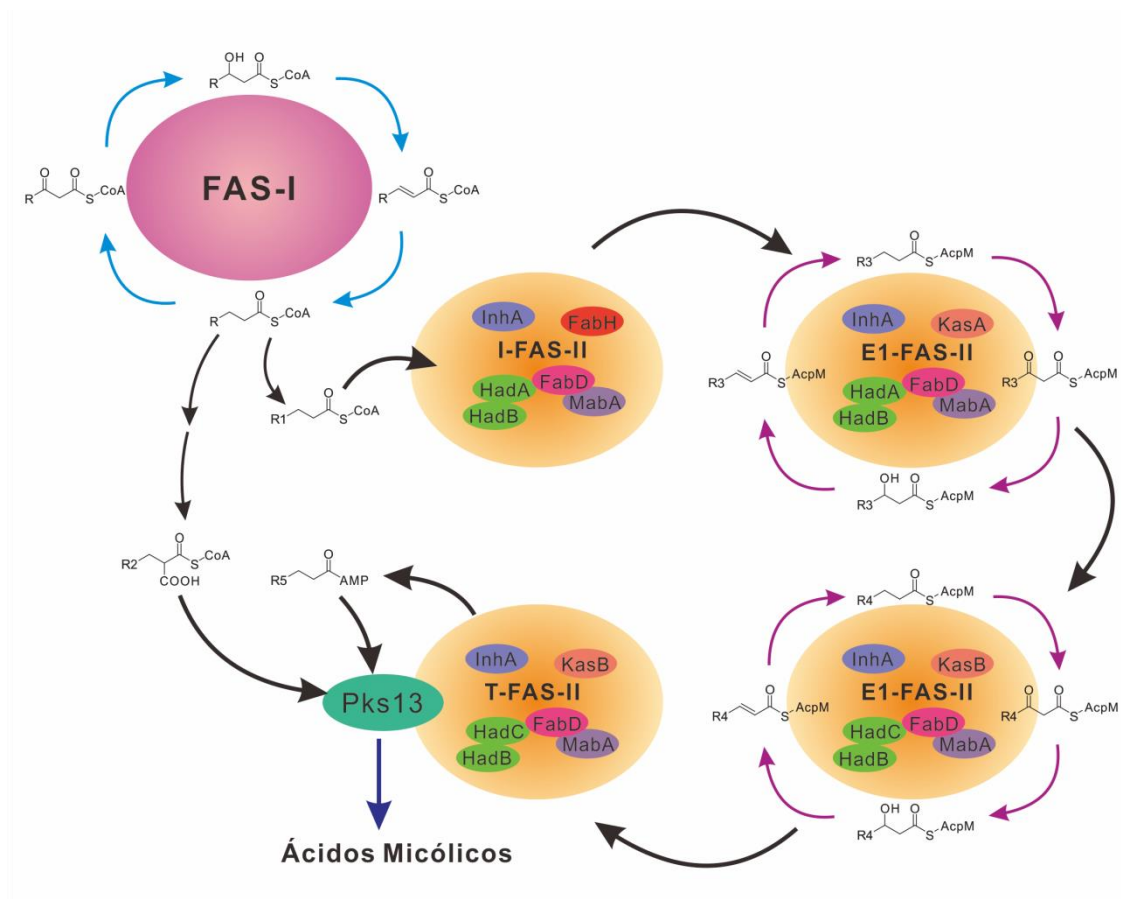
Por otro lado, el paso de deshidratación del intermediario  $\beta$ -hidroxiacil-ACP a trans-2-enoil-ACP está catalizado por las  $\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasas del operón *hadA-hadB-hadC* de *M. tuberculosis*, siendo al menos uno de estos genes esenciales para la viabilidad bacteriana. Las proteínas codificadas por estos genes forman dos

heterodímeros, HadAB y HadBC. Al igual de lo que ocurre para KasA, HadAB estaría involucrado en los ciclos iniciales de la vía de elongación, mientras que HadBC, al igual que KasB, estaría implicado en los últimos pasos de la biosíntesis del ácido meromicólico [106].

La última etapa en la vía de síntesis de los ácidos micólicos corresponde a la activación y condensación de las cadenas aciladas provenientes de los sistemas FAS-I y FAS-II. En primer lugar, la cadena del ácido meromicólico es activada a acil-AMP a través de la acción de una acil-AMP ligasa (FadD32) [122,123]. A su vez, el  $C_{24-26}$ -CoA proveniente del sistema FAS-I, es carboxilado por una acil-CoA carboxilasa de cadena larga que involucra a la subunidad carboxil transferasa AccD4 [123,124,100]. Finalmente, ambos sustratos activados son condensados por la enzima Pks13 dando lugar al precursor del ácido micólico [125]. Se ha demostrado que los genes que codifican para estas tres proteínas forman el operón *fadD32-pks13-accD4* y son esenciales para la viabilidad de las micobacterias [101,123].

Las proteínas del sistema FAS-II de *M. tuberculosis* interaccionan específicamente dando lugar a complejos especializados interconectados, sugiriendo que la organización de este sistema se asemejaría a la del sistema FAS-I de mamíferos. En este modelo, denominado Interactoma de la biosíntesis de ácidos micólicos (Figura 7), un complejo de iniciación (I-FAS-II) formado por las reductasa MabA, InhA, FabD, HadAB y mtFabH permitiría el pasaje de sustratos desde FAS-I a FAS-II. Luego, el complejo de elongación de tipo I (E1-FAS-II) formado por MabA, InhA, FabD, HadAB y KasA estaría involucrado en los ciclos iniciales de elongación y las cadenas acilo de longitud intermedia sintetizadas servirían entonces como sustratos para el complejo de elongación de tipo II (E2-FAS II), en el cual la deshidratasa sería el complejo HadBC y la enzima condensante sería KasB. Tras los sucesivos pasos de elongación, reducción y deshidratación llevados adelante por este último complejo, los meromicolil-AcpM de longitud completa resultantes son condensados con la cadena acilada  $\alpha$ , por el complejo de terminación (T-FAS-II) que involucra a la proteína Pks13, la cual se encontraría interaccionando preferentemente con KasB [126–129]. Las cadenas meromicólicas son modificadas en dos posiciones específicas: distal y

proximal (Figura 2), habiéndose identificado hasta el momento ocho metiltransferasas involucradas en estas modificaciones específicas (MmaA1-MmaA4, CmaA1, CmaA2, PcaA y UmaA). Se ha demostrado que estas proteínas interaccionarían con las enzimas condensantes, siendo específicas de los complejos E-FAS-II, modificando de esta manera la cadena meromericológica durante el proceso de elongación [128]. En consecuencia, la especificidad de cada tipo de complejo de elongación y de las modificaciones realizadas en la cadena del meromicolato, estaría dada por las interacciones específicas ocurridas entre las enzimas condensantes, los heterodímeros de las deshidratatas y las metiltransferasas.



**Figura 7. Esquema de los complejos FAS-II especializados dentro del Interactoma de la biosíntesis de ácidos micólicos en *M. tuberculosis*.** I-FAS-II, complejo de iniciación; E1-FAS-II complejo de elongación I; E2-FAS-II complejo de elongación II; T-FAS II complejo de terminación. R1, C<sub>16</sub>–C<sub>18</sub>; R2, C<sub>24</sub>–C<sub>26</sub>; R3 representa cadenas meromericológicas de longitud intermedia; R4 representa cadenas meromericológicas de longitud mayor que R3; R5 es la cadena meromericológica final.

## 1.9 Regulación de la síntesis de ácidos grasos en bacterias

La biosíntesis de ácidos grasos es uno de los metabolismos esenciales de la bacteria ya que le proporciona los precursores necesarios (acil-CoAs) para la formación de la membrana plasmática. Dado que este proceso es energéticamente costoso, las bacterias han desarrollado mecanismos sofisticados que les permiten controlar con precisión la expresión de los genes involucrados tanto en la biosíntesis como en la degradación de los ácidos grasos así como también la capacidad de modular la actividad de las enzimas claves involucradas, para poder así ajustar las propiedades biofísicas de las membranas y mantener una correcta biogénesis y estabilidad de las mismas [130,131]. Aunque se ha avanzado mucho en los últimos años, la mayor parte de los modelos de regulación de la síntesis de ácidos grasos han sido propuestos para los organismos modelos, *E. coli* [87,132–134] y *B. subtilis* [135–137].

Entre los reguladores transcripcionales involucrados en la expresión de los genes del metabolismo lipídico podemos mencionar: FadR y FabR de *E. coli* y DesT de *Pseudomonas aeruginosa*, que ajustan los niveles de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de la membrana, mientras que FapR de *B. subtilis* y FabT de *Streptococcus pneumoniae* son represores transcripcionales globales que controlan simultáneamente la expresión de genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos [131,133,135,136,138–140]. A continuación se detalla la actividad de cada uno de estos reguladores (Tabla 2):

**Tabla 2. Reguladores transcripcionales de la biosíntesis de ácidos grasos en bacterias**

Regulador	Familia	Organismo	Activación*	Represión *	Molécula señal
<b>FadR</b>	GntR	<i>E.coli</i>	<i>fabA-B</i>	Regulón <i>fad</i>	Acil-CoA (cadena larga)
<b>FabR</b>	TetR	<i>E. coli</i>	-	<i>fabA-B</i>	Acil-CoA (cadena larga)
<b>FapR</b>	DeoR	<i>B. subtilis</i>	-	<i>fabH1-F,</i> <i>fabH2, yhdO,</i> <i>fapR, fabI,</i> <i>fabD, fabG,</i> <i>plsX</i>	Malonil-CoA
<b>FabT</b>	MarR	<i>S. pneumoniae</i>	-	<i>fabT-H-acpP,</i> <i>fabK-D-G-F-</i> <i>accB-fabZ-</i> <i>accC-D-A</i>	Acil-ACP (cadena larga)
<b>DesT</b>	TetR	<i>P. aeruginosa</i>	-	<i>desC-B,</i> <i>fabA-B</i>	Acil-CoA (cadena larga)
<b>FasR<sub>SC</sub></b>	Desconocido	<i>S. coelicolor</i>	<i>fabD-fabH-</i> <i>acpP-fabF</i>	-	Desconocido
<b>FasR<sub>MT</sub></b>	TetR	<i>M. tuberculosis</i>	<i>fas-acpS</i>	-	Acil-CoA (cadena larga)

\*Se muestran sólo los genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos (excepto para FadR). Los operones se indican conectando los genes por guiones, operones o genes independientes se separan por comas.

**FadR.** El factor de transcripción mejor caracterizado es FadR (por sus siglas en inglés, Fatty acid degradation Repressor) de *E. coli*. Esta proteína reprime específicamente la transcripción de genes esenciales para el transporte, activación y  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos [133,141]. Además, actúa como activador transcripcional de los genes *fabA* ( $\beta$ -hidroxidecanoil-ACP deshidratasa/isomerasa) y *fabB* ( $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa I) involucrados en la síntesis de ácidos grasos

insaturados [141].

La unión de FadR a su sitio operador en el ADN está regulada por la presencia de acil-CoAs de cadena larga (de 12 a 18 átomos de carbono), y las funciones como activador o represor pueden ser explicadas en función de la localización de su sitio de unión en la zona promotora de los genes que regula. Cuando no hay ácidos grasos disponibles en el medio, FadR permanece unido a sus operadores reprimiendo la transcripción de los genes de  $\beta$ -oxidación (*fad*) y activando los genes de la biosíntesis *fabA* y *fabB*. En presencia de ácidos grasos exógenos de cadena larga en el medio, éstos son convertidos a sus correspondientes tioésteres de CoA e incorporados a la célula. Ha sido demostrado que moléculas de acil-CoA de cadena larga tanto saturadas como insaturadas se unen a FadR generando un cambio conformacional que disocia al regulador de su sitio de unión en el ADN, provocando la inducción de los genes *fad* y la represión de los genes biosintéticos *fabA* y *fabB*. De esta manera, la regulación mediada por FadR permite optimizar el metabolismo de ácidos grasos en respuesta a la disponibilidad de estos compuestos en el medio ambiente [133,141].

**FabR** (por sus siglas en inglés, Fatty acid biosynthesis Repressor) es un represor transcripcional de *E. coli* que controla la proporción de los ácidos grasos insaturados en la membrana regulando la expresión de los genes *fabB* y *fabA*. FadR tiene su mayor influencia sobre la expresión de *fabA*, mientras que FabR tiene un efecto más pronunciado sobre la expresión de *fabB*. La represión mediada por FadR involucra ácidos grasos tanto saturados (AGS) como insaturados (AGI), que entran a la célula en forma de acil-CoA. FabR, en cambio, regula la expresión génica monitoreando la estructura de los ácidos grasos que forman tioésteres de CoA. Se postula que moléculas de AGI-CoA de cadena larga inducen un cambio conformacional que aumenta la afinidad de unión de FabR por las regiones promotoras de *fabB* y en menor medida de *fabA*, mientras que la unión a moléculas de AGS-CoA disminuyen la afinidad del regulador por sus sitios de unión en el ADN [140,142]. Mediante experimentos *in vitro* se pudo observar este mismo efecto con los derivados acil-ACP de los AGS y AGI (AGI-ACP y AGS-ACP). Sin embargo, experimentos *in vivo* utilizando una cepa de *E. coli*  $\Delta$ *fadR*, y un inhibidor específico de FabA, demuestran

que los niveles de expresión de *fabB* y *fabA* no se ven afectados en esta cepa, a pesar del bloqueo de la síntesis de los AGI (en ausencia de AGI exógenos) y la continua síntesis de acil-ACPs de cadena saturada. Esto indicaría que FabR no sensa la concentración de AGI-ACPs *in vivo*, sino que su principal función es la de reportar la presencia de AGI exógenos (como sus derivados AGI-CoAs) al promotor de *fabB*. En consecuencia, FadR y FabR actúan de manera concertada para balancear la producción de ácidos grasos saturados e insaturados en *E. coli* [140,142].

**DesT** es un regulador transcripcional de *P. aeruginosa* que controla la expresión de los operones *desCB* y *fabAB*, implicados en las vías aeróbicas y anaeróbicas de biosíntesis de AGI respectivamente [143]. El operón *desCB* codifica para los componentes de una acil-CoA  $\Delta 9$  desaturasa dependiente de oxígeno, que introduce dobles enlaces en la posición 9 de los acil-CoAs que derivan de ácidos grasos exógenos. Mientras que la principal vía de síntesis de AGI en *P. aeruginosa* involucra a FabA [143–145]. *P. aeruginosa* convierte de forma eficiente AG provenientes del medio en sus respectivos tioésteres de CoA y los incorpora a los fosfolípidos de membrana. Dado que la membrana de esta bacteria normalmente presenta una mayor proporción de AGI respecto a los AGS, niveles elevados de AGS extracelulares tienen el potencial de alterar la homeostasis de la membrana. De esta manera, DesT detecta la composición de los ácidos grasos exógenos bajo la forma de sus derivados acil-CoAs, y ajusta la expresión de sus genes blanco para asegurar que la célula no se vea sobrecargada de AGS [144]. DesT une AGI-CoAs y AGS-CoAs prácticamente con igual afinidad, y al igual que FabR, DesT es un represor bacteriano atípico que detecta la relación AGI/AGS en lugar de la concentración de un ligando acil-CoA, como es el caso de FadR. En condiciones normales de crecimiento, DesT alterna entre su forma libre y unida al ADN, y existe un nivel de transcripción basal del operón. En presencia de AGS, los AGS-CoAs derivados interactúan con DesT bloqueándolo en una conformación que impide su interacción con el ADN, desreprimiendo así la expresión de los genes *desCB* y *fabAB*. La acumulación de AGI-CoAs en la célula y su unión a DesT provoca un cambio conformacional que promueve la unión de este regulador a sus secuencias operadoras con mayor afinidad que en ausencia del ligando, reprimiendo la expresión de estos dos operones [146].

**FabT** (por sus siglas en inglés, Fatty acid biosynthesis Transcriptional repressor) es un regulador transcripcional de *S. pneumoniae* perteneciente a la superfamilia de reguladores MarR. En este patógeno, todos los genes que codifican para las enzimas involucradas en la vía FAS-II se encuentran en un mismo locus dentro del genoma. El segundo gen de este locus codifica para el regulador transcripcional FabT que controla la composición de los ácidos grasos de membrana reprimiendo la expresión del resto de los genes *fab*, con excepción del primer gen [138]. La afinidad de FabT por sus sitios de unión en el ADN aumenta significativamente en presencia de acil-ACPs de cadena larga, siendo el largo de la cadena acilo crítico para la interacción. Este regulador determina de esta manera la demanda de ácidos grasos y regula la expresión de los genes biosintéticos [147].

**FapR** (por sus siglas en inglés, Fatty acid and phospholipid biosynthesis Regulator) es un represor transcripcional global de bacterias Gram positivas como *B. subtilis* o *Staphylococcus aureus* que controla la expresión de muchos genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos y fosfolípidos (regulón *fap*). El aumento de los niveles intracelulares de malonil-CoA, una molécula esencial para la elongación de los ácidos grasos, induce la expresión del regulón *fap*. Se demostró que el malonil-CoA se une directa y específicamente al dímero FapR provocando un cambio conformacional que libera al represor de su sitio de unión en el ADN. De esta manera, el aumento de la expresión de los genes de la ruta biosintética se basa en la acumulación del primer intermediario de la vía, constituyendo un mecanismo diferente al de regulación por producto, descritos en los ejemplos anteriores [136].

La actividad de los reguladores transcripcionales anteriormente descritos se encuentra modulada por diversas señales metabólicas. Los acil-CoAs de cadena larga parecen ser las señales que disparan la degradación de los ácidos grasos en todas las bacterias en general, éstos por ejemplo antagonizan la actividad de FadR de *E. coli*. Por su parte, un incremento del contenido intracelular de malonil-CoA es la señal metabólica para la biosíntesis de ácidos grasos y fosfolípidos en bacterias Gram positivas de bajo GC, y antagoniza la acción de FapR. De esto se puede deducir la complejidad de la red regulatoria presente en los microorganismos a fin de mantener

la homeostasis lipídica de la membrana [148].

En los actinomicetes, el panorama es aún mucho más complejo dado que estas bacterias deben alcanzar un equilibrio entre los ácidos grasos de la membrana plásmática y los otros componentes celulares como lípidos estructurales complejos (por ejemplo, ácidos micólicos o PDIM) o lípidos de almacenamiento (TAGs), lo que añade un nivel más alto de sofisticación a la regulación de la homeostasis de lípidos en estos microorganismos. Probablemente ésta sea la razón por la que no se encontró ningún regulador homólogo a los previamente caracterizados en las diferentes bases de datos de genomas de actinomicetes.

En los últimos años, en nuestro grupo se han caracterizado tres reguladores transcripcionales del metabolismo lipídico en los actinomicetes. FasR, de *S. coelicolor* (por sus siglas en inglés, Fatty acid synthesis Regulator), aquí llamado **FasR<sub>SC</sub>**, el cual actúa como un activador del operón *fab* involucrado en la síntesis de ácidos grasos destinados a fosfolípidos y triacilglicéridos [149]. El segundo factor de transcripción, **MabR** (por sus siglas en inglés, Mycolic acid biosynthesis Regulator), consta de un regulador de *M. tuberculosis* homólogo a FasR<sub>SC</sub>, que controla la expresión del operón *fasII* involucrado en la síntesis de ácidos micólicos [150]. La existencia de reguladores homólogos altamente conservados corriente arriba de los operones *fab* en la mayoría de los actinomicetes cuyos genomas han sido secuenciados, remarca la importancia de esta nueva clase de reguladores transcripcionales para el mantenimiento de la homeostasis lipídica en este grupo de bacterias. Cabe destacar que a pesar de que FasR<sub>SC</sub> no es esencial para la viabilidad bacteriana, MabR sí lo es, siendo el primer regulador transcripcional de la síntesis de ácidos grasos caracterizado en bacterias que presenta esta característica [150]. Recientemente, se caracterizó un tercer regulador transcripcional en *M. tuberculosis* denominado **FasR<sub>MT</sub>** involucrado en la activación del operón *fas-acpS* que codifica para la sintasa FAS-I y la enzima modificadora de ACP (AcpS). De esta manera, FasR<sub>MT</sub> modula la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos en este microorganismo, controlando los sustratos que posteriormente son direccionados hacia la síntesis de los fosfolípidos de membrana y los triacilglicéridos, como así también para producir los ácidos micólicos por la acción

del sistema FAS-II [110].

## **1.10 Regulación de la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos en las micobacterias**

### **1.10.1 Control bioquímico de la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo lipídico**

A pesar de la extensa literatura disponible acerca de la biosíntesis, estructura y función biológica de los principales componentes de la pared celular de *M. tuberculosis* [94], se sabe muy poco sobre los mecanismos de regulación que le permiten adaptar su composición en respuesta a los cambios ambientales. Dada su implicancia en la patogénesis de *M. tuberculosis* [28], el estudio de los procesos que regulan la biosíntesis y composición de la pared celular resulta crucial para la comprensión de la fisiología y la fisiopatología de este patógeno, como así también de las interacciones entre las micobacterias y su entorno en general. Se sabe que la actividad de enzimas claves en la biosíntesis de ácidos micólicos como FabD, FabH, MabA, KasA, KasB, FadD32, Pks13, HadAB, HadBC e InhA, son moduladas por fosforilación mediada por serina/treonina proteína quinasas (STPKs) [151–158]. A través de experimentos realizados *in vitro* con las enzimas purificadas, los autores han demostrado que la fosforilación de las enzimas condensantes KasA y KasB, modula diferencialmente su actividad. Mientras que la fosforilación disminuye la actividad de KasA en el proceso de elongación, esta modificación aumenta la actividad de KasB en presencia de malonil-ACP o C<sub>16</sub>-ACP. Se propuso entonces que para asegurar la biosíntesis de los micolatos maduros, las micobacterias regulan diferencialmente sus sistemas E1-FAS-II comprendido por KasA, y E2-FAS-II comprendido por KasB, a través de la fosforilación mediada por STPK [151]. También se demostró que mtFabD, la malonil-CoA:ACP transacilasa que provee el sustrato malonil-ACP necesario para la síntesis de ácidos micólicos, también es fosforilada por varias STPKs; sin embargo, se desconoce si esta modificación regula positiva o negativamente su actividad enzimática [151]. Además, otra enzima condensante, mtFabH, es fosforilada eficientemente *in vitro* por varias STPKs, particularmente PknF y PknA [152]. Se ha

demostrado que esta modificación de mtFabH tendría un efecto negativo sobre la actividad de esta enzima. Dado que Pks13 también es fosforilada por STPK [49] de *M. tuberculosis*, la expresión diferencial de estas quinasas como respuesta a condiciones medioambientales podría influenciar de manera directa en el perfil de fosforilación de las cuatro enzimas condensantes, modulando en consecuencia la actividad de los distintos sistemas FAS-II interconectados [152]. A su vez, se ha demostrado que las reductasas MabA e InhA son fosforiladas *in vitro* e *in vivo* por varias STPKs de *M. tuberculosis* incluida PknB [153,155]. La modificación de estas enzimas conduce a una fuerte disminución de su actividad reductasa, y la inhibición de la síntesis de ácidos micólicos *in vivo*, siendo nocivo para el crecimiento bacteriano [153,155]. Por último, las deshidratasas HadAB y HadBC también son fosforiladas *in vitro* por varias STPKs, así como también *in vivo* [156]. Se ha demostrado que la fosforilación de estas enzimas aumenta durante la fase estacionaria de crecimiento bacteriano y conduce a una fuerte disminución de la actividad de las mismas [156]. Estos trabajos han demostrado que la regulación mediada por STPKs de *M. tuberculosis* sería un mecanismo molecular que le permitiría a este patógeno adaptar rápidamente el metabolismo de los ácidos micólicos en respuesta a los cambios ambientales a los que se enfrenta. Se podría hipotetizar que las micobacterias patógenas podrían utilizar mecanismos similares que involucren a estas STPKs para regular la actividad de proteínas involucradas en la biosíntesis de otros lípidos/glicolípidos de membrana como respuesta a las señales que encuentran durante los procesos de infección y latencia [155].

#### **1.10.2 Antecedentes sobre el control transcripcional de la expresión de los genes involucrados en el metabolismo lipídico**

Si bien muchas de las enzimas que forman parte de los sistemas FAS-I y FAS-II han sido exhaustivamente estudiadas y muchas de ellas caracterizadas genética y bioquímicamente como blancos de diferentes drogas antimicobacterianas, es muy poco lo que se sabe acerca de cómo se regula la función de estas dos rutas biosintéticas y cuáles serían las señales regulatorias que permiten la correcta

interacción entre ambos sistemas metabólicos. La transcripción de genes que codifican para componentes de rutas multienzimáticas es regulada frecuentemente en respuesta a la disponibilidad de cofactores, precursores, intermediarios o productos de la misma ruta metabólica. Es de esperar que compuestos que selectivamente inhiben una enzima de la ruta causando la acumulación de precursores y la disminución de productos, induzcan selectivamente cambios en la transcripción de genes que codifican para enzimas involucradas en la vía metabólica afectada. La disponibilidad de la secuencia genómica completa de *M. tuberculosis* permitió analizar mediante el uso de microarreglos [159,160] y de proteómica cuantitativa [161], cuáles eran los transcriptos o proteínas inducidas en cultivos de *M. tuberculosis* luego de tratar a este organismo con INH, un poderoso inhibidor de la síntesis de ácidos micólicos. Ambos estudios demostraron que esta inhibición de la síntesis de ácidos micólicos induce marcadamente la transcripción del operón *fasII* y la síntesis de las proteínas codificadas por este operón. Curiosamente, en estos experimentos no se observó la inducción de otros genes que codifican para enzimas que forman parte del sistema FAS-II, como ser *InhA* o *MabA*, cuyos genes se encuentran formando un operón no asociado a *fasII*.

Resultados similares se obtuvieron cuando se trataron los cultivos de *M. tuberculosis* con ETH, otro inhibidor de *InhA*, y con TLM, un producto natural que inhibe a las enzimas condensantes *KasA* y *KasB* [121]. Este paralelismo en la respuesta de *Mycobacterium* como consecuencia al tratamiento con INH, ETH y TLM, sugiere fuertemente que se trata de una respuesta característica del proceso celular afectado, independientemente de la droga utilizada. A su vez, confirmaron que los genes del operón *fasII* se comportan como una única unidad transcripcional y dieron indicio de la existencia de un mecanismo de regulación a nivel transcripcional de la expresión de los mismos. Por otro lado, el análisis por microarreglos reveló que la transcripción de *fas*, el gen que codifica para la enzima multifuncional FAS-I, también se vio afectada ante el tratamiento con INH, sugiriendo la existencia de señales regulatorias comunes a los dos sistemas FAS [162]. Como puede deducirse, la interacción coordinada entre los sistemas enzimáticos FAS-I y FAS-II es fundamental para mantener un fino balance metabólico entre la síntesis de los ácidos grasos de membrana y los ácidos micólicos

de la envoltura celular. Teniendo en cuenta la relevancia que posee el metabolismo lipídico tanto para el crecimiento *in vitro* como *in vivo* de *M. tuberculosis* y considerando además la información disponible acerca de la respuesta a nivel transcripcional del operón *fasII* frente a los inhibidores antes detallados, en nuestro laboratorio se decidió comenzar con la caracterización de un regulador transcripcional que pudiera estar involucrado en la síntesis de lípidos, particularmente en la síntesis de ácidos micólicos, ya que son componentes esenciales tanto para la viabilidad como para la virulencia de este microorganismo. En un trabajo publicado por nuestro laboratorio, previo al inicio de este trabajo doctoral, se ha reportado la identificación y la caracterización bioquímica de un regulador transcripcional presente tanto en *M. tuberculosis* como en *M. smegmatis*, denominado MabR, el cual se une a la región promotora del operón *fasII* tanto *in vitro* como *in vivo* modulando su expresión [150]. La sintenia de los elementos reguladores tanto *cis* como *trans* en todos los genomas de los actinomicetes cuya secuencia se encuentra disponible resalta la importancia de este arreglo génico a fines de permitir regular eficientemente la transcripción de los genes de la síntesis de ácidos grasos en este grupo de microorganismos. El rol fisiológico de este nuevo regulador se estudió en cepas de *M. smegmatis* en condiciones de sobreexpresión de *mabR*. Interesantemente, se encontró que actúa como un represor del operón *fasII* a diferencia de su ortólogo en *S. coelicolor* (FasR<sub>SC</sub>) donde el regulador actúa modulando positivamente la expresión del operón *fab*. Por último, la comprobación de que una mutante en *mabR* sólo pudo ser obtenida en presencia de una copia extra del gen, confirmó la esencialidad de *mabR* ya predicha por Sassetti en experimentos de transposición por alta densidad reafirmando el rol esencial de este regulador en la síntesis de lípidos en micobacterias [150,163]. Este trabajo, desarrollado por la Dra. Valentina Salzman como parte de su trabajo de tesis doctoral, representó la primera caracterización de un regulador clave para el metabolismo de ácidos grasos en el género *Mycobacterium*. Posteriormente, fue descrito un segundo regulador transcripcional del operón *fasII* denominado FadR que actúa modulando negativamente la expresión del operón, pero a diferencia de MabR, este represor no es esencial para la viabilidad micobacteriana [164]. Se ha visto que FadR es inducido en condiciones de hambre, provocando una reducción en la expresión del operón *fasII*

[165].

Más recientemente, en nuestro laboratorio se ha identificado y caracterizado un nuevo regulador transcripcional del metabolismo lipídico, denominado FasR, involucrado específicamente en la activación del operón *fas-acpS* [110]. Interesantemente, la actividad de este regulador transcripcional es modulada por la acción de acil-CoAs de cadena larga, productos del sistema FAS-I, los cuales al unirse a FasR generan un cambio conformacional que lo despega de su zona de unión en el ADN. Cabe destacar que FasR, al igual que MabR y a diferencia de los otros reguladores transcripcionales de la biosíntesis de ácidos grasos antes descritos, es esencial para la viabilidad bacteriana. Esto sugiere que la coordinación y la modulación de los dos sistemas FAS son altamente relevantes para mantener la homeostasis lipídica en micobacterias.

En la caracterización original de MabR, los experimentos llevados a cabo en condiciones de sobreexpresión de *mabR* sugerían que esta proteína podría funcionar como un regulador negativo del operón *fasII*. Sin embargo, una serie de consideraciones generales nos llevaron a replantear el rol fisiológico de MabR en las micobacterias: **1)** El ortólogo de MabR encontrado en *Streptomyces coelicolor*, FasR<sub>SC</sub>, induce la expresión de los genes del operón *fasII* presente en este microorganismo (conocido como operón *fab*). FasR<sub>SC</sub> posee un 42% de identidad con MabR y su sitio de reconocimiento en la región operadora del operón *fab* es altamente similar al motivo al cual se une MabR en la región operadora del operón *fasII* [149]. Sin embargo, la función del sistema FAS-II en ambos microorganismos es diferente. En *S. coelicolor*, FAS-II es el sistema responsable de ajustar la composición de ácidos grasos en las membranas celulares y los lípidos de almacenamiento, mientras que en las micobacterias el sistema FAS-II está involucrado en la biosíntesis del ácido meromicólico. **2)** La ubicación del sitio de unión a FasR en la región promotora *PfasII* de *S. coelicolor*, se encuentra a una distancia de aproximadamente -67 pb del sitio de inicio de la transcripción (TSS) del operón *fab*, lo cual es consistente con su rol de activador transcripcional. Curiosamente, las secuencias de unión a MabR en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* se localizan a -87 y -147 pb del TSS de sus respectivos

operones *fasII*. Estas distancias corresponden, en la mayoría de los casos, a regiones operadoras reconocidas por activadores [166]. **3)** El hecho de que MabR sea un regulador transcripcional esencial también es consistente con la idea de un activador y no con una proteína represora.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, nos propusimos como objetivo de este trabajo de Tesis, dilucidar la identidad y el rol de los múltiples componentes que participan en la red regulatoria involucrada en el mantenimiento del equilibrio lipídico micobacteriano (entre ellos, MabR) y entender los mecanismos por los cuales estarían interactuando ambos sistemas FAS. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Construir y caracterizar cepas de *M. smegmatis* mutantes condicionales en *mabR* a fin de determinar su rol fisiológico y conocer su verdadera identidad.
- 2) Diseccionar los componentes regulatorios que actúan en *cis* para la modulación transcripcional del operón *fasII* e identificar las señales metabólicas a las cuales responde MabR *in vivo*.
- 3) Elucidar el mecanismo por el cual se activa la expresión del operón *fasII* ante el tratamiento de las micobacterias con INH.
- 4) Evaluar el impacto de una deficiencia en la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos sobre el metabolismo lipídico, y en particular sobre la biosíntesis de ácidos micólicos.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis contribuirán a lograr un mejor entendimiento de los mecanismos regulatorios asociados al metabolismo lipídico. A su vez, permitirán conocer la relevancia de la homeostasis lipídica para la viabilidad y patogenicidad de las micobacterias. De esta manera, la caracterización del sistema de regulación de la síntesis de ácidos grasos y micólicos, constituyentes de la pared celular micobacteriana, podrían brindar nuevas herramientas para el desarrollo de drogas antimicobacterianas.

## **2 MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  [167] para los subclonados de rutina y su transformación se realizó según lo descrito por Sambrook y colaboradores [168]. Las transformantes se seleccionaron en medio suplementado con los antibióticos apropiados. La cepa de *E. coli* BL21 $\lambda$  (DE3) es una cepa de *E. coli* B lisogenizada con  $\lambda$ DE3, un profago que expresa la ARN polimerasa T7 a partir del promotor *lacUV5* inducible con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) [169]. *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 es una cepa mutante de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>6 [25].

**Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo de tesis.**

Cepa	Descripción	Referencia
<b><i>Escherichia coli</i> DH5<math>\alpha</math></b>	<i>E. coli</i> K12 F $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) <i>endA1 recA1 hsdR17 deoR supE44 thi-1<math>\lambda</math><sup>-</sup></i> <i>gyrA96 relA1</i>	[167]
<b><i>Escherichia coli</i> BL21<math>\lambda</math>(DE3)</b>	<i>E. coli</i> B F <i>ompT</i> r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> $\lambda$ (DE3)	[169]
<b><i>Mycobacterium</i> <i>smegmatis</i> mc<sup>2</sup>155</b>	Cepa de <i>M. smegmatis</i> de alta eficiencia de transformación, mutante <i>ept</i> de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 6	[25]
<b>WT-pMT13</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMT13. Am <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MSSCO</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo dos copias de <i>mabR</i> <sub>MS</sub> , una salvaje y otra interrumpida por el cassette de Hyg ( <i>mabR</i> :: <i>hyg</i> ). Hyg <sup>r</sup>	[150]
<b><i>mabR</i> cKD</b>	<i>M. smegmatis</i> mutante condicional en <i>mabR</i> , derivada de la cepa MSSCO con un intercambio alélico intra-cromosomal en el locus <i>mabR</i> <sub>MS</sub> en presencia de pMT12 y pMT13. Hyg <sup>r</sup> , Am <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>DCO78</b>	Mutante de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo un cambio alélico intra-cromosomal en el locus <i>mabR</i> <sub>MS</sub> en presencia de una copia de <i>mabR</i> <sub>MT</sub> bajo el control de Pami. Hyg <sup>r</sup> Str <sup>r</sup>	Cedida por la Dra. Salzman

<b>MS-PfasI/800</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMR104. Str <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MS-PfasI/800Mut2</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMT4. Str <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MS-pMR46</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMR46. Str <sup>r</sup>	Cedida por la Dra. Salzman
<b>MS-pMR86</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMR86. Str <sup>r</sup>	Cedida por la Dra. Salzman
<b>MS-pMR101</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMR101. Str <sup>r</sup>	Cedida por la Dra. Salzman
<b>MS-pMR102</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMR102. Str <sup>r</sup>	Cedida por la Dra. Salzman
<b>MS-pMT1</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMT1. Str <sup>r</sup>	Este tesis
<b>MS-pMT2</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMT2. Str <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MS26</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMR26. Kan <sup>r</sup>	[150]
<b>MS26-PfasI/800</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMR26 y pMR104. Kan <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup>	Cedida por la Dra. Salzman
<b>MS26-pMR46</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMR26 y pMR46. Kan <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup>	Este tesis
<b>MS26-pMR86</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMR26 y pMR86. Kan <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MS26-pMR101</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMR26 y pMR101. Kan <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup>	Este tesis
<b>MS26-pMR102</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMR26 y pMR102. Kan <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MS26-pMT1</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMR26 y pMT1. Kan <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup>	Este tesis
<b>MS26-pMT2</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pMR26 y pMT2. Kan <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>WT-pFRA42B</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pFRA42B. Str <sup>r</sup>	[170]

<b>fas cKD</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 mutante condicional en el gen <i>fas<sub>MS</sub></i> donde el promotor salvaje fue reemplazado por el promotor <i>P<sub>ptr</sub></i> por recombinación homóloga mediante un único evento de recombinación del vector pFR18 [170], conteniendo pFRA42B. Str <sup>r</sup> Am <sup>r</sup>	[170]
----------------	---	-------

Am<sup>r</sup>, resistencia a apramicina; Str<sup>r</sup>, resistencia a estreptomina; Kan<sup>r</sup>, resistencia a kanamicina; Hyg<sup>r</sup>, resistencia a higromicina.

**Tabla 4. Plásmidos utilizados en el presente trabajo de tesis.**

Plásmidos	Descripción	Referencia
<b>pCR BluntII TOPO</b>	Vector utilizado para el clonado de productos de PCR. Kan <sup>r</sup>	Invitrogen
<b>pCK3</b>	Vector integrativo derivado del pMV306 [171], conteniendo el gen <i>mcr16<sub>MT</sub></i> bajo el control del promotor <i>P<sub>myc1</sub>tetO</i> . Kan <sup>r</sup>	Cedido por Lic. Cabruja
<b>pMT12</b>	Vector integrativo derivado del pCK3, conteniendo el gen <i>mabR<sub>MS</sub></i> bajo el control del promotor <i>P<sub>myc1</sub>tetO</i> . Kan <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>pMP349</b>	Vector de intercambio <i>E. coli</i> - <i>Mycobacterium</i> . Am <sup>r</sup>	[172]
<b>pFRA42B</b>	Vector derivado del pFRA40; <i>P<sub>smyc</sub>-tetR(→)</i> ; <i>P<sub>furA102</sub>tetO<sub>pip</sub>(→)</i> ; <i>P<sub>ptr</sub>-lacZ</i> ; <i>int</i> ; Str <sup>r</sup>	[173]
<b>pMT13</b>	Vector derivado del pMP349 con origen de replicación para <i>E. coli</i> ( <i>oriE</i> ) y <i>Mycobacterium</i> ( <i>oriM</i> ), que contiene el gen <i>tetR</i> bajo el control de <i>P<sub>smyc</sub></i> , promotor constitutivo en <i>M. smegmatis</i> . Am <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>pET24a(+)</b>	Fagémido para la expresión de proteínas recombinantes bajo control de señales de transcripción y traducción fuertes ( Kan <sup>r</sup> <i>lacZ'</i> )	Novagen
<b>pMR10</b>	pET24a(+) con el gen MS4324 ( <i>mabR<sub>MS</sub></i> ) como fusión a una cola de seis histidinas ( <i>his6</i> ) N-terminal, bajo control del promotor T7. Kan <sup>r</sup>	Cedido por la Dra. Salzman

<b>pJAM2</b>	Vector de expresión de <i>Mycobacterium</i> , que contiene el promotor inducible por acetamida <i>Pami. Kan<sup>r</sup></i>	[174]
<b>pMR26</b>	Vector derivado del pJAM2, conteniendo el gen <i>mabR<sub>MT</sub></i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv fusionado a 6 residuos de histidina N-terminales, bajo el control del promotor <i>Pami. Kan<sup>r</sup></i>	[150]
<b>pSM128</b>	Vector integrativo para la construcción de fusiones transcripcionales al gen <i>lacZ</i> , por clonado en el sitio único <i>Scal</i> . Contiene el gen de la integrasa del micobacteriófago L5 ( <i>int</i> ). <i>Str<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup></i>	[175]
<b>pMR104</b>	Vector derivado del pSM128 con fragmento de región promotora del operón <i>fasII</i> (807 pb) de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv fusionado transcripcionalmente al gen <i>lacZ</i> ( <i>PfasII800<sub>MT</sub>::lacZ</i> ). <i>Str<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup></i>	Cedido por la Dra. Salzman
<b>pMT4</b>	Vector derivado del pSM128 que contiene una fusión transcripcional del <i>PfasII<sub>MT</sub></i> de 807pb mutado al gen <i>lacZ</i> ( <i>PfasII800<sub>MT</sub>Mut2::lacZ</i> ). <i>Str<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup></i>	Esta tesis
<b>pMR46</b>	Vector derivado del pSM128 con fragmento de región promotora del operón <i>fasII</i> (267 pb-fragmento mínimo) de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv fusionado transcripcionalmente al gen <i>lacZ</i> . <i>Str<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup></i>	Cedido por la Dra. Salzman
<b>pMR86</b>	Vector derivado del pSM128 con fragmento de región promotora del operón <i>fasII</i> (588 pb) de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv fusionado transcripcionalmente al gen <i>lacZ</i> . <i>Str<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup></i>	Cedido por la Dra. Salzman
<b>pMR101</b>	Vector derivado del pSM128 con fragmento de región promotora del operón <i>fasII</i> (655 pb-delección 1) de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv fusionado transcripcionalmente al gen <i>lacZ</i> . <i>Str<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup></i>	Cedido por la Dra. Salzman

<b>pMR102</b>	Vector derivado del pSM128 con fragmento de región promotora del operón <i>fasII</i> (536 pb-delección 2) de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv fusionado transcripcionalmente al gen <i>lacZ</i> . Str <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	Cedido por la Dra. Salzman
<b>pMT1</b>	Vector derivado del pSM128 con fragmento de región promotora de <i>mabR<sub>MT</sub></i> (300 pb-promotor MabR) de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv fusionado transcripcionalmente al gen <i>lacZ</i> . Str <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>pMT2</b>	Vector derivado del pSM128 con fragmento de región promotora del operón <i>fasII</i> (1516 pb-MabR entero) de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv fusionado transcripcionalmente al gen <i>lacZ</i> . Str <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	Esta tesis

Kan<sup>r</sup>, resistencia a kanamicina; Am<sup>r</sup>, resistencia a apramicina; Str<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup>, resistencia a estreptomicina/espectinomicina.

