



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

**“Síntesis de ácidos α - y α' - micólicos en micobacterias:
identificación de pasos biosintéticos y su utilización para
el diseño racional de nuevas drogas con acción anti-
micobacteriana”**

Presentada por María Virginia Buchieri

Rosario, Argentina

2013

**“Síntesis de ácidos α - y α' -micólicos en micobacterias:
identificación de pasos biosintéticos y su utilización
para el diseño racional de nuevas drogas con acción
anti-micobacteriana”**

María Virginia Buchieri

Microbióloga

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales,
Universidad Nacional de Río Cuarto

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 la Cátedra de Microbiología, Virología y Parasitología dependiente de la Facultad de Ciencias Médicas, durante el período comprendido entre el mes de abril de 2009 y diciembre de 2013, bajo la dirección del Dr. Héctor Ricardo Morbidoni.

Agradecimientos

Al Dr. Morbidoni, por su apoyo, estímulo para el trabajo, comprensión y consejo. Por haberme abierto las puertas de su laboratorio cuando más lo necesitaba.

Al “gran grupo” de micobacterias”. A los “micolocos” Juan Manuel y Mariana, por haber compartido conmigo momentos científicos (y no tanto), discusiones y dolores de cabeza, por haberme brindado su apoyo y amistad. A Virginia F. y a las “fagólogas” Emma y Sabrina, por su compañía, mates compartidos y algún que otro protocolo brindado. A los compañeros más recientes: Cristian, Ana, Virginia, Natalia, Nora, Carina y Alejandro. A todos los que forman o formaron parte de este grupo de trabajo tan lindo, por compartir el día a día tan importante.

Al director y personal del IBR por facilitarnos el uso de equipamientos y materiales.

A Jorgelina (Jole) una mención especial, porque es compañera fagóloga y gran amiga rosarina. Por haberme escuchado y acompañado, por estar presente en cada momento. Por todos los feriados y fines de semana compartidos en el lab, y por acompañarme en la escritura de esta tesis con correcciones y sugerencias.

A mis amigas rosarinas (a todas, para no olvidarme de nadie), por el tiempo compartido durante estos años (que fue mucho), y por haber hecho de Rosario mi lugar. Sin ustedes no sería lo mismo. Por el apoyo, por el oído, la compañía, el aguante, en resumen: por su amistad.

A mis amigas del alma (Flor, Ina, Day, Tami) que me acompañaron en todo momento a pesar de la distancia, en las buenas y en las malas. Por su apoyo y amistad. En especial a Mili, con quien también compartí mis días en esta ciudad.

Y por último, pero no menos importante, a mi familia. A mi tía Daniela y compañía, porque siempre están. A Ricardo (el tío Richard) por ser un gran apoyo y un ejemplo a seguir en la vida. Y en especial a mi madre y a mi abuela, porque me apoyaron siempre en cada paso dado y me formaron como persona. Gracias infinitas...

*Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.*

*Al andar se hace camino
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.*

*Caminante no hay camino
sino estelas en la mar...*

*Hace algún tiempo en ese lugar
donde hoy los bosques se visten de espinos
se oyó la voz de un poeta gritar
"Caminante no hay camino,
se hace camino al andar..."*

Golpe a golpe, verso a verso...

Extracto de Caminante no hay camino por Antonio Machado

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. El género <i>Mycobacterium</i>	3
2.2. Tuberculosis: generalidades	4
2.3. Características y función de la envoltura celular micobacteriana	7
2.3.1. Ácidos micólicos: estructura y biosíntesis	8
2.3.2. Regulación de la síntesis de ácidos micólicos por Serina/Treonina quinasas	15
2.4. La síntesis de ácidos micólicos como blanco de acción de drogas anti-tuberculares	16
2.5. Caracterización de mutantes deficientes en la síntesis de ácidos micólicos	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Cepas bacterianas y vectores	20
3.2. Condiciones y medios de cultivo	21
3.2.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	22
3.2.2. Medios de cultivo para micobacterias	23
3.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima 99% (CIM ₉₉)	25
3.4. Manipulación de ADN	25
3.4.1. Extracción de ADN cromosomal	25
3.4.2. Extracción de ADN para la realización de PCR de colonia	26
3.4.3. Preparación de ADN plasmídico	26
3.4.4. Tratamiento con enzimas de restricción, ligasas y fosfatasas alcalinas	28
3.4.5. Separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa	28
3.4.6. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa	28
3.4.7. Secuenciación de ADN	29
3.5. Clonado de genes	29
3.5.1. Reacciones de PCR	29
3.5.2. Clonado de productos de PCR	30
3.6. Preparación de células electrocompetentes y electroporación	34
3.6.1. <i>E. coli</i>	34
3.6.2. <i>M. smegmatis</i>	34
3.7. Manipulación de Proteínas	35
3.7.1. Preparación de extractos proteicos de <i>M. smegmatis</i>	35
3.7.2. Preparación de geles de proteína y condiciones de electroforesis	36
3.7.3. Tinción de proteínas	37
3.8. Análisis de la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos	37