## **2.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano**

Para el crecimiento de *M. smegmatis* en cultivo líquido se utilizó medio Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado con 0.18 % Glicerol y 0.028 % Tyloxapol. Para el crecimiento en medio Sauton se lo suplementó con 0.028% Tyloxapol. Para el crecimiento en medio sólido se utilizó Middlebrook 7H10 agar (Difco) suplementado con 0.5% glicerol. Para la contraselección utilizando el marcador *sacB* se suplementó el medio sólido con 10% sacarosa. Para la propagación de *E. coli* en cultivo líquido se utilizó medio LB. Para su crecimiento en cultivo sólido, el mismo medio se suplementó con 2% agar.

En cada caso, una colonia de la cepa bacteriana en estudio se inoculó en medio de cultivo líquido y se incubó con agitación constante a la temperatura apropiada. Cuando este inóculo inicial llegó a saturación (1 día para las células de *E. coli*, hasta 3-7 días para *M. smegmatis*) se guardó a -80 °C y para la inoculación posterior se diluyó en medio fresco hasta alcanzar la DO<sub>600nm</sub>= 0.01. El volumen del medio de cultivo en ningún caso superó la quinta parte del recipiente. La concentración final de

los antibióticos empleados para el cultivo de los diferentes microorganismos se detalla en la Tabla 5.

La composición de los medios se detalla a continuación:

Luria Bertani (LB) [168]

Peptona de caseína .....	10 g
Extracto de levadura .....	5 g
NaCl.....	5 g
H <sub>2</sub> O .....	csp. 1 l

Ajustar a pH 7 con NaOH

Para la propagación de *E. coli* en medio sólido se suplementó el medio con el agregado de agar hasta una concentración final de 2 % (p/v).

Middlebrook 7H9

Para preparar 900 ml de 7H9 (Difco™), pesar 4.7 g de polvo y agregar 900 ml de agua destilada y 1.85 ml de glicerol 85%. La fórmula del medio Difco™ Middlebrook 7H9, es la siguiente:

Sulfato de Amonio.....	0.5 g
Ácido L-Glutámico.....	0.5 g
Citrato de Sodio .....	0.1 g
Piridoxina .....	1 mg
Biotina .....	0.5 mg
Fosfato Disódico .....	2.5 g
Fosfato Monopotásico .....	1.0 g
Citrato de Amonio Férrico.....	0.04 g
Sulfato de Magnesio.....	0.05 g
Cloruro de Calcio .....	0.5 mg
Sulfato de Zinc .....	1.0 mg
Sulfato de Cobre .....	1.0 mg
H <sub>2</sub> O .....	900 ml

A este medio agregar Tyloxapol 0.028% (v/v)

Middlebrook 7H10

Para preparar 900 ml de 7H10 (Difco™), pesar 19 g de polvo y agregar 900 ml de agua destilada y 5 ml de glicerol 85%. La composición es la siguiente:

Sulfato de Amonio.....	0.5 g
Fosfato Monopotásico.....	1.5 g
Fosfato Disódico.....	1.5 g
Citrato de Sodio.....	0.4 g
Sulfato de Magnesio.....	25 mg
Cloruro de Calcio.....	0.5 mg
Sulfato de Zinc.....	1 mg
Sulfato de Cobre.....	1 mg
Ácido L-Glutámico.....	0.5 g
Citrato de Amonio Férrico.....	0.04 g
Piridoxina.....	1 mg
Biotina.....	0.5 mg
Verde de malaquita.....	250 µg
Agar.....	15 g

Medio Sauton

La fórmula del medio Sauton líquido es la siguiente:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0.5 g
L-Asparagina.....	4 g
Glicerol.....	60 ml
Citrato de Amonio Férrico.....	0.05 g
Acido cítrico.....	2 g
1% ZnSO <sub>4</sub> .....	0.1 ml

Disolver en 900 ml de agua destilada, llevar a pH 7 y agregar Tyloxapol 0.028% (v/v).

Sacarosa 50% (p/v)

Sacarosa.....500 g

Agregar agua destilada hasta alcanzar un volumen de 1 l. Filtrar a través de una membrana de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ . Usar a una concentración final de 10% para la contraselección de *sacB*.

**Tabla 5. Concentración de los antibióticos empleados**

Antibiótico	<i>E. coli</i>	<i>M. smegmatis</i>
Kanamicina (Kan)	50 $\mu\text{g/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$
Espectinomicina (Sp)	100 $\mu\text{g/ml}$	-
Estreptomycin (Str)	-	20 $\mu\text{g/ml}$
Higromicina (Hyg)	200 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
Apramicina (Am)	50 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$

### 2.2.1 Tratamiento de *M. smegmatis* con isoniazida (INH)

A partir de un cultivo saturado de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 crecido en medio 7H9 a 37 °C, se realizó una dilución en medio 7H9 fresco para obtener una DO inicial de 0.01 y se incubó nuevamente a 37 °C con agitación constante hasta alcanzar una DO de 1. En este punto se dividió el cultivo en dos fracciones separadas, una de las cuales fue inoculada con INH a una concentración 10 veces superior a la concentración inhibitoria mínima (CIM). Por lo tanto, como la CIM es de 10  $\mu\text{g/ml}$  para *M. smegmatis*, la inducción se realizó con INH en una concentración final de 100  $\mu\text{g/ml}$ . La fracción restante se dejó sin tratar con el antibiótico. Los cultivos fueron incubados nuevamente en las mismas condiciones y a los 90 min de realizado el agregado, se retiró una alícuota de 10 ml de cada cultivo tratado y no tratado con INH para realizar la extracción de ARN y posterior análisis por PCR en tiempo real (qRT-PCR). El mismo procedimiento fue realizado para las cepas MS-*PfasII*/800 y MS-*PfasII*/800 Mut.

## 2.3 Transformación de las cepas bacterianas

### 2.3.1 Transformación química de *E. coli*

Las células de *E. coli* se transformaron de acuerdo a Sambrook y colaboradores [168]. 10 ml de un cultivo crecido a 37 °C hasta fase logarítmica ( $DO_{600} = 0.5$ ) se recolectó por centrifugación (10 min, 2000 g, 4 °C). Las células correspondientes a 1 ml de cultivo se lavaron con 0.5 ml de Solución 1 de transformación estéril (10 mM MOPS pH 7 y 10 mM KCl). Posteriormente se resuspendieron en 0.5 ml de Solución 2 (100 mM MOPS pH 6.5, 50 mM  $CaCl_2$ , 10 mM KCl) y se incubaron 15 min a 4 °C, tras lo cual las células se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en 0.1 ml de Solución 2. Para la transformación se agregó 1-200 ng de ADN en un volumen menor a 10  $\mu$ l, y la mezcla se incubó 1 h a 4 °C. El choque térmico se realizó durante 1 min a 42 °C, con posterior incubación durante 2 min a 4 °C. Las células se recuperaron a 37 °C en 1 ml de medio LB durante 30 min a 1 h. Las transformantes se sembraron en medio LB agar con los antibióticos apropiados para su selección.

### 2.3.2 Electroporación de *E. coli*

Para la introducción de determinados plásmidos en *E. coli*, se utilizó el protocolo de electroporación. Para ello, 10 ml de un cultivo de *E. coli*, crecido hasta una  $DO_{600nm}$  de 0.5 a 37 °C con agitación constante, fue incubado en baño de hielo durante 15 min. Las células fueron recolectadas por centrifugación (10 min, 5000 g, 4 °C) y luego fueron lavadas una vez con 20 ml de agua destilada estéril fría y dos veces con 10 ml glicerol 10% (v/v) estéril incubado a 4 °C. Las células fueron recuperadas por centrifugación (10 min, 5000 g, 4 °C) y luego de descartar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en 1 ml de glicerol 10% (v/v) estéril incubado a 4 °C. Finalmente las células competentes fueron alicuotadas en tubos eppendorf estériles (40  $\mu$ l c/u), congeladas con  $N_2$  líquido y almacenadas a -80 °C hasta el momento de su uso.

Para la transformación se utilizaron cubetas de electroporación de 0.2 cm (Bio-Rad) pre-enfriadas, donde se incubaron las células con 100 ng de ADN en un volumen de 1  $\mu$ l. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador MicroPulser™ (Bio-Rad), fijando el pulso programado EC2 (2.5 kV, 1 pulso).

Inmediatamente se agregó 1 ml de medio de cultivo LB, se recuperaron las células durante 1 h a 37 °C y se sembraron en placas selectivas de medio de cultivo LB.

### **2.3.3 Transformación de *M. smegmatis* por electroporación**

50 ml de un cultivo fresco de *M. smegmatis* crecido en medio 7H9 hasta fase logarítmica ( $DO_{600}=0.5-1$ ) se incubó durante 20 min en hielo. Las células se recolectaron por centrifugación (10 min, 2000 g, 4 °C) y se lavaron dos veces con 1 volumen de glicerol 10% estéril y frío. Posteriormente el precipitado celular se resuspendió en 1:10 del volumen inicial de glicerol 10% frío y se dividió en alícuotas de 400 µl cada una para ser conservadas a -80 °C. Para la transformación, las células se incubaron a 4 °C con aproximadamente 1 µg de ADN durante 10 min, en una cubeta de electroporación de 0.2 cm (BioRad). La electroporación se realizó a un pulso de 2.5 kV, 25 µF y 1000Ω (Hatfull 2000), e inmediatamente después las células se recuperaron en 3 ml de medio LB con agitación a la temperatura adecuada para la replicación del plásmido (37 °C), durante 3 h. Las transformantes se seleccionaron por siembra en placas de LB agar con los antibióticos correspondientes, e incubación a la misma temperatura (37 °C) durante 5-7 días.

## **2.4 Manipulación de ADN**

### **2.4.1 Tratamiento con enzimas de restricción y ligación de fragmentos de ADN**

El tratamiento del ADN con enzimas de restricción, fosfatasa alcalina y T4 ADN ligasa, se realizó según Sambrook y colaboradores [168] y siguiendo las recomendaciones de los manuales de los proveedores de las enzimas utilizadas.

### **2.4.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

La separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa se realizó según Sambrook y colaboradores [168]. Se utilizaron concentraciones de agarosa entre 1-2%, según el tamaño de los fragmentos a separar, y solución TAE (40 mM Tris-acetato pH 8, 1 mM EDTA) para la preparación y corrida de los mismos. Las

muestras se mezclaron con solución de siembra (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol y 30% glicerol) y la corrida electroforética se realizó a corriente constante de 90 mA. Los fragmentos de ADN fueron visualizados por tinción con GelGreen™ (Biotium) y visualización en un transiluminador con luz azul (excitación a 488 nm). En algunos casos, la visualización fue realizada empleando un transiluminador de luz UV (255 nm) para lo cual se agregó bromuro de etidio al gel de agarosa en una concentración final de 0.3 µg/ml. Como marcador de peso molecular se sembró ladder 100 pb o ADN del bacteriófago λ digerido con *HindIII* o *BstEII*.

### **2.4.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa**

Los fragmentos de ADN resultantes de las digestiones enzimáticas fueron purificados con el kit GFX (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **2.4.4 Secuenciación de nucleótidos y análisis de secuencias**

Para la determinación de la secuencia de fragmentos de ADN se utilizó el servicio de secuenciación de la Universidad de Maine (DNA Sequence Facility-UMaine, Maine, USA).

### **2.4.5 Extracción de ADN**

#### *2.4.5.1 Extracción de ADN genómico de *M. smegmatis**

Las células de 10 ml de un cultivo de *M. smegmatis* ( $DO_{600} = 0.8-1$ ) se recolectaron por centrifugación (2000 g, 20 min). El precipitado celular se lavó con 1 ml de solución GTE (50 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8 y 10 mM EDTA) y se resuspendió en 450 µl de la misma. Se agregaron 50 µl de lisozima 10 mg/ml y se incubó a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, a la suspensión se le adicionó 100 µl de SDS 10% y 50 µl de proteinasa K 10 mg/ml, y se incubó durante 30 min a 55 °C. Posteriormente, se le agregó 330 µl de H<sub>2</sub>O y 410 µl NaCl 5 M, se agitó por inversión y se centrifugó durante 15 min a 10000 g. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y se trató dos veces con un volumen de una mezcla cloroformo:alcohol

isoamílico (24:1), mezclando y centrifugando en cada etapa 10 min a 10000 g. El ADN se precipitó a partir de la fase acuosa recuperada tras el último paso de centrifugación, mediante el agregado de 0.7 volúmenes de isopropanol e incubación de la muestra a -20 °C durante toda la noche. El precipitado de ADN se recuperó por centrifugación (15000 g, 20 min, 4 °C) y se lavó con 500 µl de etanol 70% frío. Finalmente, el ADN obtenido se resuspendió en 50 µl de agua milli-Q estéril y se incubó un día en heladera para su completa solubilización. El ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso.

El ADN cromosomal de *M. tuberculosis* H37Rv fue gentilmente cedido por la Dra. S. Mondino.

#### 2.4.5.2 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Los plásmidos utilizados se purificaron utilizando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos fueron obtenidos en un volumen final de 100 µl.

#### 2.4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR de rutina se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl, conteniendo *Buffer Taq* ADN polimerasa 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 20 pmoles de cada oligonucleótido, 1 µl de una dilución 1/20 del ADN genómico obtenido por el método anteriormente descrito o aproximadamente 5 pmol de ADN molde, 0.2 U de Taq ADN polimerasa y 0.025 mM de cada uno de los dNTPs (dCTP, dATP, dGTP, dTTP). Se completó el volumen restante con agua destilada. Para los casos en donde se necesitó una alta fidelidad para la amplificación de fragmentos cortos de ADN, se utilizó la enzima *Pfu* ADN polimerasa y el buffer correspondiente (PB-L, Productos Bio-Lógicos), mientras que para fragmentos más largos de ADN se recurrió a la ADN polimerasa Q5® High-Fidelity y el buffer correspondiente (New England BioLabs). Para la amplificación de ADN de alto contenido de GC fue necesaria la adición de DMSO 1-10% en el caso de la enzima *Pfu*, mientras que para la enzima Q5 se utilizó Q5 High GC Enhancer.

Para la PCR de colonia, se recuperó una colonia bacteriana en 10 µl de agua y se incubó a 100 °C durante 5 min (en el caso de *E. coli*) o 1 h (en el caso de *M. smegmatis*); 5-7 µl del extracto resultante se utilizó como molde en la reacción de amplificación. Se emplearon las ADN polimerasas Taq o *Pfu* (PB-L, Productos Bio-Lógicos) siguiendo las indicaciones del proveedor.

Las reacciones de amplificación respetaron el siguiente protocolo básico de amplificación, el cual se ajustó en cada caso particular según el tamaño del fragmento a amplificar y las secuencias de los cebadores. Después de una primera etapa de desnaturalización del ADN genómico a 95 °C durante 2 min, se programaron 30 ciclos de amplificación con los siguientes parámetros: desnaturalización (30-45 s, 94 °C), anillado (30-45 s a la temperatura correspondiente al par de cebadores empleados) y polimerización (el tiempo adecuado según el largo del fragmento a amplificar, 72 °C). Para la extensión final de los fragmentos amplificados, la reacción fue continuada durante 10 min a 72 °C, y fue terminada a 15 °C. Los tiempos de elongación de la se calcularon en base a la velocidad de síntesis promedio de las ADN Polimerasas utilizadas (Taq ADN Polimerasa, 1 kb/min; *Pfu* ADN Polimerasa, 1 kb/2 min; Q5 1 kb/20 s). Se utilizó un equipo MyCycler Thermal Cycler (BioRad®).

## **2.5 Contrucción de plásmidos**

**pMT12:** Con el fin de expresar *mabR<sub>MS</sub>* de manera condicional en *M. smegmatis*, se digirió el plásmido pMR10 con *NdeI* y *EcoRI* y el fragmento resultante conteniendo MSMEG\_4324 (*mabR<sub>MS</sub>*) fue clonado bajo el control de  $P_{myc1}tetO$  en el vector pCK3 derivado de pMV306 [171], el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas, generando así pMT12. Este plásmido fue utilizado para transformar la cepa MSSCO a fin de lograr el intercambio alélico *mabR/mabR::hyg* y obtener la mutante condicional *mabR* cKD con la complementación de una copia adicional de *mabR<sub>MS</sub>* bajo el control de un promotor inducible,  $P_{myc1}tetO$ . La obtención de la cepa con el genotipo deseado fue corroborado utilizando dos pares de oligonucleótidos: N-Prom MS4324 (5'-GGTACCTCTAGACGGCTTCGGCTTCTCC-3') y 4324 Right New; PtetON

(5'-CAGTGATAGATAGGCTCTGGG-3') y 4324 Right New  
(5'-ACTCGACGAAGTTGACGACG-3').

**pMT13:** *Psmyc-tetR* fue obtenido a partir de la digestión de pFRA42B con *SacII* y *EcoRI* y posteriormente fue clonado en pMP349 [172], previamente digerido con las mismas enzimas, generando el plásmido pMT13. Este plásmido fue utilizado junto con pMT12 para transformar *M. smegmatis* MSSCO para la construcción de la mutante condicional en *mabR* denominado *mabR* cKD.

**pMT4:** El fragmento que contiene la región promotora de *PfasII*<sub>MT</sub> mutado de 807 pb (800 Mut2) se generó mediante un método basado en dos rondas de PCR. En la primera ronda, se generaron dos fragmentos utilizando dos plásmidos diferentes como molde, el primer fragmento se amplificó a partir de pMR104 usando como cebadores N800fas2 (5'-AGTACTGCGCTGCGCTGACCGACGTG-3') y C-mut2frag800 (5'-TGACACGGCATTGCTGTGCGATGCTT-3'); el segundo fragmento se amplificó a partir de pMut2box [150], un derivado pBluescript que contiene la región *PfasII* de 272 pb con las dos SRI reemplazadas por secuencias aleatorias, usando como cebadores N-fas2MtProm (5'-AAGCATCGACAGCAATGCCGTGTCA-3') y C-fas2MtProm (5'-CGAACCCTGTCCGGGTGCGAGCAAC-3'). Los fragmentos generados se mezclaron para la hibridación con sus secuencias complementarias y después de 10 ciclos de amplificación sin cebadores, se añadieron los cebadores externos N-800fas2 y ScalC-fas2TBProm (5'-AGTACTCGAACCCTGTCCGGGTGCGAGCA-3') a las mezclas de reacción para la segunda ronda de PCR. El fragmento final se digirió con *Scal* y se ligó en el sitio *Scal* del vector integrativo pSM128 [175] generando el plásmido reportero micobacteriano, pMT4. El vector pSM128 contiene una fusión *cII-lacZ*, el gen que codifica para la integrasa del micobacteriófago L5, sitios de inserción *att*, y un cassette de resistencia a estreptomina/espectinomina (*Str<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup>*). El fragmento clonado se analizó por secuenciación para confirmar tanto la identidad del producto amplificado como la correcta fusión transcripcional del inserto al gen *lacZ* sin promotor del vector pSM128.

**pMT1:** El fragmento conteniendo la región promotora de *mabR<sub>MT</sub>* utilizada para el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa como fusión al gen *lacZ*, se generó por amplificación por PCR a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv, utilizando los cebadores N-Prom MabR TB new (5'-GATATCGTGGGTGCCGGGCACATACCTCA-3') y C-Prom MabR TB new (5'-GATATCTCCTAAAAGCTACGCCAGATTTCTGG-3'). El fragmento amplificado de 300 pb se clonó en pCR BluntII TOPO y se digirió con *EcoRV* para ligar al sitio *Scal* presente en el vector integrativo pSM128 [175] generando el plásmido reportero de micobacterias, pMT1.

**pMT2:** El fragmento conteniendo la región promotora del operón *fasII* (1516 pb-MabR entero) utilizada para el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa como fusión al gen *lacZ*, se generó por amplificación por PCR a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv, utilizando los cebadores N-MabR entero *fas2* (5'-GATATCGTGAACGACAATCAGTTGGCTCCAG-3') y *EcoRV* C-Fas2 TB (5'-GATATCCGAACCCTGTCCGGGTGCGAGCA-3'). El fragmento amplificado de 1516 pb se clonó en pCR BluntII TOPO y se digirió con *EcoRV* para ligar al sitio *Scal* presente en el vector integrativo pSM128 [175] generando el plásmido reportero de micobacterias, pMT2.

## 2.6 Análisis de proteínas

### 2.6.1 Expresión y purificación de MabR<sub>MS</sub>

La inducción de la expresión de MabR<sub>MS</sub> a partir de la cepa de *E. coli* BL21 transformada con el vector pMR10, se realizó a DO<sub>600</sub> 0.6-0.7 con IPTG 0.5 mM durante toda la noche a 37 °C). Las células se recolectaron por centrifugación, se resuspendieron en solución A (50 mM Tris-HCl pH 8, 1 M NaCl, 30% (v/v) glicerol, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol y 5 mM imidazol) suplementada con 1 mM PMSF, y se lisaron por sonicación (5 pulsos, 10 s ON y 10 s OFF, 20% de amplitud, 4 °C). Los restos celulares se clarificaron por centrifugación (20000 g, 4 °C, 30 min) y la proteína His<sub>6</sub>-MabR<sub>MS</sub> se purificó a partir de la fracción soluble obtenida por cromatografía de afinidad, utilizando una columna de Ni-NTA agarosa (Qiagen), y siguiendo las

instrucciones del fabricante. El extracto proteico total libre de células se incubó 1 h a 4 °C con 2 ml de la resina de afinidad de Ni-NTA agarosa, equilibrada previamente con la solución A. Tras el lavado de la columna con 15 volúmenes de la solución A, la proteína His<sub>6</sub>- MabR<sub>MS</sub> se eluyó con concentraciones crecientes de imidazol (40, 100, 200 y 250 mM). Cada una de las fracciones recolectadas se analizaron por SDS-PAGE. Aquellas que contenían la proteína pura se dializaron a 4 °C durante toda la noche, contra una solución de diálisis (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 M NaCl y 30% (v/v) glicerol). Las proteínas obtenidas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

## 2.6.2 Dosaje de proteínas y SDS-PAGE

### 2.6.2.1 Análisis en *M. smegmatis*

La concentración de proteínas fue determinada mediante el ensayo del ácido bicinconínico [176] utilizando el kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce). El mismo se utilizó siguiendo las recomendaciones del fabricante y usando como patrón una solución de BSA comercial (Promega). También se determinó la concentración de proteínas mediante la utilización del Kit Quant-iT™ Protein Assay junto al fluorómetro Qubit® (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los extractos proteicos y las proteínas purificadas se analizaron mediante SDS-PAGE, utilizando la celda Mini-gel PROTEAN IV (BioRad) y el sistema discontinuo de Laemmli [177]. El gel de concentración al 5% (p/v) del monómero de acrilamida se preparó en solución C (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 1.8 mM EDTA y 0.1% (p/v) SDS), y el gel de separación al 12% (p/v), en solución B (375 mM Tris-HCl pH 8.8, 1.8 mM EDTA y 0.1% (p/v) SDS). Se utilizó una relación de acrilamida:bisacrilamida 30:0.8. Las muestras a sembrar se calentaron a 100 °C durante 5 min, en solución de siembra (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 25% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 14.4 mM β-mercaptoetanol y 0.1% (p/v) azul de bromofenol), y se corrieron a una corriente constante de 30 mA a temperatura ambiente, en solución Laemmli (25 mM Tris base, 192 mM glicina pH 8.3, 1 mM EDTA y 0.1 % (p/v) SDS). Como marcador de peso molecular se utilizó una mezcla de proteínas: lisozima (14.4 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa), anhidrasa carbónica

(31 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), albúmina sérica bovina (BSA, 66.2 kDa) y fosforilasa B (97.4 kDa). Para detectar proteínas totales los geles se fijaron en una solución de ácido acético-H<sub>2</sub>O (3:7) y se tiñeron con una solución de azul brillante de Coomassie (0.25% Azul brillante de Coomassie R250, 50% etanol y 10% ácido acético).

### **2.6.3 Transferencia e inmunodetección de proteínas (Western blot)**

#### *2.6.3.1 Inmunización con MabR<sub>MS</sub> y obtención de suero*

Para la producción de anticuerpos policlonales anti-MabR<sub>MS</sub> se inmunizaron conejos con 200 µg de la proteína His<sub>6</sub>- MabR<sub>MS</sub> purificada, en un buffer que contiene 50 mM Tris-HCl pH 8, 1 M NaCl, 30% (v/v) glicerol y 10 mM β-mercaptoetanol, mediante la aplicación de inyecciones subcutáneas con adyuvante de Freund incompleto en relación 1:1. A las cuatro semanas posteriores se inyectaron nuevamente 200 µg de la proteína en forma subcutánea con adyuvante de Freund incompleto (1:1). Previo a la inmunización se extrajo sangre para chequear la ausencia de reacciones inespecíficas con el antígeno. A partir de la segunda inyección, se extrajo sangre cada 15 días para monitorear la producción de anticuerpos específicos, hasta que se alcanzaron los títulos adecuados contra el antígeno de interés. La sangre se dejó coagular durante toda la noche a 4 °C. El suero se separó por centrifugación (10 min, 3000 rpm) y se guardaron alícuotas del mismo a -20 °C hasta su uso.

#### *2.6.3.2 Western blot con extractos proteicos de M. smegmatis*

Las células de 10-20 ml de un cultivo de *M. smegmatis* se recolectaron por centrifugación (10 min, 2000 g, 4 °C) y se resuspendieron en 200 µl de solución de ruptura (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 1 mM y PMSF 1 mM). La disrupción se realizó por sonicación (10 pulsos, 30 s ON y 30 s OFF, amplitud máxima, 4 °C) y el extracto resultante se clarificó por centrifugación (15000 g, 20 min, 4 °C). Las proteínas se cuantificaron, se separaron por SDS-PAGE y se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Protran Premium 0.45 NC, GE Healthcare) utilizando la celda Mini-Trans-Blot transfer (BIORAD) y siguiendo

la técnica descrita por Burnette [178] y Sambrook y colaboradores [168]. La transferencia húmeda se realizó en solución de transferencia (25 mM Tris, 150 mM glicina, 20% (v/v) metanol) durante 2 h a 250 mA a 4 °C. La eficiencia de la transferencia y la localización de las bandas se corroboró por tinción de las proteínas sobre la membrana con una solución de Rojo Ponceau (0.1% (p/v) Rojo Ponceau en 5% (v/v) ácido acético).

Después de la transferencia, las membranas se lavaron dos veces en solución TBS (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) durante 10 min, y se incubaron 1 h con solución de bloqueo (3% (p/v) BSA en TBS). Posteriormente, se lavaron dos veces con TBS-Tween-Tritón (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.2% (v/v) Tritón X-100), y una vez con TBS, durante 10 min. Para la detección de MabR<sub>MS</sub>, la membrana se incubó por 1 h con una dilución de suero de conejo conteniendo el anticuerpo primario policlonal anti-MabR<sub>MS</sub>, obtenido en nuestro laboratorio e indicado previamente en el punto 2.6.3.1. (dilución 1:100 en solución de bloqueo), tras lo cual se volvieron a repetir los lavados indicados previamente. Finalmente, se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (BIORAD, dilución 1:5000 en solución de bloqueo) durante 1 h. Tras tres lavados con TBS-Tween-Tritón, el revelado se llevó a cabo utilizando el kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) siguiendo las especificaciones del fabricante. Por su parte, la identificación de RpoB<sub>MS</sub> se llevó a cabo utilizando el anticuerpo primario monoclonal comercial contra la subunidad β de la ARN polimerasa de *E. coli* (anti-RpoB<sub>EC</sub>, NeoClone Biotechnology International) (dilución 1:20000), y el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (dilución 1:100000). Este anticuerpo primario reconoce numerosas ARN polimerasas bacterianas incluida la presente en micobacterias. En este caso, para el revelado se incubó la membrana con los sustratos de la fosfatasa alcalina, cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT) y sal de toluidina 5-bromo-4-cloro-3'-indol fosfato (BCIP) (Sigma), en solución fosfatasa (100 mM Tris•Cl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>).

#### 2.6.4 Ensayos de $\beta$ -galactosidasa

La actividad  $\beta$ -galactosidasa en cultivos fue medida como lo describe Miller [179], con las siguientes modificaciones. Cultivos saturados de *M. smegmatis* crecidos en medio 7H9 en presencia de los correspondientes antibióticos, se diluyeron en el mismo medio a una DO inicial de 0.01 y se incubaron a 37 °C. En fase exponencial temprana ( $DO_{600} \sim 0.2$ ), se suplementaron (cuando se indica) con acetamida 0.2% y/o ácidos grasos a una concentración final de 0.15 mM. Tras un determinado tiempo de incubación, las células de 10 ml de cada cultivo se recuperaron por centrifugación, se lavaron y se resuspendieron en 250  $\mu$ l solución Z (0.06 M  $Na_2HPO_4$ , 0.04 M  $NaH_2PO_4$ , 0.01 M KCl, 0.001 M  $MgSO_4$  y 0.05 M  $\beta$ -mercaptoetanol). Las células se rompieron por sonicación en el Bioruptor<sup>TM</sup>-UCD200 (Diagenode) (10 pulsos, 30 s ON y 30 s OFF, máxima potencia, 4 °C) y la suspensión se clarificó por centrifugación (23000 g, 30 min, 4 °C). El extracto proteico obtenido se cuantificó con Quant-iT<sup>TM</sup> Protein Assay Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen) y se utilizó para los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa [179]. Una alícuota del mismo se llevó a volumen final de 250  $\mu$ l con la misma solución Z, y luego de 5 min de incubación en un baño termostático a 28 °C, se le adicionó 50  $\mu$ l del sustrato orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG 4 mg/ml). La suspensión se mezcló por inversión y se incubó un tiempo fijo a 28 °C. La reacción se detuvo por adición de 125  $\mu$ l de  $Na_2CO_3$  1 M y se midió la DO a 420 nm, utilizando como blanco una mezcla de reacción a la cual no se le adicionó un volumen de extracto proteico. La actividad específica  $\beta$ -galactosidasa expresada en nmol ONPG por min por mg de proteína se calculó con la siguiente ecuación  $(188888 \times DO_{420}) / (c \times V \times t)$ , donde  $DO_{420}$  es la densidad óptica medida a 420 nm,  $c$  es la concentración proteica del extracto (mg/ml),  $V$  es el volumen de extracto utilizado en el ensayo (ml), y  $t$  es el tiempo de reacción (min). En todos los casos se utilizó un volumen de extracto proteico y un tiempo de reacción tal que los valores de  $DO_{420}$  estuvieran comprendidos entre 0.15 y 0.3. Los datos se obtuvieron por triplicado para al menos tres experimentos independientes ( $n=3$ ) y los valores de actividad reportados corresponden al promedio de los resultados obtenidos para tres experimentos independientes  $\pm$  desvío estándar. El nivel promedio de actividad  $\beta$ -galactosidasa debido al plásmido parental pSM128

constituye el ruido experimental. Para ello, el plásmido pSM128 se utilizó para transformar una cepa salvaje de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y la cepa MSpMR26, dando lugar a las cepas control con el vector vacío.

Para el caso del ensayo ante el tratamiento con INH, los cultivos saturados de *M. smegmatis* MS-PfasI/800 y MS-PfasI/800Mut2 también se diluyeron en un DO inicial = 0.01 y se incubaron a 37 °C. Una vez que los cultivos alcanzaron DO = 1, cada uno de ellos se dividió en dos partes iguales, una se trató con INH 100 µg/ml y la otra sirvió como control no tratado. Después de 90 minutos de tratamiento, las células se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en la solución Z. Posteriormente, las células recogidas se procesaron como lo descrito anteriormente. Los datos se registraron por triplicado y los niveles de actividad se expresan como nmol ONPG por minuto por mg de proteína, y los valores son la media de los resultados ± desviaciones estándar. Los controles de ruido experimental se hicieron usando la fusión *lacZ* sin promotor (pSM128).

## **2.7 Manipulación de ARN**

### **2.7.1 Extracción de ARN de *M. smegmatis***

El ARN se extrajo a partir de cultivos de *M. smegmatis* en fase exponencial temprana (10 ml) o fase exponencial media a tardía (5 ml), centrifugando los cultivos a 2000 g durante 10 min y lavando las células 2 veces con 1 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8. Posteriormente, se resuspendieron estas células en Quick zol (Kalium Technologies), rompiéndolas luego con el Bioruptor™-UCD200 (Diagenode) y mezclando el sobrenadante proveniente de la resuspensión clarificada por centrifugación con igual volumen de etanol 100%. La extracción se realizó utilizando Direct zol RNA MiniPrep (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando fue necesario, se trató con la enzima DNasa RQ1 libre de RNasa (Promega) para remover el ADN genómico remanente en las muestras. La calidad (pureza e integridad) del ARN obtenido se analizó mediante determinación de la relación DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> y DO<sub>260</sub>/DO<sub>230</sub>, y por electroforesis en geles de agarosa 1% (p/v) teñidos con GelGreen™ (Biotium) con posterior visualización en un transiluminador con luz azul (excitación a 488 nm).

### 2.7.2 Retrotranscripción (Síntesis de ADNc)

Para determinar los niveles de expresión de *mabR*, *fabD*, *acpM*, *kasA*, *kasB*, *inhA*, *hadB*, *fabH*, *fas*, *acpS* y *fasR* ante una deficiencia de FAS-I o MabR así como para definir el nivel de expresión de *mabR* ante el tratamiento de *M. smegmatis* con INH, el ARN extraído a partir de cultivos de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, *fas* cKD y *mabR* cKD en fase exponencial fue utilizado como molde para la síntesis de ADNc, usando la transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen), según las especificaciones del fabricante, y hexanucleótidos degenerados como cebadores de la reacción. En el caso de la mutante *fas* cKD, un cultivo saturado de la cepa crecida en medio 7H9 fue diluido a la D.O= 0.01 en el mismo medio e incubado por aproximadamente 12 h a 42 °C (DO<sub>600</sub>~0.2). Posteriormente, el cultivo se dividió en dos fracciones iguales y una de ellas se suplementó con ATc 200 ng/ml. Tras la incubación de ambos cultivos a 42 °C durante 13 h y 17 h, se extrajo el ARN de cada uno de ellos. Para el estudio de la deficiencia de MabR, se crecieron las cepas *mabR* cKD y WT-pMT13 en medio 7H9 en presencia de ATc 2.5 ng/ml y al cabo de 33 h y 38 h de incubación a 37 °C en agitación, se extrajo ARN de cada una de ellas.

### 2.7.3 PCR en tiempo real (qRT-PCR)

El nivel de expresión de los genes *mabR*, *fabD*, *acpM*, *kasA*, *kasB*, *inhA*, *hadB*, *fabH*, *fas*, *acpS* y *fasR* se determinó tras la normalización de los correspondientes niveles de ARN a la expresión del gen invariable *sigA<sub>MS</sub>*. El ADNc fue sintetizado según lo detallado en el apartado anterior fue utilizado como molde para la amplificación por qRT-PCR usando una mezcla de reacción concentrada comercial la cual utiliza fluorocromo verde como colorante indicador (qPCR Mezcla Real, Biodynamics). Para la amplificación por qRT-PCR se utilizó el equipo Mastercycler® ep *realplex* de Eppendorf, siguiendo las siguientes condiciones: 95 °C por 2 min seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 58 °C por 15 s y 68 °C por 20 s. Los datos de qRT-PCR se presentan para el caso de la mutante condicional en *fas-acpS* como la diferencia de expresión relativa en la cepa *fas* cKD crecida con ATc 200 ng/ml respecto a la misma cepa sin ATc, usando el método de Pfaffl [180]. Para la mutante condicional

en *mabR*, se presentan como la diferencia de expresión relativa en la cepa *mabR* cKD crecida en ATc 2.5 ng/ml respecto de la cepa parental WT-pMT13. En todos los casos, el gen *sigA<sub>MS</sub>* se utilizó como gen normalizador.

Según el método de *Pfaffl*, los niveles de expresión relativa de un gen blanco se calculan teniendo en cuenta la eficiencia de los oligonucleótidos (E) y el valor del punto de corte (Ct) para una muestra desconocida respecto a la muestra control, y se expresa en comparación a un gen de referencia. El modelo matemático es:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E_{\text{blanco}})^{\Delta Ct_{\text{blanco}}(\text{control-muestra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{control-muestra})}}$$

En esta fórmula, *E<sub>blanco</sub>* y *E<sub>ref</sub>* son las eficiencias de los pares de oligonucleótidos utilizados en la qRT-PCR para amplificar el transcripto de un gen blanco y un gen de referencia respectivamente; y  $\Delta Ct_{\text{blanco}}$  y  $\Delta Ct_{\text{ref}}$  son las desviaciones de los valores de Ct del transcripto de un gen blanco y un gen de referencia respectivamente, en la muestra control respecto a la tratada. El gen de referencia debe ser un gen de expresión constitutiva cuya expresión no varíe en las condiciones de análisis, en este caso empleamos el gen *sigA* que codifica para el factor sigma vegetativo de *Mycobacterium* ( $\sigma^A$ ), perteneciente a la familia  $\sigma^{70}$  [181].

En la Tabla 6 se indican los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada uno de los genes por qRT-PCR. Estos oligonucleótidos fueron diseñados utilizando el programa Primer3 Plus.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de qRT-PCR.

Nombre	Secuencia (5'-3')
L-sigA	CCAAGGGCTACAAGTTCTCG
R-sigA	TGGATCTCCAGCACCTTCTC
L-mabR	CTGGTGACGATCGTGTCTGG
R-mabR	GTTTCATCCCCGAGATCGCTT
L-fabD	CACACCCACTACATGGCATC
R-fabD	GAGTTGTGCGACGAGCTTCT
L-acpM	ATCGAAGAGGTCACCGGTAT
R-acpM	CTCGAGCTTCTGGATGTAGG
L-kasA	CCGACGCTGAACTACGAGAC
R-kasA	AACCCGAACGAGTTGTTGAT
L-kasB	AACAACCTGGATCCGAAAT
R-kasB	ACATTGTGCCACCGAAT
L-fabH	GACCAGGCACAACACACATA
R-fabH	ACTGCAATTGATCACCACCT
L-hadB	CGGAGATCTGGTCAACTACG
R-hadB	TGAACCGCACGTTGTAATC
L-inhA	GAGGAGCACCTGTCGACTCT
R-inhA	ACGGTCATCCAGTTGTAGGC
L-fas	CGATGCAGACCATGTACCAC
R-fas	CCCACATACGACTGCATGAC
L-acpS	GTCGAGCTCTCGGTTCTCC
R-acpS	GTCACGTCCTCCAGGTGTTT
L-fasR	AGGCGTTCTTCGATTTTCATC
R-fasR	ATCAGATCGAACACGGCATC

## 2.8 Análisis de lípidos

### 2.8.1 Análisis de ácidos grasos y ácidos micólicos por cromatografía en capa delgada (TLC)

La biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos se analizó por incorporación de [ $^{14}\text{C}$ ] acetato. Se marcaron 5 ml de cada cultivo durante 1 h con [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ] acetato (50.5 mCi/mmol; Pelkin Elmer) a una concentración de 1  $\mu\text{Ci/ml}$ . Los metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) y ácidos micólicos (MAMEs) se extrajeron siguiendo el protocolo reportado previamente [34]. Las células marcadas se recuperaron por centrifugación, se lavaron con buffer fosfato 0.1 M pH 7.6 y se sometieron a hidrólisis alcalina en 2 ml de hidróxido de terbutilamonio (TBHA) 12% (v/v) a 95 °C durante toda la noche, estandarizando previamente el número de células a tratar. Posteriormente, se adicionó a la mezcla de reacción 2 ml de diclorometano y 100  $\mu\text{l}$  de yoduro de metilo, y se agitó en agitador rotatorio durante 1 h. Las fases se separaron por centrifugación (1000 g, 10 min), y la fase orgánica inferior se lavó con 2 ml de agua y se evaporó hasta sequedad a 55 °C. Los metil ésteres se disolvieron en 2 ml de éter etílico. El éter se traspasó a un nuevo contenedor y se evaporó nuevamente hasta sequedad. El residuo final se disolvió en 200  $\mu\text{l}$  de diclorometano, y 10  $\mu\text{l}$  de la solución resultante de FAMES y MAMEs fue utilizada para medir radioactividad en un contador de centelleo Beckman. A su vez, la mezcla se sometió a TLC utilizando una placa de silica gel (TLC silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck) normalizando la siembra por densidad óptica o número de cuentas. Las placas se corrieron en una mezcla de hexano:etil-acetato (9:1 v/v). Los autoradiogramas se obtuvieron por exposición de los cromatogramas a placas Carestream® Kodak® BioMax® MR, durante toda la noche. Sin embargo, en algunos casos la radiactividad de los FAMES y MAMEs en los cromatogramas ha sido visualizado mediante el empleo del láser scanner Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare). Los spots de FAMES y MAMEs marcados radiactivamente con  $^{14}\text{C}$  fueron cuantificados usando el programa Gel-Pro Analyzer y los valores obtenidos fueron expresados en unidades arbitrarias (UA).

### **2.8.2 Análisis de triacilglicéridos (TAG) por cromatografía en capa delgada (TLC)**

Para la extracción de lípidos totales de *M. smegmatis*, se colectaron las células por centrifugación y los lípidos se extrajeron por el método de Bligh y Dyer utilizando metanol/cloroformo (2:1 v/v) [182]. Los extractos se secaron y se analizaron por cromatografía de capa delgada (TLC) en placas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck). Para el análisis de TAG se utilizó un solvente de corrida compuesto por hexano:dietiléter:ácido acético en una proporción de 75:25:1 (v/v/v). Las fracciones lipídicas fueron visualizadas por tinción con Cu-fosfórico o bien, en caso de estar marcadas radiactivamente para el estudio de síntesis *de novo*, por autorradiografía utilizando placas Carestream® Kodak® BioMax® MR. Para los análisis densitométricos, las imágenes fueron digitalizadas y analizadas a través del programa Gel-Pro Analyzer. En este caso, la marcación fue realizada según lo descrito en el apartado 2.8.1.

### **2.8.3 Análisis de la composición de ácidos grasos por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)**

El análisis de la composición de ácidos grasos se realizó preparando los metil-ésteres de los ácidos grasos como se describe en la sección 2.8.1. Los metil-ésteres obtenidos fueron analizados por GC-MS en una columna capilar SPB-1 (28 m x 0.25 mm diámetro interno) utilizando el equipo GCMS-QP2010 Plus de Shimadzu. Se usó Helio como gas de corrida a 1 ml por min. Se programó la columna a 4 °C por min desde 40 °C a 310 °C.

### **2.8.4 Análisis de lípidos totales por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)**

En colaboración con el Lic. Cabruja se determinó la composición de lípidos totales en las cepas *mabR* cKD y WT-pMT13 por HPLC-MS. Para ello, se prepararon los lípidos totales a partir de sedimentos celulares lavados con acetato de amonio 50 mM, pH 7.8, siguiendo el protocolo de extracción que se detalla a continuación. Las

muestras se incubaron durante la noche a 4 °C con 5 ml de CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (2:1, v/v) con agitación suave. Después de la centrifugación, los sedimentos bacterianos se sometieron a una extracción adicional usando CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (1:2, v/v) durante 2 h. Los extractos orgánicos se juntaron y se secaron en nitrógeno a 4 °C. Los lípidos se resuspendieron en 3 ml de CHCl<sub>3</sub>, se lavaron con 3 ml de H<sub>2</sub>O y luego se transfirió la fase orgánica de cada muestra a tubos de vidrio previamente pesados, se secaron en nitrógeno a 4 °C y se volvieron a pesar en una balanza. Los extractos se disolvieron en CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH (1:1, v/v) a 1 mg/ml y se centrifugaron a 3000 g durante 5 minutos.

Los lípidos extraídos se analizaron en un sistema de HPLC serie Agilent 1200 con una columna C<sub>8</sub> Reprospher 100 (1.8 µm x 50 mm x 2 mm). El caudal fue de 0.3 ml/min en modo de gradiente binario con el siguiente programa de elución: la columna se equilibró con 100% de fase móvil A (CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (99:1, v/v), conteniendo AcNH<sub>4</sub> 0.05 mM). Se inyectaron 2 µl de cada muestra, que contenía 13 µg de lípidos totales en CHCl<sub>3</sub> y se mantuvo la condición de elución durante 1 min, seguida de un gradiente de 12 min hasta alcanzar una fase móvil del 100% B (isopropanol:hexano:H<sub>2</sub>O (79:20:1, v/v/v), conteniendo AcNH<sub>4</sub> 0.05 mM), manteniéndose 1 minuto en esa condición. Se utilizó un instrumento Q-TOF de la serie 6500 de Agilent con un ESI Dual AJS para el análisis de masas. La temperatura del gas de ionización se mantuvo a 200 °C con un flujo de gas de secado de 14 l/min, una presión del nebulizador de 35 psig y 3500 voltios. Los espectros se recogieron en modo positivo y negativo de m/z 115 a 3000 a 4 espectros/s. Los calibradores de infusión continua incluyen m/z 121.051 y 922.010 en modo positivo y m/z 119.035 y 955.972 en modo negativo.

## **2.9 Determinación de las actividades FAS-I y FAS-II utilizando ensayos radiométricos *in vitro* de incorporación de [2-<sup>14</sup>C] malonil-CoA**

Se determinaron las actividades FAS-I y FAS-II midiendo la incorporación de [2-<sup>14</sup>C] malonil-CoA en los ácidos grasos resultantes. Se utilizó [2-<sup>14</sup>C] malonil-CoA (0.37 MBq/ml) y todas las actividades se calcularon como pmol de malonil-CoA incorporado en el ácido graso y se estandarizaron por mg de proteína. Se prepararon extractos libres de células de la cepa mutante *fas* cKD crecida en ausencia y

presencia de ATc 200 ng/ml en T3 y T4. Las células se cosecharon por centrifugación, se resuspendieron en buffer de extracción (buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.5, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) y se rompieron por sonicación. El extracto se clarificó por centrifugación a 25000 g durante 30 min seguido de ultracentrifugación a 40000 g por 1 h. La fracción soluble fue lavada tres veces con buffer de extracción por filtración a través de una unidad de filtración Amicon Ultra-15, con un corte de 10000 Da. La concentración de proteína de los extractos se determinó utilizando el Kit Quant-iT™ Protein Assay junto al fluorómetro Qubit® (Invitrogen).

Solución para ensayo de actividad FAS-I: 1 mg del extracto proteico, 300 mM acetil-CoA, 20 mM malonil-CoA, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 1 mM flavinamonucleótido, 0.5 mM β-ciclodextrina, 100 mM NADPH, 100 mM NADH, 50000 cpm [2-<sup>14</sup>C] malonil-CoA (Perkin Elmer) y buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7, en un volumen total de 500 μl.

Solución para ensayo de actividad FAS-II: 1 mg del extracto proteico, 40 mM malonil-CoA, 100 mM palmitoil-CoA, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 140 mM NADPH, 140 mM NADH, 10 mM Coenzima A (Sigma), 90 mg AcpM, 100000 cpm [2-<sup>14</sup>C] malonil-CoA y buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7, en un volumen total de 500 μl.

La reacción para la síntesis de ácidos grasos se llevó a cabo durante 30 min a 37 °C. Los ácidos grasos se separaron por saponificación (0.5 ml 20% KOH-50% metanol, 30 min, 100 °C) seguida de acidificación (0.3 ml HCl 6 M) y extracción con éter de petróleo (cuatro veces con 1 ml). Los ácidos grasos extraídos fueron secados a 50 °C y disueltos en 0.2 ml de éter dietílico. Finalmente, se determinó la radioactividad utilizando un contador de centelleo Beckman luego de adicionar 1 ml de líquido de centelleo (Perkin Elmer).

## **2.10 Análisis de la biosíntesis de macromoléculas**

Con el fin de evaluar exclusivamente el impacto de la deficiencia de FAS-I sobre la biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos, se estudió la biosíntesis de proteínas por incorporación de [<sup>3</sup>H] leucina a fin de verificar el normal funcionamiento

de la maquinaria traduccional. Para ello, se marcaron 5 ml de cada cultivo (fas cKD tratada con ATc 200 y sin tratar a distintos tiempos de la curva), durante 1 h con L-[<sup>3</sup>H] leucina (0.5 µCi/ml) (10.96 GBq/mmol) (New England Nuclear). Las células se recolectaron por centrifugación, se lavaron dos veces con Tris-HCl 50 mM pH 8 y se resuspendieron en líquido de centelleo. La radioactividad incorporada se determinó utilizando un contador de centelleo Beckman.

### **2.11 Análisis estadístico**

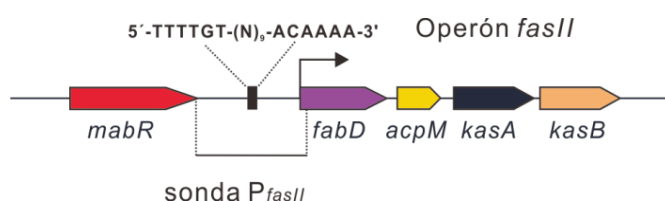
Los datos se reportan como promedios aritméticos de los resultados obtenidos a partir de tres experimentos independientes ± desviación estándar/error estándar. La significancia estadística se calculó utilizando el test *t* de Student desapareado de dos colas (Figuras 18, 19 y 26) y el test *t* de Student con la corrección de Welch (Figuras 24 y 25). La significancia estadística fue aceptada con un valor  $p < 0.05$ .

### **3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1 Capítulo I. Estudio del rol fisiológico de MabR en la regulación de la biosíntesis de ácidos micólicos en *M. smegmatis*

La síntesis de ácidos grasos en micobacterias es un proceso que se encuentra finamente regulado mediante la interacción de los dos sistemas de sintasa de ácidos grasos, FAS-I y FAS-II, los cuales coexisten en estos microorganismos y se encuentran involucrados tanto en la biosíntesis de los ácidos grasos de membrana como en la de algunos de los componentes lipídicos de la pared celular, como ser los ácidos micólicos. Se ha demostrado que estos lípidos son esenciales para las micobacterias y que los mismos estarían involucrados tanto en la impermeabilidad celular como también en la virulencia de estas bacterias y su habilidad de persistir en el hospedador. Asimismo, se ha comprobado que potentes inhibidores de estos microorganismos tienen como blanco de acción algunos componentes del sistema FAS-II, el cual está involucrado específicamente en la síntesis de los ácidos micólicos [31,32,34]. Experimentos de microarreglos y proteómica cuantitativa han demostrado que existe una inducción de la expresión de los genes del operón *fasII* en respuesta al tratamiento con estas drogas [159,160,162]. Sin embargo, estos estudios no proveen información alguna acerca de los mecanismos mediante los cuales la expresión de estos genes estaría siendo regulada. Teniendo en cuenta el rol clave de los lípidos para la viabilidad de las micobacterias tanto *in vivo* como *in vitro* y considerando que la interacción coordinada entre los sistemas enzimáticos FAS-I y FAS-II sería fundamental para mantener un fino balance metabólico entre la síntesis de los ácidos grasos de membrana y los ácidos micólicos de la envoltura celular, nuestro laboratorio decidió comenzar con el estudio de la regulación de la síntesis de los ácidos micólicos a nivel transcripcional, tratando de elucidar el mecanismo empleado por estas bacterias para mantener la homeostasis lipídica de la membrana y la pared celular. Para ello, se trabajó en primer lugar con la búsqueda de un regulador transcripcional que pudiera estar involucrado en la síntesis de lípidos, particularmente en la síntesis de ácidos micólicos. En un trabajo publicado por Salzman *et al* [150], se ha reportado la identificación y la caracterización bioquímica de un regulador transcripcional presente

tanto en *M. tuberculosis* como en *M. smegmatis*, denominado MabR, el cual se une a la región promotora del operón *fasII* tanto *in vitro* como *in vivo* [150]. Mediante los ensayos *in vitro* de protección contra DNasa I y retardo en gel se demostró que MabR se une a la región promotora del operón *fasII* (*PfasII*) de *M. tuberculosis*, a un motivo palindrómico de 21 pb formado por dos secuencias repetidas invertidas (SRI, 5'-TTTTGT-3') separadas una de otra por 9 nucleótidos (Figura 8).

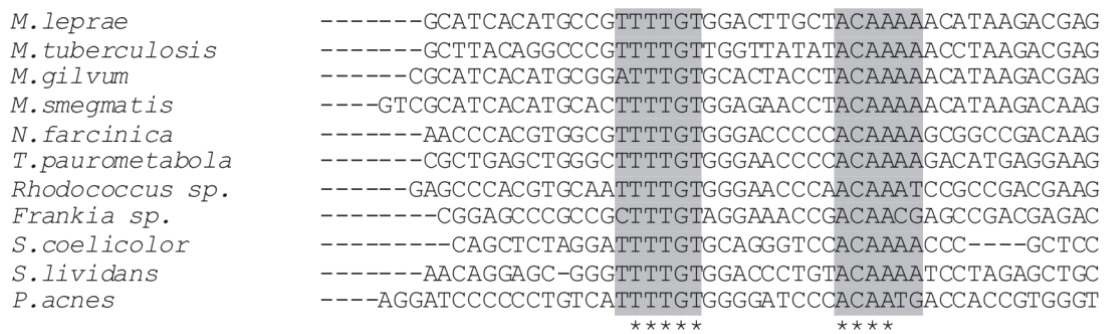


**Figura 8. MabR<sub>MT</sub> se une específicamente a la región promotora del operón *fasII*.** Organización genética del operón *fasII* y el putativo regulador transcripcional, *mabR*. La barra muestra el fragmento de ADN utilizado como sonda radiactiva (*P<sub>fasII</sub>*) para el estudio de la especificidad de unión MabR-*P<sub>fasII</sub>* llevado a cabo a través de ensayos de retardo en gel.

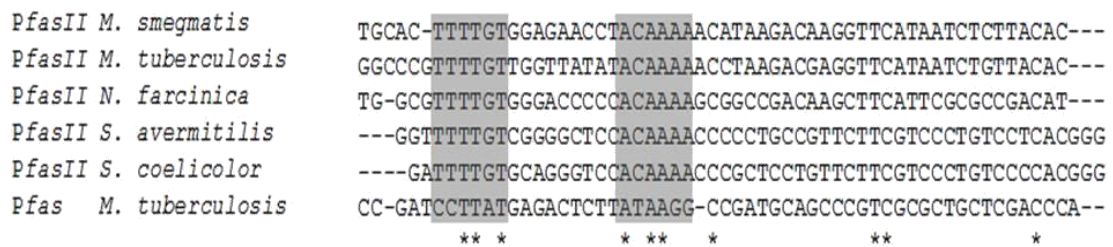
Luego al realizar un alineamiento del promotor *P<sub>fasII</sub>* de diferentes actinomicetes se vio que las SRIs y su separación de 9 pb se encuentran altamente conservadas (Figura 9), sugiriendo que este motivo formaría parte de la región reconocida por los ortólogos de MabR en todos los actinomicetes donde esta organización genética está conservada. Una búsqueda *in silico* de este motivo en el genoma de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* a su vez reveló que solamente estaba presente de manera altamente conservada en la región promotora del operón *fasII*.

Posteriormente, al realizar un alineamiento de *P<sub>fasII</sub>* con la región promotora del operón *fas-acpS* que codifica para la sintasa FAS-I (*P<sub>fas</sub>*), se encontró que seis nucleótidos correspondientes a las SRIs se encontraban conservados (5'-CCTTAT-N<sub>9</sub>-ATAAGG-3'). Esta secuencia palindrómica presente 180 pb corriente

arriba del codón de inicio de la traducción del gen *fas* (Figura 10) podría eventualmente ser reconocida por MabR para regular de manera coordinada la expresión de los genes *fas* y *fasII* y modular así la interacción entre ambos sistemas FAS. Sin embargo, no se pudo demostrar, al menos *in vitro*, la unión de MabR al promotor *P<sub>fas</sub>* mediante ensayos de retardo en gel. De esta manera, en principio, MabR sería un regulador transcripcional específico del operón *fasII*.



**Figura 9. Alineamiento de las regiones promotoras del operón *fasII* de micobacterias y actinomicetes relacionados.** Los asteriscos indican los residuos invariables en todos los genomas analizados. La secuencia invertida altamente conservada se encuentra resaltada.



**Figura 10. Comparación de las regiones promotoras del operón *fasII* de diversos actinomicetes y el gen *fas* de *M. tuberculosis*.** Las regiones promotoras fueron alineadas usando CLUSTALW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Los asteriscos indican los residuos invariables en todos los genomas. Las secuencias repetidas invertidas están resaltadas.

Experimentos combinados de mutagénesis de alta densidad y análisis por secuenciación masiva llevados a cabo por *Sassetti et al*, han sugerido que *mabR* sería un gen esencial en *M. tuberculosis* [163]. Este método se basa en la construcción de una biblioteca de mutantes por transposición de *M. tuberculosis* H37Rv, de manera tal que cada cepa que sobrevive a la mutagénesis contenga sólo una única copia del transposón integrada en su genoma. Mediante amplificación por PCR y secuenciación, se identifican los genes cuya mutación no resulta perjudicial para la viabilidad celular. Los genes que caen fuera de este grupo y no presentan inserciones en su secuencia se clasifican, por defecto, como esenciales. Como consecuencia, los resultados obtenidos a partir de este tipo de análisis son solamente orientativos y resulta necesario realizar experimentos de mutagénesis dirigida para determinar si un gen en particular es esencial o no para la viabilidad de un microorganismo. Con el fin de confirmar la esencialidad de *mabR* en la viabilidad de *Mycobacterium*, en el laboratorio se trató de mutar este gen en *M. smegmatis* utilizando una estrategia de recombinación homóloga en dos pasos. Ante la imposibilidad de hacer una delección en *mabR* sin la presencia de una copia extra de dicho gen, se confirmó la esencialidad ya predicha por *Sassetti* para *mabR* de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis*. Esto fue sumamente novedoso ya que la mayoría de los reguladores de la biosíntesis de ácidos grasos descritos en bacteria no son esenciales para su viabilidad [135,138].

Entonces, dada la esencialidad de *mabR* para la viabilidad de *M. smegmatis* fue imposible generar una mutante nula en dicho gen para el análisis de su función biológica, por lo cual en primera instancia se evaluaron las consecuencias metabólicas de la unión de MabR al promotor del operón *fasII* en condiciones de sobreexpresión de *mabR<sub>MT</sub>* o *mabR<sub>MS</sub>* en *M. smegmatis*. En dichas cepas sobreexpresantes se vio que los niveles de expresión de los genes *fasII* se encontraban levemente reducidos [150], sugiriendo en un principio el rol de MabR como represor del operón *fasII*. Sin embargo, luego de una serie de consideraciones como las que se citaron en la **Introducción**, decidimos replantear los experimentos a fin de dilucidar el rol fisiológico de esta proteína en las micobacterias.

### 3.1.1 Objetivo

Teniendo en cuenta que el rol fisiológico de MabR como represor del operón *fasII* fue determinado en condiciones de sobreexpresión y conociendo las discordancias encontradas en cuanto a la localización de su sitio de unión en el ADN y el carácter activador de su ortólogo en *S. coelicolor*, nos propusimos como objetivo de esta parte del trabajo de Tesis dilucidar el rol fisiológico de MabR en la regulación de la síntesis de ácidos micólicos y determinar su implicancia en la interacción entre los sistemas FAS-I y FAS-II utilizando estrategias alternativas. Para ello, nos planteamos como objetivos específicos construir y caracterizar mutantes condicionales en *mabR* usando *M. smegmatis* como modelo de trabajo con el fin de conocer el impacto de la deficiencia de MabR en la expresión de los genes del operón *fasII* y la biosíntesis de ácidos micólicos, y estudiar el efecto que ésto podría tener en la homeostasis lipídica y la sobrevivencia de la bacteria.

La elección de *M. smegmatis* como modelo se basa en que MabR de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* comparten un 75% de identidad en sus secuencias aminoacídicas y las regiones promotoras de los operones *fasII*, definidas como las regiones intergénicas entre *mabR* y *fabD*, el primer gen del operón, tienen un 72 % de identidad en su secuencia nucleotídica. Además, mediante la técnica de 5' RACE, se determinó que el sitio de inicio de la transcripción del gen *fabD* de *M. smegmatis* coincide con el codón de inicio de la traducción del gen, al igual que en *M. tuberculosis* [150].

### 3.1.2 Resultados

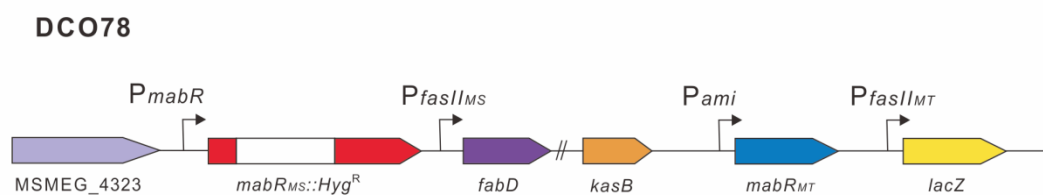
#### 3.1.2.1 Análisis de una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en *mabR*, inducible por acetamida

El rol de MabR como represor del operón *fasII* ha sido determinado en cepas de *M. smegmatis* salvaje que sobreexpresan *mabR<sub>MS</sub>* o *mabR<sub>MT</sub>* a partir de un promotor inducible por acetamida (*Pami*) en un vector multicopia. Con el fin de re-evaluar el rol fisiológico de MabR decidimos buscar una condición en donde los niveles de

expresión de *mabR* fuesen del orden sub-fisiológico, para lo cual elegimos trabajar con una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en *mabR* disponible en el laboratorio. Esta cepa denominada DCO78, cuenta con la copia endógena de *mabR* (*mabR<sub>MS</sub>*) interrumpida por un cassette de resistencia a higromicina y posee una copia complementante de *mabR* de *M. tuberculosis* integrada en el genoma, bajo el control del promotor *Pami* (Figura 11).

De esta manera, a pesar de expresar *mabR* bajo el control del mismo promotor (*Pami*) que en las cepas sobreexpresantes, se logró disminuir el número de copias del gen y por ende los niveles intracelulares del regulador. Es preciso señalar que la exitosa complementación de la mutante en *mabR* de *M. smegmatis* con *mabR* de *M. tuberculosis* sugiere que MabR<sub>MT</sub> y MabR<sub>MS</sub> tienen funciones similares en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.

Por otra parte, cabe destacar que esta cepa posee una fusión transcripcional de la región promotora del operón *fasII* de *M. tuberculosis* (*PfasII<sub>MT</sub>*) al gen de la β-galactosidasa (*lacZ*) de *E. coli*, integrada en el genoma. El fragmento fusionado de 272 pb corresponde a la zona intergénica entre *mabR* y *fabD*, el primer gen del operón *fasII* (Figura 11).

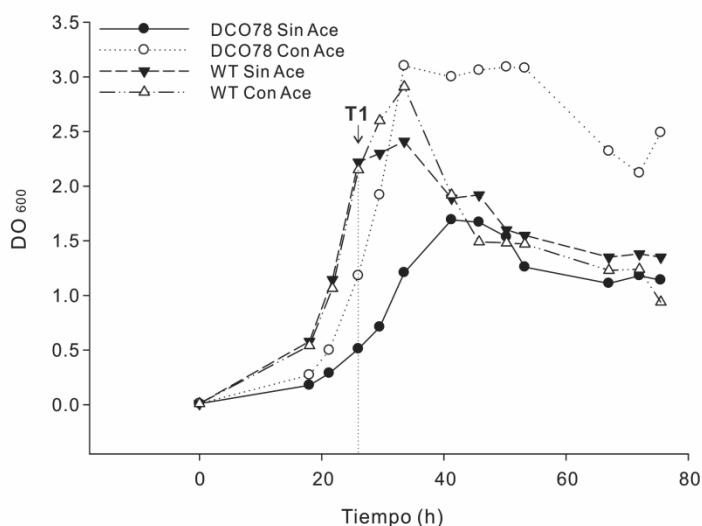


**Figura 11. Organización genética de la mutante condicional en *mabR*, DCO78.** La cepa DCO78 se encuentra complementada con *mabR<sub>MT</sub>*.

Partiendo de esta cepa construída en el laboratorio, se realizaron en primer lugar curvas de crecimiento en presencia y en ausencia del inductor acetamida y se evaluaron las diferencias en el crecimiento (Figura 12). Dado probablemente al carácter “leaky” del promotor *Pami*, la cepa mutante fue capaz de crecer aún en

ausencia del inductor, en principio, por expresión basal del regulador. Sin embargo, se observó una notoria diferencia en el crecimiento de la cepa inducida respecto de la no inducida. A fin de evaluar si esta diferencia en el crecimiento se debe a los niveles de MabR presentes en la célula o a la ventaja nutricional que eventualmente le podría estar aportando la acetamida (fuente adicional de carbono), se creció la cepa salvaje de *M. smegmatis* (WT) en presencia y en ausencia de acetamida como control del ensayo, y como resultado se observó que el crecimiento exponencial en ambas fue similar. Por lo cual, la diferencia observada en la mutante se debería eventualmente a los niveles intracelulares de MabR.

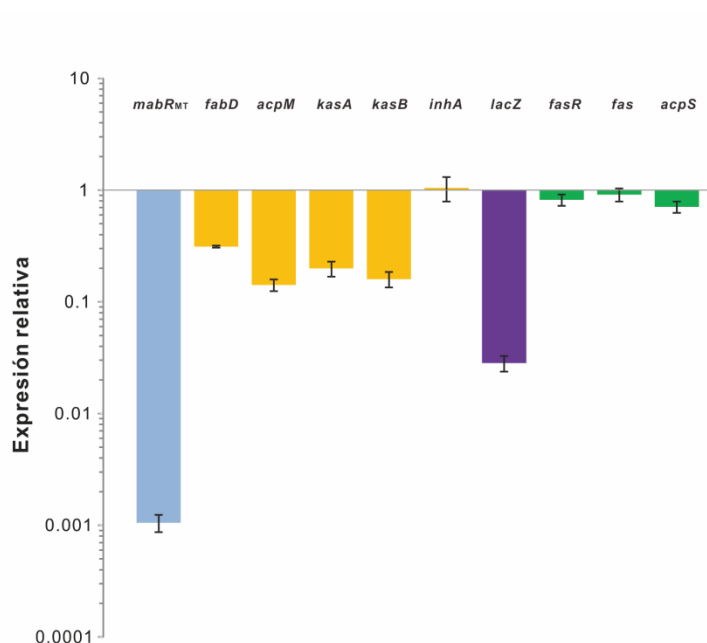
Para verificar la hipótesis planteada, se tomaron muestras de los cultivos de DCO78 en fase exponencial de crecimiento (T1) (Figura 12) y se analizaron por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) los niveles de expresión de *mabR<sub>MT</sub>* y de varios genes involucrados en el metabolismo lipídico de las micobacterias a fin de determinar su rol fisiológico y luego correlacionar estos resultados con los efectos en la viabilidad.



**Figura 12. Curvas de crecimiento de las cepas DCO78 y WT** crecidas a 37°C en medio 7H9 en ausencia y en presencia del inductor acetamida (Ace) 0.2% p/v, agregados al tiempo 0 de las curvas junto a la inoculación de los cultivos. El crecimiento de cada uno de estos cultivos fue seguido por densidad óptica (DO<sub>600nm</sub>).

Como se muestra en la Figura 13, en ausencia de acetamida la expresión de  $mabR_{MT}$  fue notablemente menor en comparación con la cepa inducida y la expresión de los genes del operón *fasII* se mostró claramente disminuída, sugiriendo el rol de MabR como activador transcripcional del operón *fasII*, al igual que su ortólogo en *S. coelicolor*, FasR<sub>SC</sub> [149]. La misma disminución fue observada al analizar la expresión del gen *lacZ*, cuya respuesta fue aún más drástica que la del operón *fasII* bajo el control del promotor *PfasII* de *M. smegmatis*. Esto nos estaría sugiriendo que la afinidad de unión de MabR de *M. tuberculosis* al promotor *PfasII* de *M. smegmatis* sería menor que la de un reconocimiento homólogo entre el par promotor-regulador de la misma especie.

A pesar de haber podido determinar el rol activador de MabR a nivel transcripcional comparando los niveles de expresión del operón *fasII* en la mutante DCO78 inducida respecto de la no inducida, nos resultó imposible correlacionar los niveles de expresión de  $mabR_{MT}$  en la cepa DCO78 con los niveles fisiológicos de los transcriptos de  $mabR_{MS}$  en la cepa salvaje, ya que los oligonucleótidos utilizados para los ensayos de qRT-PCR no reconocen secuencias heterólogas. Esto sumado a la imposibilidad de llevar a cabo ensayos de marcación con [<sup>14</sup>C] acetato por dilución isotópica de la marca radiactiva en presencia del inductor acetamida, nos llevó a la búsqueda de un sistema alternativo que ofrezca un control más regulado de la expresión del gen en estudio y que sea dependiente de otro inductor. Además, decidimos construir la nueva mutante condicional complementando con una copia extra de *mabR* de *M. smegmatis* a fin de poder correlacionar la concentración intracelular de MabR en la mutante respecto a la cepa salvaje y evaluar el efecto que genera la depleción de MabR sobre el metabolismo lipídico.



**Figura 13. Perfil transcripcional de la mutante DCO78 en el tiempo T1.** La expresión relativa de *mabR*, *fabD*, *acpM*, *kasA*, *kasB*, *inhA*, *lacZ*, *fasR*, *fas* y *acpS* fue determinada por PCR cuantitativa al tiempo T1 indicado en la Figura 12. El valor de corte de cada gen de interés fue normalizado con el gen *sigA*. Los valores representan el promedio de la diferencia entre la cepa DCO78 crecida en presencia de acetamida 0.2% p/v respecto a la misma cepa crecida en ausencia del inductor. El experimento fue realizado por triplicado a partir de muestras biológicas diferentes.

### 3.1.2.2 Construcción de una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en *mabR*, utilizando el sistema TetON

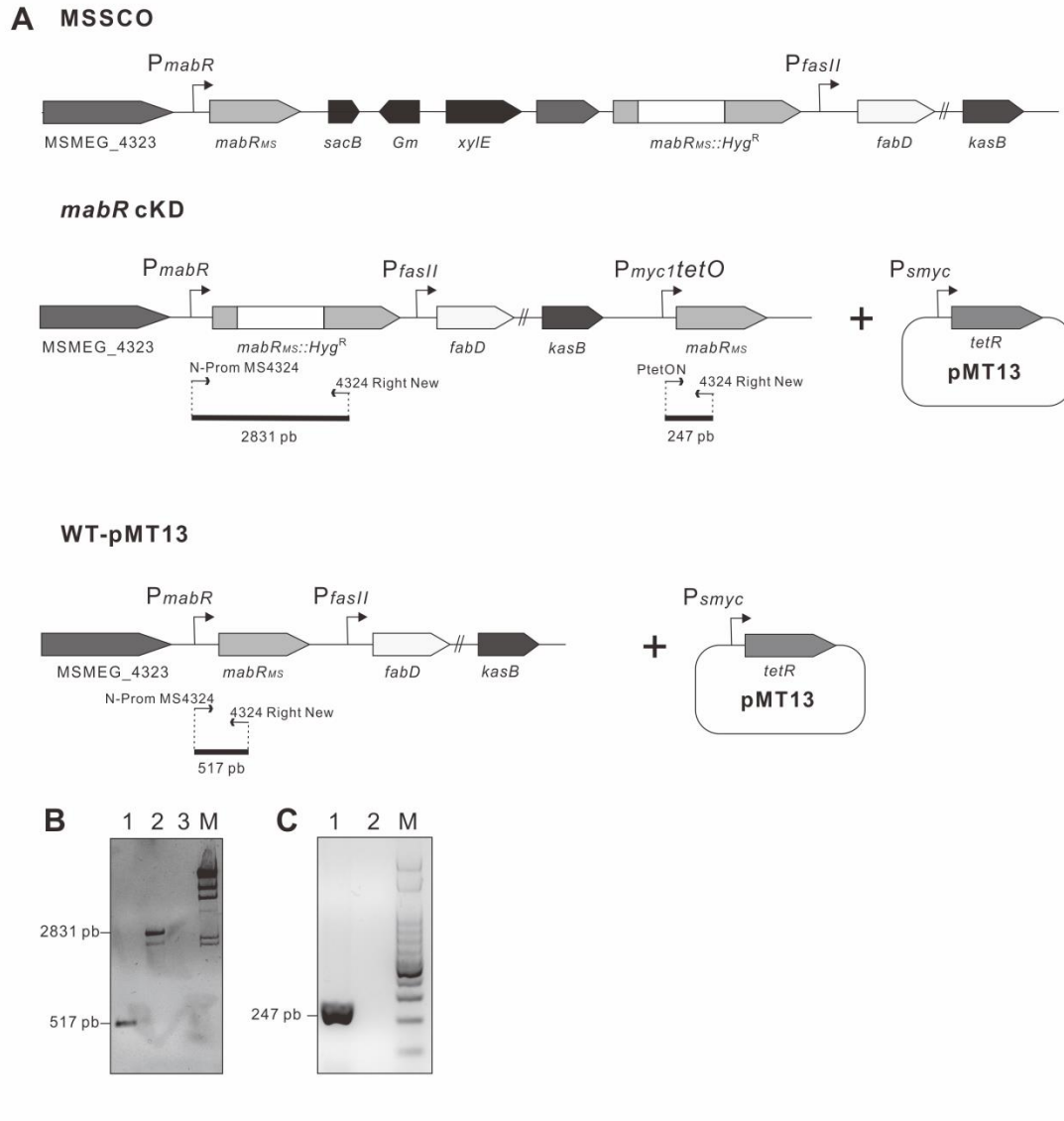
Con el fin de construir una cepa en la cual los niveles de MabR pudiesen ser regulados de una manera más controlada, decidimos utilizar un sistema de expresión basado en la represión mediada por el represor TetR, denominado sistema TetON [183]. Este sistema permite regular de forma estricta los niveles de expresión de un gen de interés, mediante la expresión constitutiva del regulador transcripcional TetR y la presencia o no del efector de dicho regulador, la anhidrotetraciclina (ATc). Con este sistema, en ausencia de ATc, el gen de interés se encuentra reprimido por acción de TetR; pero al adicionar ATc al medio de cultivo, ésta ingresa a la célula y se une a TetR, liberándolo de la zona operadora permitiendo así la expresión del gen de interés.

La estrategia consiste en clonar el gen de interés bajo el control del promotor  $P_{myc1tetO}$ , dependiente del regulador TetR y expresar de manera constitutiva el represor TetR a partir del promotor  $P_{smyc}$ , constitutivo en *Mycobacterium*.

Para la construcción de esta nueva mutante condicional en *mabR*, decidimos utilizar la cepa MSSCO previamente construída en el laboratorio [150], la cual posee dos copias de *mabR* integradas en el cromosoma, una interrumpida por el cassette de resistencia a higromicina (Hyg) y la otra salvaje bajo el control de su propio promotor (Figura 14A). La cepa MSSCO fue construída a partir de la integración de un plásmido termosensible por un simple evento de recombinación homóloga a través de la secuencia de *mabR* en el genoma de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. Esta integración insertó en el cromosoma una copia de *mabR* interrumpida por un cassette de Hyg (*mabR::hyg*). La selección de las recombinantes se basó en la resistencia a Hyg que le confiere el cassette integrado, y la capacidad de metabolizar el catecol (dando coloración amarilla a las colonias) y la sensibilidad a sacarosa que le confieren los genes *xylE* y *sacB*, presentes en el plásmido integrado (Figura 14A).

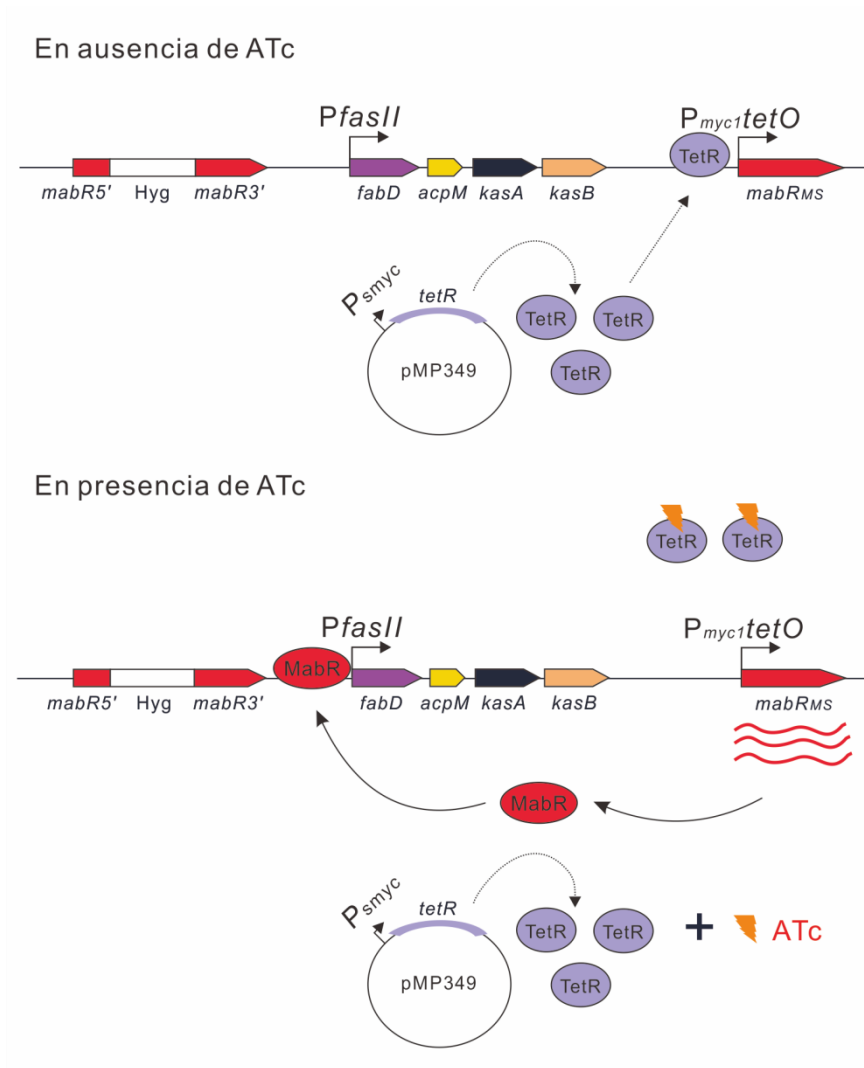
A continuación, a fin de delecionar la copia cromosómica de *mabR*<sub>MS</sub> presente en la cepa MSSCO mediante un segundo evento de recombinación y poder obtener una mutante donde *mabR* se exprese bajo el control de un promotor inducible, construimos una cepa merodiploide en *mabR*<sub>MS</sub> transformando la cepa MSSCO con dos plásmidos: pMT12 (plásmido integrativo con una copia salvaje de *mabR*<sub>MS</sub> bajo el control de  $P_{myc1tetO}$ ) y pMT13 (plásmido replicativo que expresa el represor TetR de manera constitutiva a partir del promotor  $P_{smyc}$ ). De esta manera se pudo lograr el intercambio alélico *mabR/mabR::hyg* y obtener una cepa mutante condicional en *mabR*<sub>MS</sub> por integración de una segunda copia bajo el control de TetR en el sitio de unión *attB* del fago L5 en el cromosoma. Esta cepa fue denominada *mabR* cKD (Figura 14A y Materiales y métodos). En ausencia de ATc, el inductor de este sistema de regulación génica, el represor TetR de expresión constitutiva se une al promotor  $P_{myc1tetO}$  inhibiendo la expresión de *mabR*. Ante el agregado de ATc, TetR sufre un cambio conformacional que lo despega de la zona operadora  $P_{myc1tetO}$  y consecuentemente *mabR* se expresa (Figura 15). Cabe resaltar que el segundo

evento sólo se pudo lograr en presencia de una copia adicional de *mabR*, dado su carácter esencial.



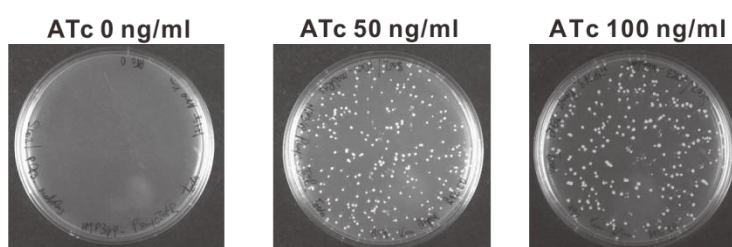
**Figura 14. Obtención de una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en *mabR* mediante el sistema TetON. (A)** Representación esquemática del locus *fasII* en las tres cepas derivadas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155: MSSCO, *mabR* cKD y WT-pMT13. **(B-C)** La organización genética para la mutante condicional en *M. smegmatis*, *mabR* cKD fue verificada a través de PCR utilizando ADN genómico como molde. **(B)** El reemplazo alélico intra-cromosomal legítimo en MSSCO que dio lugar a la mutante condicional *mabR* cKD fue verificado por PCR usando como oligonucleótidos N-Prom MS4324 y 4324 Right New. En el gel se muestran los productos de amplificación obtenidos a partir del ADN genómico de WT-pMT13 (calle 1) y *mabR* cKD (calle 2). Calle 3: Control negativo; M: Marcador de peso molecular  $\lambda$

*HindIII* (PB-L Productos Bio-Lógicos). (C) El par de oligonucleótidos PtetON and 4324 Right New fueron diseñados específicamente para la amplificación del constructo  $P_{myc1tetO}$ -*mabR*<sub>MS</sub>. En la calle 1 se puede observar el producto de amplificación obtenido a partir del ADN genómico de *mabR* cKD y en la calle 2, lo obtenido a partir del ADN genómico de WT-pMT13. M: Marcador de peso molecular ladder 100 pb (PB-L Productos Bio-Lógicos).



**Figura 15. Modelo del sistema regulador TetON para la mutante *mabR* cKD.** En ausencia de anhidrotetraciclina (ATc), TetR se une a sus regiones operadoras ( $P_{myc1tetO}$ ) corriente arriba del gen *mabR* apagando la transcripción del mismo. En presencia de ATc, ésta se une a TetR liberándolo de sus regiones operadoras, *mabR* se expresa y se une a la zona promotora del operón *fasII* ( $P_{fasII}$ ).

Las transformantes fueron seleccionadas en placas conteniendo Hyg-Kan-Am-sacarosa, en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de ATc. En ausencia de ATc, no se pudo recuperar ninguna colonia transformante, confirmando el rol esencial de MabR para la viabilidad de *M. smegmatis* (Figura 16). No obstante, en presencia de ATc 50 ng/ml, fue posible la obtención de transformantes, sugiriendo la esencialidad de la expresión de *mabR* para el normal crecimiento bacteriano. Cuando estas transformantes fueron rociadas con catecol, las colonias obtenidas presentaron una coloración blanquecina indicando que el segundo evento de recombinación había ocurrido satisfactoriamente dando lugar al reemplazo alélico intracromosomal *mabR/mabR::hyg*. De esta manera, todos los clones obtenidos deberían contar con la copia endógena de *mabR* interrumpida por el cassette de resistencia a Hyg y una copia extra de *mabR* integrada de manera ectópica en el genoma de la bacteria, cuya expresión se encuentra regulada por la presencia de ATc (Figura 14A). El genotipo de la cepa mutante *mabR cKD* fue confirmado por PCR a partir del ADN genómico extraído, usando dos pares de oligonucleótidos para tal fin (Figuras 14B y C). Como control, se utilizó como molde el ADN genómico de la cepa WT-pMT13, derivada de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 que lleva el plásmido pMT13 expresando de manera constitutiva TetR (Figura 14). Los resultados de las amplificaciones confirmaron la obtención de la mutante con el genotipo esperado.



**Figura 16. Selección de la mutante condicional *mabR cKD*.** El intercambio alélico intra-cromosomal *mabR/mabR::hyg* (Hyg<sup>r</sup>, Kan<sup>r</sup>, Am<sup>r</sup>, Sacarosa<sup>r</sup> y XylE<sup>r</sup>) fue obtenido únicamente en presencia del inductor ATc. Cuando se creció en placas de LB-Hyg-Kan-Am-sacarosa en ausencia de ATc, no se pudo recuperar ninguna colonia transformante.

La eliminación de la copia cromosómica de *mabR* mediante un doble evento de recombinación sólo pudo ser obtenido en presencia de una copia extra de *mabR*, en este caso bajo control de un promotor inducible por ATc,  $P_{myc1}tetO$ , confirmándose nuevamente la esencialidad postulada para *mabR* en *M. smegmatis*. Esta esencialidad junto a la de FasR remarca la importancia de una regulación estricta del metabolismo lipídico en las micobacterias, las cuales necesitan mantener un control muy preciso de la síntesis de sus ácidos grasos para ser viables, probablemente debido a la atípica longitud de los mismos, a la importancia de su rol tanto en el crecimiento como en el proceso infectivo y a la complejidad de su envoltura celular en general [184].