3.8.1. Análisis del efecto de TAC en los perfiles de MEAMs y MEAGs de micobacterias	38
3.9. Construcción de cepas mutantes mediante el sistema de Recombineering	38
4. RESULTADOS	
4.1. Capítulo 1: Cepa mutante UNR21: síntesis de ácidos α' -micólicos en <i>M. smegmatis</i>	
4.1.1. Introducción	42
4.1.2. Resultados	44
4.1.2.1. Sobre-expresión del gen <i>kasC</i>	44
4.1.3. Discusión	47
4.1.4. Conclusiones	48
4.2. Capítulo 2: Cepa mutante UNR18: Estudio de los blancos de acción de TAC en <i>M. smegmatis</i>	
4.2.1. Introducción	49
4.2.2. Resultados	51
4.2.2.1. Transformación de la cepa UNR18 con las MtfSAM de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	51
4.2.2.2. Secuenciación de los ORFs que codifican para MtfSAM en la cepa UNR18	52
4.2.2.3. Efecto del tratamiento con TAC en las cepas de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 que sobre-expresan las MtfSAM	52
4.2.2.4. El ORF <i>MSMEG_0902</i> se encuentra involucrado en la síntesis de ácidos micólicos dicitopropanados	53
4.2.3. Discusión	54
4.2.4. Conclusiones	57
4.3. Capítulo 3: Cepa mutante UNR1: una posible conexión entre la síntesis de ácidos grasos insaturados y ácidos ϵ -micólicos en <i>M. smegmatis</i>	
4.3.1. Introducción	58
4.3.2. Resultados	59
4.3.2.1. Construcción de la mutante puntual en <i>desA3</i> (C1006T) de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	59
4.3.2.2. Análisis de las características fenotípicas de la cepa UNR1 Re	61
4.3.2.2.1. Crecimiento, morfología y resistencia a drogas	61
4.3.2.2.2. Ácidos grasos insaturados y ácidos ϵ -micólicos	65
4.3.2.3. Aislamiento y caracterización de clones revertantes de la mutante UNR1	69
4.3.2.3.1. Secuenciación el gen <i>desA3</i>	70
4.3.2.3.2. GC-MS	71
4.3.3. .Discusión	72

4.3.4. Conclusiones	76
4.4. Capítulo 4: Estudio de los genes <i>desA1</i> y <i>desA2</i> y su relación con la síntesis de los ácidos micólicos	
4.4.1. Introducción	77
4.4.2. Resultados	77
4.4.2.1. Construcción de las cepas de <i>M. smegmatis</i> delecionales en <i>desA1</i> y <i>desA2</i>	77
4.4.2.2. Construcción de las cepas merodiploides <i>M. smegmatis::desA1</i> y <i>M. smegmatis::desA2</i>	80
4.4.2.3. Análisis de los efectos fenotípicos producidos por la sobre-expresión de <i>desA1</i> y <i>desA2</i>	82
4.4.3. Discusión	84
4.4.4. Conclusiones	87
5. CONCLUSIONES	88
6. RESUMEN	91
7. BIBLIOGRAFÍA	93