### 3.1.2.3 Caracterización de la cepa *mabR* cKD

La cantidad de herramientas genéticas disponibles para el desarrollo de mutantes condicionales en *Mycobacterium* es escasa y la mayoría no permite un control estricto de la expresión del gen en estudio. Los reguladores transcripcionales ejercen su función fisiológica a concentraciones muy bajas en comparación con las demás proteínas bacterianas. Por consiguiente, se decidió evaluar primero el crecimiento de la mutante *mabR* cKD a diferentes concentraciones del inductor ATc y comparar la misma con la cepa control WT-pMT13, *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 transformada con el plásmido pMT13.

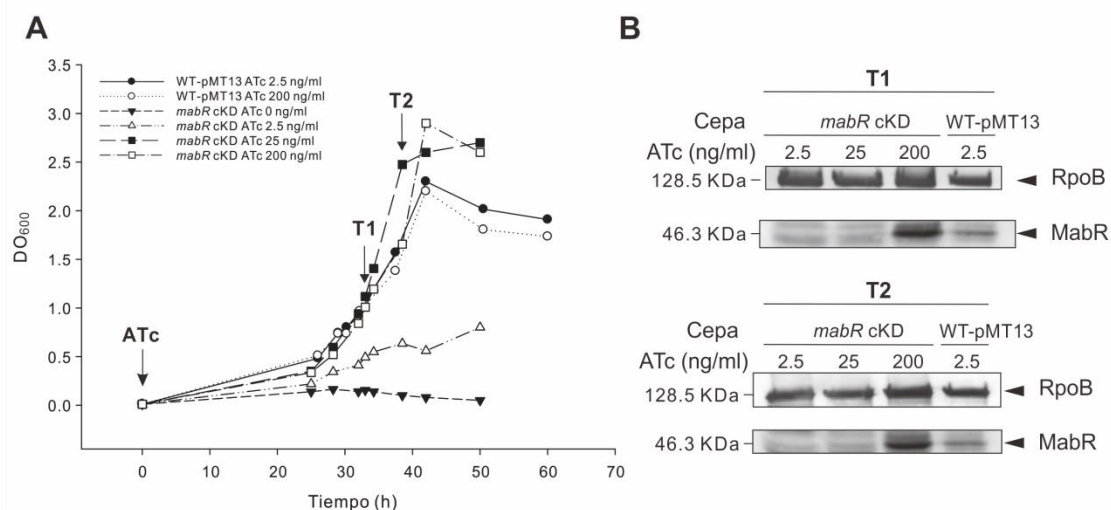
Para comenzar con esta caracterización ambas cepas fueron cultivadas a 37 °C en medio 7H9 suplementado con Am, en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes del inductor ATc, 2.5, 25 y 200 ng/ml, agregados al momento de la inoculación del cultivo. Luego se siguió el crecimiento bacteriano a través de la medida espectrofotométrica de los cultivos a 600 nm. En fase exponencial temprana (T1) y tardía (T2) de crecimiento se tomaron muestras de cada cultivo a partir de las cuales se prepararon extractos proteicos libres de células. Los mismos se analizaron por Western blot utilizando anticuerpos anti-MabR<sub>MS</sub> obtenidos en conejos.

Como puede verse en la Figura 17A, la suplementación del medio 7H9 con ATc 25 ng/ml permitió un normal crecimiento de la cepa mutante. Sin embargo, en

presencia de ATc 2.5 ng/ml, el crecimiento bacteriano fue claramente deficiente y en ausencia del inductor, donde la expresión de MabR sería nula, no se observó crecimiento. Este comportamiento en el desarrollo bacteriano se correlaciona de manera directa con los niveles de expresión de MabR en la célula, como se puede evidenciar a través de los ensayos de Western Blot de las muestras tomadas a distintos tiempos de las curvas (T1 y T2) (Figura 17B). A través del mismo ensayo, se determinó que el nivel de expresión de MabR<sub>MS</sub> en la mutante condicional crecida en presencia de ATc 2.5 ng/ml es menor al de la cepa parental WT-pMT13 a la misma concentración del inductor, por el contrario en presencia de ATc 200 ng/ml, la expresión de MabR supera a las cantidades presentes en la cepa control.

El crecimiento de la cepa parental WT-pMT13 no se mostró afectado por la presencia del inductor ATc, al menos hasta la máxima concentración de ATc ensayada, 200 ng/ml. A su vez, como puede verse en la Figura 17A, la cinética de crecimiento de la cepa mutante *mabR* cKD en presencia de ATc  $\geq 25$  ng/ml es similar a la de la cepa parental WT-pMT13, particularmente en la fase exponencial.

De esta manera, podemos concluir que la expresión de *mabR* a partir del promotor P<sub>*myc1tetO*</sub> es dependiente de la dosis de ATc suministrada al medio y el nivel de expresión resultante se correlaciona con el crecimiento bacteriano. A su vez, podemos observar que existe un umbral de expresión de *mabR* a partir del cual la bacteria crece normalmente. Hemos encontrado así un sistema de regulación estricta de la expresión de *mabR*.



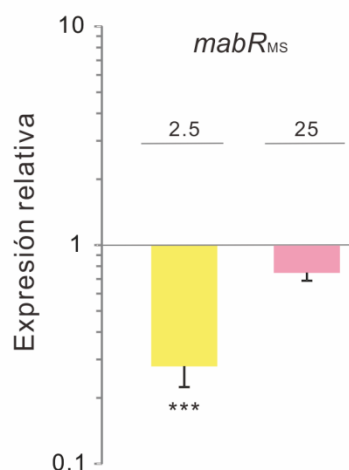
**Figura 17. (A) El crecimiento de la cepa *mabR* cKD responde a las distintas concentraciones de *MabR*.** Las cepas WT-pMT13 y *mabR* cKD fueron crecidas a 37 °C en medio 7H9 suplementado con Am, en ausencia y en presencia de ATc 2.5, 25 and 200 ng/ml agregados al tiempo 0 de las curvas junto a la inoculación de los cultivos. El crecimiento de cada uno de estos cultivos fue seguido por densidad óptica (DO<sub>600</sub>). Las muestras para los ensayos de Western blot fueron tomadas en los tiempos T1 y T2 señalados en las curvas. **(B)** Análisis por Western blot de extractos proteicos libre de células de la cepa *mabR* cKD crecida en presencia de 3 concentraciones distintas de ATc (2.5, 25 y 200 ng/ml). Como control sembramos el lisado celular de la cepa WT-pMT13 crecida en presencia de ATc 2.5 ng/ml. Las muestras fueron tomadas en fase exponencial temprana (T1) y tardía (T2) de crecimiento. La siembra fue normalizada por cantidad de proteína. La detección fue realizada utilizando anticuerpos anti-MabR<sub>MS</sub> obtenidos en conejo. La detección de RpoB sirvió como control de carga.

### 3.1.2.4 *MabR* es un activador del operón *fasII* in vivo

A partir de los ensayos de Western Blot se pudo determinar la condición en la mutante donde la concentración intracelular de MabR es del orden sub-fisiológico. Con el fin de corroborar que los niveles del transcripto de *mabR* en la mutante crecida en presencia de ATc 2.5 ng/ml eran menores a los de la cepa parental WT-pMT13, cuantificamos los niveles del ARNm correspondiente por PCR en tiempo real (qRT-PCR) utilizando el método de Pfaffl [180].

Como puede observarse en la Figura 18, la transcripción de *mabR* se encuentra severamente reprimida en la mutante crecida en presencia de ATc 2.5 ng/ml, en concordancia con lo obtenido en los experimentos de Western blots. Esta condición

fue entonces seleccionada para el estudio del impacto de la deficiencia de MabR sobre el metabolismo lipídico.



**Figura 18. Expresión relativa de *mabR<sub>MS</sub>* medida por qRT-PCR en T2.** Niveles de transcritos de *mabR* medidos por qRT-PCR en la cepa *mabR*-cKD crecida en presencia de ATc 2.5 o 25 ng/ml respecto a la cepa parental WT-pMT13 crecida en presencia de las mismas concentraciones de ATc. La normalización se realizó utilizando el transcripto de *sigA<sub>MS</sub>* como invariable. La significancia estadística fue determinada utilizando el test *t* de Student desapareado de dos colas. \*\*\* $p < 0.001$ .

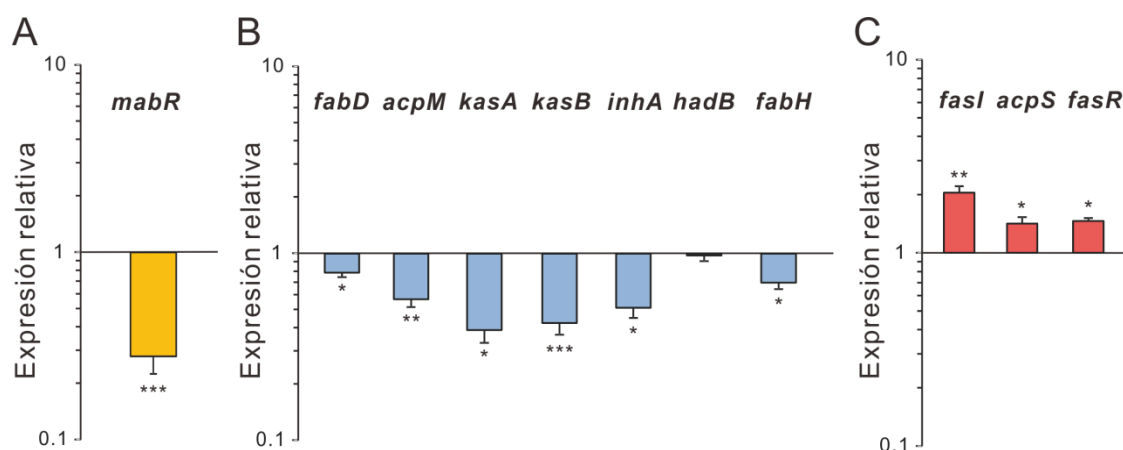
Con el fin de indagar el rol de MabR en la regulación transcripcional de los genes involucrados en la biosíntesis de ácidos micólicos, se analizó en primer lugar la expresión de los genes del operón *fasII*, donde se ha demostrado *in vitro* una unión directa del promotor *PfasII* de *M. tuberculosis* al regulador MabR de la misma especie. Para ello, se crecieron las cepas *mabR* cKD y WT-pMT13 en medio 7H9 suplementado con ATc 2.5 ng/ml (Figura 17A) y se tomaron muestras de cada cultivo en fase exponencial tardía (T2) de crecimiento para la extracción de los ARNs. Los ARNs purificados fueron sometidos a retrotranscripción (RT) utilizando hexanucleótidos degenerados y los ADNc resultantes fueron utilizados para determinar las cantidades relativas de *fabD*, *acpM*, *kasA* y *kasB* por PCR cuantitativa en tiempo real, comparando el perfil de expresión de la mutante *mabR* cKD en presencia de cantidades sub-fisiológicas de MabR respecto de la condición control en

la cepa WT-pMT13. Como se muestra en la Figura 19B, ante una expresión disminuída de MabR, se presenta una caída en la expresión de los genes del operón *fasII*, el cual codifica para la enzima malonil-coA:AcpM transacilasa (FabD), las dos  $\beta$ -cetoacil AcpM sintasas del sistema FAS-II (KasA y KasB), así como también para la proteína transportadora de acilos, AcpM. De esta manera, logramos confirmar la naturaleza activadora de MabR sobre la expresión del operón *fasII*. Sin embargo, también se puede observar que la expresión de *fabD* es levemente diferente al resto de los genes del operón.

Para profundizar aún más en el estudio de la red regulatoria involucrada en la biosíntesis de ácidos micólicos, se estudió la expresión de otros genes que codifican para componentes del sistema FAS-II pero que se encuentran localizados en otros loci dentro del genoma de *M. smegmatis*, como ser *inhA* y *fabH*. Como puede verse en la Figura 19B, estos genes al igual que los del operón *fasII* cuentan con una expresión reducida ante una deficiencia de MabR, por lo que se podría especular sobre la existencia de una regulación global que se dispara ante una señal de estrés generalizado, generada a raíz de una actividad disminuída del sistema FAS-II.

Por otra parte, también se estudió la expresión del operón *fas-acpS* que codifica para la sintasa multidominio FAS-I y la fosfopanteteinil transferasa AcpS, a fin de indagar acerca de la co-regulación entre los sistemas FAS-I y FAS-II involucrada en la homeostasis lipídica. Como puede verse en la Figura 19C, este operón se encuentra activado ante una deficiencia del regulador MabR, sugiriendo una comunicación entre los dos sistemas de sintasa de ácidos grasos a fin de restaurar el equilibrio lipídico perturbado por la depleción de MabR y la consecuente reducción de los componentes del sistema FAS-II.

Los resultados obtenidos confirman el rol regulatorio de MabR como activador transcripcional del operón *fasII* y a su vez dan indicio de una comunicación entre los dos sistemas FAS ya que en presencia de niveles sub-óptimos de MabR, la expresión de los genes que codifican para los otros componentes del metabolismo lipídico central, FAS-I y FAS-II, también se encuentra afectada.



**Figura 19. Perfil transcripcional de los genes relacionados con las síntesis de AM y ácidos grasos ante una deficiencia de MabR en el tiempo T2.** Niveles de transcritos de *mabR*, *fabD*, *acpM*, *kasA*, *kasB*, *inhA*, *hadB*, *fabH*, *fasI*, *acpS* y *fasR* medidos por qRT-PCR en la cepa *mabR*-cKD crecida en presencia de ATc 2.5 ng/ml respecto a la cepa parental WT-pMT13 crecida en presencia de la misma concentración de ATc. La normalización se realizó utilizando el transcritos de *sigA<sub>MS</sub>* como invariable. La significancia estadística fue determinada utilizando el test *t* de Student desapareado de dos colas. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 3.1.2.5 La deficiencia de MabR impacta negativamente sobre la biosíntesis de novo de ácidos micólicos

Con el fin de estudiar las consecuencias fisiológicas de la disminución en el contenido intracelular de MabR, se realizaron experimentos de marcación con [<sup>14</sup>C] acetato y se analizó el perfil de ácidos grasos y ácidos micólicos en la mutante condicional *mabR* cKD. A las 33 hs (T1), 38 hs (T2) y 43 hs posteriores al agregado de ATc (en 3 concentraciones distintas: 2.5, 5 y 25 ng/ml), se marcaron 5 ml de cada cultivo con [<sup>14</sup>C] acetato durante 1 h. Como control del ensayo se procesaron las muestras provenientes de los cultivos de WT-pMT13 en los mismos estadios de crecimiento y crecidos con las mismas concentraciones del inductor que la mutante *mabR* cKD. Los lípidos se extrajeron de las células y se metilaron utilizando

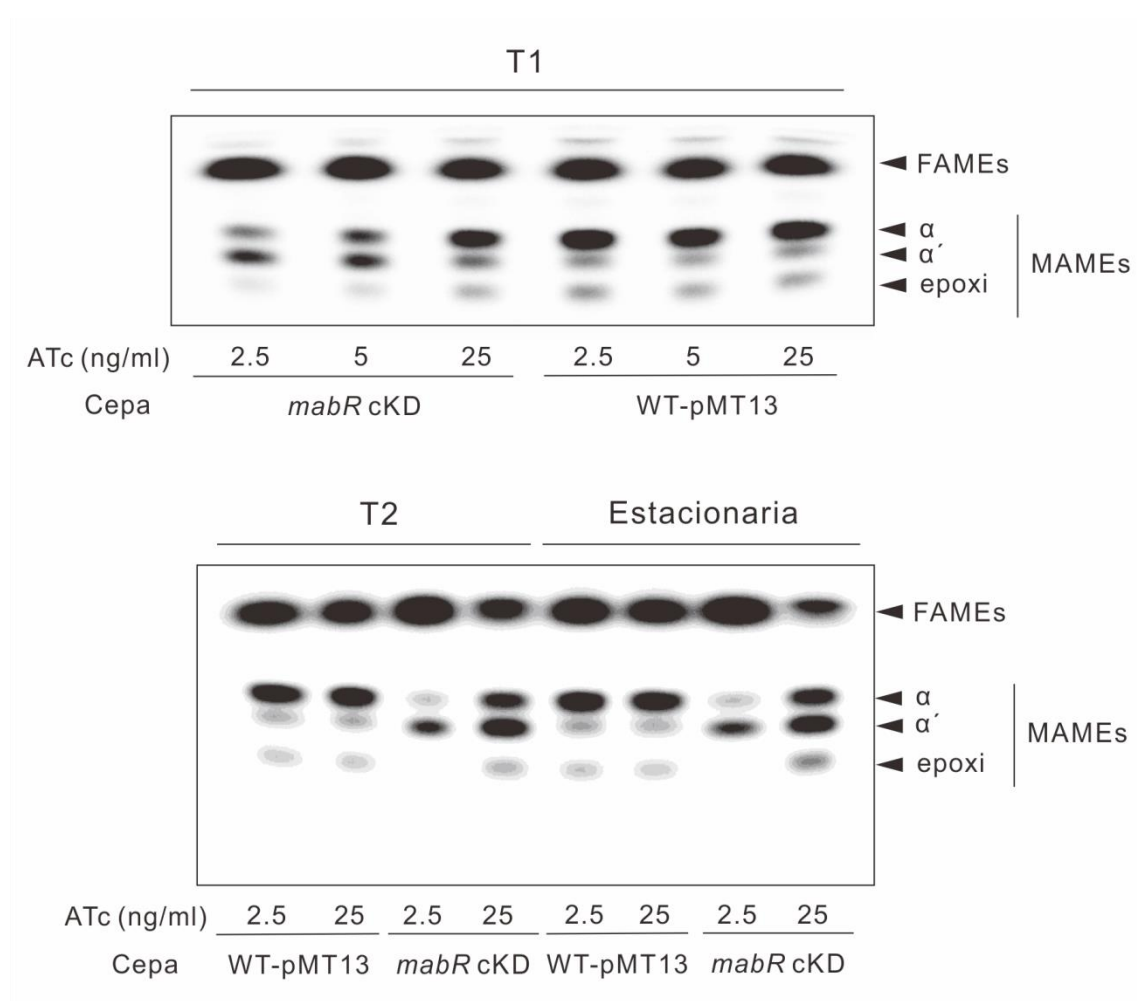
yodometano. Los metil ésteres derivados de ácidos grasos (FAMEs) y ácidos micólicos (MAMEs) obtenidos se sometieron a TLC seguida de autoradiografía, normalizando la siembra por cantidad total de marca (igual número de cpm).

Como se muestran en la Figuras 20 y 21, la biosíntesis *de novo* de ácidos micólicos se ve fuertemente reprimida cuando la cantidad intracelular de MabR se encuentra por debajo de los niveles fisiológicos del regulador, como ocurre con la cepa *mabR* cKD crecida en presencia de ATc 2.5 ng/ml; esta represión se acentúa conforme progresa el tiempo de cultivo. De acuerdo al rol fisiológico postulado para MabR en la activación de la expresión de las enzimas que participan en el sistema FAS-II para la síntesis de la cadena meromicólica de los ácidos micólicos, era de esperar que ante una expresión deficiente de MabR, la biosíntesis de ácidos micólicos se vea afectada de manera negativa. Sin embargo, se puede observar que la síntesis de la especie  $\alpha'$  de los ácidos micólicos no se ve afectada en la misma magnitud que las especies  $\alpha$  y epoxi (Figuras 20 y 21).

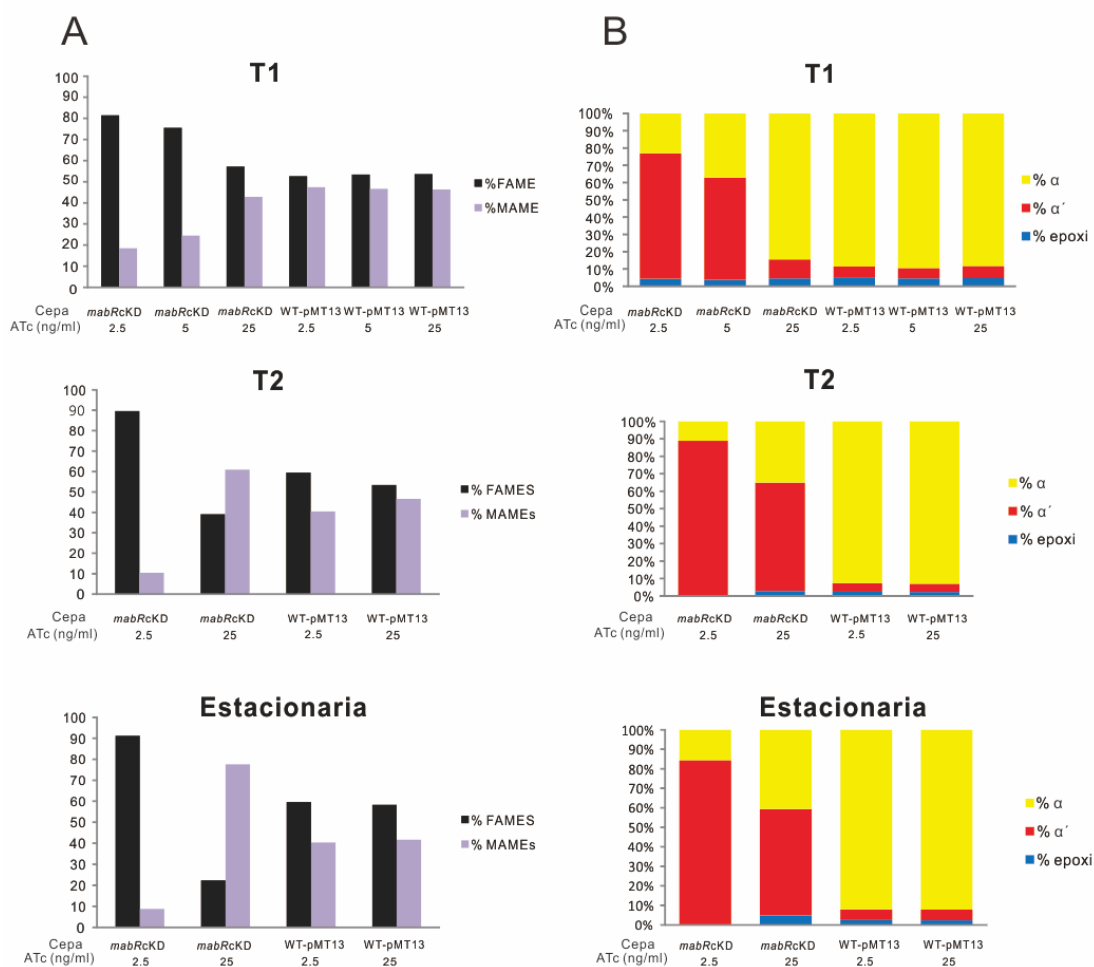
En contraposición, se puede observar en la Figura 20 que la biosíntesis de ácidos grasos no se encuentra afectada aún ante una disminución exacerbada de la biosíntesis de ácidos micólicos, dando indicio de un normal funcionamiento del sistema FAS-I. Sin embargo, esto resultó ser insuficiente para rescatar a las micobacterias de la muerte celular, dado al rol esencial de los ácidos micólicos para la arquitectura de la pared celular.

Por otra parte, a pesar de que la cepa *mabR* cKD suplementada con ATc 25 ng/ml presente niveles de MabR similares a los encontrados en WT-pMT13, y que consecuentemente no se haya observado alteraciones en la biosíntesis *de novo* de ácidos micólicos (Figura 20), aún se pueden detectar diferencias en la abundancia relativa de las tres clases de MAMEs (Figura 21B). Para el tiempo T2, las composiciones relativas de los  $\alpha$ -,  $\alpha'$ - y epoxi-micólicos en la cepa WT-pMT13 cultivada en presencia de ATc 2.5 y 25 ng/ml resultaron ser idénticas entre sí; 93, 4.5 y 2.5%, respectivamente, mientras que el perfil obtenido para la cepa *mabR* cKD cultivada en presencia de ATc 25 ng/ml fue de 35, 62 y 3%, respectivamente, mostrando un aumento significativo en la abundancia de los  $\alpha'$ -micólicos (62%) con

una reducción compensatoria de los  $\alpha$ -micólicos. Nuevamente, se puede ver que dentro de la baja cantidad de ácidos micólicos sintetizados *de novo* en *mabR* cKD cultivada en presencia de ATc 2.5 ng/ml, existe una prevalencia de los  $\alpha'$ -micólicos (89%) en comparación con las otras especies (Figura 21B).



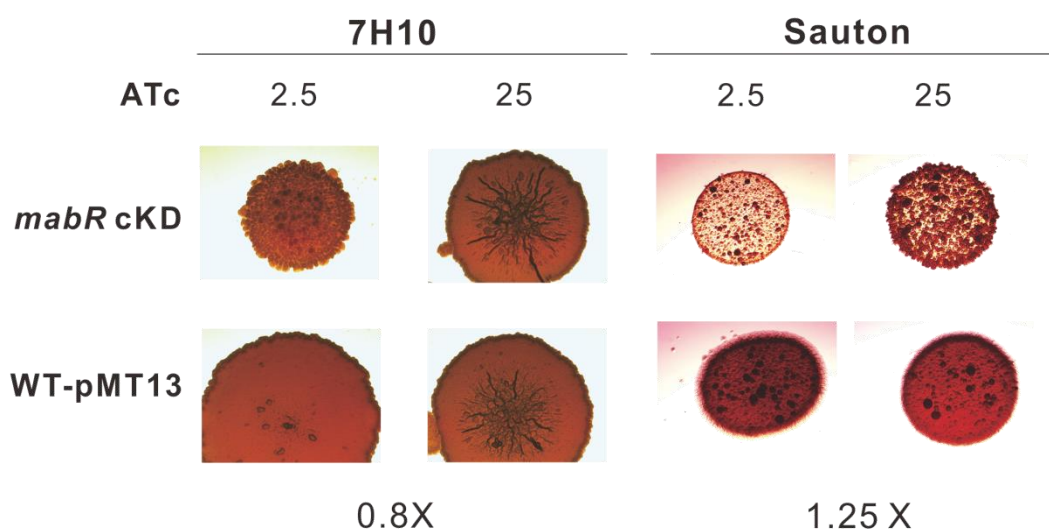
**Figura 20. Biosíntesis *de novo* de ácidos micólicos ante una expresión reducida de MabR** Cromatografía en capa delgada (TLC) de ácidos grasos y ácidos micólicos derivatizados a partir de cultivos de *mabR* cKD y WT-pMT13 crecidos en presencia de ATc 2.5, 5 y 25 ng/ml, en 3 estadios de crecimiento: fase exponencial temprana (T1), exponencial tardía (T2) y estacionaria temprana. La distribución de marca entre las distintas especies de ácidos micólicos varía entre las cepas *mabR* cKD y WT-pMT13, siendo predominante la especie  $\alpha'$  en la mutante *mabR* cKD. FAME: Metil éster de ácido graso; MAME: Metil éster de ácido micólico.



**Figura 21. Cuantificación de las marcas radioactivas presentes en las cromatografías en capa delgada de la Figura 20. (A)** Distribución relativa de FAMES y MAMES, en los 3 tiempos indicados (T1, T2 y estacionaria), de la mutante *mabR* cKD y la cepa parental WT-pMT13 crecidas en presencia de 2.5, 5 y 25 ng/ml de ATc. **(B)** Distribución relativa de las tres especies de MAMES en los tiempos T1, T2 y fase estacionaria, para las muestras provenientes de la mutante *mabR* cKD y la cepa parental WT-pMT13 crecidas en presencia de 2.5, 5 y 25 ng/ml de ATc.

De acuerdo a los resultados expuestos, la severa caída de la expresión del operón *fasII*, ocasionada por depleción de MabR, conduce a la disminución de la producción de ácidos micólicos. Estudios previos donde se vio alterada la síntesis de ácidos micólicos por mutagénesis de los genes biosintéticos o por efecto de inhibidores del sistema FAS-II [34,185], mostraron cambios en el metabolismo lipídico

que se tradujeron en severas modificaciones fisiológicas y estructurales del microorganismo. Por consiguiente, nos propusimos analizar si la presencia de niveles sub-fisiológicos de MabR en la mutante condicional se traducía en algún efecto observable a nivel macroscópico. Para esto, alícuotas de 2 µl de cultivo de las cepas *mabR* cKD y WT-pMT13, crecidas hasta saturación en medio 7H9 suplementado con ATc 50 ng/ml y lavadas posteriormente con medio fresco, fueron sembradas en placas de Petri con medio 7H10 o Sauton agar, suplementado con el colorante Rojo Congo, en presencia de dos concentraciones de ATc: 2.5 y 25 ng/ml. En primer lugar, se encontró que en condiciones de depleción de MabR (placas de *mabR* cKD con ATc 2.5 ng/ml) las colonias presentaron un tamaño mucho menor en comparación a las colonias de la cepa parental WT-pMT13, denotando menor crecimiento. Además, estos puntos de siembra mostraron una morfología claramente diferente a la cepa control (WT-pMT13) en los medios utilizados (7H10 y Sauton), debido probablemente a una deficiencia más global en la síntesis de los componentes de la pared celular que contienen ácidos micólicos (Figura 22).



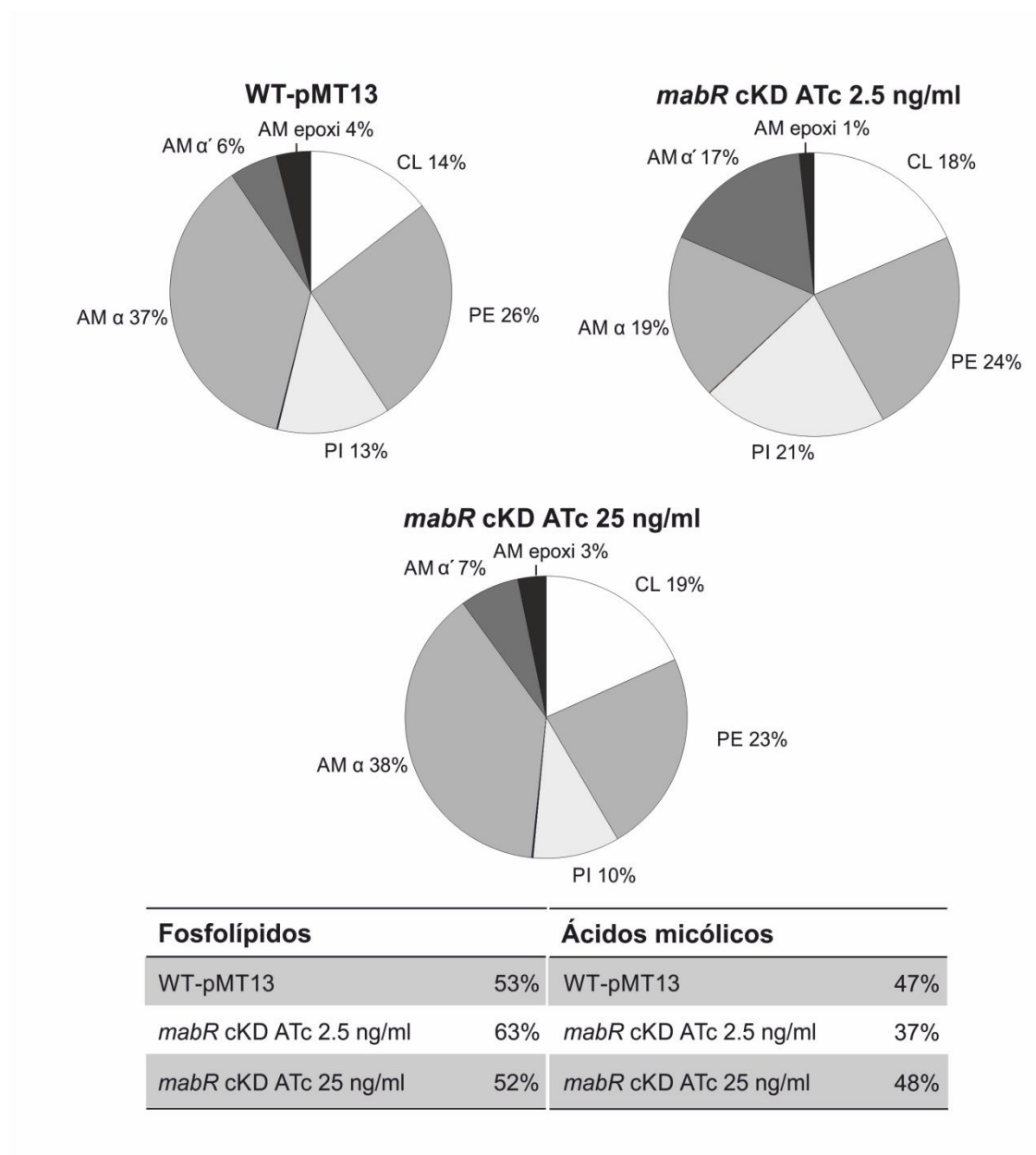
**Figura 22. Consecuencias fenotípicas de la deficiencia de *mabR* en *M. smegmatis*.** Dos microlitros de cultivos saturados de *mabR* cKD y WT-pMT13 fueron sembrados por triplicado en placas con medio 7H10 y Sauton-Agar conteniendo 100 mg/ml de Rojo Congo, en presencia de ATc 2.5 o 25 ng/ml. Las placas fueron incubadas de 3 a 5 días a 37 °C. Se tomaron fotos con 0.8 y 1.25 veces de aumento.

3.1.2.6 *La composición lipídica de M. smegmatis se encuentra globalmente afectada ante la presencia de cantidades sub-fisiológicas de MabR*

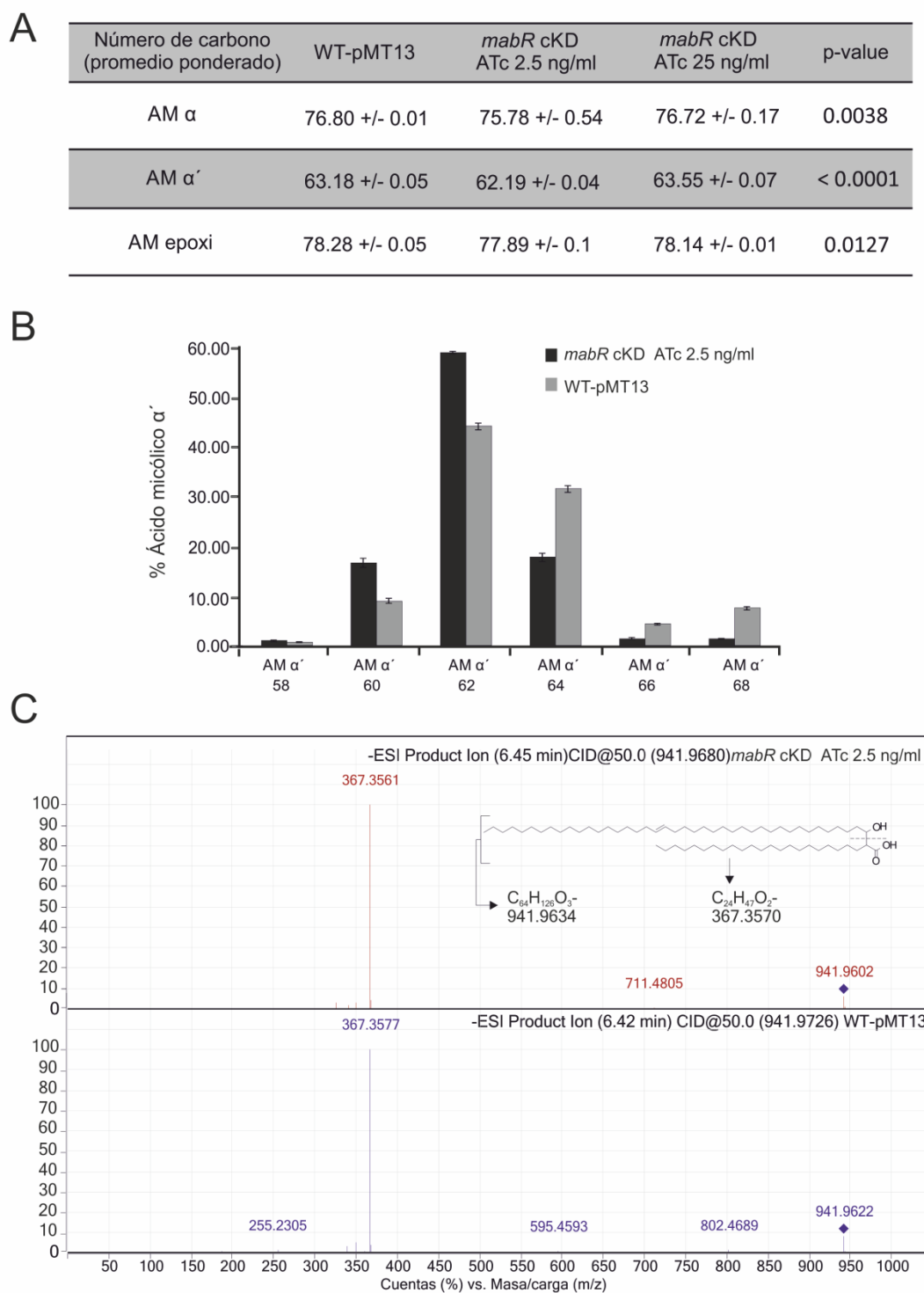
Basándonos en los resultados obtenidos para la síntesis *de novo* de ácidos micólicos ante una deficiencia de MabR, decidimos ampliar nuestros estudios y determinar el impacto de los niveles sub-fisiológicos de MabR en el perfil lipídico global. Para lo cual, se realizó un análisis lipídico comparativo entre la mutante condicional *mabR* cKD y su cepa parental WT-pMT13. Se extrajeron los lípidos de la mutante condicional cultivada en presencia de ATc 2.5 y 25 ng/ml y se analizó el contenido de lípidos totales por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrómetro de masas (HPLC-MS). Como control, se extrajeron y analizaron los lípidos de la cepa control WT-pMT13 cultivada en presencia de ATc 2.5 ng/ml. La Figura 23 muestra los resultados obtenidos para el análisis lipídico llevado a cabo en modo negativo. Las diferencias más significativas se encontraron en el contenido y la composición relativa de los ácidos micólicos, como se observó previamente por TLC de muestras marcadas con [<sup>14</sup>C] acetato, donde la mutante cultivada en presencia de ATc 2.5 ng/ml mostró una disminución significativa de ácidos micólicos en comparación con la cepa control, siendo predominante la especie  $\alpha'$ -micólico. Cabe destacar además que hay una reducción en el tamaño de las moléculas de ácidos micólicos, en promedio un carbono más corto en la mutante con niveles reducidos de MabR (Figuras 24A y 24B). Haciendo un análisis más detallado por espectrometría de masas en tándem (MS-MS) de las distintas especies de ácidos micólicos, se demostró que la cadena  $\alpha$  de los ácidos micólicos en ambas cepas cultivadas en presencia de ATc 2.5 ng/ml contiene principalmente 24 átomos de carbono, por lo que la diferencia de longitud en estas moléculas corresponde a la cadena del ácido meromicólico (Figura 24C). Por otra parte, la composición relativa de los fosfolípidos mostró un efecto más sesgado hacia la población de fosfatidilinositol (PI), donde se observó un incremento significativo del mismo en presencia de niveles sub-fisiológicos de MabR (Figura 23).

A su vez se analizaron en modo positivo los lípidos complejos que contienen ácidos micólicos, tales como glicerol monomicolato (GroMM), monomeromicolil

diacilglicerol (MMDAG) o trehalosa monomicolato (TMM). Como se puede observar en la Tabla 7, hay una disminución en los niveles de estas especies en presencia de niveles sub-fisiológicos de MabR (*mabR* cKD ATc 2.5 ng/ml). Este resultado refleja el impacto que este regulador transcripcional ejerce en todas las moléculas que contienen ácidos micólicos. Sin embargo, el contenido relativo de otros lípidos neutros tales como diacilglicerol (DAG) y triacilglicérido (TAG) no se vio afectado; aunque el tamaño promedio de las cadenas aciladas de los TAGs es menor en la mutante condicional *mabR* cKD cultivada en presencia de ATc 2.5 ng/ml (Figuras 25A y 25B).



**Figura 23. Análisis por HPLC-MS de los fosfolípidos y ácidos micólicos presentes en las cepas *mabR* cKD y WT-pMT13.** Los valores indicados representan la abundancia relativa de las señales MS correspondientes a las diferentes clases lipídicas encontradas en las muestras. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. AM: ácidos micólicos, CL: cardiolipina, PE: fosfatidiletanolamina, PI: fosfatidilinositol.

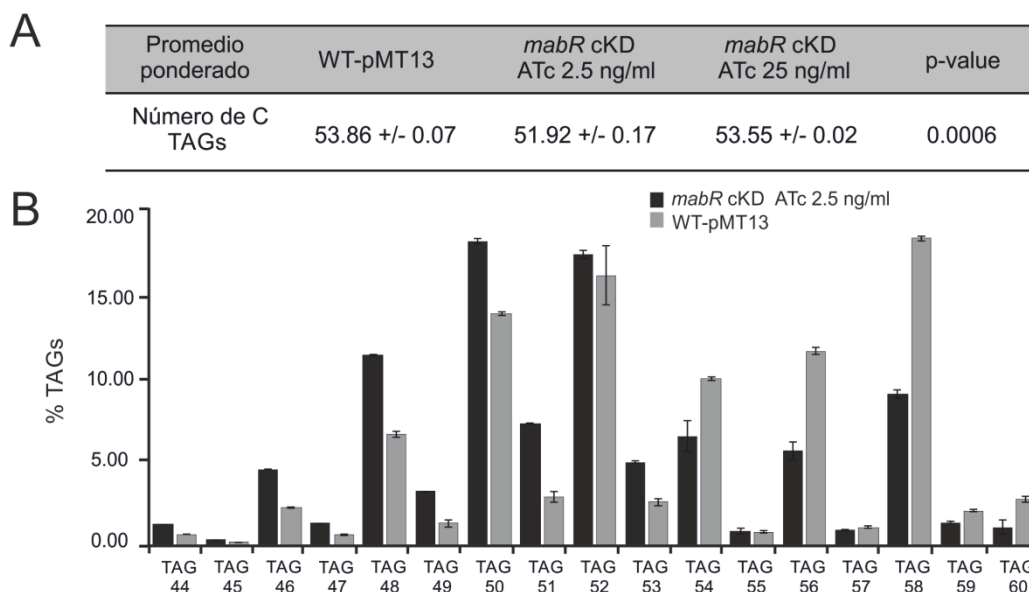


**Figura 24. Análisis detallado de las especies moleculares de ácidos micólicos. (A)** En la tabla se muestra el promedio ponderado del número total de átomos de carbono por molécula dentro de la población de AM  $\alpha$ ,  $\alpha'$  y epoxi libres, en las muestras provenientes de cultivos de *mabR* cKD y WT-pMT13. Los resultados que se muestran son el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). El p-value se calculó utilizando el test  $t$  desapareado con la corrección de

Welch entre WT-pMT13 y *mabR* cKD ATc 2.5 ng/ml. **(B)** El gráfico muestra la distribución del número de carbono de AM  $\alpha'$  libres en *mabR* cKD ATc 2.5 ng/ml y WT-pMT13. **(C)** Tanto el espectro de masas en tándem del AM  $\alpha'$  de 64 átomos de carbono (941,97 m / z) proveniente de WT-pMT13 como el proveniente de *mabR* cKD ATc 2.5 ng/ml presenta la señal de la cadena alfa de 24 átomos de carbono (367,35 m/z). En la figura se muestra el sitio en la estructura AM donde se produjo la fragmentación.

Cepa	TAG (%)	MMDAG (%)	DAG (%)	TMM (%)	GroMM(%)
WT-pMT13	95.7	3.02	0.61	0.47	0.17
<i>mabR</i> cKD ATc 2.5 ng/ml	98.6	0.71	0.54	0.1	0.05
<i>mabR</i> cKD ATc 25 ng/ml	96.3	2.82	0.46	0.3	0.14

**Tabla 7. Análisis por HPLC-MS de los triacilglicéridos (TAG) y otros lípidos neutros presentes en la mutante *mabR* cKD y la cepa parental WT-pMT13.** Los valores indicados representan la abundancia relativa de las señales MS correspondientes a las diferentes clases lipídicas encontradas en las muestras. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. TAG: triacilglicérido; GroMM: glicerol monomicolato; TMM: trehalosa monomicolato; DAG: diacilglicerol; MMDAG: monomeromicolil diacilglicerol.



**Figura 25. Análisis detallado de las especies moleculares de TAG. (A)** La tabla muestra el promedio ponderado del número total de átomos de carbono por molécula dentro de la población de TAG de las diferentes muestras. Los resultados representan la media de tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar. El p-value se calculó utilizando el test *t* desapareado con la corrección de Welch entre las muestras provenientes de *mabR* cKD en presencia de ATc 2.5 ng/ml y WT-pMT13. **(B)** El histograma muestra la distribución de tamaño de los TAG (en número de carbonos) de las muestras provenientes de *mabR* cKD en presencia de ATc 2.5 ng/ml y de WT-pMT13.

### 3.1.3 Discusión

La envoltura externa de *M. tuberculosis* es una barrera de permeabilidad altamente eficaz que contiene muchos determinantes antigénicos y es esencial para la viabilidad celular y la virulencia de esta especie bacteriana. Uno de los componentes principales de esta envoltura son los ácidos micólicos, que desempeñan un papel central en el proceso de infección y persistencia dentro del huésped. Durante el proceso de infección, la bacteria debe adaptarse continuamente a diversas condiciones ambientales mediante la regulación de su metabolismo energético y la composición de su pared celular. Para controlar finamente la biosíntesis de la pared celular, *M. tuberculosis* emplea diversas estrategias sofisticadas de regulación, como la regulación transcripcional de los genes implicados en el metabolismo lipídico [110,150,164] o la modulación de la actividad de las enzimas claves en la biosíntesis de ácidos micólicos por modificación postraduccional [151,152,186]. Estos mecanismos se asemejan a los empleados por otras bacterias para controlar su metabolismo de ácidos grasos, como han sido bien estudiado en *E. coli* [133,140,187], *S. pneumoniae* [138] y *B. subtilis* [131,135]. De esta manera, al ajustar los niveles y las actividades de las enzimas de la biosíntesis de ácidos micólicos, las micobacterias podrían alcanzar un equilibrio constante entre la biosíntesis de la membrana plasmática y la de su compleja pared celular.

Sin embargo, a diferencia de los reguladores transcripcionales implicados en el metabolismo lipídico de otras bacterias, MabR de *M. smegmatis* ha demostrado ser esencial para la viabilidad celular al igual que FasR [110,150], lo que sugiere un rol clave de estas proteínas en el mantenimiento de la homeostasis lipídica en este microorganismo mediante la coordinación de los dos sistemas de sintasa de ácidos grasos, FAS-I y FAS-II.

En este capítulo, a través de la construcción de una mutante condicional en *mabR*, se pudo regular la expresión de MabR y estudiar la respuesta fisiológica de la célula ante niveles subóptimos de este regulador transcripcional. Mediante estudios de complementación *in vivo*, llevados a cabo con la mutante condicional *mabR cKD*, se logró demostrar que MabR es un activador transcripcional del operón *fasII*. Las

secuencias de unión a MabR en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* se localizan a -87 y -147 pb de los sitios de inicio de la transcripción en los respectivos promotores *P<sub>fasII</sub>*, que corresponden en la mayoría de los casos, a regiones operadoras reconocidas por activadores transcripcionales, en concordancia con la función reguladora de MabR descrita en este capítulo [166]. A su vez, el carácter activador de esta proteína explica también su esencialidad para la viabilidad de *Mycobacterium*. El rol activador de esta proteína sobre el operón *fasII* también concuerda con el papel que desempeña su ortólogo FasR<sub>SC</sub> en *S. coelicolor*, donde este regulador actúa activando el operón *fab* [149]. Los sitios de unión en el ADN de MabR y FasR<sub>SC</sub> están altamente conservados, al igual que sus secuencias carboxilo terminal, que incluyen un dominio hélice-giro-hélice [188–190] prácticamente idéntico. Sin embargo, las secuencias amino terminal de estas proteínas son altamente divergentes, lo cual puede estar correlacionada con los diferentes roles fisiológicos de los sistemas FAS que regulan. Recordemos que en el género *Streptomyces* el sistema FAS-II se utiliza para la síntesis *de novo* de ácidos grasos mientras que en los organismos que sintetizan ácidos micólicos este sistema permite la elongación de los ácidos grasos sintetizados por FAS-I.

La naturaleza activadora de MabR es una diferencia importante con la mayoría de los reguladores transcripcionales de la biosíntesis de ácidos grasos en bacterias, los cuales son principalmente proteínas represoras [131]. Las únicas excepciones conocidas hasta el momento corresponden a FadR de *E. coli*, que actúa como represor de los genes de la  $\beta$ -oxidación y activador de los genes de la biosíntesis de ácidos grasos *fabA* y *fabB* (específicamente involucrados en la síntesis de ácidos grasos insaturados) [141], FasR<sub>SC</sub> de *S. coelicolor*, el cual fue el primer activador del conjunto de genes *fab* descrito en bacterias [149] y FasR de *M. smegmatis* que actúa como activador del operón *fas-acpS*, involucrado en la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos en *Mycobacterium* [110].

Es interesante destacar que la presencia de niveles sub-fisiológicos de MabR en la célula no sólo impacta de manera negativa sobre la expresión de los genes del operón *fasII*, sino también sobre la transcripción de otros genes relacionados con el

sistema FAS-II, pero codificados en otros loci del genoma, tales como *inhA* (segundo gen del operón bicistrónico *mabA-inhA*) y *fabH*, el cual codifica para la enzima que conecta los sistemas FAS-I y FAS-II. Sin embargo, el análisis de las secuencias de ADN corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción del operón *mabA-inhA* o del gen *fabH* no reveló la existencia de sitios consenso de reconocimiento de MabR. Por lo tanto, esta regulación cruzada podría ocurrir a un nivel jerárquico superior donde un regulador global podría actuar en respuesta a una señal de estrés generalizado generada por la inhibición de la biosíntesis de ácidos micólicos, apagando así la expresión de otras enzimas relacionadas con este metabolismo para el ahorro energético de la bacteria. En relación a estos resultados, se ha demostrado recientemente que el hambreado de *M. tuberculosis* también conduce a una regulación negativa o apagado de los genes necesarios para la síntesis (esto incluye los operones *fasII*, *mabA-inhA* y *hadABC*), la modificación y el transporte de los ácidos micólicos [112]. Esto podría deberse a que la biosíntesis de los AM y sus derivados glicosilados, como por ejemplo trehalosa monomicolato, glicerol monomicolato, entre otros, se trata de un proceso altamente costoso a nivel energético para la célula, por lo que es fisiológicamente relevante para la bacteria enlentecer su síntesis ante una escasez nutricional. Es relevante destacar que durante el hambreado, la expresión de *mabR* también se encuentra disminuída, en consonancia con la regulación negativa de los genes de biosíntesis de ácidos micólicos, confirmando el carácter activador de este regulador transcripcional. Además, en dicho estudio al igual que lo observado en el análisis transcripcional de *mabR* cKD, la expresión de *fabD* muestra ser levemente diferente al resto de los genes del operón *fasII*. Una posible explicación para la respuesta de *fabD* ante una deficiencia de MabR podría ser que ante la presencia de cantidades mínimas del regulador la maquinaria transcripcional se vuelva menos estable, generando una finalización prematura de la transcripción y que *fabD* siendo el primer gen del operón sea el menos afectado.

Por su parte, la expresión de los genes *hadABC* no se vio modificada en condiciones de depleción de MabR. Aún queda por explorar si la falta de respuesta por parte de este operón está relacionada con la existencia de una segunda deshidratasa (MSMEG\_6754) presente en *M. smegmatis* la cual tiene redundancia funcional con

HadB. Se ha visto que la estructura de la proteína codificada por MSMEG\_6754 es similar a la del complejo deshidratasa HadAB y que el gen esencial *hadB* puede ser inactivado únicamente al complementar la cepa con una copia de MSMEG\_6754 bajo el control transcripcional de un promotor fuerte [191]. Otra razón para la falta de respuesta por parte de *hadB* podría deberse a que la regulación transcripcional del operón *hadABC* es aún más compleja, ya que también forma parte de un operón de siete genes junto a cuatro genes implicados en la traducción, y al menos en *M. tuberculosis*, todos estos genes responden a la alarmona (p)ppGpp, reprogramando de manera drástica la transcripción celular [112]. Por lo tanto, la coordinación conjunta de la expresión de todos los genes que codifican para las enzimas del sistema FAS-II es sumamente compleja y denota una eventual interacción entre las diferentes vías regulatorias.

Por otro lado, se ha observado una respuesta opuesta entre la expresión de *fas* y *fabH*, igual a lo que ocurre ante un arresto en el crecimiento [192]. En este último caso se propuso que el desacoplamiento entre los sistemas FAS-I y FAS-II conduce a un redireccionamiento del flujo de carbono hacia la síntesis de compuestos de almacenamiento y protectores del estrés, tales como TAG y glutamato. En nuestro caso, la depleción de MabR, que a su vez conlleva a una disminución en la expresión de los genes de la biosíntesis de ácidos micólicos, podría conducir a una situación similar en donde los acil-CoAs producidos por FAS-I podrían ser dirigidos preferencialmente hacia la síntesis de TAG.

En la condición donde los niveles de MabR se encuentran por debajo de su concentración fisiológica, y la transcripción de la mayoría de los genes implicados en el sistema FAS-II se encuentra disminuída, encontramos que la biosíntesis de los ácidos micólicos se ve fuertemente alterada. Bajo estas condiciones, la composición relativa de dichos lípidos también se encuentra significativamente modificada, con una prevalencia de los ácidos micólicos  $\alpha'$ . Estudios previos sugieren que los  $\alpha'$ -micólicos son precursores de los  $\alpha$ -micólicos, y que la enzima condensante KasA sería la enzima clave en la elongación del  $\alpha'$ -micólico a su producto final,  $\alpha$ -micólico [108]. En una cepa de *M. smegmatis* sobreexpresante de KasA, los  $\alpha'$ -micólicos sufren una

drástica reducción con un aumento concomitante de la especie  $\alpha$  [108], lo cual demuestra la capacidad de KasA de elongar la cadena meromíclica de la especie  $\alpha'$  hasta su longitud final. También se demostró que la depleción de KasA, o la inhibición de su actividad  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa con tiolactomicina, genera una acumulación de  $\alpha'$ -micólicos y una inhibición en la biosíntesis de los  $\alpha$  y epoxi micólicos [118,193]. Por lo tanto, nuestros resultados concuerdan con los estudios previos, ya que ante una depleción de MabR hay una reducción de KasA, resultando en la acumulación de  $\alpha'$ -micólicos y una reducida síntesis de  $\alpha$  y epoxi micólicos.

Con respecto a la composición de fosfolípidos encontrada en las células con menores niveles de MabR, se observa un aumento relativo de la población de fosfatidilinositol (PI). A diferencia de fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina y cardiolipina que se encuentran en general en todos los organismos vivos, fosfatidilinositol es un fosfolípido esencial en células eucariotas, pero rara vez se lo ha encontrado en células procariontas. La presencia de fosfatidilinositol en procariontas parece estar limitada a algunos actinomicetes (*Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Streptomyces* y *Propionibacterium*), myxobacteria, y al género *Treponema*. En *Mycobacterium sp.*, el fosfatidilinositol y moléculas derivadas en donde el mismo constituye un anclaje lipídico a la envoltura celular, tales como fosfatidilinositol manósido (PIM), lipomanano (LM) lineal y LM ramificado maduro y lipoarabinomanano, resultan ser de suma importancia [194]. PI y PIMs son considerados esenciales para la estabilidad de la membrana y, por tanto, para la viabilidad celular [195,196]. Esta podría ser la razón por la que PI es la única especie de fosfolípido que más variaciones sufre ante una alteración en el metabolismo lipídico. Se sabe que la síntesis de PI depende de la enzima PI sintasa codificada por *pgsA*, la cual es esencial para las micobacterias [195]. Probablemente ante una disminución de las enzimas del FAS-II, se active la expresión de *pgsA* para la síntesis de PI y moléculas derivadas a fin de preservar la integridad de la membrana plasmática frente a la caída abrupta del contenido celular de ácidos micólicos. Consideramos que sería de vital importancia estudios adicionales, como por ejemplo RNA seq, para poder determinar el perfil transcriptómico de las células con niveles

sub-fisiológicos de MabR y de esta manera interconectar las diferentes vías metabólicas afectadas.

## **3.2 Capítulo II. Caracterización bioquímica y genética de los elementos *cis* y *trans* involucrados en la regulación transcripcional del operón *fasII***

### **3.2.1 Objetivo**

Los resultados presentados en el Capítulo 1, nos permitieron definir el rol fisiológico de MabR en la regulación transcripcional del operón *fasII* y conocer el impacto de su deficiencia sobre el metabolismo lipídico global de las micobacterias. Para poder entender la compleja red regulatoria involucrada en el mantenimiento del equilibrio lipídico, en este capítulo nos propusimos identificar y caracterizar los elementos *cis* y *trans* adicionales involucrados en la modulación transcripcional de los genes de la ruta biosintética de ácidos micólicos.

Para ello, nos planteamos buscar las eventuales moléculas efectoras que actuarían como señal moduladora de la actividad de MabR *in vivo*, con el fin de elucidar la estrategia empleada por las micobacterias para llevar a cabo una correcta comunicación entre los dos sistemas de sintasas de ácidos grasos, FAS-I y FAS-II, y poder de esta manera mantener la homeostasis en la síntesis de los lípidos de la membrana y de la pared celular.

A su vez, también nos planteamos construir diversas fusiones reporteras del promotor *PfasII<sub>MT</sub>* al gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* para poder identificar otros elementos regulatorios que pudiesen existir en el promotor del operón *fasII*.

### **3.2.2 Resultados**

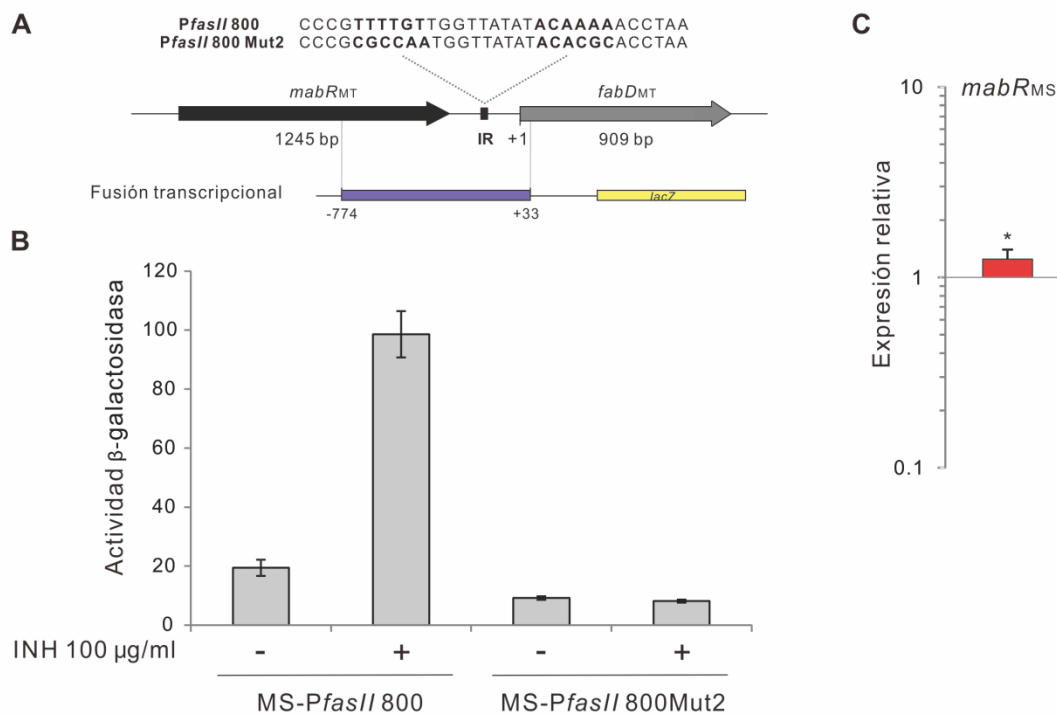
#### *3.2.2.1 La activación del operón *fasII* ante el tratamiento con isoniazida es dependiente de MabR*

En numerosos estudios de microarreglos y proteómica cuantitativa fue reportado que al tratar *M. tuberculosis* con drogas que inhiben la síntesis de ácidos micólicos, como isoniazida (INH), tiolactomicina (TLM) o etambutol (ETH), se inducen los genes

del operón *fasII* [121,159,197]. Sin embargo, estos estudios no proveen información acerca de los componentes o mecanismos mediante los cuales la expresión de estos genes estaría siendo regulada. En el capítulo 1 demostramos que MabR es un regulador transcripcional que modula positivamente la expresión del operón *fasII*. En este capítulo decidimos indagar si MabR participa en la activación transcripcional del operón *fasII* ante el tratamiento con INH. Para responder a esta pregunta, construimos dos fusiones transcripcionales al gen reportero *lacZ* denominadas *PfasII*/800<sub>MT</sub>::*lacZ* y *PfasII*/800<sub>MT</sub>Mut2::*lacZ*. La primera fusión transcripcional consiste de un fragmento de 807 pb que comprende 774 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *fabD* y corresponde a la secuencia salvaje de *PfasII* de *M. tuberculosis*, incluyendo la secuencia reconocida por MabR (5'-TTTTGT-(N)<sub>9</sub>-ACAAA-3'). La segunda fusión transcripcional *PfasII*/800<sub>MT</sub>Mut2::*lacZ* corresponde a una variante de esta región promotora en donde las secuencias repetidas invertidas (SRI) fueron reemplazadas por secuencias aleatorias (5'-CGCAA-(N)<sub>9</sub>-ACACGC-3') (Figura 26A). Se vio previamente, mediante ensayos de retardo en gel, que MabR era incapaz de unirse *in vitro* a las repeticiones invertidas mutadas [150]. De esta manera, si la activación dada por el tratamiento con INH es independiente de la acción de MabR, ambas fusiones deberían dar una señal incrementada de actividad β-galactosidasa luego del tratamiento con este antibiótico.

Una vez obtenidas las dos fusiones transcripcionales, éstas fueron clonadas en el plásmido integrativo pSM128 y transformadas en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, generando las cepas MS-*PfasII*/800 y MS-*PfasII*/800Mut2, respectivamente. Estas cepas fueron cultivadas en medio 7H9 a 37 °C con agitación constante. Una vez alcanzada la fase exponencial temprana de crecimiento, se trató una fracción de cada cultivo con INH a una concentración final de 10 veces la concentración inhibitoria mínima (CIM=10 µg/ml). Al cabo de 90 minutos de tratamiento, se tomaron muestras de los cultivos de MS-*PfasII*/800 y MS-*PfasII*/800Mut2 tratados y sin tratar, y se las utilizó para el estudio de actividad transcripcional llevado a cabo mediante el ensayo de la actividad β-galactosidasa en sus extractos libres de células. Como se muestra en la Figura 26B, después del tratamiento de ambos cultivos con INH 100 µg/ml durante 90 min, la actividad β-galactosidasa presente en los extractos de MS-*PfasII*/800 mostró un

incremento de cinco veces en comparación con los niveles de actividad encontrados en la células no tratadas, mientras que ninguna variación en dicha actividad fue observada para MS-*PfasII*/800Mut2 tratada respecto de la no tratada. Este resultado sugiere que los sitios de unión a MabR, y por consiguiente MabR, son necesarios para la activación transcripcional del operón *fasII* tras el tratamiento con INH. Además, este experimento también validó la naturaleza activadora de MabR en la regulación transcripcional del operón *fasII*, ya que la actividad presente en el extracto de MS-*PfasII*/800 sin tratar fue mayor que la encontrada en MS-*PfasII*/800Mut.



**Figura 26. La activación del operón *fasII* ante el tratamiento con INH es dependiente de MabR. (A)**

Representación esquemática de la región intergénica entre *mabR*<sub>MT</sub> y *fabD*<sub>MT</sub> de *M. tuberculosis*. En la figura se muestran las secuencias repetidas invertidas altamente conservadas (SRIs) (indicadas en negrita) presentes en la secuencia de *PfasII*/800 y una variante de este motivo de ADN donde las SRIs fueron reemplazadas por secuencias aleatorias (*PfasII*/800Mut2). Los límites 5' y 3' de las fusiones transcripcionales utilizadas para el ensayo de actividad transcripcional se encuentran indicados. **(B)** Actividad β-galactosidasa de los extractos proteicos preparados de las cepas MS-*PfasII*/800 y MS-*PfasII*/800Mut2 tratadas con INH y sin tratar. Los niveles de dicha actividad se muestran expresados como nmol ONPG por min por mg de proteína total y representan la media de los resultados obtenidos en

tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). **(C)** Incremento en los niveles relativos del ARNm de *mabR* determinado por qRT-PCR. Los valores representan el promedio de las diferencias entre *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 tratada 90 min con INH y el control sin tratar. Dichos valores fueron normalizados usando *sigA* como transcripto invariable. La significancia estadística fue determinada utilizando el test *t* de Student desapareado de dos colas. \* $p < 0.05$ .

Para determinar si la inducción del operón *fasII* dada por el tratamiento con INH se encontraba relacionada con un cambio en el nivel de expresión de *mabR*, se purificó el ARN total a partir de los cultivos de *M. smegmatis* tratado con INH y sin tratar, y se los empleó para el análisis de la expresión por qRT-PCR. Como se muestra en la Figura 26C, la expresión de *mabR* mostró tan sólo un leve aumento (aproximadamente 30%) después del tratamiento con INH.

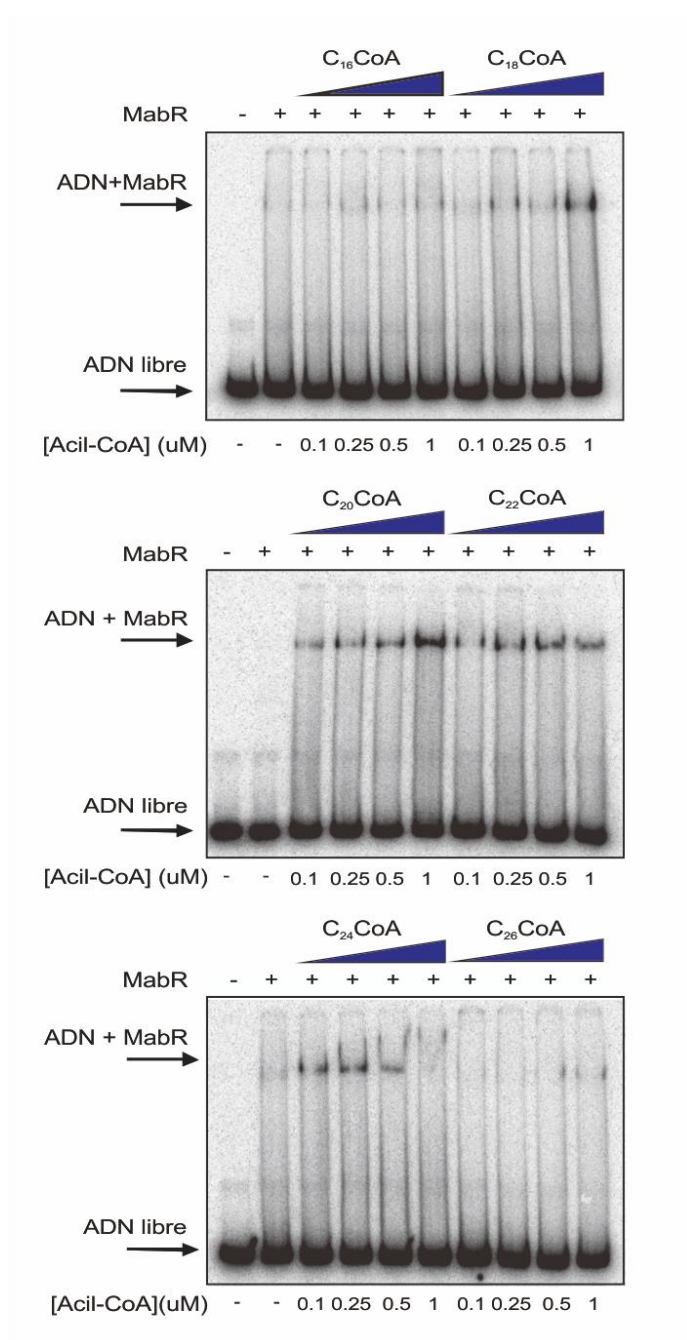
Los resultados obtenidos sugieren que la activación del operón *fasII* debido al tratamiento con INH involucra al regulador transcripcional MabR, por eso ante una mutación en las SRI reconocidas por dicho regulador, no logramos observar una actividad transcripcional incrementada. No obstante, esta activación del operón *fasII* no ocurriría por un incremento en la expresión de MabR (Figura 26C), cuyo aumento en condiciones de tratamiento con INH no parece ser significativo, sino probablemente debido a la acumulación de alguna molécula efectora capaz de modular de manera positiva la afinidad de la proteína por el promotor, generando un aumento en la expresión del operón *fasII*. Esta molécula podría ser algún intermediario del metabolismo lipídico que se esté acumulando a raíz del tratamiento con INH (ej: productos del FAS-I o intermediarios del FAS-II) y se esté uniendo a MabR incrementando su afinidad por *PfasII*, potenciando así la activación del operón *fasII*.

### 3.2.2.2 *Los acil-CoAs de cadena larga aumentan la afinidad de MabR por el promotor fasII promoviendo la activación del operón fasII in vivo*

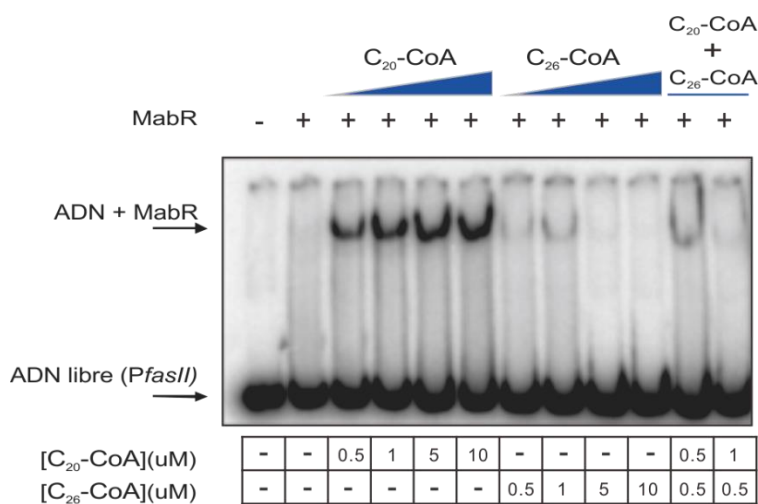
Numerosos reguladores transcripcionales del metabolismo de ácidos grasos modulan su unión al ADN mediante el reconocimiento de moléculas de acil-CoAs o acil-ACPs [131,138,146,198]. Al igual que lo demostrado para los reguladores FadR y FabT [131,138], donde la afinidad de estas proteínas por el ADN es controlada por un

intermediario del metabolismo lipídico, es probable que ciertos intermediarios de la síntesis de ácidos grasos/micólicos sean los efectores del regulador MabR. Ensayos de retardo en gel realizados previamente en el laboratorio demostraron un incremento de la afinidad de unión de MabR-*PfasII* ante el agregado de acil-CoAs de 18 a 24 átomos de carbono (Figura 27). Teniendo en cuenta que *in vivo* estas moléculas son productos del sistema FAS-I y sustratos del FAS-II, se las podría proponer como eventuales efectores de MabR. En dicho experimento *in vitro* se vio que el agregado de C<sub>16</sub>-CoA no tuvo ningún efecto sobre la afinidad de MabR por el ADN, mientras que el agregado de C<sub>18</sub>-CoA incrementó la afinidad del regulador por *PfasII* a la mayor concentración analizada (1 μM). Por otro lado, las moléculas de C<sub>20</sub>-CoA y C<sub>22</sub>-CoA aumentaron la afinidad de MabR por el promotor en todo el rango de concentraciones estudiado. El agregado de C<sub>24</sub>-CoA también promovió la unión de MabR a la sonda; sin embargo, a las concentraciones de 0.5 y 1 μM la intensidad de la banda disminuyó. Esto podría deberse a la actividad detergente que tienen los acil-CoAs de cadena larga cuando están presentes en altas concentraciones, lo que provoca una reducción en la disponibilidad de la proteína MabR nativa para la interacción con el promotor y por ende, se habría formado una menor cantidad del complejo proteína-ADN.

Con la adición de C<sub>26</sub>-CoA directamente no se detectó formación del complejo MabR-ADN. Esta observación podría deberse a que el acil-CoA no tiene efecto sobre la afinidad de MabR por su sitio de unión o que la alta actividad detergente del compuesto modifica la estructura de MabR, desnaturalizando la proteína. Como control de dicho ensayo, se pre-incubó MabR con C<sub>26</sub>-CoA a una concentración final de 0.5 μM por cinco minutos, luego se agregó C<sub>20</sub>-CoA a una concentración final de 0.5 μM o 1 μM y se incubó la mezcla por 5 minutos más; finalmente se agregó la sonda marcada radiactivamente y se realizó una incubación de 15 minutos más en la solución de unión. Como se muestra en la Figura 28, bajo estas condiciones no se formó el complejo MabR-ADN, sugiriendo que C<sub>26</sub>-CoA tendría un efecto desnaturalizante sobre MabR que impediría la formación del complejo regulador-ADN estimulado por C<sub>20</sub>-CoA. Por lo tanto, a través de este tipo de análisis sería imposible definir si un acil-CoA de 26 o más átomos de carbono podría tener un efecto más pronunciado sobre la afinidad de MabR por el ADN.



**Figura 27. Análisis de la capacidad de los acil-CoAs de cadena larga de promover la unión de MabR al ADN.** A. Se analizó el efecto de acil-CoAs de cadena larga sobre la unión de His<sub>6</sub>-MabR<sub>MT</sub> a *PfasII*. Los compuestos fueron agregados a una concentración final de 0.1; 0.25; 0.5 y 1  $\mu$ M. El ensayo de retardo en gel fue realizado pre-incubando His<sub>6</sub>-MabR<sub>MT</sub> (1nM) con el acil-CoA por cinco minutos, e incubando luego la mezcla con la sonda de 272 pb marcada con <sup>32</sup>P en presencia de poli-dIdC por 15 minutos. (Tesis Dra. Valentina Salzman).

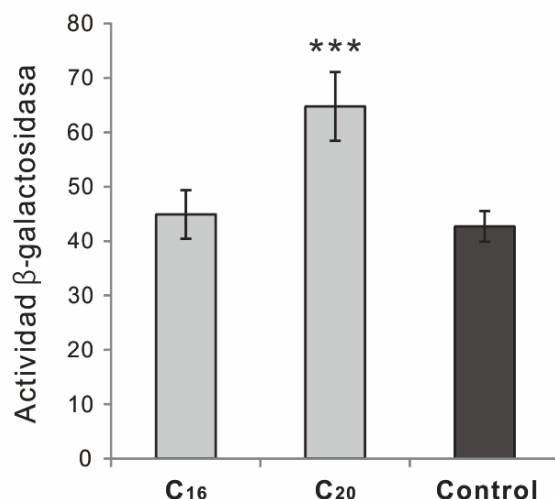


**Figura 28. Efecto de C<sub>26</sub>-CoA sobre la formación del complejo C<sub>20</sub>-CoA/ His<sub>6</sub>-MabR<sub>MT</sub> /PfasII.** His<sub>6</sub>-MabR<sub>MT</sub> se preincubó 5 min con C<sub>26</sub>-CoA en presencia de poli-dIdC, luego se agregó C<sub>20</sub>-CoA y a los 5 min la sonda PfasII (calles 11 y 12). Como control se analizó al mismo tiempo el efecto que tiene sobre la formación del complejo His<sub>6</sub>-MabR<sub>MT</sub>-ADN el agregado de C<sub>20</sub>-CoA (calles 3 a 6) o de C<sub>26</sub>-CoA (calles 7 a 10) por separado. (Tesis Dra. Valentina Salzman).

En función de los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, decidimos estudiar la capacidad de los acil-CoAs de variada longitud de cadena de modular la actividad del promotor PfasII *in vivo*. Para ello, medimos la actividad β-galactosidasa de una cepa reportera denominada MS26, ante la suplementación del medio de cultivo con diferentes ácidos grasos. La cepa MS26 contiene la fusión PfasII/800 descrita anteriormente integrada en el genoma de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y además cuenta con el plásmido replicativo pMR26 el cual contiene una copia del gen *mabR* de *M. tuberculosis* clonado bajo el control del promotor *Pami*, inducible por acetamida. En ausencia del inductor, esta cepa presenta niveles fisiológicos de MabR de *M. smegmatis* (MabR<sub>MS</sub>) y a su vez niveles basales de MabR de *M. tuberculosis* (MabR<sub>MT</sub>) generados por expresión “leaky” a partir del *Pami*. Por su parte, los ácidos grasos suplementados exógenamente al ingresar a la célula se convierten en sus correspondientes derivados de CoA por acción de las acil-CoA sintetasas presentes en las micobacterias, como por ejemplo FACL6, FadD13, FadD5, entre otros [84,199,200]. De esta manera, el análisis de la actividad β-galactosidasa en la cepa

MS26, nos permitirá validar *in vivo* el rol de los diferentes acil-CoAs en la activación transcripcional del operón *fasII* mediada por MabR.

Para llevar a cabo este experimento, se cultivó entonces la cepa MS26 en medio 7H9 sin acetamida para permitir la presencia de niveles basales de MabR<sub>MT</sub>. Una vez que el cultivo celular alcanzó DO<sub>600</sub> = 0.2-0.3, se lo dividió en tres fracciones iguales, dos de ellas fueron suplementadas con ácidos grasos C<sub>16</sub> (ácido palmítico) y C<sub>20</sub> (ácido araquídico), respectivamente, a una concentración final de 0.15 mM, y la tercera fue crecida sin adición de ácidos grasos, como control del ensayo. Al cabo de 6.5 horas de la suplementación de los cultivos con ácidos grasos, se tomaron muestras para el análisis de actividad β-galactosidasa. Como se muestra en la Figura 29, la presencia del ácido palmítico en el medio de crecimiento no potenció la actividad transcripcional del gen *lacZ* en comparación al cultivo control, mientras que el agregado del ácido araquídico condujo a niveles incrementados de actividad β-galactosidasa, sugiriendo el rol de C<sub>20</sub>-CoA como efector positivo de MabR, el cual aumenta la afinidad del regulador por *PfasII*. Este resultado concuerda con lo observado en los experimentos *in vitro* mostrados en la Figura 27, donde C<sub>16</sub>-CoA no mejoró la interacción MabR-*PfasII* mientras que C<sub>20</sub>-CoA incrementó la afinidad de dicha unión. Todos estos resultados señalan a los acil-CoAs de cadena larga como señales metabólicas detectadas por MabR para modular la activación transcripcional del operón *fasII*, desempeñando un rol crucial en la coordinación de la actividad de los dos sistemas FAS para mantener una regulación estricta de la homeostasis lipídica.



**Figura 29. Los ácidos grasos de cadena larga aumentarían la afinidad de unión de MabR al promotor *PfasII* *in vivo*.** Se midió la actividad β-galactosidasa de la cepa MS26-*PfasII*/800 crecida en medio 7H9 en presencia de diferentes ácidos grasos a una concentración final de 0.15 mM. El control se realizó cultivando la cepa sin adición de ácidos grasos. Se retiraron muestras de cada cultivo 6.5 h después de la inducción para ensayar la actividad específica. Los niveles de actividad se muestran como nmol ONPG por min por mg de proteína total y representan el promedio de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes ± desviación estándar (n = 3). \*\*\*p<0.001

### 3.2.2.3 Elementos *cis* que participan en la regulación del operón *fasII* de *M. tuberculosis*

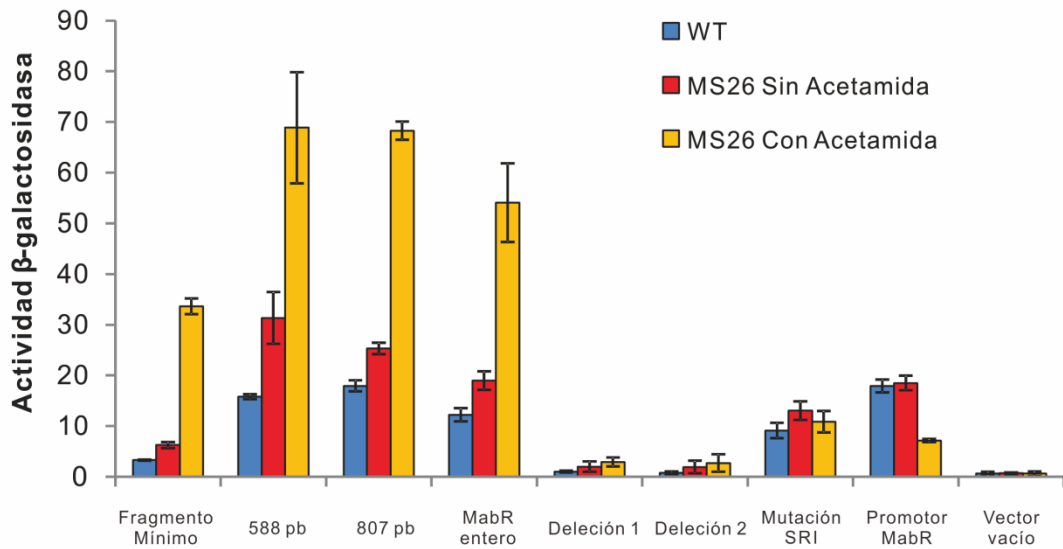
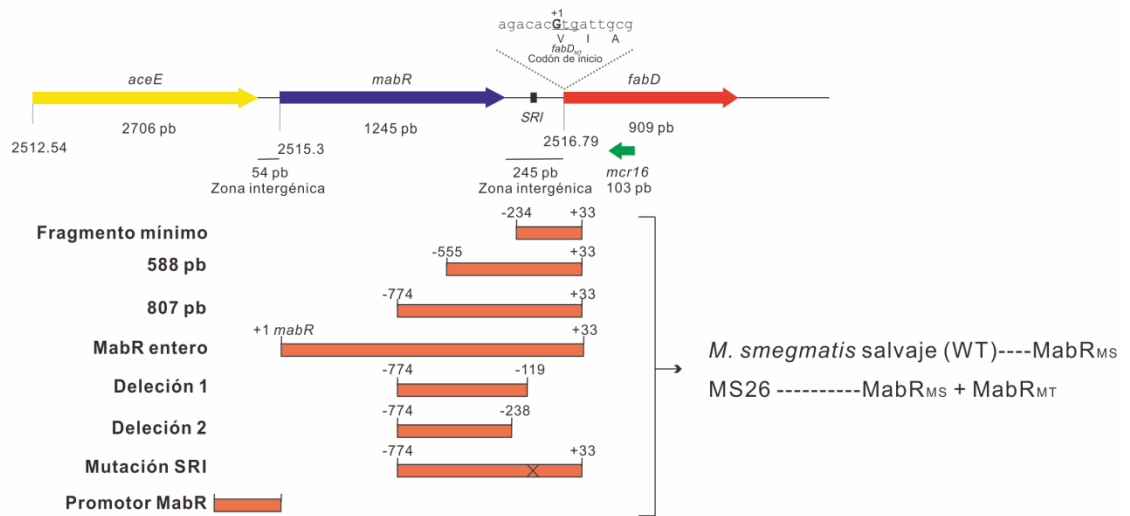
Con el fin de conocer el conjunto de elementos *cis* implicados en la regulación del operón *fasII*, se construyeron diversas fusiones transcripcionales *PfasII-lacZ*. Para ello, se clonaron secuencias de ADN de distinta longitud correspondientes a la región promotora del operón *fasII* de *M. tuberculosis*, corriente arriba del gen *lacZ* en el vector pSM128, el cual se integra a través de los sitios *attP* al genoma de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 [171]. Estas mismas fusiones fueron estudiadas también en la cepa MS26 de *M. smegmatis* que sobreexpresa MabR<sub>MT</sub> ante el agregado de acetamida.