1. ABREVIATURAS

ACP: proteína transportadora de acilos
ADS: albumina-dextrosa-cloruro de sodio
CoA: Coenzima A
CIM: concentración inhibitoria mínima
cpm: cuentas por minuto
DO: densidad óptica
ETH: Etionamida
FAS: sintetasa de ácidos grasos
GT: glycerol-tritón
GTw: Glicerol-tween 80
Hyg: higromicina
INH: Isoniacida
ISO: Isoxil
Km: kanamicina
MDR: multiresistente a drogas
MEAG: metil-éster de ácido graso
MEAGI: metil-éster de ácido graso insaturado
MEAGS: metil-éster de ácido graso saturado
MEAM: metil-éster de ácido micólico
MTB: *Mycobacterium tuberculosis*
MtfSAM: metiltransferasas de ácidos micólicos
NTG: nitrosoguanidina
OADS: ácido oleico-albumina-dextrosa-cloruro de sodio
OMS: Organización mundial de la salud, sus siglas en inglés WHO (World health organization)
ORF: marco de lectura abierto
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
p/v: peso en volumen
rpm: revoluciones por minuto
SAD: sensibilidad aumentada a drogas
SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SNP: polimorfismo de nucleótido simple
STPK: proteínas serina/treonina quinasas
TAC: Tiacetazona
TB: Tuberculosis
TDR: totalmente resistente a Drogas
TLC: cromatografía en capa delgada
TS: sensible a temperatura
UFC: unidad formadora de colonias
VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana
v/v: volumen en volumen
XDR: extremadamente resistente a drogas

2. INTRODUCCIÓN

2.1. EL GÉNERO *Mycobacterium*

La familia *Mycobacteriaceae*, se encuentra incluida taxonómicamente en el orden Actinomycetales, clase Actinomycetes y está formada por un único género: *Mycobacterium*. Se han descrito las características mínimas que debe poseer una especie para pertenecer a este género (Vincent Lévy-Frébault y Portaels, 1992), una de ellas es la ácido alcohol resistencia, es decir la resistencia de las células micobacterianas a la decoloración con ácido-alcohol luego de ser teñidas. Esta propiedad es producto de la presencia de los ácidos micólicos en su pared celular, ácidos grasos complejos que poseen entre 60 y 90 átomos de carbono. Además de estas dos características, las micobacterias poseen un contenido por mol de guanina-citosina (G+C) de entre 61 y 71% (Shinnick, 1994). El género *Mycobacterium* comparte propiedades importantes con otros dos actinomycetes, *Corynebacterium* y *Nocardia*, y en ocasiones estos tres géneros son agrupados bajo el nombre CNM. Todos producen ácidos micólicos (de diferente longitud) y tienen un contenido similar de (G+C) (Wolfgang et al., 1994; Lengeler et al., 1999).

Las micobacterias son bacilos aerobios, ligeramente curvos o rectos (0,2-0,6 x 1,0-10 µm), no esporulados e inmóviles (Lengeler, et al., 1999; Krieg, 1984-1989). Pueden ser bacterias saprófitas de vida libre, patógenas o potencialmente patógenas (oportunistas). *M. smegmatis* es una de las especies utilizadas como modelo de estudio del género, se considera no patógena ya que raramente causa enfermedad. *M. tuberculosis* (MTB), agente causal de la tuberculosis (TB) humana, es responsable del mayor número de muertes por año a nivel mundial causadas por una infección bacteriana. Dentro de las especies denominadas oportunistas, *M. avium* se ha transformado en un serio problema para los sistemas de salud debido a un aumento en su incidencia de infección en pacientes inmunocomprometidos. Además se han descrito numerosos patógenos animales, como es el caso de *M. marinum* que infecta peces cebra y es patógeno oportunista en humanos.

Las especies del género *Mycobacterium* se agrupan generalmente en dos grandes categorías de acuerdo a su velocidad de crecimiento a temperatura óptima (Shinnick, 1994). Las micobacterias de crecimiento rápido generan colonias aisladas en medio sólido antes de los 7 días de incubación y las micobacterias de crecimiento lento lo hacen posteriormente, requiriendo hasta 30-45 días. Dentro del segundo grupo se encuentran los patógenos

humanos más importantes. Otra característica de las distintas especies de este género, es su marcada diferencia en el rango de temperatura y la temperatura óptima de crecimiento, pudiendo ser tan extremas como es el caso de *M. tuberculosis* (tiempo de duplicación 18-24 h a su temperatura óptima, rango de temperatura de crecimiento 36°C- 41°C, temperatura óptima 37°C) y *M. smegmatis* (tiempo de duplicación 3h a su temperatura óptima, rango de temperatura de crecimiento 22°C-55°C, temperatura óptima 42°C).