Los ensayos de β-galactosidasa realizados sobre extractos libre de células señalan que el fragmento mínimo del promotor *fasII* que contiene la secuencia palindrómica de unión a MabR, caracterizada previamente por ensayos de retardo en gel [150], produce bajos niveles de actividad enzimática. A medida que se incluyen

secuencias adicionales corriente arriba (5') de los límites del fragmento mínimo, los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa van incrementando, siendo máxima la diferencia observada entre la fusión del fragmento mínimo y la de 588 pb (Figura 30). Esto nos estaría sugiriendo la existencia de elementos *cis* adicionales que podrían estar involucrados en la regulación del operón *fasII*, pudiendo ser nuevas secuencias promotoras, elementos potenciadores (enhancers) o secuencias estabilizadoras del complejo MabR-ARN Pol-ADN. A su vez, se vio que todas estas fusiones responden a los niveles del regulador presente en la célula, ya que ante una inducción con acetamida, donde los niveles de MabR se ven incrementados, se observa un aumento en la actividad transcripcional. De esta manera, se vuelve a corroborar el carácter activador de MabR en la regulación transcripcional del operón *fasII* y este efecto regulatorio se conserva aún en un reconocimiento heterólogo del par promotor-regulador compuesto por diferentes especies.

Sin embargo, cuando se deletiona la región palindrómica de unión a MabR y la región promotora donde se une la ARN polimerasa, las fusiones transcripcionales pierden su actividad (Delección 1 y Delección 2 de la Figura 30). Esto sugiere que los elementos *cis* ubicados 5' de la zona de unión a MabR no poseen actividad promotora de manera independiente. Posteriormente, el análisis de la fusión transcripcional del promotor *fasII* incluyendo secuencias adicionales 5' del fragmento mínimo, pero con mutaciones puntuales en el sitio de unión a MabR (Mutación SRI de la Figura 30), muestra una actividad enzimática basal independiente de los niveles de MabR. Esto nos llevó a hipotetizar acerca de la posible existencia de secuencias enhancer, las cuales podrían interactuar con otros factores regulatorios estabilizando la maquinaria de transcripción. O simplemente podría tratarse de secuencias que actúen en *cis* estabilizando el complejo de iniciación. Cabe destacar que la actividad observada en la fusión con mutaciones puntuales no se debe meramente a la actividad promotora de la zona de unión a la ARN polimerasa, ya que la actividad que se observa en esta fusión es mayor que la observada con la unidad mínima de transcripción, donde también cuenta con las regiones de unión a la maquinaria de transcripción y a MabR. Finalmente, se observó que la fusión que incluye la región 5' del gen *mabR* (Promotor MabR) responde a las cantidades del regulador presentes en la célula y ante una

sobreexpresión del mismo, hay una disminución en la actividad enzimática (Figura 30). Esto podría ser un mecanismo de retroalimentación negativa donde el regulador controla su propio nivel de expresión. Sin embargo, mediante el análisis *in silico* de secuencias usando el programa MAST, no se detectó ningún sitio canónico de unión a MabR, por lo que podría ser producto de una respuesta global de la célula ante el estrés generado por la sobreexpresión de MabR. A través de estos estudios se lograron identificar elementos *cis* adicionales que intervienen en el control de la expresión del operón *fasII* en las micobacterias. Quedarían por explorar los eventuales elementos *trans* adicionales que podrían actuar de manera concertada en esta regulación.



**Figura 30. Elementos *cis* que actúan de manera concertada potenciando la activación del operón *fasII*.** Mediante ensayos de actividad β-galactosidasa evaluamos la actividad transcripcional de los distintos fragmentos de la región promotora *PfasII* y *PmabR* acoplándolos a un gen reportero (*lacZ*). Las diferentes fusiones fueron estudiadas en 3 contextos distintos: en la cepa salvaje de *M. smegmatis* (WT), en una cepa WT pero transformada con un plásmido que lleva una copia de *mabR<sub>MT</sub>* bajo el control de *Pami* (MS26) ensayada con y sin agregado del inductor acetamida. Los valores corresponden al promedio de los resultados de tres experimentos independientes ± desviación estándar.

### 3.2.3 Discusión

En este capítulo hemos demostrado a través de dos fusiones transcripcionales *P<sub>fasII</sub>-lacZ*, una de las cuales posee la secuencia de reconocimiento a MabR mutada, que la activación del operón *fasII* ante el tratamiento de las micobacterias con INH es dependiente de MabR. Esto se determinó al evidenciar un incremento en la actividad transcripcional de la fusión salvaje ante el tratamiento con la droga y una falta de respuesta por parte de la fusión con el sitio de unión a MabR mutado. Sin embargo, al realizar experimentos de qRT-PCR vimos que el nivel de expresión de *mabR* sólo aumentó un 30% después del tratamiento con INH. Los resultados obtenidos nos llevaron a hipotetizar que probablemente un leve aumento de MabR sea suficiente para inducir la expresión de los genes del operón *fasII*, o que luego de la inhibición del sistema FAS-II por acción de INH se estén acumulando las moléculas señal reconocidas por este activador (acil-CoAs de cadena larga, productos del FAS-I) las cuales podrían alcanzar, bajo estas circunstancias, el umbral necesario para unirse a MabR aumentando su afinidad por el sitio operador e induciendo así la expresión del operón *fasII*. Posteriormente, observamos que la actividad reguladora de MabR es modulada positivamente por el agregado de ácidos grasos de cadena larga a los medios de cultivo, lo que sugeriría que los acil-CoAs de cadena larga (> C<sub>18</sub>) derivados de los mismos estarían actuando como los efectores de MabR *in vivo*. En base a esto, podríamos plantear un modelo en donde MabR se expresa de manera constitutiva en condiciones normales de crecimiento, activando la síntesis de las enzimas necesarias para la producción de los ácidos micólicos, pero ante una inhibición de dicha síntesis se acumularían los productos finales del sistema FAS-I (acil-CoAs de cadena larga, precursores de la cadena  $\alpha$  de los ácidos micólicos y sustratos del sistema FAS-II), disparando como respuesta una inducción marcada de una parte de los genes de la biosíntesis de ácidos micólicos. Lo mismo se observaría ante una actividad exacerbada del sistema FAS-I. El modelo planteado sería análogo al mecanismo de regulación empleado por la mayoría de los factores de transcripción bacterianos implicados en la biosíntesis de lípidos, donde la actividad del regulador es modulada a través del sensado de moléculas efectoras, las cuales son sustratos o productos finales de la biosíntesis de ácidos grasos (por ejemplo, malonil-CoA, acil-CoA de cadena larga

o acil-ACP) [142,147,148]. Sin embargo, la particularidad del sistema de regulación de MabR sería análogo al de FabR de *E. coli*, el cual actúa como represor de los genes *fabA* y *fabB* que codifican para las enzimas de la biosíntesis de ácidos grasos insaturados. FabR es capaz de interactuar con el ADN en ausencia del efector pero su afinidad por la región operadora aumenta con la unión de AGI-CoA y disminuye con la de AGS-CoA, permitiendo así el ajuste de la relación AGS/AGI intracelular y preservando consecuentemente la fluidez de la membrana plasmática [142]. Por su parte, se ha visto que en la regulación transcripcional del operón arabinosa en *E. coli*, la proteína reguladora AraC está siempre unida a la región operadora pero sus propiedades de unión cambian tras asociarse al ligando, el cual genera un cambio conformacional promoviendo la unión de AraC al sitio *araI*<sub>2</sub> para la activación de dicho operón [201,202].

En el caso de MabR, el mecanismo de modulación implicado sería un clásico ejemplo de regulación por sustrato, dado que los ésteres de CoA de cadena larga, productos del sistema FAS-I y sustratos del FAS-II, son los responsables de controlar la actividad de este regulador, en este caso aumentando su afinidad de unión al promotor *PfasII* una vez asociados. De esta manera, el regulador transcripcional detecta y responde a una variación de las moléculas señal, que de hecho reflejan el estado metabólico de la célula, y permite un ajuste en la composición lipídica celular para adaptar a las bacterias a una nueva condición de vida.

Los estudios transcripcionales realizados con el regulador FasR, el activador transcripcional del operón *fas-acpS* de *Mycobacterium*, demostraron que los acil-CoAs de cadena larga (> C<sub>18</sub>-CoA) inhiben la unión de FasR a *Pfas* reduciendo la expresión del operón *fas-acpS* que codifica para el sistema FAS-I y la 4'-fosfopanteteinil transferasa AcpS [110]. Por ende, en conjunto con los resultados obtenidos en este capítulo, podríamos proponer a los acil-CoAs > C<sub>18</sub> como la señal metabólica que conecta los dos sistemas de sintetas, siendo los principales metabolitos sensados por los reguladores transcripcionales encargados de mantener la homeostasis lipídica en micobacterias. Teniendo en cuenta que ambas proteínas reguladoras han demostrado ser esenciales para la viabilidad celular en *M. smegmatis*, se podría especular que también lo sean en *M. tuberculosis* por lo que podrían ser consideradas como nuevos

blancos para la búsqueda de compuestos capaces de perturbar su capacidad de unión al ADN y de esta manera inhibir el crecimiento celular.

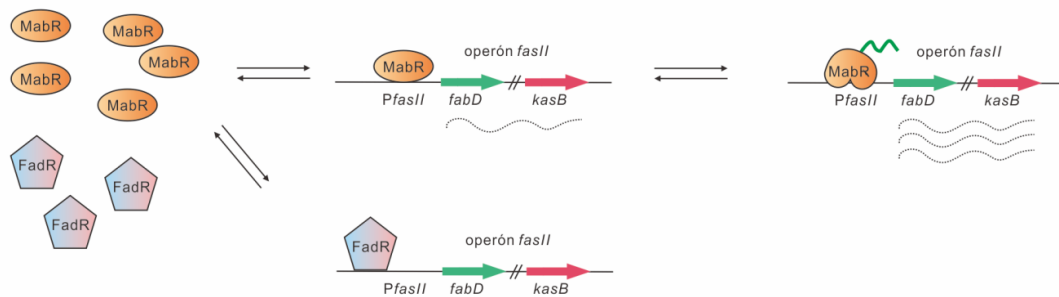
A través de los ensayos de protección contra DNAsa I y retardo en gel, Salzman *et al* demostraron la unión de MabR a la región promotora del operón *fasII* [150]. A su vez, en el capítulo I hemos definido el rol fisiológico de MabR como activador transcripcional del operón *fasII*, involucrado específicamente en la biosíntesis de ácidos micólicos. Se sabe que la regulación de la expresión génica es un proceso altamente complejo y sensible a las señales tanto intra como extracelulares, por lo que se requiere de la participación de múltiples factores. Además de la zona de unión a la ARN polimerasa, existen numerosos elementos proximales y distales en el ADN que actúan en *cis* modulando la actividad transcripcional [166]. Una clave en la regulación es la localización relativa del sitio de unión a factores de transcripción, respecto del sitio de inicio de la transcripción y la zona de unión a la ARN polimerasa, ya que define en general el carácter de su actividad. En la naturaleza existen diversas clases de activadores que difieren en la localización de su sitio de unión en el ADN y por lo tanto poseen diferentes modos de acción. Los activadores de clase I que interactúan con la subunidad  $\alpha$  de la ARN polimerasa se unen en general a secuencias que se encuentran entre las posiciones -60 y -95 (distal), mientras que los activadores de clase II se unen a sitios adyacentes al de la ARN polimerasa. Estos últimos actúan uniéndose a las secuencias de ADN contiguas al promotor base y promueven la unión de los factores  $\sigma$  [166,203]. También existen activadores que se unen a sitios remotos corriente arriba del promotor base [166]. En este sentido, la localización del sitio de unión a MabR correspondería a la de los activadores de tipo I.

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, al realizar una caracterización detallada de la región promotora del operón *fasII* por estudios de fusión transcripcional, descartamos la eventual existencia de un promotor alternativo corriente arriba del sitio de unión de MabR, ya que al delecionar la secuencia de unión a la ARN polimerasa, ubicada en los sitios -10 y -35 respecto del +1 de *fabD*, la fusión conteniendo las secuencias localizadas 5' de la región promotora dejó de ser funcional. Sin embargo, observamos que corriente arriba del sitio de unión al regulador transcripcional MabR,

ubicado en el -87 del sitio de inicio de la transcripción en *M. tuberculosis*, existe una secuencia capaz de modular la actividad transcripcional de la ARN polimerasa. Dicha secuencia, aún no identificada, podría ser un elemento potenciador de la transcripción (enhancer) a donde podrían unirse factores que estabilizarían la maquinaria transcripcional.

Al trasladar este conjunto de fusiones transcripcionales a la cepa MS26, vimos que la actividad *P<sub>fasII</sub>-lacZ* aumentó al sobreexpresar *MabR<sub>MT</sub>*, agregando un mayor grado de complejidad a la regulación génica del operón *fasII* dependiente de *MabR*. La activación dada por *MabR* no sólo respondería al incremento en la molécula señal sino también al aumento en el contenido intracelular de *MabR*. Sin embargo, esta última condición no es fisiológica y tal vez sugiera una interacción no canónica del regulador a las secuencias operadoras simplemente por estar en condiciones de sobreexpresión. Por lo tanto, se podría plantear un modelo en el cual *MabR* actúa como un sensor del metabolismo lipídico dentro de la célula, el cual incrementa la expresión del operón *fasII* ante una acumulación de los sustratos del sistema FAS-II (acil-CoAs de cadena larga); sin embargo, ya que en ausencia del ligando vimos que, al menos *in vitro*, *MabR* es capaz de unirse a la región promotora del operón *fasII* permitiendo la expresión basal de las enzimas del sistema FAS-II, podríamos especular que su rol esencial en la viabilidad de las micobacterias radicaría en que el mismo podría unirse *in vivo* en ausencia del efector a su sitio operador y así mantener las condiciones basales de expresión de los genes del operon *fasII*. Por el contrario, cuando hay una desregulación o inhibición de FAS-II con la consiguiente acumulación de acil-CoAs de cadena larga, los mismos se unirían a *MabR* aumentando su afinidad por las regiones operadoras y produciendo así una respuesta más rápida y exacerbada de dicho operón. Esto le permite a la micobacteria una adaptación rápida ante modificaciones en el entorno celular. Por su parte, se conoce hasta el momento dos reguladores transcripcionales que modulan la actividad del operón *fasII*, *FadR* y *MabR*, siendo *FadR* un represor [164] y *MabR* un activador del operón en cuestión, por lo que en condiciones normales de crecimiento los niveles de expresión del operón *fasII* estarían determinados por el equilibrio entre estos dos reguladores. Ante un exceso de *MabR* o de sus moléculas efectoras, habría un desplazamiento del equilibrio hacia la activación

del operón *fasII*, donde la región operadora se encontraría ocupada por MabR (Figura 31). El sitio de unión a FadR en *M. tuberculosis* se encuentra en el sitio -143 del TSS de *fabD* y cuya unión a FadR probablemente pueda generar un cambio en la torsión del ADN impidiendo la unión de MabR a su sitio ubicado en el -87, en el caso de *M. tuberculosis*.

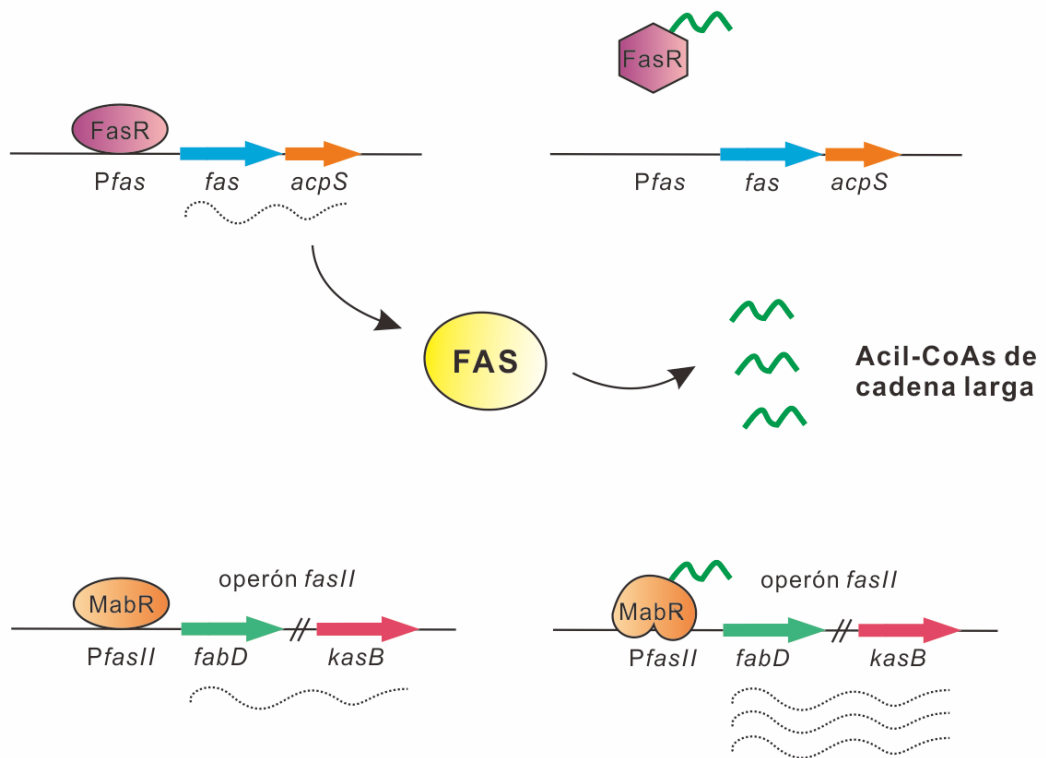


**Figura 31. Modelo planteado para la regulación transcripcional del operón *fasII*.** Esquematización de la competencia entre FadR y MabR en la regulación del operón *fasII*. La transición entre los diferentes estados de equilibrio estaría definida por la afinidad de cada unión y la cantidad de cada componente en cuestión.

En conclusión, en este capítulo logramos avanzar en la identificación y caracterización de nuevos componentes de la compleja red regulatoria involucrada en la transcripción de los genes del operón *fasII*, pilares en el metabolismo lipídico de las micobacterias. Este es un proceso regulatorio que involucra la participación de numerosos componentes, incluyendo elementos *cis* y *trans* actuando de manera concertada junto a MabR. Nuestros estudios han contribuido a la identificación de los acil-CoAs de cadena larga como moléculas efectoras de MabR *in vivo*, a la caracterización genética del promotor *PfasII* y a la elucidación del mecanismo involucrado en la activación del operón *fasII* ante el tratamiento con INH.

Los resultados obtenidos en conjunto con los estudios previos realizados sobre FasR nos permiten plantear un modelo de regulación coordinada de la biosíntesis de

ácidos grasos y ácidos micólicos mediado por FasR y MabR. En éste FasR activa la expresión del operón *fas-ACP* durante el crecimiento exponencial de las micobacterias por unión a su secuencia consenso en la región promotora *P<sub>fas</sub>*, mientras que MabR activa la expresión del operón *fasII* por unión al motivo palindrómico presente en la región promotora *P<sub>fasII</sub>*. Cuando la producción de acil-CoAs de cadena larga sintetizados por FAS-I, exceden los requerimientos metabólicos de la célula, éstos interaccionan con FasR conduciendo a la liberación del regulador de la región promotora *P<sub>fas</sub>*, posiblemente como consecuencia de un cambio conformacional de la proteína tras la unión del efector. Mientras que la unión de los mismos metabolitos a MabR conduce a un aumento de la afinidad de interacción con *P<sub>fasII</sub>*. Como resultado, los niveles de expresión del operón *fas-ACP* disminuyen con un concomitante aumento de los transcritos del operón *fasII*. Esta regulación coordinada es lo que le permite a la bacteria mantener el equilibrio lipídico intracelular (Figura 32).



**Figura 32. Modelo de regulación transcripcional coordinada de los operones *fas-acpS* y *fasII* mediada por FasR y MabR.** Durante el crecimiento exponencial de las micobacterias, FasR y MabR se unen a sus respectivos motivos de reconocimiento ubicados en *Pfas* y *PfasII*, respectivamente, activando la expresión de los operones *fas-acpS* y *fasII*. Cuando la cantidad de acil-CoAs de cadena larga sintetizados por FAS-I excede los requerimientos metabólicos de la célula, estos interactúan con FasR conduciendo a la liberación del regulador de la región promotora *Pfas*. La unión de los mismos metabolitos a MabR conduce a un aumento de la afinidad de interacción con *PfasII*. Como resultado, se inhibe la expresión de los genes del operón *fas-acpS* y se potencia la expresión del operón *fasII*.

### 3.3 Capítulo III. Impacto de la deficiencia de FAS-I sobre el metabolismo lipídico en *M. smegmatis*

En las micobacterias, la biosíntesis de ácidos grasos es iniciada por la sintasa de ácidos grasos multifuncional FAS-I, que cataliza la síntesis *de novo* de acil-CoAs de cadena mediana y larga a partir de acetil-CoA, utilizando malonil-CoA como unidad extensora. Los acil-CoAs resultantes son utilizados posteriormente para la síntesis de fosfolípidos de membrana (PL), TAG de reserva o direccionados hacia el sistema FAS-II para la síntesis de ácidos micólicos. En las micobacterias, el sistema FAS de tipo II es el responsable de la elongación de estos acil-CoAs a través de reacciones de condensación iterativas con malonil-ACP que conduce a la síntesis de los meromicolil-ACPs de cadena muy larga [107,108,204]. Una característica notable del sistema FAS-I micobacteriano es su comportamiento bimodal, el cual fue demostrado *in vitro* [88,89]. Además de producir acil-CoAs de cadena mediana, el sistema FAS-I libera C<sub>24</sub>-CoAs en *M. smegmatis* [205,206] o C<sub>26</sub>-CoAs en *M. tuberculosis* [89], los cuales son carboxilados posteriormente por una acil-CoA carboxilasa de cadena larga para producir  $\alpha$ -carboxi-C<sub>24</sub>/C<sub>26</sub>-CoAs [123,124,100]. Estos carboxi-acil-CoAs se condensan entonces con el meromicolil-AMP en una reacción catalizada por la policétido sintasa Pks13, para producir ácidos micólicos y sus glico-derivados, como por ejemplo trehalosa mono y dimicolato, glicerol monomicolato, entre otros, los cuales son lípidos de extrema importancia para la inmunopatogenicidad y las propiedades de la membrana de *M. tuberculosis* [184].

Para añadir un mayor grado de complejidad al metabolismo lipídico de *M. tuberculosis*, los acil-CoAs sintetizados por FAS-I no solo se incorporan en los PL o en los lípidos de almacenamiento (TAG); sino que también son utilizados como precursores biosintéticos para producir policétidos asociados a virulencia como tiocerol-dimicocerosato (PDIM), trehalosa poli-acilada (PAT) y sulfolípidos (SL) [184,207]. Por lo que podemos deducir el rol central del sistema FAS-I para el metabolismo lipídico en las micobacterias.

La comunicación entre los sistemas FAS-I y FAS-II, la acción de las diferentes policétido sintetasas (PKS) y la ruta de biosíntesis de TAG, amplían la complejidad de la eventual red regulatoria que mantiene la homeostasis lipídica en *M. tuberculosis*. Actualmente sólo se dispone de información parcial sobre los mecanismos implicados en la regulación del metabolismo de ácidos grasos y ácidos micólicos en respuesta a las condiciones ambientales. Varias evidencias sugieren que existe una estricta regulación de la actividad de las enzimas biosintéticas de ácidos micólicos por intermedio de modificaciones postraduccionales tipo fosforilación mediadas por las serina/treonina quinasas (STPK) [155–158]. Por otro lado, también se conocen algunos reguladores transcripcionales involucrados en el metabolismo de ácidos micólicos, como FasR que controla la expresión de *fas-*acpS** [110] y MabR, regulador estudiado en el Capítulo 1, que modula la expresión del operón *fasII* [150]. El hecho de que MabR y FasR sean esenciales para la viabilidad de *M. smegmatis* muestra la importancia del equilibrio entre los dos sistemas FAS para un normal crecimiento de estos microorganismos.

En el Capítulo 1 hemos visto que al alterar los niveles de expresión de MabR, no sólo se perturba la transcripción del operón *fasII* sino también del gen *fas*. Este resultado nos llevó a plantear un modelo de regulación coordinada entre los dos sistemas FAS mediada por MabR y FasR, con una activa participación de las moléculas señal, acil-CoAs de cadena larga, estudiadas en el Capítulo 2.

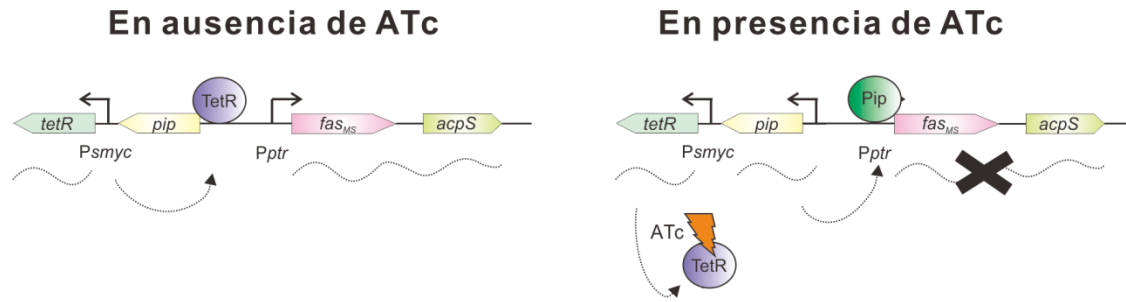
### 3.3.1 Objetivo

Teniendo en cuenta que el sistema FAS-II requiere del sistema FAS-I para su actividad, podríamos suponer que una alteración en el sistema FAS-I conllevaría a una modificación en la expresión de los genes que codifican para las enzimas del sistema FAS-II. Entonces, como objetivo de este capítulo nos propusimos estudiar el impacto de la deficiencia del sistema FAS-I en la expresión de los genes del operón *fasII*, y por lo tanto en la biosíntesis de ácidos micólicos, y de esta manera tratar de elucidar el mecanismo de comunicación que existe entre ambos sistemas para alcanzar el fino balance entre la biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos. Para lograr el objetivo planteado decidimos trabajar con una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en el operón *fas-acpS* construída en el laboratorio.

### 3.3.2 Resultados

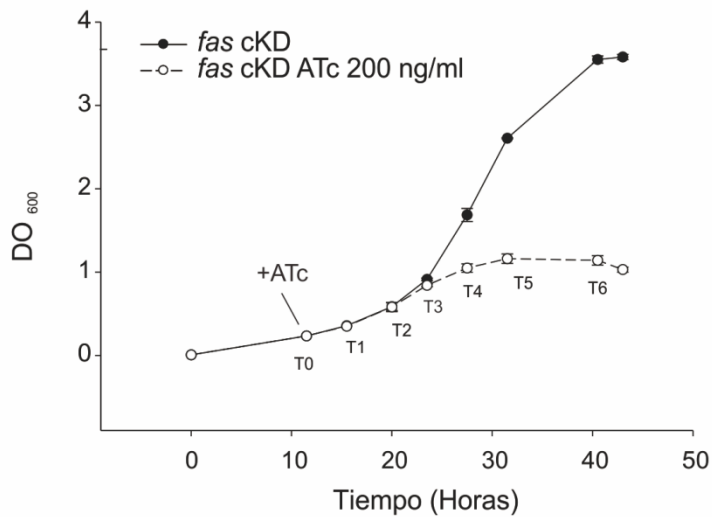
#### 3.3.2.1 Caracterización de la cepa *fas cKD*

Para profundizar la caracterización de la red regulatoria involucrada en la coordinación funcional de ambos sistemas de sintasas, en el laboratorio contamos con una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en el operón *fas-acpS*, denominada *fas cKD*, donde la transcripción del operón *fas-acpS* fue colocada bajo el control del promotor *ptr* (*Pptr*) que se reprime ante el agregado de anhidrotetraciclina (ATc) (Figura 33). En este sistema, el gen bajo estudio es clonado bajo el control del promotor *Pptr*, dependiente del represor pristinamicina (Pip) de *Streptomyces pristinaespiralis* [208]. El gen *pip*, a su vez está regulado por el represor TetR, que se expresa de manera constitutiva. La estrategia consiste en agregar ATc al medio de cultivo, que ingresa a la bacteria y se une a la proteína TetR, liberándola de la región promotora y permitiendo la expresión del gen *pip*. Tras su síntesis, Pip se une al *Pptr* y reprime la expresión del gen en estudio. El sistema TetR/Pip OFF completo se encuentra en el vector integrativo pFRA42B, el cual a su vez confiere a la bacteria resistencia a estreptomicina (Str) [173].

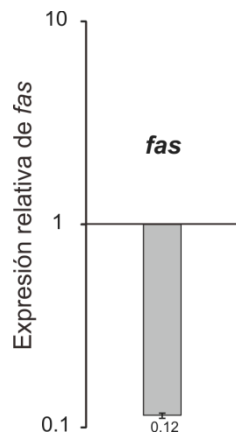


**Figura 33. Modelo del sistema TetR/Pip OFF.** En ausencia de anhidrotetraciclina (ATc), TetR se une a sus regiones operadoras corriente arriba del gen *pip* apagando la transcripción del mismo y permitiendo la expresión de los genes de interés (*fas-acpS*). En presencia de ATc, ésta se une a TetR liberando al regulador de sus regiones operadoras, *pip* se transcribe y como resultado Pip reprime la expresión de los genes de interés.

Para poder inhibir la expresión del operón *fas-acpS* y analizar su impacto sobre el metabolismo lipídico, se creció la mutante condicional *fas* cKD en medio 7H9 a 42 °C. Una vez alcanzada la  $DO_{600} = 0.2$  se dividió el cultivo en 2 partes iguales y a una de las partes se le adicionó ATc 200 ng/ml (Cf). En la Figura 34 se observa que el agregado de ATc en fase exponencial temprana provoca una inhibición del crecimiento bacteriano. Para corroborar que esta inhibición se debía a una disminución en la expresión del operón *fas-acpS* y no a las concentraciones de ATc utilizadas, se creció la cepa parental WTpFRA42B (posee el sistema TetR/Pip OFF completo pero el operón *fas-acpS* se encuentra bajo el control de su promotor nativo) en las mismas condiciones que la cepa mutante, notándose una normal división celular aún en medio 7H9 suplementado con ATc 200 ng/ml. A su vez, se determinó por qRT-PCR los niveles relativos del gen *fas* en el tiempo T3, antes que comience a observarse un arresto en el crecimiento (Figura 34). El ensayo arrojó como resultado un 90% de inhibición en la expresión de *fas* al comparar los niveles de dicho ARNm en la cepa mutante crecida en presencia de ATc respecto de la misma cepa crecida en ausencia de ATc (Figura 35). De esta manera, se podría correlacionar el arresto en el crecimiento con una baja expresión del gen *fas*.



**Figura 34. Curva de crecimiento de la mutante *fas cKD* en medio 7H9 a 42 °C.** A las 12 horas de la inoculación inicial se divide el cultivo en dos y a uno de ellos se le adiciona ATc 200 ng/ml. Las muestras fueron tomadas a distintos tiempos post inducción con ATc para su posterior análisis. Se grafica el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar.

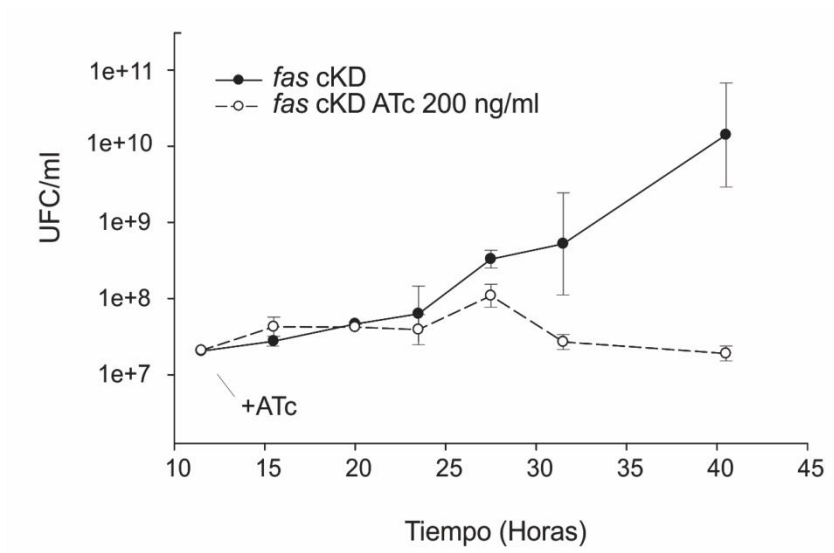


**Figura 35. Expresión relativa de *fas* medido por RT-PCR cuantitativa.** Niveles de los transcritos de *fas* medidos por qRT-PCR a las 12 h (T3) posteriores al agregado de ATc en la cepa *fas cKD* crecida con ATc 200 ng/ml respecto a la crecida en ausencia del mismo. La normalización se realizó utilizando el transcritto de *sigA<sub>MS</sub>* como invariable. El resultado representa el promedio de tres experimentos independientes.

Posteriormente, para determinar el efecto de la disminución del contenido celular de FAS-I en la viabilidad bacteriana, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias por ml de cultivo (UFC/ml) en cada punto indicado en la curva de crecimiento.

En la Figura 36 se puede observar que después del agregado de ATc al medio de cultivo, el número de células viables permaneció constante en el tiempo. El fenómeno observado sugiere que la deficiencia de FAS-I ejerce un efecto bacteriostático sobre las micobacterias.

Dada la relevancia del sistema FAS-I en el metabolismo lipídico y en la biosíntesis de moléculas estructurales esenciales de la membrana y la pared celular, era de esperar que cualquier alteración del mismo comprometiera al crecimiento celular.



**Figura 36. El agregado de ATc inhibe el crecimiento *in vitro* de la cepa *fas cKD*.** La cepa se creció en medio 7H9 a 42 °C. A las 12 h de crecimiento ( $DO_{600} \sim 0.2$ ) el cultivo se dividió en dos y uno de ellos se suplementó con ATc 200 ng/ml. A distintos tiempos se tomaron alícuotas de ambos cultivos y se plaquearon en medio LBA en ausencia de ATc. Se determinaron las unidades formadoras de colonias por ml de cultivo (UFC/ml).

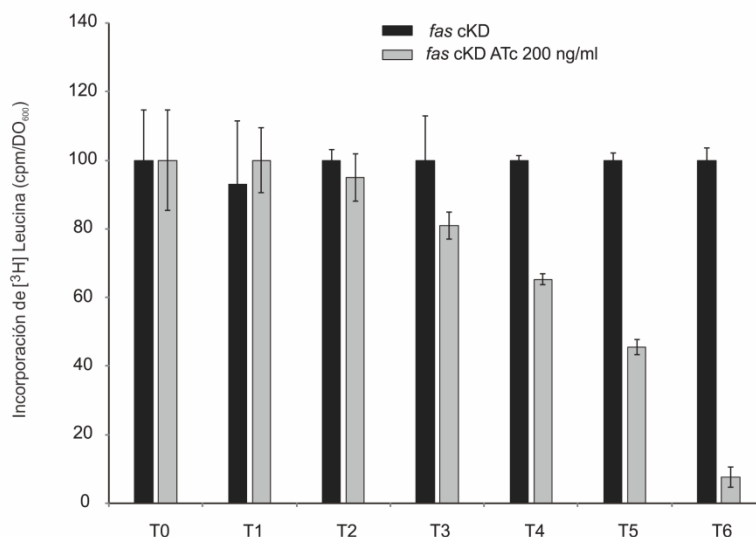
### 3.3.2.2 Regulación coordinada de los sistemas FAS-I y FAS-II

Teniendo en cuenta que el gen *fas* forma parte de la misma unidad transcripcional que el gen *acpS*, la cepa mutante *fas cKD* no sólo presentará menores niveles de FAS-I ante el agregado de ATc sino también de la enzima AcpS (4'-fosfopanteteinil transferasa) responsable de la activación del dominio ACP de la proteína multifuncional FAS-I de las micobacterias [209]. La modificación postraduccional

catalizada por esta enzima es necesaria para la actividad de ACP, la cual media la transferencia de los intermediarios acilados durante la biosíntesis de ácidos grasos. Para el sistema FAS-II está reportado que dicha activación está dada por acción de la enzima PptT sobre AcpM [114].

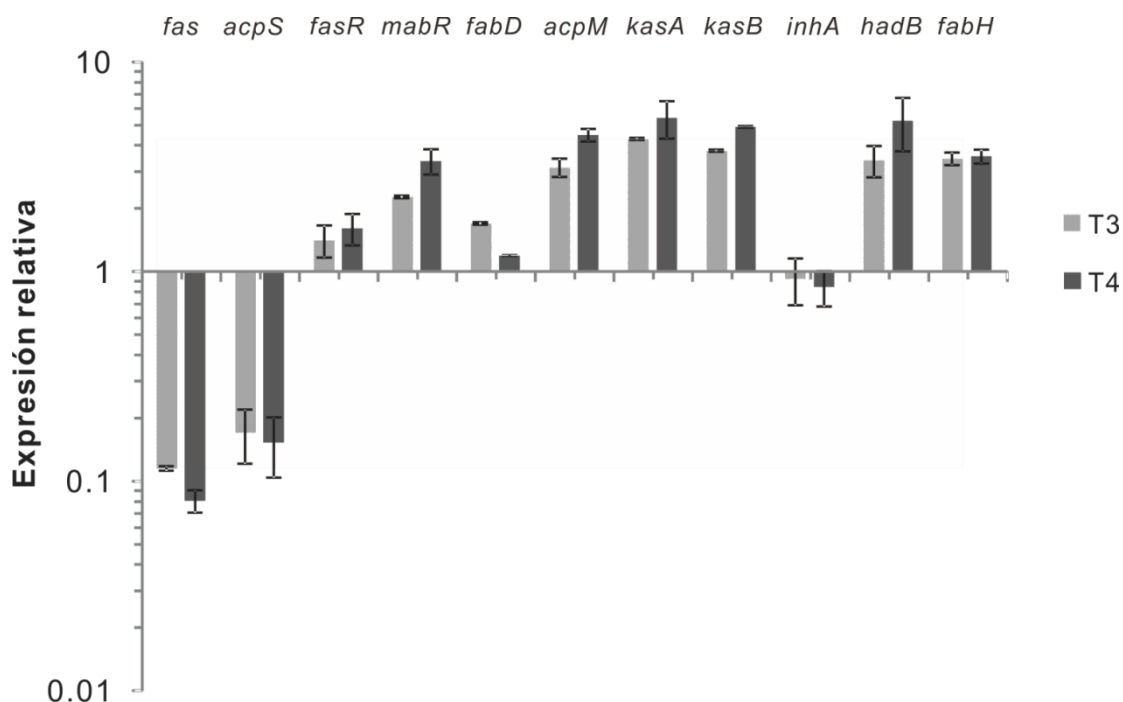
Dado que el sistema FAS-I le provee de sustrato al sistema FAS-II, una alteración en los niveles de expresión de *fas-acpS* podría influir simultáneamente en la biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos. En consecuencia, el estudio fisiológico de la cepa *fas* cKD ayudaría a elucidar el complejo mecanismo de regulación de la biosíntesis de ácidos grasos/micólicos y la comunicación entre los dos sistemas FAS.

En primer lugar, decidimos cuantificar el grado de inhibición de FAS-I y AcpS ante el tratamiento con ATc y analizar el impacto de dicha disminución sobre la expresión de los genes del operón *fasII*. Para ello, determinamos los niveles de expresión de los operones *fas-acpS* y *fasII* en la cepa *fas* cKD por qRT-PCR. La misma fue crecida en medio 7H9 durante 12 h ( $DO_{600} \sim 0.2$ ), tras lo cual el cultivo fue dividido en dos fracciones iguales y una de ellas fue suplementada con ATc 200 ng/ml. A las 13 h (T3) y 17 h (T4) posteriores al agregado de ATc (Figura 34) se tomaron muestras de cada cultivo (con y sin ATc 200 ng/ml) y se extrajeron los ARNs. La elección de los tiempos T3 y T4 para el análisis transcripcional se basó en el estado metabólico de la mutante, determinado a través de la marcación con [ $^3$ H] Leucina. Este ensayo define si la deficiencia de FAS-I genera un desorden metabólico con efecto pleiotrópico sobre otras vías metabólicas de la bacteria. Pudimos determinar así que en T3 la biosíntesis de proteínas se encuentra afectada solamente en un 10% y en T4 el metabolismo proteico se ve levemente comprometido, presentando una disminución del 30% (Figura 37).



**Figura 37. Efecto de la disminución de los niveles de FAS-I sobre la síntesis de proteínas.** Alícuotas de la cepa *fas* cKD crecida con y sin ATc 200 ng/ml se marcaron a los tiempos T1-T6 de la curva de crecimiento (ver Figura 34) durante 1 h con [<sup>3</sup>H] leucina. Los resultados fueron normalizados por la densidad óptica de los cultivos a cada punto de la curva. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes ± desviación estándar.

Los ARNs obtenidos fueron sometidos a retrotranscripción (RT) utilizando hexanucleótidos degenerados. Los ADNc resultantes fueron utilizados para cuantificar las cantidades relativas de los genes *fas*, *acpS*, *fasR*, *mabR*, *fabD*, *acpM*, *kasA*, *kasB*, *inhA*, *hadB* y *fabH* por qRT-PCR.



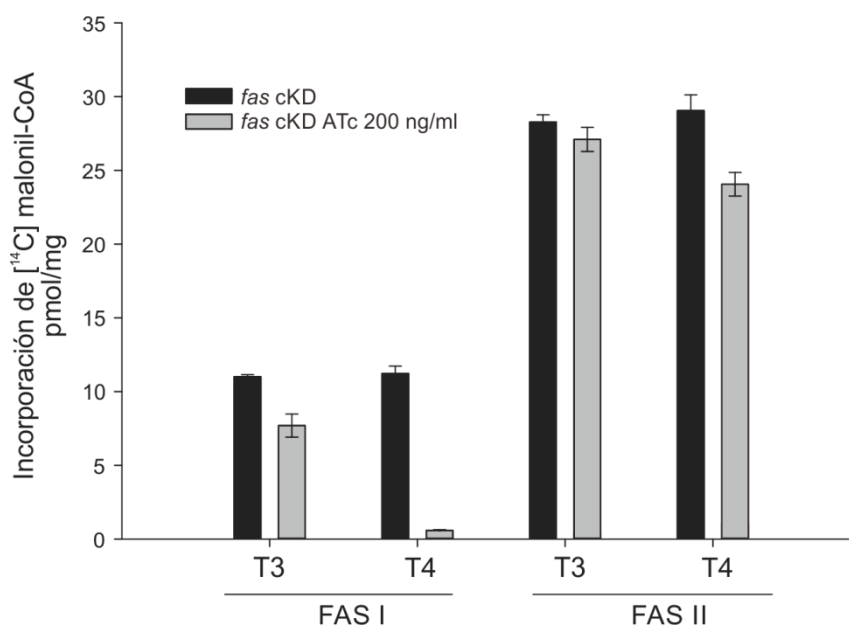
**Figura 38. Regulación de la expresión de los genes del sistema FAS-II ante una expresión reducida del operón *fas-acpS*.** Niveles de los transcritos de *fas*, *acpS*, *fasR*, *mabR*, *fabD*, *acpM*, *kasA*, *kasB*, *inhA*, *hadB* y *fabH* medidos por qRT-PCR a las 13 h (T3) y 17 h (T4) posteriores al agregado de ATc en la cepa *fas-cKD* crecida con ATc 200 ng/ml respecto a la crecida en ausencia del mismo. La normalización se realizó utilizando el transcripto de *sigA<sub>MS</sub>* como invariable.

Como puede verse en la Figura 38, ante el agregado de ATc hay una clara disminución en la expresión de los genes del operón *fas-acpS*, de aproximadamente 10 veces. Teniendo en cuenta que el sistema FAS-II utiliza como sustrato iniciador a los productos de condensación del sistema FAS-I, esperábamos encontrar una disminución concomitante en la expresión del operón *fasII*. Sin embargo, contrario a lo esperado, vimos un aumento en la expresión de *mabR*, gen que codifica para el regulador transcripcional del operón *fasII* y consecuentemente pudimos observar la activación de dicho operón, el cual codifica para varias enzimas del sistema FAS-II, KasA y KasB ( $\beta$ -cetoacil AcpM sintasas), así como también para la proteína transportadora de acilos, AcpM y la enzima malonil-CoA:AcpM transacilasa, FabD. Nuevamente la expresión de *fabD* mostró ser levemente diferente al resto del operón *fasII*, al igual que lo observado para la mutante en *mabR* (Capítulo 1). Para determinar

si esta activación es global sobre las enzimas que participan en el sistema FAS-II para la elongación de ácidos grasos, decidimos analizar la expresión de los genes *hadB*, *inhA* y *fabH*. Como se muestra en la Figura 38, la expresión de *hadB*, una de las  $\beta$ -hidroxiacil AcpM deshidratasas del sistema FAS-II, se encuentra activada, al igual que la de *fabH* ( $\beta$ -cetoacil AcpM sintasa), la enzima condensante que conecta ambos sistemas de sintasas FAS. En cuanto a los niveles relativos de expresión de la enoil-AcpM reductasa, *inhA*, vemos que permanece inalterada frente a los niveles reducidos de FAS-I, sugiriendo la existencia de otro mecanismo de regulación para esta proteína en estas condiciones, pudiendo involucrar una modificación postraduccional por fosforilación o una regulación alostérica de la enzima.

### 3.3.2.3 Una expresión disminuída de *fas* impacta negativamente sobre la actividad FAS-I en *M. smegmatis*

Con el fin de determinar las consecuencias fisiológicas asociadas a la disminución de la expresión de *fas*, se tomaron muestras de la mutante *fas* cKD cultivada en presencia y en ausencia de ATc 200 ng/ml en diferentes puntos de la curva (T3 y T4) y se prepararon extractos libres de células para la determinación de las actividades FAS-I y FAS-II *in vitro*. Como puede observarse en la Figura 39, en T3 la actividad del sistema FAS-I proveniente de *fas* cKD crecida en presencia de ATc fue un 25% menor comparada con la misma actividad enzimática determinada en el extracto proteico de *fas* cKD crecida en ausencia de ATc. Dicha actividad fue casi nula luego de haber incubado la mutante durante 17 h con ATc (T4). Sorprendentemente, cuando se usaron los mismos extractos libres de células para analizar la actividad del sistema FAS-II, se encontró que esta actividad enzimática permaneció inalterada en T3 y presentó sólo una ligera reducción (17%) en T4, debido probablemente a un efecto pleiotrópico sobre el metabolismo celular desencadenado por la caída abrupta de la biosíntesis de ácidos grasos (Figura 37).



**Figura 39. Actividades FAS-I y FAS-II *in vitro*.** Se prepararon extractos libres de células a partir de cultivos de *fas* cKD crecidos presencia o en ausencia de ATc 200 ng/ml en T3 y T4. Las actividades FAS-I y FAS-II se midieron en una reacción que contenía 1 mg de extracto de proteínas libres de células en presencia de [2-<sup>14</sup>C] malonil-CoA como unidad de extensión y acetil-CoA o palmitoil-CoA como sustrato iniciador para FAS-I o FAS-II, respectivamente. Después de la incubación y extracción de lípidos saponificables, se midió la radioactividad incorporada. Los resultados representan el promedio de tres repeticiones biológicas independientes  $\pm$  desviación estándar. Todos los resultados fueron normalizados por DO<sub>600</sub> y la concentración total de proteínas (en colaboración con la Dra. Julia Lara).

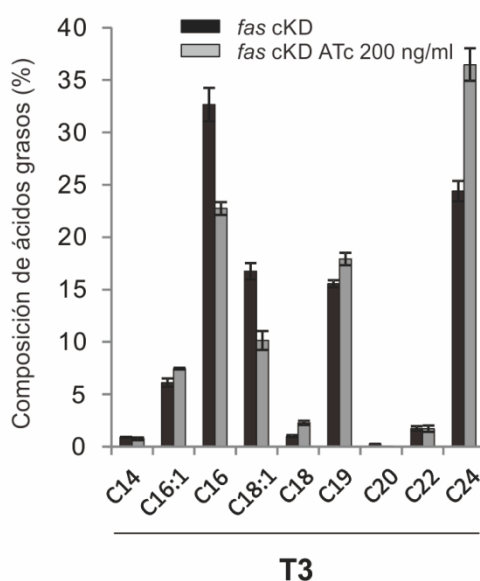
Posteriormente, decidimos evaluar el impacto de esta deficiente actividad FAS-I sobre el metabolismo lipídico de *M. smegmatis*, para lo cual determinamos la composición de los ácidos grasos totales presentes en la cepa mutante en presencia y ausencia de ATc, empleando cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Como resultado del experimento pudimos observar que ante una reducida actividad FAS-I, hubo una clara disminución en la cantidad de ácidos grasos de cadena mediana C<sub>16</sub> y C<sub>18:1</sub>, productos mayoritarios del sistema FAS-I en *M. smegmatis*. Sin embargo, cuando analizamos la cantidad total del ácido graso de 24 unidades de carbono (C<sub>24</sub>), vimos que su producción no se vio atenuada. En términos relativos, esto se tradujo en una disminución de la proporción de C<sub>16</sub> y C<sub>18:1</sub> con un concomitante incremento de C<sub>24</sub> (Figura 40). Esto fue sumamente llamativo dado que

en condiciones normales de crecimiento, el sistema FAS-I actúa de manera bimodal liberando por un lado ácidos grasos de cadena mediana C<sub>16</sub> y C<sub>18:1</sub>, y por el otro, el ácido graso de cadena larga C<sub>24</sub>. Aparentemente ante una caída en la actividad FAS-I, el equilibrio en la bimodalidad de FAS-I estaría perturbado, siendo reducida la producción de ácidos grasos de cadena mediana, manteniéndose constante la producción del ácido graso C<sub>24</sub>.

A)

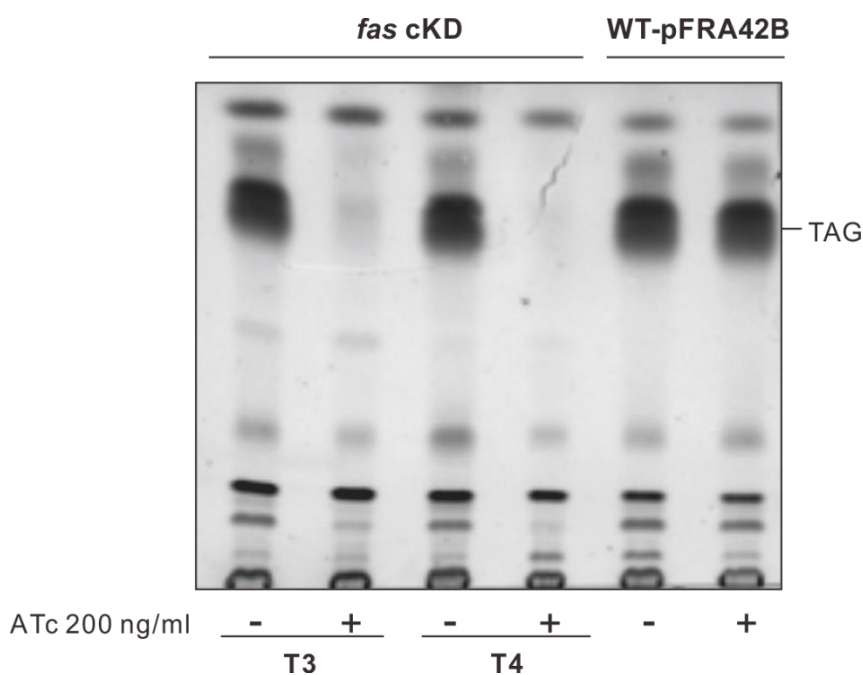
Cepa	% de:									
	C14	C16:1	C16	C17	C18:1	C18	C19	C20	C22	C24
<i>fas</i> cKD T3	0.9	6.12	32.65	0	16.74	0.99	15.56	0.25	1.74	24.41
<i>fas</i> cKD ATc 200 ng/ml T3	0.76	7.46	22.74	0	10.15	2.29	17.91	0	1.72	36.47
<i>fas</i> cKD T4	0.73	4.48	33.9	0.51	17	1.1	16.88	0.16	1.43	23.81
<i>fas</i> cKD ATc 200 ng/ml T4	0.61	7.71	22.68	0.51	10.31	2.88	17.68	0	1.42	36.05
WT-pFRA42B	1.03	5.11	32.52	0.37	22.25	1.11	13.67	0.38	2.47	21.04
WT-pFRA42B ATc 200 ng/ml	1.11	6.51	31.29	0.4	21.57	1.56	13.91	0.45	2.51	20.69

B)



**Figura 40. La actividad FAS-I reducida impacta sobre el contenido de C<sub>16</sub> y C<sub>18:1</sub> en la célula pero no sobre el contenido de C<sub>24</sub>.** Se determinó el contenido de ácidos grasos totales en la mutante *fas* cKD crecida en presencia y en ausencia de ATc 200 ng/ml en T3 y T4 por espectrometría de masas acoplada a cromatografía gaseosa. Como control se procesó la cepa parental WT-pFRA42B. **A)** Tabla con los porcentajes relativos de los ácidos grasos de diferente longitud de cadena en las diferentes cepas y condiciones de crecimiento. **B)** Gráfico comparativo de la distribución relativa de ácidos grasos en la cepa *fas* cKD en presencia y ausencia de ATc en T3. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes ± desviación estándar.

Ante una carencia de los sustratos principales para la generación de TAG en las condiciones de baja expresión del sistema FAS-I, era de esperar que la producción de estas moléculas de reserva se vea severamente afectada. De hecho, al analizar el contenido total de TAG en la mutante tratada con ATc, se observó una total depleción de este lípido de reserva (Figura 41). Mientras que en la mutante sin tratar, el contenido de TAG resultó ser similar al presente en la cepa parental WT-pFRA42B. Posteriormente, un análisis exhaustivo de la composición de ácidos grasos en los TAG, a partir del raspado y extracción de las muestras corridas en la cromatografía en capa delgada (TLC) seguido de GC-MS, mostró que se componen de un 35% de C<sub>16</sub>, 40% de C<sub>18:1</sub>, 10% de C<sub>18</sub> y 15% de C<sub>24</sub>.



**Figura 41. Depleción de TAG ante una expresión reducida de FAS.** Cromatografía en capa delgada (TLC) de los lípidos obtenidos por Bligh and Dyer a partir de cultivos de *fas cKD* crecidos en presencia y en ausencia de ATc 200 ng/ml en T3 y T4. Como control se procesó la cepa isógénica construida a partir de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 salvaje (WT-pFRA42B). La siembra fue normalizada por densidad óptica. Sistema de solventes: hexano/dietileter/ácido acético(75:25:1, v/v/v). TAG: triacilglicéridos

### 3.3.2.4 Una caída abrupta de la actividad FAS-I impacta de manera diferencial sobre la biosíntesis de novo de ácidos grasos y ácidos micólicos

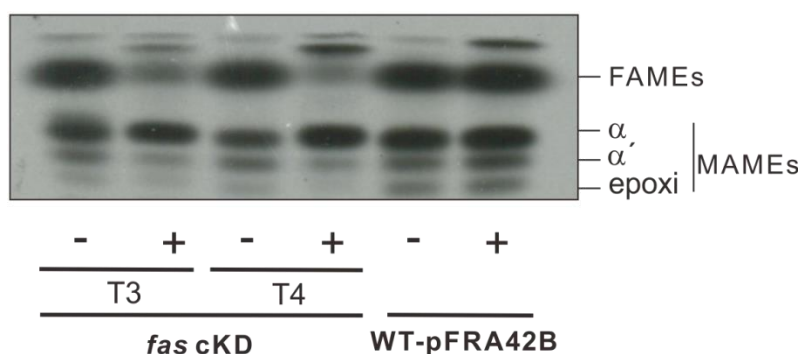
Con el fin de estudiar el impacto de la depleción de FAS-I en la síntesis *de novo* de ácidos grasos y ácidos micólicos, se realizaron experimentos de marcación con [<sup>14</sup>C] acetato en la cepa mutante *fas* cKD crecida en presencia y ausencia de ATc. A las 13 h (T3) y 17 h (T4) posteriores al agregado de ATc, se marcaron 5 ml de cada cultivo con [<sup>14</sup>C] acetato durante 1 h. Los lípidos se extrajeron de las células y se metilaron utilizando yodometano. Los extractos de FAMEs y MAMEs obtenidos se sometieron a TLC seguida de autoradiografía, normalizando la siembra por densidad óptica.

Como se muestran en las Figuras 42 y 43, la síntesis *de novo* de ácidos grasos se ve fuertemente reprimida tras el agregado de ATc y este efecto se acentúa conforme progresa la curva de crecimiento. Sin embargo, la biosíntesis de los ácidos micólicos no se ve alterada frente a los niveles reducidos de FAS-I, aunque se pueden observar diferencias en la abundancia relativa de las tres clases de MAMEs (Figuras 42 y 44). Los porcentajes relativos de  $\alpha$ -,  $\alpha'$ - y epoxi-micólicos en la cepa *fas* cKD crecida en ausencia de ATc fueron de 60, 30 y 10%, respectivamente. Perfiles similares fueron obtenidos para la cepa parental WT-pFRA42B cultivada en presencia y ausencia de ATc. Por el contrario, los porcentajes para la mutante *fas* cKD crecida en presencia de ATc 200 ng/ml fueron de 80, 14, 7% en T3 y 85, 12, 3% en T4, mostrando un aumento significativo en la abundancia de  $\alpha$ -micólicos (25% en T4) con una reducción compensatoria de  $\alpha'$ - y epoxi-micólicos (Figura 44B).

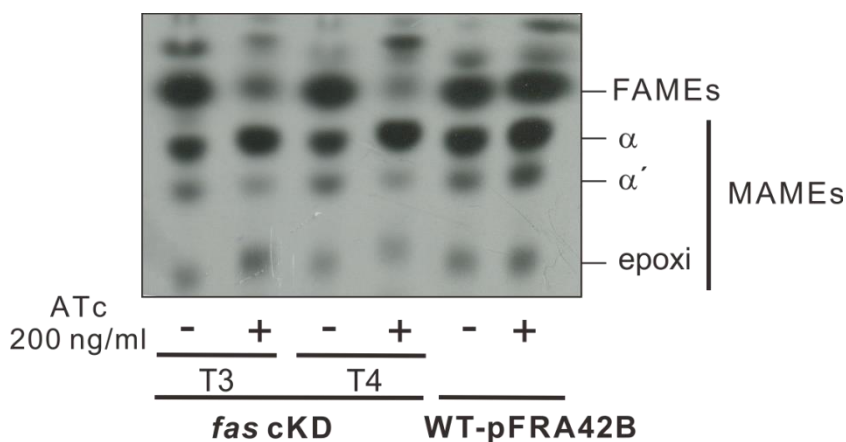
A su vez, se puede observar que la especie  $\alpha$  de los ácidos micólicos provenientes de cultivos tratados con ATc presenta un patrón de migración ligeramente diferente al de los cultivos sin tratar (Figura 42). Esta mayor movilidad en el sistema de solventes hexano: etil acetato (9:1 v/v) denota una mayor apolaridad del compuesto la cual podría estar asociada a una mayor longitud de cadena del ácido meromicólico. Al analizar las mismas muestras por cromatografía en capa delgada utilizando otro sistema de solvente de corrida, diclorometano, se observó una mejor resolución y separación de las diferentes especies de ácidos micólicos. Nuevamente

la cepa *fas* cKD crecida en presencia de ATc mostró una distribución relativa de MAMEs diferente, con una predominancia de los  $\alpha$ -micólicos en comparación a las muestras provenientes de la mutante crecida en ausencia de ATc o de la cepa parental WT-pFRA42B. Todas las especies de ácidos micólicos en la mutante deficiente en FAS-I mostraron una mayor movilidad en la cromatografía de capa delgada en sílica gel.

El fenómeno observado para la distribución relativa de los ácidos micólicos sugeriría que el sistema FAS-II ante una carencia de sustrato proveniente del FAS-I, probablemente esté elongando la cadena meromicólica de los  $\alpha'$ -micólicos para dar lugar a la especie  $\alpha$ , de mayor longitud que  $\alpha'$ .



**Figura 42. Disminución de la biosíntesis de ácidos grasos ante una expresión reducida de FAS.** Cromatografía en capa delgada (TLC) de ácidos grasos y ácidos micólicos derivatizados a partir de cultivos de *fas* cKD crecidos en presencia y en ausencia de ATc 200 ng/ml en T3 y T4. Como control se procesó la cepa isogénica construída a partir de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 salvaje (WT-pFRA42B). Sistema de solventes: hexano: etil acetato (9:1 v/v). FAMES: metil ésteres de ácidos grasos. MAMEs: metil ésteres de ácidos micólicos.



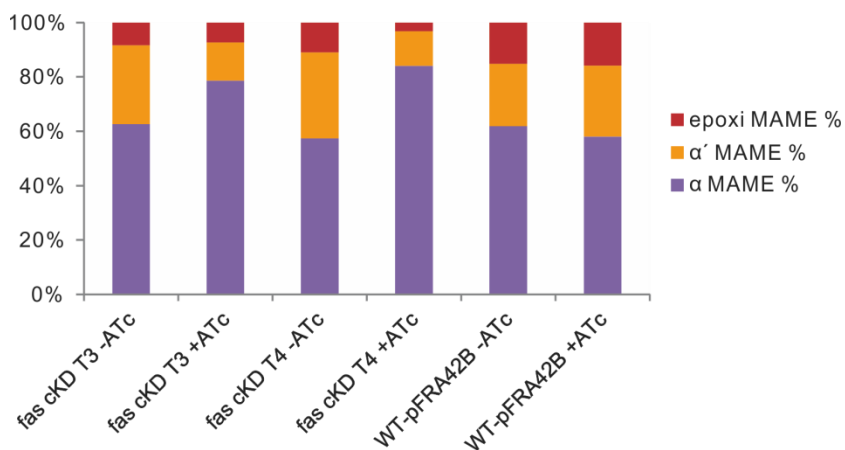
**Figura 43. Disminución de la biosíntesis de ácidos grasos ante una expresión reducida de FAS.**

Las muestras analizadas son idénticas a las empleadas para la corrida en el sistema de solvente hexano: etil acetato (9:1 v/v). En este caso el sistema de solvente empleado es el diclorometano.

A)

Composición	<i>fas cKD</i> T3 -ATc	<i>fas cKD</i> T3 +ATc	<i>fas cKD</i> T4 -ATc	<i>fas cKD</i> T4 +ATc	WT-pFRA42B -ATc	WT-pFRA42B +ATc
FAME	1478.8	336.05	1511.2	157.62	1287.7	1577.8
MAME	1506.15	1583.67	1460.65	1800.159	2323.92	2816.83
RELACIÓN FAME/MAME	0.98	0.21	1.03	0.09	0.55	0.56

B)



**Figura 44. Densitometría de FAMES y MAMES de la TLC (Figura 42). A.** Cuantificación de los spots de

FAMES y MAMES. En la tabla se informan los valores de densitometría en unidades arbitrarias. **B.**

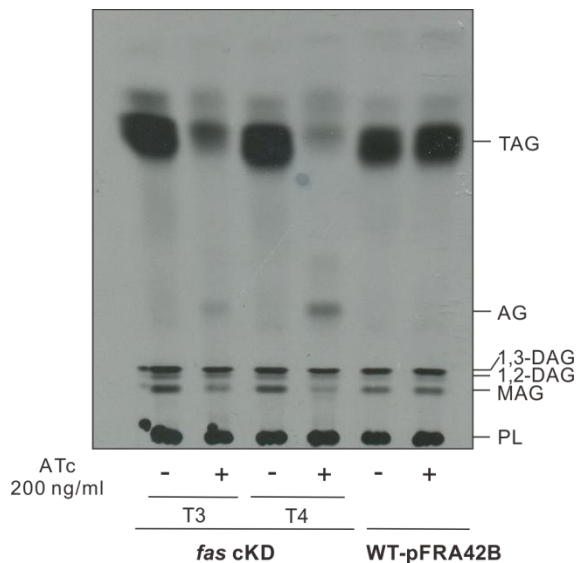
Distribución relativa de las especies de ácidos micólicos en las muestras analizadas.

### 3.3.2.5 La movilización de los triacilglicéridos provee de sustrato iniciador al sistema FAS-II para la biosíntesis de ácidos micólicos

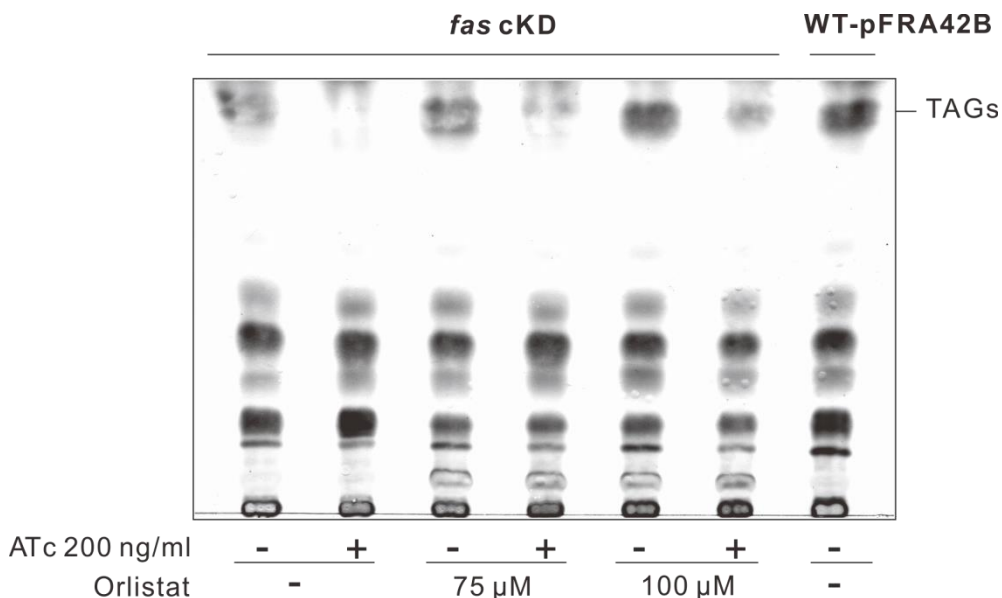
Teniendo en cuenta que el sistema FAS-I le proporciona al sistema FAS-II los precursores (acil-CoAs) para la producción de ácidos meromicólicos, se esperaba que la biosíntesis de ácidos micólicos estuviera detenida al igual que la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos en los cultivos de *fas* cKD tratados con ATc. Sin embargo, en el apartado anterior se vio que la síntesis de ácidos micólicos continúa siendo activa aún cuando las células ya están depletadas de la enzima FAS-I, con la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos seriamente comprometida (Figuras 42 y 43). Por lo tanto, con el fin de determinar la fuente de acil-CoAs en las células deficientes en la enzima FAS-I, se decidió analizar el reciclado de TAG en dichas células. Para ello, se estudió en primer lugar la biosíntesis *de novo* de TAG creciendo la mutante en presencia y en ausencia de ATc 200 ng/ml, y se marcaron las células con [<sup>14</sup>C] acetato a las 13 h (T3) y 17 h (T4) posteriores al agregado de ATc durante 1 h. Como control se ensayó la cepa parental WT-pFRA42B. El contenido de TAG fue analizado mediante cromatografía en capa delgada luego de la extracción por el método de Bligh and Dyer. Como se puede apreciar en la Figura 45, la biosíntesis de TAG se ve atenuada en T3 luego de 13 horas de tratamiento con ATc y el efecto se acentúa en T4. A su vez se puede apreciar la aparición del spot correspondiente a los ácidos grasos libres en las muestras tratadas con ATc en T3 y T4. Este resultado sugeriría que además de una biosíntesis reducida de TAG, las células comenzaron a degradar activamente los TAG para compensar la deficiente actividad FAS-I, proporcionando de esta manera ácidos grasos a las otras vías metabólicas, como por ejemplo, la ruta biosintética de ácidos micólicos.

A fin de ensayar la hipótesis propuesta sobre el reciclado de TAG para la biosíntesis de ácidos micólicos, se trataron los cultivos con tetrahidrolipstatina (cuyo nombre comercial es Orlistat), un potente inhibidor de lipasas que ha demostrado inhibir la hidrólisis de TAG en las micobacterias [210,211]. Si la degradación de TAG consiste en un proceso regenerativo de precursores para el sistema FAS-II, su inhibición debería impedir la síntesis activa de ácidos micólicos.

Este ensayo se llevó a cabo tratando el cultivo de *fas* cKD con ATc y tetrahidrolipstatina al mismo tiempo una vez alcanzada la  $D.O_{600}=0.2$ . A las 13 h del tratamiento (T3) se tomaron las muestras para la extracción de lípidos totales y el análisis del contenido total de TAG mediante cromatografía en capa delgada. Las concentraciones de tetrahidrolipstatina empleadas fueron de 75  $\mu$ M y 100  $\mu$ M finales. Como se muestra en la Figura 46, la cepa *fas* cKD tratada con ATc y Orlistat presenta un mayor contenido total de TAG respecto de la misma cepa crecida en presencia de ATc pero en ausencia de Orlistat y este efecto se acentúa conforme incrementa la concentración de Orlistat, demostrando su acción inhibitoria sobre las enzimas involucradas en la hidrólisis de TAG, impidiendo que estos sean movilizados hacia otros destinos celulares. Posteriormente, al marcar con [ $^{14}$ C] acetato las células tratadas con ATc y Orlistat, observamos una clara disminución de la biosíntesis de ácidos micólicos respecto de las células que no fueron tratadas con Orlistat (Figura 47). Esto nos estaría sugiriendo que ante un déficit de los productos del FAS-I, el sistema FAS-II emplearía los ácidos grasos provenientes de la hidrólisis y movilización de TAG como sustrato iniciador para la biosíntesis de ácidos micólicos.

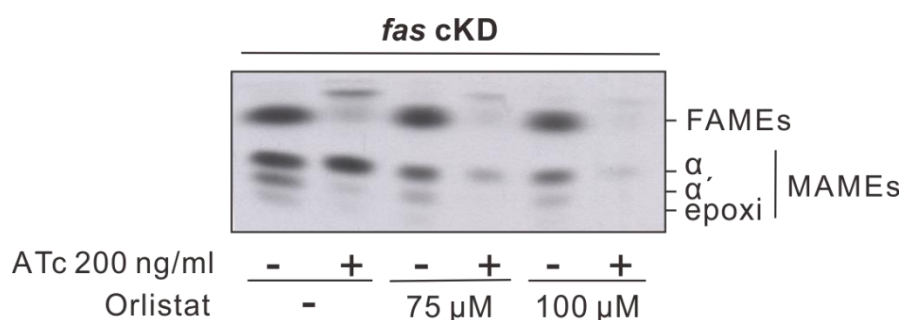


**Figura 45. Disminución de la producción de TAG ante una expresión reducida de FAS** observada a partir de cromatografía en capa delgada (TLC) de las especies lipídicas totales extraídas por el método de Bligh and Dyer a partir de cultivos de *fas*-cKD crecidos en presencia y en ausencia de ATc 200 ng/ml en T3 y T4. Como control se procesó la cepa parental WT-pFRA42B. Sistema de solventes: hexano: dietileter: ácido acético (75:25:1 v/v/v). TAG: triacilglicéridos; AG: ácido graso; DAG: diacilgliceroles; MAG: monoacilgliceroles; PL: fosfolípidos.



**Figura 46. La movilización de TAG en la mutante *fas* cKD se ve disminuída ante el tratamiento con tetrahidrolipstatina (Orlistat).** Se realizó una cromatografía en capa delgada (TLC) de las especies lipídicas totales extraídas por el método de Bligh and Dyer a partir de cultivos de *fas*-cKD en T3 crecidos

en presencia y en ausencia de ATc 200 ng/ml y de Orlistat 75 y 100  $\mu$ M. Como control se procesó la cepa parental WT-pFRA42B. Sistema de solventes: hexano: dietileter: ácido acético (75:25:1 v/v/v). Los distintos lípidos se visualizaron mediante su tinción química con Cu-fosfórico.



**Figura 47. La biosíntesis de ácidos micólicos se encuentra reducida ante la acción inhibitoria del Orlistat sobre las lipasas que hidrolizan los TAG.** Se realizó una cromatografía en capa delgada (TLC) de ácidos grasos y ácidos micólicos derivatizados a partir de cultivos de *fas cKD* en T3 crecidos en presencia y en ausencia de ATc 200 ng/ml y de Orlistat 75 y 100  $\mu$ M. La siembra se normalizó de acuerdo a la densidad óptica. Sistema de solventes: hexano: etil acetato (9:1 v/v).

### 3.3.3 Discusión

Con el fin de lograr un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la homeostasis lipídica en las micobacterias, nos planteamos como objetivo de este Capítulo estudiar la interacción entre el sistema FAS-I y las rutas metabólicas que dependen de los productos del FAS-I para su funcionamiento. Para poder obtener información sobre este proceso crítico de regulación lipídica, hemos analizado una mutante condicional de *M. smegmatis* deficiente en la expresión del operón *fas-acpS* ante el agregado de ATc al medio de cultivo. Esta mutante condicional nos permitió estudiar específicamente el efecto fisiológico de la deficiencia del sistema FAS-I *in vivo*.

En primer lugar, esta cepa mostró una deficiencia marcada en el crecimiento *in vitro* ante una severa disminución en la expresión de *fas* y por lo tanto de la actividad específica de la enzima que codifica. Esta merma en la actividad FAS-I condujo a una reducción concomitante del contenido total de ácidos grasos en la célula, observándose una clara reducción de los ácidos grasos C<sub>16</sub> y C<sub>18:1</sub>, productos mayoritarios del sistema FAS-I. Sin embargo, el nivel intracelular de C<sub>24</sub>, otro de los productos del FAS-I que se genera por la característica bimodalidad de esta sintasa, no se vio afectado en estas condiciones, siendo además la especie predominante.

Dado que tanto el sistema FAS-II como la acil-CoA carboxilasa de cadena larga [100], encargados de producir el ácido meromicólico y el carboxi-C<sub>24</sub>-CoA, respectivamente, utilizan los productos del FAS-I como sustrato de sus reacciones correspondientes, se esperaba que un cese en la actividad FAS-I resultase en una inhibición concomitante de la biosíntesis *de novo* de ácidos micólicos. Sin embargo, se observó un normal funcionamiento del sistema FAS-II e incluso una activación en la expresión de los genes que codifican para las enzimas de dicho sistema. A fin de conocer el motivo de la síntesis continua de ácidos micólicos ante una deficiencia de FAS-I y buscar así la posible fuente de precursores para estas reacciones de condensación, se inhibió la degradación de TAG con Orlistat, un fuerte inhibidor de las lipasas. Los resultados obtenidos demuestran que al inhibir la movilización de TAG, la síntesis *de novo* de ácidos micólicos se ve perjudicada de manera parcial, sugiriendo

que los ácidos grasos liberados a partir de los TAG podrían complementar, en cierta medida, la ausencia (o los niveles reducidos) de ácidos grasos sintetizados *de novo* por FAS-I. Se conoce a partir de estudios previos que en condiciones de inanición las micobacterias dependen de la movilización de TAG para la producción de energía [212]. Sin embargo, es la primera vez que los TAG son presentados como el reservorio de ácidos grasos para la biosíntesis de moléculas más complejas en las micobacterias.

Un análisis lipídico más detallado reveló que en condiciones de deficiencia de FAS-I, la especie  $\alpha$  de los ácidos micólicos aumenta en relación a las especies  $\alpha'$ - y epoxi-micólicos, siendo además en promedio más larga. Este resultado sugiere que el sistema FAS-II probablemente haya perdido su regulación natural. De hecho, hemos observado que casi todos los genes que codifican para el sistema FAS-II, con excepción de *inhA*, cuentan con una expresión activada en respuesta a la represión de la expresión de *fas*. Esta condición es similar a la presentada en la mutante que sobreexpresa KasA, donde se ha visto un aumento en la población de los  $\alpha$ -micólicos y una reducción de los  $\alpha'$  [108]. En función de esto, podríamos suponer que el aumento de la proporción de  $\alpha$ -micólicos detectado en la mutante condicional *fas* cKD en presencia de ATc, sería una consecuencia del aumento observado en los niveles de KasA.

Los bajos niveles de actividad FAS-I provocaron un claro desequilibrio en la composición relativa de los ácidos grasos, que no sólo son precursores de la biosíntesis de otros lípidos complejos, sino también moléculas señal en forma de acil-CoAs detectadas por los reguladores transcripcionales del metabolismo lipídico en varias especies [131], incluyendo FasR de *M. smegmatis*, el regulador positivo del operón *fas-*acpS** [110] y MabR, el regulador transcripcional del operón *fasII* (Capítulo 2 de esta Tesis). En el Capítulo 2 vimos que los acil-CoAs de cadena larga incrementan la afinidad de MabR por el promotor *fasII*, por lo que podríamos especular que el aumento observado en la expresión de los genes del operón *fasII* en la mutante *fas* cKD no sólo se deba al aumento de MabR sino también a la acumulación de las moléculas señal. Por lo tanto, a través de la depleción condicional de FAS-I hemos

demostrado que este estrés metabólico no sólo afecta la síntesis *de novo* de ácidos grasos, sino que produce un efecto pleiotrópico en la regulación de otros genes del metabolismo lipídico, conduciendo a un desequilibrio que inevitablemente compromete el crecimiento celular.

En el Capítulo 1 demostramos que una modificación en los niveles de expresión de *mabR* provoca una desregulación en la comunicación entre los sistemas FAS-I y FAS-II, en cuyo caso se produjo un aumento en la población de los  $\alpha$ -micólicos a la que asociamos con una disminución en la expresión de KasA, codificada por uno de los genes del operón *fasII*. A su vez, en dicha mutante vimos que una disminución en la expresión de *mabR* no sólo impacta negativamente sobre la expresión del operón *fasII*, sino también sobre la de *inhA* y *fabH*, aunque de manera indirecta como respuesta al estrés generalizado ocasionado por el desbalance lipídico intracelular, ya que no se ha encontrado ningún sitio de reconocimiento para MabR en dichos promotores. Sin embargo, en este Capítulo vimos que a pesar del desequilibrio lipídico provocado por la caída en la expresión de *fas*, no se logró perturbar la expresión de *inhA*. Esto podría deberse a que las respuestas metabólicas globales generadas en ambas mutantes hayan sido diferentes, dependiendo del grado de alteración del metabolismo lipídico en cada una de ellas. Por otra parte, vimos que la expresión de *hadB* ha sido activada ante una depleción de FAS-I. Una posible explicación a este resultado podría ser que *hadB* no sólo forma parte del operón *hadABC*, sino que junto a otros cuatro genes involucrados en la traducción forman un operón de siete genes que responde a la alarmona (p)ppGpp ante situaciones de hambre reprogramando la transcripción y reduciendo el potencial traduccional de la célula [112]; en este caso ante una caída en la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos se estaría generando dentro de la célula una señal de estrés que podría conducir a la activación del operón que incluye *hadABC* a fin de restablecer el equilibrio lipídico intracelular, tal como ha sido reportado para *B. subtilis* [213]. En este caso se ha visto que la inanición de ácidos grasos dispara una respuesta estricta en *B. subtilis*, en la cual (p)ppGpp juega un rol crucial en la coordinación de diferentes rutas biosintéticas y en la modulación del metabolismo lipídico [213]. De todas maneras serían necesarios estudios

complementarios para determinar la razón por la que la depleción de ácidos grasos afecta este operón.

En conjunto, los estudios realizados en esta Tesis indican que ante una deficiencia o perturbación del sistema FAS-I o FAS-II se produce una severa desregulación en la homeostasis lipídica global comprometiendo la viabilidad celular.

Por último, diversos estudios de interacción patógeno-huésped señalan que *M. tuberculosis* utiliza un conjunto restringido de nutrientes derivados de la célula huésped para persistir dentro de ella, entre los que podemos mencionar a los ácidos grasos y el colesterol [54]. Por ende consideramos que sería de vital importancia la construcción de una cepa de *M. tuberculosis* mutante condicional en *fas* para poder definir el rol de la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos en la supervivencia de este patógeno durante el proceso infectivo y de esta manera indagar si podría ser un blanco adecuado para el desarrollo de nuevos fármacos.

## **4 CONCLUSIONES**

Las conclusiones principales obtenidas a partir del desarrollo del presente trabajo de tesis son las siguientes:

- ✓ Se construyó una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en *mabR* regulado por TetR (*mabR* cKD). El análisis de esta mutante condicional nos permitió determinar *in vivo* el rol fisiológico de MabR como activador transcripcional del operón *fasII*, dado que una disminución de los niveles intracelulares del regulador se tradujo en una menor expresión de los genes del operón *fasII* y una reducción concomitante en la síntesis de ácidos micólicos.
- ✓ La presencia de niveles sub-fisiológicos de MabR no sólo generó una caída en la expresión del operón *fasII* sino también en la expresión de otros genes que codifican para el sistema FAS-II pero que están ubicados en otros loci del genoma donde no existen secuencias consenso de unión a MabR. Esto estaría dando indicio de una regulación cruzada a un nivel jerárquico superior donde un regulador global podría actuar en respuesta a una señal de estrés generalizado generada por la inhibición de la biosíntesis de ácidos micólicos, apagando así la expresión de otras enzimas relacionadas con este metabolismo para el ahorro energético de la bacteria.
- ✓ Ante una disminución en los niveles intracelulares de MabR, la expresión del operón *fas-accS* se vio afectada, sugiriendo una regulación coordinada a nivel transcripcional entre ambas sintetas de ácidos grasos (FAS-I y FAS-II).
- ✓ La unión de MabR a la región promotora *PfasII* se encuentra modulada *in vivo* por acil-CoAs de cadena carbonada > C<sub>18</sub>, productos del sistema FAS-I y sustratos del FAS-II. Estos ligandos son sensados por MabR, los cuales al unirse a MabR incrementan su afinidad por el promotor *PfasII* y potencian su función activadora. Este modelo de regulación de la función de MabR constituye un clásico ejemplo de regulación por sustrato.
- ✓ La activación del operón *fasII* ante el tratamiento con INH es dependiente de MabR, ya que al mutar el sitio de unión a MabR en el promotor *PfasII*, el operón

perdió la capacidad de responder a la perturbación introducida por el tratamiento con INH.

- ✓ A través de los ensayos de fusión transcripcional, se descartó la existencia de un promotor alternativo corriente arriba del sitio de unión a la ARN polimerasa en la región promotora del operón *fasII* (*PfasII*) y se observó que corriente arriba del sitio de unión a MabR, ubicado en el -87 en *M. tuberculosis*, existe una secuencia capaz de modular la actividad transcripcional de la ARN polimerasa.
- ✓ Se analizó una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en el operón *fas-ACP*S (*fas cKD*). La caracterización de esta mutante demostró que la actividad FAS-I es esencial para el crecimiento micobacteriano. La caída en la expresión del operón *fas-ACP*S se tradujo en una seria disminución en la biosíntesis de ácidos grasos. Sin embargo, el contenido intracelular del ácido graso C<sub>24</sub> no se vio afectado.
- ✓ Ante una deficiencia de los productos de condensación del sistema FAS-I, el sistema FAS-II funciona normalmente utilizando los acil-CoAs provenientes de la degradación de TAG como sustrato para la biosíntesis de ácidos micólicos.
- ✓ El estudio de las mutantes *mabR cKD* y *fas cKD* junto al análisis de las moléculas efectoras que modulan la actividad de MabR dan indicio de la compleja red de regulación encargada de mantener la homeostasis lipídica en las micobacterias, la cual involucra señales regulatorias comunes a los dos sistemas FAS.

## **5 RESUMEN**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* y se ha convertido en una emergencia sanitaria en los últimos años provocando más de un millón de muertes al año. El éxito de *M. tuberculosis* como patógeno se debe en gran medida a su notable capacidad de evadir las respuestas inmunes del huésped y así sobrevivir en el individuo infectado. Para ello, *M. tuberculosis* ha desarrollado un amplio espectro de lípidos específicos que interactúan activamente con el sistema inmune receptor, entre los cuales podemos mencionar a los ácidos micólicos, uno de los principales lípidos bioactivos presentes en la pared celular de esta bacteria, el cual es esencial para su viabilidad y crucial para su patogenicidad. Se sabe que la isoniazida (INH), uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de la TB actúa inhibiendo la biosíntesis de los ácidos micólicos, llevada a cabo por la acción concertada de dos sistemas de sintasa de ácidos grasos presentes en las micobacterias (FAS-I y FAS-II). El sistema FAS-I está involucrado en la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos, liberando acil-CoAs como productos de condensación. Estos compuestos sirven como sustratos para la biosíntesis de los fosfolípidos de la membrana plasmática y los triacilglicéridos de reserva, o pueden ser tomados por el sistema FAS-II para la biosíntesis de ácidos micólicos. Por lo tanto, una correcta interacción entre los dos sistemas FAS sería de vital importancia para las micobacterias a fin de mantener la homeostasis lipídica estrictamente regulada.