2.2. TUBERCULOSIS: generalidades

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más antiguas conocidas por el hombre y es causada por el grupo de micobacterias agrupado en el Complejo *M. tuberculosis* (CMTB). De este grupo, *M. tuberculosis* y *M. africanum* son las especies asociadas primariamente a la enfermedad en humanos. La TB se disemina a través del aire y sus manifestaciones clínicas dependen de las características del organismo huésped, del microbio y de las consecuencias de las interacciones que se establezcan entre ambos (Bloom, 1994).

En el año 1991, la TB fue reconocida como enfermedad reemergente por la Organización mundial de la salud (OMS). De acuerdo con lo publicado en el último informe del Programa de control mundial de la tuberculosis (World health organization, 2012) 1,4 millones de personas mueren anualmente a causa de este mal. MTB es el mayor agente infeccioso bacteriano, aproximadamente 2 millones de personas están infectadas por esta bacteria. Sin embargo, solo una de cada diez personas infectadas desarrollará la enfermedad activa a lo largo de su vida. Estas estadísticas se agravan en el caso de individuos co-infectados por MTB y el Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Este virus es el agente causal del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), que involucra un conjunto de afecciones clínicas relacionadas con deficiencias primarias en células T y defectos funcionales secundarios en células B y Natural Killers (Wolfgang et al., 1994). TB y VIH forman una combinación letal, cada uno acelerando la diseminación del otro. De acuerdo con la hoja informativa VIH asociado a TB (World health organization, 2013) una persona VIH positiva e infectada con el bacilo tuberculoso es entre 21 y 34 veces más susceptible de desarrollar TB activa que alguien VIH negativo. La TB es la enfermedad más frecuente en personas enfermas de SIDA y la principal causa de muerte en

estos pacientes, en el año 2011 hubo 1,1 millones de nuevos casos de TB en pacientes VIH positivos (más de la mitad se presentaron en el África sub-sahariana) y 430.000 muertes de pacientes co-infectados.

MTB ingresa al organismo huésped por inhalación de gotitas de aerosol que contienen al bacilo y son expulsadas por personas con enfermedad pulmonar activa en acciones como toser, estornudar o hablar. Aunque la TB afecta predominantemente al tejido pulmonar (tuberculosis pulmonar), puede localizarse en otros órganos (tuberculosis extra pulmonar). Generalmente, solo un pequeño porcentaje de los individuos inmunocompetentes que se infectan con MTB desarrolla la enfermedad con evidencias clínicas; en los restantes la infección es eliminada o bien contenida por el sistema inmune, permaneciendo en el último caso, en estado latente durante toda la vida. La TB latente es un estado clínico en el que el individuo infectado no presenta síntomas ni daño tisular debido al control que ejerce su sistema inmune sobre la replicación del microorganismo (Lawn, 2011). Esta contención de la infección culmina en la formación de focos caseosos encapsulados en donde el bacilo persiste en un estado de inactivación metabólica (dormancia) y protegido de la acción de agentes antimicrobianos (Bloom, 1994). Las poblaciones portadoras de MTB representan un gran reservorio de la enfermedad, dado que el bacilo puede activarse por diversos factores que comprometan la inmunocompetencia del huésped.

El estudio de los mecanismos de patogénesis del bacilo tuberculoso es de gran importancia y en los últimos veinte años, mediante el desarrollo de herramientas para la manipulación genética, ha habido avances considerables en su entendimiento. Así, recientes trabajos mostraron que este patógeno interacciona con el huésped y realiza una exquisita modulación de la respuesta inmune del mismo a través de elementos de su envoltura celular, fundamentalmente lípidos complejos y ácidos grasos. Hasta el momento no se ha descrito ninguna toxina producida por MTB, a pesar de que el daño al pulmón puede ser de considerable magnitud. Esto es explicable dado la estimulación que provoca MTB de una respuesta inmune inflamatoria con abundante producción de citoquinas pro-inflamatorias y destrucción de tejido en un intento del sistema inmune por contener y aislar el punto de infección.