Los componentes genéticos del sistema FAS-II han sido identificados en *M. tuberculosis* y se encuentran agrupados en tres unidades transcripcionales principales: *fabD-ACP-M-kasA-kasB* (operón *fasII*), *mabA-inhA* y *hadA-hadB-hadC*. Estudios de microarreglos demostraron que el tratamiento de *M. tuberculosis* con diversos antibióticos que afectan la síntesis de ácidos micólicos, inducen la transcripción de los genes de operón *fasII*. Esta información condujo a nuestro grupo de investigación a la búsqueda de reguladores transcripcionales que pudieran estar involucrados en la regulación de la homeostasis lipídica de las micobacterias.

De esta manera, utilizando el microorganismo modelo *M. smegmatis* nuestro laboratorio descubrió dos reguladores transcripcionales que controlan el metabolismo lipídico: FasR, un regulador transcripcional que activa el operón que codifica para la enzima FAS-I y MabR, un segundo regulador transcripcional que regula

específicamente la expresión del operón *fasII*. Ambos reguladores mostraron ser esenciales para la viabilidad de las micobacterias, sugiriendo que una regulación estricta del metabolismo lipídico sería fundamental para el desarrollo normal de estas bacterias.

Con el fin de profundizar en la caracterización de la red reguladora involucrada en el mantenimiento de la homeostasis lipídica micobacteriana, en este trabajo de tesis construimos un mutante condicional en el gen *mabR* y demostramos que la presencia de niveles sub-fisiológicos de este regulador transcripcional conduce a una disminución en la expresión del operón *fasII*, lo cual nos permitió determinar el rol de MabR como activador transcripcional de dicho operón. Esta disminución en la expresión de MabR se tradujo a su vez en una clara inhibición de la biosíntesis de los ácidos micólicos y una merma en el contenido celular de lípidos complejos que contienen residuos de ácidos micólicos. Además, se observó un aumento notable en el porcentaje de fosfatidil inositol en la membrana plasmática. Todos estos resultados respaldan una activa comunicación entre los dos sistemas FAS.

También demostramos que la activación del operón *fasII* ante el tratamiento con INH es dependiente de MabR y que la afinidad de MabR por la región promotora del operón *fasII* es modulada *in vivo* por los acil-CoAs de cadena larga, productos del sistema FAS-I. Por lo tanto, MabR sería un sensor de la composición de acil-CoA en las micobacterias, el cual articula la interacción entre FAS-I y FAS-II para un correcto funcionamiento de la maquinaria lipídica.

Finalmente, vimos que ante una deficiencia de los productos de condensación del sistema FAS-I, el sistema FAS-II funciona normalmente utilizando los acil-CoAs provenientes de la degradación de TAG como sustrato alternativo para la biosíntesis de ácidos micólicos.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, junto con aquellos previamente publicados por nuestro grupo, sugieren que los dos sistemas FAS deben estar estrictamente co-regulados a nivel transcripcional para mantener la homeostasis lipídica en las micobacterias, y que la disrupción o alteración de dicha comunicación conduce a un microorganismo altamente comprometido en su viabilidad.

## **6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. WHO. 2016 Global tuberculosis report 2016.
2. Koch R. 1882 The etiology of tuberculosis. *Berliner Klinische Wochenschrift*. **15**, 221-230.
3. Harisinghani MG, McCloud TC, Shepard J-AO, Ko JP, Shroff MM, Mueller PR. 2000 Tuberculosis from Head to Toe. *RadioGraphics* **20**, 449–470.
4. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. 2013 The Immune Response in Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 475–527.
5. Gengenbacher M, Kaufmann SHE. 2012 *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 514–532.
6. Chopra K. 1996 Multi drug resistant tuberculosis. *Indian J. Pediatr.* **63**, 159–62.
7. Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, Tabarsi P, Ghanavi J, ZiaZarifi AH, Hoffner SE. 2009 Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant Tuberculosis Bacilli. *Chest* **136**, 420–425.
8. Migliori GB, De Iaco G, Besozzi G, Centis R, Cirillo DM. 2007 First tuberculosis cases in Italy resistant to all tested drugs. *Euro Surveill.* **12**, E070517.1.
9. Udawadia ZF, Amale RA, Ajbani KK, Rodrigues C. 2012 Totally Drug-Resistant Tuberculosis in India. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 579–581.
10. Chao MC, Rubin EJ. 2010 Letting sleeping dogs lie: does dormancy play a role in tuberculosis? *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 293–311.
11. Denholm JT, McBryde ES. 2010 The use of anti-tuberculosis therapy for latent TB infection. *Infect. Drug Resist.* **3**, 63–72.
12. Brennan PJ, Nikaido H. 1995 The Envelope of Mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 29–63.
13. Tortoli E. 2006 The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **48**, 159–178.
14. Embley TM, Stackebrandt E. 1994 The Molecular Phylogeny and Systematics of the Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 257–289.
15. Falkinham JO. 1996 Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 177–215.
16. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, Musser JM. 1997 Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 9869–74.
17. Cole ST. 2002 Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* **148**, 2919–2928.
18. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. 2006 The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 338–81.

19. Sizaire V, Nackers F, Comte E, Portaels F. 2006 *Mycobacterium ulcerans* infection: control, diagnosis, and treatment. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 288–296.
20. Clark-Curtiss JE, Jacobs WR, Docherty MA, Ritchie LR, Curtiss R. 1985 Molecular analysis of DNA and construction of genomic libraries of *Mycobacterium leprae*. *J. Bacteriol.* **161**, 1093–102.
21. Young RA, Bloom BR, Grosskinsky CM, Ivanyi J, Thomas D, Davis RW. 1985 Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 2583–7.
22. Jacobs WR, Docherty MA, Curtiss R, Clark-Curtiss JE. 1986 Expression of *Mycobacterium leprae* genes from a *Streptococcus mutans* promoter in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 1926–30.
23. Kieser T, Moss MT, Dale JW, Hopwood DA. 1986 Cloning and expression of *Mycobacterium bovis* BCG DNA in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **168**, 72–80.
24. Shiloh MU, DiGiuseppe Champion PA. 2010 To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 86–92.
25. Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, Kieser T, Jacobs Jr. WR. 1990 Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **4**, 1911–1919.
26. Etienne G, Laval F, Villeneuve C, Dinadayala P, Abouwarda A, Zerbib D, Galamba A, Daffé M. 2005 The cell envelope structure and properties of *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155: is there a clue for the unique transformability of the strain? *Microbiology* **151**, 2075–2086.
27. Trias J, Jarlier V, Benz R. 1992 Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science* **258**, 1479–81.
28. Daffé M, Draper P. 1998 The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* **39**, 131–203.
29. Guenin-Macé L, Siméone R, Demangel C. 2009 Lipids of Pathogenic Mycobacteria: Contributions to Virulence and Host Immune Suppression. *Transbound. Emerg. Dis.* **56**, 255–268.
30. Neyrolles O, Guilhot C. 2011 Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. *Tuberculosis* **91**, 187–195.
31. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, de Lisle G, Jacobs WR. 1994 *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **263**, 227–30.
32. Larsen MH *et al.* 2002 Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **46**, 453–66.

33. Baulard AR, Betts JC, Engohang-Ndong J, Quan S, McAdam RA, Brennan PJ, Locht C, Besra GS. 2000 Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **275**, 28326–31.
34. Kremer L, Douglas JD, Baulard AR, Morehouse C, Guy MR, Alland D, Dover LG, Lakey JH, Jacobs WR Jr, Brennan PJ, Minnikin DE, Besra GS. 2000 Thiolactomycin and related analogues as novel anti-mycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **275**, 16857–64.
35. Zhang Y. 2005 The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 529–64.
36. Kilburn JO, Takayama K. 1981 Effects of ethambutol on accumulation and secretion of trehalose mycolates and free mycolic acid in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **20**, 401–4.
37. Avenir G, Daffé M, Reyrat J-M. 2008 The Mycobacterial Cell Envelope. *American Society of Microbiology*.
38. Crick DC, Jackson M, Daffé M. 2014 Genetics of Capsular Polysaccharides and Cell Envelope (Glyco)lipids. *Microbiol. Spectr.* **2**.
39. Hett EC, Rubin EJ. 2008 Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 126–56.
40. McNeil M, Daffe M, Brennan PJ. 1991 Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **266**, 13217–23.
41. Laneelle M-A, Eynard N, Spina L, Lemassu A, Laval F, Huc E, Etienne G, Marrakchi H, Daffe M. 2013 Structural elucidation and genomic scrutiny of the C<sub>60</sub>-C<sub>100</sub> mycolic acids of *Segniliparus rotundus*. *Microbiology* **159**, 191–203.
42. Quémard A. 2016 New Insights into the Mycolate-Containing Compound Biosynthesis and Transport in Mycobacteria. *Trends Microbiol.* **24**, 725–738.
43. Barry CE, Lee RE, Mdluli K, Sampson AE, Schroeder BG, Slayden RA, Yuan Y. 1998 Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid Res.* **37**, 143–79.
44. Dubnau E, Chan J, Raynaud C, Mohan VP, Lanéelle MA, Yu K, Quémard A, Smith I, Daffé M. 2000 Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol. Microbiol.* **36**, 630–7.
45. Glickman MS, Cox JS, Jacobs WR. 2000 A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell* **5**, 717–27.
46. Glickman MS, Jacobs WR. 2001 Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell* **104**, 477–85.
47. Bhatt A, Fujiwara N, Bhatt K, Gurcha SS, Kremer L, Chen B, Chan J, Porcelli SA, Kobayashi K, Besra GS, Jacobs WR Jr. 2007 Deletion of *kasB* in

- Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5157–62.
48. Yuan Y, Zhu Y, Crane DD, Barry CE. 1998 The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **29**, 1449–58.
  49. Bhatt A, Molle V, Besra GS, Jacobs WR, Kremer L. 2007 The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Mol. Microbiol.* **64**, 1442–1454.
  50. Brown AK, Taylor RC, Bhatt A, Fütterer K, Besra GS. 2009 Platensimycin activity against mycobacterial beta-ketoacyl-ACP synthases. *PLoS One* **4**, e6306.
  51. Kremer L, Besra GS. 2005 A Waxy Tale, by *Mycobacterium tuberculosis*. In *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, pp. 287–305. American Society of Microbiology.
  52. Hunter RL, Olsen MR, Jagannath C, Actor JK. 2006 Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **36**, 371–86.
  53. Agrawal N, Bhattacharyya C, Mukherjee A, Ullah U, Pandit B, Rao KVS, Majumder PP. 2016 Dissecting host factors that regulate the early stages of tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb).* **100**, 102–13.
  54. Lovewell RR, Sasseti CM, VanderVen BC. 2016 Chewing the fat: Lipid metabolism and homeostasis during *M. tuberculosis* infection. *Curr. Opin. Microbiol.* **29**, 30–36.
  55. Aguilar-Ayala DA, Palomino JC, Vandamme P, Martin A, Gonzalez-y-Merchand JA. 2016 'Genetic regulation of *Mycobacterium tuberculosis* in a lipid-rich environment'. *Infect. Genet. Evol.*
  56. Passemar C, Arbués A, Malaga W, Mercier I, Moreau F, Lepourry L, Neyrolles O, Guilhot C, Astarie-Dequeker C. 2014 Multiple deletions in the polyketide synthase gene repertoire of *Mycobacterium tuberculosis* reveal functional overlap of cell envelope lipids in host-pathogen interactions. *Cell. Microbiol.* **16**, 195–213.
  57. Vromman F, Subtil A. 2014 Exploitation of host lipids by bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **17**, 38–45. (doi:10.1016/j.mib.2013.11.003)
  58. Ishikawa E, Mori D, Yamasaki S. 2017 Recognition of Mycobacterial Lipids by Immune Receptors. *Trends Immunol.* **38**, 66–76.

59. Thirunavukkarasu S, de Silva K, Plain KM, J Whittington R. 2016 Role of host- and pathogen-associated lipids in directing the immune response in mycobacterial infections, with emphasis on *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. *Crit. Rev. Microbiol.* **42**, 262–75.
60. Cambier CJ, Falkow S, Ramakrishnan L. 2014 Host Evasion and Exploitation Schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* **159**, 1497–1509.
61. Ernst JD. 2012 The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 581–591.
62. Astarie-Dequeker C, Le Guyader L, Malaga W, Seaphanh F-K, Chalut C, Lopez A, Guillhot C. 2009 Phthiocerol Dimycocerosates of *M. tuberculosis* Participate in Macrophage Invasion by Inducing Changes in the Organization of Plasma Membrane Lipids. *PLoS Pathog.* **5**, e1000289.
63. Barczak AK, Avraham R, Singh S, Luo SS, Zhang WR, Bray MA, Hinman AE, Thompson M, Nietupski RM, Golas A, *et al.* 2017 Systematic, multiparametric analysis of *Mycobacterium tuberculosis* intracellular infection offers insight into coordinated virulence. *PLOS Pathog.* **13**, e1006363.
64. Quigley J, Hughitt VK, Velikovskiy CA, Mariuzza RA, El-Sayed NM, Briken V. 2017 The Cell Wall Lipid PDIM Contributes to Phagosomal Escape and Host Cell Exit of *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio* **8**, e00148-17.
65. Axelrod S, Oschkinat H, Enders J, Schlegel B, Brinkmann V, Kaufmann SHE, Haas A, Schaible UE. 2008 Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cell. Microbiol.* **10**, 1530–1545.
66. Patin EC, Geffken AC, Willcocks S, Leszczyc C, Haas A, Nimmerjahn F, Lang R, Ward TH, Schaible UE. 2017 Trehalose dimycolate interferes with FcγR-mediated phagosome maturation through Mincle, SHP-1 and FcγRIIB signalling. *PLoS One* **12**, e0174973.
67. Rhoades E, Hsu F-F, Torrelles JB, Turk J, Chatterjee D, Russell DG. 2003 Identification and macrophage-activating activity of glycolipids released from intracellular *Mycobacterium bovis* BCG. *Mol. Microbiol.* **48**, 875–88.
68. Beatty WL, Rhoades ER, Ullrich HJ, Chatterjee D, Heuser JE, Russell DG. 2000 Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic* **1**, 235–47.
69. van den Elzen P *et al.* 2005 Apolipoprotein-mediated pathways of lipid antigen presentation. *Nature* **437**, 906–10.
70. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ. 2007 *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* **129**, 1287–98.
71. Mahamed D , Boulle M, Ganga Y, Mc Arthur C, Skroch S, Oom L, Catinas O, Pillay K, Naicker M, Rampersad S, Mathonsi C, Hunter J, Wong EB, Suleman M,

- Sreejit G, Pym AS, Lustig G, Sigal A. 2017 Intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* after macrophage cell death leads to serial killing of host cells. *Elife* **6**.
72. Russell DG, Cardona P-J, Kim M-J, Allain S, Altare F. 2009 Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat. Immunol.* **10**, 943–8.
73. Lee W, VanderVen BC, Fahey RJ, Russell DG. 2013 Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* exploits host-derived fatty acids to limit metabolic stress. *J. Biol. Chem.*
74. Ryan GJ, Hoff DR, Driver ER, Voskuil MI, Gonzalez-Juarrero M, Basaraba RJ, Crick DC, Spencer JS, Lenaerts AJ. 2010 Multiple *M. tuberculosis* phenotypes in mouse and guinea pig lung tissue revealed by a dual-staining approach. *PLoS One* **5**, e11108.
75. Gouzy A, Larrouy-Maumus G, Wu TD, Peixoto A, Levillain F, Lugo-Villarino G, Guerquin-Kern JL, de Carvalho LP, Poquet Y, Neyrolles O. 2013 *Mycobacterium tuberculosis* nitrogen assimilation and host colonization require aspartate. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 674–6.
76. Trujillo C, Blumenthal A, Marrero J, Rhee KY, Schnappinger D, Ehrt S. 2014 Triosephosphate isomerase is dispensable *in vitro* yet essential for *Mycobacterium tuberculosis* to establish infection. *MBio* **5**, e00085.
77. Daniel J, Maamar H, Deb C, Sirakova TD, Kolattukudy PE. 2011 *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. *PLoS Pathog.* **7**, e1002093.
78. Pandey AK, Sasseti CM. 2008 Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 4376–80.
79. Singh V, Jamwal S, Jain R, Verma P, Gokhale R, Rao KVS. 2012 *Mycobacterium tuberculosis*-driven targeted recalibration of macrophage lipid homeostasis promotes the foamy phenotype. *Cell Host Microbe* **12**, 669–681.
80. Singh V, Kaur C, Chaudhary VK, Rao KVS, Chatterjee S. 2015 *M. tuberculosis* Secretory Protein ESAT-6 Induces Metabolic Flux Perturbations to Drive Foamy Macrophage Differentiation. *Sci. Rep.* **5**, 12906.
81. Peyron P *et al.* 2008 Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog.* **4**, e1000204.
82. Griffin JE, Pandey AK, Gilmore SA, Mizrahi V, McKinney JD, Bertozzi CR, Sasseti CM. 2012 Cholesterol catabolism by *Mycobacterium tuberculosis* requires transcriptional and metabolic adaptations. *Chem. Biol.* **19**, 218–27.

83. de Carvalho LPS, Fischer SM, Marrero J, Nathan C, Ehrt S, Rhee KY. 2010 Metabolomics of *Mycobacterium tuberculosis* reveals compartmentalized co-catabolism of carbon substrates. *Chem. Biol.* **17**, 1122–31.
84. Daniel J, Sirakova T, Kolattukudy P. 2014 An Acyl-CoA Synthetase in *Mycobacterium tuberculosis* Involved in Triacylglycerol Accumulation during Dormancy. *PLoS One* **9**, e114877.
85. Nazarova E V, Montague CR, La T, Wilburn KM, Sukumar N, Lee W, Caldwell S, Russell DG, VanderVen BC. 2017 Rv3723/LucA coordinates fatty acid and cholesterol uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. *Elife* **6**, e26969.
86. Schweizer E, Hofmann J. 2004 Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 501–17.
87. Rock CO, Cronan JE. 1996 *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1302**, 1–16.
88. Fernandes ND, Kolattukudy PE. 1996 Cloning, sequencing and characterization of a fatty acid synthase-encoding gene from *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. *Gene* **170**, 95–9.
89. Kikuchi S, Rainwater DL, Kolattukudy PE. 1992 Purification and characterization of an unusually large fatty acid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**, 318–26.
90. Wood WI, Peterson DO, Bloch K. 1978 Subunit structure of *Mycobacterium smegmatis* fatty acid synthetase. Evidence for identical multifunctional polypeptide chains. *J. Biol. Chem.* **253**, 2650–6.
91. Marrakchi H, Zhang YM, Rock CO. 2002 Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1050–5. (doi:10.1042/)
92. Rock CO, Jackowski S. 2002 Forty years of bacterial fatty acid synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 1155–66. (doi:10.1006/bbrc.2001.2022)
93. Cronan, Jr. JE, Rock CO. 2008 Biosynthesis of Membrane Lipids. *EcoSal Plus* **3**.
94. Takayama K, Wang C, Besra GS. 2005 Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 81–101.
95. Bloch K, Vance D. 1977 Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 263–98.
96. Wheeler PR, Bulmer K, Ratledge C. 1990 Enzymes for biosynthesis de novo and elongation of fatty acids in mycobacteria grown in host cells: is *Mycobacterium leprae* competent in fatty acid biosynthesis? *J. Gen. Microbiol.* **136**, 211–7.

97. Papaioannou N, Cheon H-S, Lian Y, Kishi Y. 2007 Product-regulation mechanisms for fatty acid biosynthesis catalyzed by *Mycobacterium smegmatis* FAS I. *Chembiochem* **8**, 1775–80.
98. Zimhony O, Vilchèze C, Jacobs WR. 2004 Characterization of *Mycobacterium smegmatis* expressing the *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I (*fas1*) gene. *J. Bacteriol.* **186**, 4051–5.
99. Kolattukudy PE, Fernandes ND, Azad AK, Fitzmaurice AM, Sirakova TD. 1997 Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **24**, 263–70.
100. Bazet Lyonnet B, Diacovich L, Gago G, Spina L, Bardou F, Lemassu A, Quémard A, Gramajo H. 2017 Functional reconstitution of the *Mycobacterium tuberculosis* long-chain acyl-CoA carboxylase from multiple acyl-CoA subunits. *FEBS J.* **284**, 1110–1125.
101. Portevin D, de Sousa-D'Auria C, Houssin C, Grimaldi C, Chami M, Daffe M, Guilhot C. 2004 A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 314–319.
102. Choi KH, Kremer L, Besra GS, Rock CO. 2000 Identification and substrate specificity of beta -ketoacyl (acyl carrier protein) synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **275**, 28201–7.
103. Scarsdale JN, Kazanina G, He X, Reynolds KA, Wright HT. 2001 Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. *J. Biol. Chem.* **276**, 20516–22.
104. Brown AK, Sridharan S, Kremer L, Lindenberg S, Dover LG, Sacchettini JC, Besra GS. 2005 Probing the mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III mtFabH: factors influencing catalysis and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **280**, 32539–47.
105. Banerjee A, Sugantino M, Sacchettini JC, Jacobs WR. 1998 The *mabA* gene from the *inhA* operon of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3-ketoacyl reductase that fails to confer isoniazid resistance. *Microbiology* **144** ( Pt 10), 2697–704.
106. Sacco E, Covarrubias AS, O'Hare HM, Carroll P, Eynard N, Jones TA, Parish T, Daffé M, Bäckbro K, Quémard A. 2007 The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 14628–33.
107. Schaeffer ML, Agnihotri G, Volker C, Kallender H, Brennan PJ, Lonsdale JT. 2001 Purification and Biochemical Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* Beta-Ketoacyl-acyl Carrier Protein Synthases KasA and KasB. *J. Biol. Chem.* **276**, 47029–47037.

108. Kremer L, Dover LG, Carrère S, Nampoothiri KM, Lesjean S, Brown AK, Brennan PJ, Minnikin DE, Locht C, Besra GS. 2002 Mycolic acid biosynthesis and enzymic characterization of the beta-ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **364**, 423–430.
109. Slayden RA, Barry CE. 2002 The role of KasA and KasB in the biosynthesis of meromycolic acids and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. **82**, 149–60.
110. Mondino S, Gago G, Gramajo H. 2013 Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **89**, 372–387.
111. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, *et al.* 1998 Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537–544.
112. Jamet S, Quentin Y, Coudray C, Texier P, Laval F, Daffé M, Fichant G, Cam K. 2015 Evolution of mycolic acid biosynthesis genes and their regulation during starvation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **197**, JB.00433-15.
113. Kremer L, Nampoothiri KM, Lesjean S, Dover LG, Graham S, Betts J, Brennan PJ, Minnikin DE, Locht C, Besra GS. 2001 Biochemical characterization of acyl carrier protein (AcpM) and malonyl-CoA:AcpM transacylase (mtFabD), two major components of *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II. *J. Biol. Chem.* **276**, 27967–74.
114. Zimhony O, Schwarz A, Raitses-Gurevich M, Peleg Y, Dym O, Albeck S, Burstein Y, Shakked Z. 2015 AcpM, the Meromycolate Extension Acyl Carrier Protein of *Mycobacterium tuberculosis*, Is Activated by the 4'-Phosphopantetheinyl Transferase PptT, a Potential Target of the Multistep Mycolic Acid Biosynthesis. *Biochemistry* **54**, 2360–2371.
115. Schaeffer ML, Agnihotri G, Kallender H, Brennan PJ, Lonsdale JT. 2001 Expression, purification, and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* acyl carrier protein, AcpM. *Biochim. Biophys. Acta* **1532**, 67–78.
116. Sridharan S, Wang L, Brown AK, Dover LG, Kremer L, Besra GS, Sacchettini JC. 2007 X-ray crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl acyl carrier protein synthase II (mtKasB). *J. Mol. Biol.* **366**, 469–80.
117. Gao L-Y, Laval F, Lawson EH, Groger RK, Woodruff A, Morisaki JH, Cox JS, Daffe M, Brown EJ. 2003 Requirement for *kasB* in *Mycobacterium* mycolic acid biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Mol. Microbiol.* **49**, 1547–63.
118. Bhatt A, Kremer L, Dai AZ, Sacchettini JC, Jacobs WR. 2005 Conditional depletion of KasA, a key enzyme of mycolic acid biosynthesis, leads to mycobacterial cell lysis. *J. Bacteriol.* **187**, 7596–606.

119. Marrakchi H, Ducasse S, Labesse G, Montrozier H, Margeat E, Emorine L, Charpentier X, Daffé M, Quémard A. 2002 MabA (FabG1), a *Mycobacterium tuberculosis* protein involved in the long-chain fatty acid elongation system FAS-II. *Microbiology* **148**, 951–60.
120. Quémard A, Sacchettini JC, Dessen A, Vilcheze C, Bittman R, Jacobs WR, Blanchard JS. 1995 Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **34**, 8235–41.
121. Betts JC, McLaren A, Lennon MG, Kelly FM, Lukey PT, Blakemore SJ, Duncan K. 2003 Signature gene expression profiles discriminate between isoniazid-thiolactomycin-, and triclosan-treated *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2903–2913.
122. Trivedi OA, Arora P, Sridharan V, Tickoo R, Mohanty D, Gokhale RS. 2004 Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature* **428**, 441–445.
123. Portevin D, de Sousa-D'Auria C, Montrozier H, Houssin C, Stella A, Lanéelle M-A, Bardou F, Guilhot C, Daffé M. 2005 The acyl-AMP ligase FadD32 and AccD4-containing acyl-CoA carboxylase are required for the synthesis of mycolic acids and essential for mycobacterial growth: identification of the carboxylation product and determination of the acyl-CoA carboxylase components. *J. Biol. Chem.* **280**, 8862–74.
124. Gande R, Gibson KJ, Brown AK, Krumbach K, Dover LG, Sahm H, Shioyama S, Oikawa T, Besra GS, Eggeling L. 2004 Acyl-CoA carboxylases (*accD2* and *accD3*), together with a unique polyketide synthase (*Cg-pks*), are key to mycolic acid biosynthesis in *Corynebacteriaceae* such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **279**, 44847–57.
125. Gavalda S, Léger M, van der Rest B, Stella A, Bardou F, Montrozier H, Chalut C, Burlet-Schiltz O, Marrakchi H, Daffé M, Quémard A. 2009 The Pks13/FadD32 Crosstalk for the Biosynthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **284**, 19255–19264.
126. Veyron-Churlet R, Guerrini O, Mourey L, Daffé M, Zerbib D. 2004 Protein-protein interactions within the Fatty Acid Synthase-II system of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for mycobacterial viability. *Mol. Microbiol.* **54**, 1161–72.
127. Veyron-Churlet R, Bigot S, Guerrini O, Verdoux S, Malaga W, Daffé M, Zerbib D. 2005 The biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis* relies on multiple specialized elongation complexes interconnected by specific protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* **353**, 847–58.
128. Cantaloube S, Veyron-Churlet R, Haddache N, Daffé M, Zerbib D. 2011 The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II dehydratases and methyltransferases define the specificity of the mycolic acid elongation complexes. *PLoS One* **6**, e29564.

129. Nataraj V, Varela C, Javid A, Singh A, Besra GS, Bhatt A. 2015 Mycolic acids: Deciphering and targeting the Achilles' heel of the tubercle bacillus. *Mol. Microbiol.* **98**, 7–16.
130. Zhang Y-M, Rock CO. 2008 Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 222–233.
131. Zhang YM, Rock CO. 2009 Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S115-9.
132. DiRusso CC, Heimert TL, Metzger AK. 1992 Characterization of FadR, a global transcriptional regulator of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. Interaction with the *fadB* promoter is prevented by long chain fatty acyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.* **267**, 8685–91.
133. Cronan JE, Subrahmanyam S. 1998 FadR, transcriptional co-ordination of metabolic expediency. *Mol. Microbiol.* **29**, 937–943.
134. Zhang Y-M, White SW, Rock CO. 2006 Inhibiting bacterial fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **281**, 17541–4.
135. Schujman GE, Paoletti L, Grossman AD, de Mendoza D. 2003 FapR, a bacterial transcription factor involved in global regulation of membrane lipid biosynthesis. *Dev. Cell* **4**, 663–672.
136. Schujman GE, Guerin M, Buschiazzo A, Schaeffer F, Llarrull LI, Reh G, Vila AJ, Alzari PM, de Mendoza D. 2006 Structural basis of lipid biosynthesis regulation in Gram-positive bacteria. *EMBO J.* **25**, 4074–83.
137. Matsuoka H, Hirooka K, Fujita Y. 2007 Organization and function of the YsiA regulon of *Bacillus subtilis* involved in fatty acid degradation. *J. Biol. Chem.* **282**, 5180–94.
138. Lu Y-J, Rock CO. 2006 Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **59**, 551–566.
139. Schujman GE, de Mendoza D. 2008 Regulation of type II fatty acid synthase in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 148–52.
140. Zhu K, Zhang Y-M, Rock CO. 2009 Transcriptional Regulation of Membrane Lipid Homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **284**, 34880–34888.
141. Campbell JW, Cronan JE. 2001 *Escherichia coli* FadR positively regulates transcription of the *fabB* fatty acid biosynthetic gene. *J. Bacteriol.* **183**, 5982–90.
142. Feng Y, Cronan JE. 2011 Complex binding of the FabR repressor of bacterial unsaturated fatty acid biosynthesis to its cognate promoters. *Mol. Microbiol.* **80**, 195–218.
143. Subramanian C, Rock CO, Zhang Y-M. 2010 DesT Coordinates the Expression of Anaerobic and Aerobic Pathways for Unsaturated Fatty Acid Biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **192**, 280–285.

144. Zhu K, Choi K-H, Schweizer HP, Rock CO, Zhang Y-M. 2006 Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **60**, 260–73.
145. Zhang Y-M, Zhu K, Frank MW, Rock CO. 2007 A *Pseudomonas aeruginosa* transcription factor that senses fatty acid structure. *Mol. Microbiol.* **66**, 622–32.
146. Miller DJ, Zhang Y-M, Subramanian C, Rock CO, White SW. 2010 Structural basis for the transcriptional regulation of membrane lipid homeostasis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 971–5.
147. Jerga A, Rock CO. 2009 Acyl-acyl carrier protein regulates transcription of fatty acid biosynthetic genes via the FabT repressor in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **284**, 15364–15368.
148. Fujita Y, Matsuoka H, Hirooka K. 2007 Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Mol. Microbiol.* **66**, 829–839.
149. Arabolaza A, D'Angelo M, Comba S, Gramajo H. 2010 FasR, a novel class of transcriptional regulator, governs the activation of fatty acid biosynthesis genes in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **78**, 47-63.
150. Salzman V, Mondino S, Sala C, Cole ST, Gago G, Gramajo H. 2010 Transcriptional regulation of lipid homeostasis in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **78**, 64–77.
151. Molle V, Brown AK, Besra GS, Cozzone AJ, Kremer L. 2006 The Condensing Activities of the *Mycobacterium tuberculosis* Type II Fatty Acid Synthase Are Differentially Regulated by Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 30094–30103.
152. Veyron-Churlet R, Molle V, Taylor RC, Brown AK, Besra GS, Zanella-Cléon I, Fütterer K, Kremer L. 2009 The *Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III Activity Is Inhibited by Phosphorylation on a Single Threonine Residue. *J. Biol. Chem.* **284**, 6414–6424.
153. Veyron-Churlet R, Zanella-Cléon I, Cohen-Gonsaud M, Molle V, Kremer L. 2010 Phosphorylation of the *Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Reductase MabA Regulates Mycolic Acid Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **285**, 12714–12725.
154. Molle V, Kremer L. 2010 Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol. Microbiol.* **75**, 1064–77.
155. Molle V, Gulten G, Vilchère C, Veyron-Churlet R, Zanella-Cléon I, Sacchettini JC, Jacobs Jr WR, Kremer L. 2010 Phosphorylation of InhA inhibits mycolic acid biosynthesis and growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **78**, 1591–1605.
156. Slama N, Leiba J, Eynard N, Daffé M, Kremer L, Quémard A, Molle V. 2011 Negative regulation by Ser/Thr phosphorylation of HadAB and HadBC

- dehydratases from *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **412**, 401–406.
157. Vilchèze C, Molle V, Carrère-Kremer S, Leiba J, Mourey L, Shenai S, Baronian G, Tufariello J, Hartman T, Veyron-Churlet R, Trivelli X, Tiwari S, Weinrick B, Alland D, Guérardel Y, Jacobs WR Jr, Kremer L. 2014 Phosphorylation of KasB Regulates Virulence and Acid-Fastness in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* **10**, e1004115.
158. Le N-H, Molle V, Eynard N, Miras M, Stella A, Bardou F, Galandrin S, Guillet V, André-Leroux G, Bellinzoni M, Alzari P, Mourey L, Burlet-Schiltz O, Daffé M, Marrakchi H. 2016 Ser/Thr Phosphorylation Regulates the Fatty Acyl-AMP Ligase Activity of FadD32, an Essential Enzyme in Mycolic Acid Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **291**, 22793–22805.
159. Wilson M, DeRisi J, Kristensen HH, Imboden P, Rane S, Brown PO, Schoolnik GK. 1999 Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12833–8.
160. Boshoff HIM, Myers TG, Copp BR, McNeil MR, Wilson MA, Barry CE. 2004 The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action. *J. Biol. Chem.* **279**, 40174–84.
161. Wang R, Prince JT, Marcotte EM. 2005 Mass spectrometry of the *M. smegmatis* proteome: protein expression levels correlate with function, operons, and codon bias. *Genome Res.* **15**, 1118–26.
162. Fu LM. 2006 Exploring drug action on *Mycobacterium tuberculosis* using affymetrix oligonucleotide genechips. *Tuberculosis (Edinb).* **86**, 134–43.
163. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. 2003 Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **48**, 77–84.
164. Biswas RK, Dutta D, Tripathi A, Feng Y, Banerjee M, Singh BN. 2013 Identification and characterization of Rv0494: A fatty acid-responsive protein of the GntR/FadR family from *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* **159**, 913–923.
165. Yousuf S, Angara R, Vindal V, Ranjan A. 2015 Rv0494 is a starvation-inducible, auto-regulatory FadR-like regulator from *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **161**, 463–476.
166. van Hijum SAFT, Medema MH, Kuipers OP. 2009 Mechanisms and Evolution of Control Logic in Prokaryotic Transcriptional Regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 481–509.
167. Hanahan D. 1983 Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580.

168. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989 Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
169. Studier FW, Moffatt BA. 1986 Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–30.
170. Cabruja M, Mondino S, Tsai YT, Lara J, Gramajo H, Gago G. 2017 A conditional mutant of the fatty acid synthase unveils unexpected cross talks in mycobacterial lipid metabolism. *Open Biol.* **7**, 160277.
171. Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, Bansal GP, Young JF, Lee MH, Hatfull GF, *et al.* 1991 New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* **351**, 456–60.
172. Consaul SA, Pavelka MS. 2004 Use of a novel allele of the *Escherichia coli* *aacC4* aminoglycoside resistance gene as a genetic marker in mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**, 297–301.
173. Boldrin F, Casonato S, Dainese E, Sala C, Dhar N, Palú G, Riccardi G, Cole ST, Manganelli R. 2010 Development of a repressible mycobacterial promoter system based on two transcriptional repressors. *Nucleic Acids Res.* **38**, e134.
174. Triccas JA, Parish T, Britton WJ, Gicquel B. 1998 An inducible expression system permitting the efficient purification of a recombinant antigen from *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**, 151–6.
175. Dussurget O, Timm J, Gomez M, Gold B, Yu S, Sabol SZ, Holmes RK, Jacobs WR, Smith I. 1999 Transcriptional control of the iron-responsive *fxbA* gene by the mycobacterial regulator IdeR. *J. Bacteriol.* **181**, 3402–8.
176. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. 1985 Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85.
177. Laemmli UK. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5.
178. Burnette WN. 1981 Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195–203.
179. Miller JH. 1972 Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
180. Pfaffl MW. 2001 A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
181. Gomez M, Doukhan L, Nair G, Smith I. 1998 *sigA* is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **29**, 617–28.
182. Bligh EG, Dyer WJ. 1959 A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–7.

183. Ehart S, Guo X V, Hickey CM, Ryou M, Monteleone M, Riley LW, Schnappinger D. 2005 Controlling gene expression in mycobacteria with anhydrotetracycline and Tet repressor. *Nucleic Acids Res.* **33**, e21.
184. Marrakchi H, Lanéelle M-A, Daffé M. 2014 Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. *Chem. Biol.* **21**, 67–85.
185. Vilchèze C, Morbidoni HR, Weisbrod TR, Iwamoto H, Kuo M, Sacchettini JC, Jacobs WR. 2000 Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **182**, 4059–67.
186. Khan S, Nagarajan SN, Parikh A, Samantaray S, Singh A, Kumar D, Roy RP, Bhatt A, Nandicoori VK. 2010 Phosphorylation of enoyl-acyl carrier protein reductase InhA impacts mycobacterial growth and survival. *J. Biol. Chem.* **285**, 37860–71.
187. Henry MF, Cronan JE. 1992 A new mechanism of transcriptional regulation: Release of an activator triggered by small molecule binding. *Cell* **70**, 671–679.
188. Huffman JL, Brennan RG. 2002 Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 98–106.
189. Rigali S, Derouaux A, Giannotta F, Dusart J. 2002 Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J. Biol. Chem.* **277**, 12507–15.
190. Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu MM, Iyer LM. 2005 The many faces of the helix-turn-helix domain: Transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 231–262.
191. Carrère-Kremer S, Blaise M, Singh VK, Alibaud L, Tuailon E, Halloum I, van de Weerd R, Guérardel Y, Drancourt M, Takiff H, Geurtsen J, Kremer L. 2015 A new dehydratase conferring innate resistance to thiacetazone and intra-amoebal survival of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **96**, 1085–1102.
192. Shi L, Sohaskey CD, Pfeiffer C, Datta P, Parks M, McFadden J, North RJ, Gennaro ML. 2010 Carbon flux rerouting during *Mycobacterium tuberculosis* growth arrest. *Mol. Microbiol.* **78**, 1199–1215.
193. Slayden RA, Lee RE, Armour JW, Cooper AM, Orme IM, Brennan PJ, Besra GS. 1996 Antimycobacterial action of thiolactomycin: an inhibitor of fatty acid and mycolic acid synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2813–2819.
194. Jankute M, Cox JAG, Harrison J, Besra GS. 2015 Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annu. Rev. Microbiol.* **69**, 405-23.
195. Jackson M, Crick DC, Brennan PJ. 2000 Phosphatidylinositol is an essential phospholipid of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **275**, 30092–30099.

196. Haites RE, Morita YS, McConville MJ, Billman-Jacobe H. 2005 Function of phosphatidylinositol in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **280**, 10981–10987.
197. Mdluli K, Slayden RA, Zhu Y, Ramaswamy S, Pan X, Mead D, Crane DD, Musser JM, Barry CE. 1998 Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -Ketoacyl ACP Synthase by Isoniazid. *Science.* **280**, 1607–1610.
198. Irzik K, van Ooyen J, Gätgens J, Krumbach K, Bott M, Eggeling L. 2014 Acyl-CoA sensing by FasR to adjust fatty acid synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **192**, 96–101.
199. Khare G, Gupta V, Gupta RK, Gupta R, Bhat R, Tyagi AK. 2009 Dissecting the role of critical residues and substrate preference of a Fatty Acyl-CoA Synthetase (FadD13) of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* **4**, e8387.
200. Dunphy KY, Senaratne RH, Masuzawa M, Kendall L V, Riley LW. 2010 Attenuation of *Mycobacterium tuberculosis* functionally disrupted in a fatty acyl-coenzyme A synthetase gene *fadD5*. *J. Infect. Dis.* **201**, 1232–9.
201. Roy S, Garges S, Adhya S. 1998 Activation and repression of transcription by differential contact: two sides of a coin. *J. Biol. Chem.* **273**, 14059–62.
202. Schleif R. 2010 AraC protein, regulation of the l-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 779–796.
203. Browning DF, Busby SJ. 2004 The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 57–65.
204. Jackson M, McNeil MR, Brennan PJ. 2013 Progress in targeting cell envelope biogenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol.* **8**, 855–875.
205. Odriozola JM, Ramos JA, Bloch K. 1977 Fatty acid synthetase activity in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of the acyl carrier protein-dependent elongating system. *Biochim. Biophys. Acta* **488**, 207–17.
206. Peterson DO, Bloch K. 1977 *Mycobacterium smegmatis* fatty acid synthetase. Long chain transacylase chain length specificity. *J. Biol. Chem.* **252**, 5735–9.
207. Quadri LEN. 2014 Biosynthesis of mycobacterial lipids by polyketide synthases and beyond. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **49**, 179–211.
208. Folcher M, Morris RP, Dale G, Salah-Bey-Hocini K, Viollier PH, Thompson CJ. 2001 A Transcriptional Regulator of a Pristinamycin Resistance Gene in *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.* **276**, 1479–1485.
209. Chalut C, Botella L, de Sousa-D'Auria C, Houssin C, Guillhot C. 2006 The nonredundant roles of two 4'-phosphopantetheinyl transferases in vital processes of Mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 8511–8516.
210. Low KL, Rao PSS, Shui G, Bendt AK, Pethe K, Dick T, Wenk MR. 2009 Triacylglycerol Utilization Is Required for Regrowth of *In Vitro* Hypoxic

- Nonreplicating *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. *J. Bacteriol.* **191**, 5037–5043.
211. Ravindran MS, Rao SPS, Cheng X, Shukla A, Cazenave-Gassiot A, Yao SQ, Wenk MR. 2014 Targeting Lipid Esterases in Mycobacteria Grown Under Different Physiological Conditions Using Activity-based Profiling with Tetrahydrolipstatin (THL). *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 435–448.
212. Munoz-Elias EJ, McKinney JD. 2006 Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cell. Microbiol.* **8**, 10–22.
213. Pulschen AA, Sastre DE, Machinandiarena F, Crotta Asis A, Albanesi D, de Mendoza D, Gueiros-Filho FJ. 2017 The stringent response plays a key role in *Bacillus subtilis* survival of fatty acid starvation. *Mol. Microbiol.* **103**, 698–712.