En la actualidad se dispone de más de veinte drogas para el tratamiento de la TB, la mayoría de las cuales fueron descubiertas en años recientes. Isoniacida (INH), Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol, se denominan drogas de primera línea y son las más efectivas en el tratamiento. El régimen de administración de drogas se basa en la utilización de dos o más fármacos para prevenir la aparición de mutantes resistentes y varía de acuerdo a si el paciente nunca ha tomado drogas anti-tuberculosas (o lo ha hecho durante menos de un mes) o si ya ha sido tratado con drogas anti-tuberculosas durante más de un mes en el pasado. En el primer caso se administran INH, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol durante 4 meses de tratamiento y luego se continúa el mismo durante dos meses más, solo con INH y Rifampicina. En el caso de los pacientes que ya han recibido tratamiento, si se comprueba bacteriológicamente la resistencia de la cepa con la que están infectados, deben ser tratados con las drogas alternativas, denominadas de segunda línea. Estas drogas son menos efectivas, poseen más efectos adversos y menor disponibilidad en muchos países, que las drogas de primera línea. Algunos ejemplos de drogas de segunda línea son Amikacina (aminoglucósido), Ciprofloxacina (Fluoroquinolona), etionamida (tioamida) y Acido p-Amino Salicílico (PAS).

En las últimas dos décadas se ha producido la emergencia mundial de las cepas de MTB multi-resistentes a drogas (MDR, del inglés Multiple drug resistant) y posteriormente las cepas extremadamente resistentes a drogas (XDR, del inglés Extensively drug resistant). Las cepas MDR son resistentes, a al menos, INH y Rifampicina y las cepas XDR son cepas MDR con resistencia a cualquier fluoroquinolona y a por lo menos uno de los tres aminoglucósidos inyectables utilizados como drogas de segunda línea (Amikacina, Capreomicina o Kanamicina (Km)). De acuerdo con lo informado por la OMS, en el año 2011 se estimaron 310000 casos de TB-MDR en pacientes con TB pulmonar, de los cuales el 60% se presentaron en China, India y la Federación Rusa. Los informes también detallan que un 3,7% de los casos nuevos de TB y un 20% de los pacientes ya tratados corresponden a cepas de MTB MDR, encontrándose mayoritariamente en Europa del este y Asia central. Las cepas XDR han sido detectadas en 84 países, conformando un 9% de las cepas MDR aisladas (World health organization, 2012). Recientemente, se han informado en Irán e India casos de cepas resistentes a todas las drogas de primera y segunda línea en uso, que fueron

denominadas por esta característica cepas totalmente resistentes a Drogas (TDR, del inglés Totally drug resistant) (Velayati et al., 2009; Udwadia et al., 2011).

2.3. CARACTERÍSTICAS Y FUNCIÓN DE LA ENVOLTURA CELULAR MICOBACTERIANA

La envoltura celular micobacteriana ha sido blanco preferencial de estudios químicos y bioquímicos a lo largo de varias décadas. El interés generado en diversos grupos de investigación radica, no solo en las diferencias de composición y estructura que la hacen única entre las demás bacterias, sino también en las propiedades inmunomoduladoras de varios de sus componentes. Nigou et al., (2001) reportaron que los lipoarabinomananos que presentan residuos manosa terminales inhiben de manera dosis dependiente la producción de IL-12 por células dendríticas, interleucina involucrada en el desarrollo de la respuesta de los linfocitos Th1 contra patógenos intracelulares como MTB. De la misma forma, varios de estos componentes, incluyendo algunas familias de ácidos micólicos han sido involucrados en la patogénesis del bacilo (Glickman et al., 2000). Además de estas interesantes características, la envoltura celular es la única barrera de protección entre el bacilo y el medio que lo rodea, por lo que la síntesis de la misma se presenta como un blanco atractivo para el diseño de nuevas drogas anti-tuberculosas. En los últimos años con la emergencia de las cepas MDR, XDR y las tan temidas TDR, el estudio de los blancos moleculares de las drogas anti-tuberculosas ya conocidas así como el diseño de nuevas drogas, han sido planteados como necesidades urgentes. En este ámbito, la secuenciación del genoma completo de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole et al., 1998) ha constituido una herramienta de estudio muy importante que permitió grandes avances en dichos campos de estudio.

La envoltura celular micobacteriana consta de tres partes: la membrana celular, la pared celular y la cápsula (Daffé y Drapper, 1998). La primera funciona como una barrera osmótica y en ella se llevan a cabo los transportes de iones y moléculas. La membrana celular micobacteriana presenta una cara externa espesa, debido a la abundancia en ella de fosfatidilinositol manósidos (PIMs, del inglés Phosphatidylinositol mannosides) (Brennan y Nikaido, 1995). Estos componentes poseen extensiones multiglicosiladas con actividad inmunológica, los lipoarabinomananos (LAM) y lipomananos (Chatterjee et al., 1992), que

generalmente son encontrados en células animales. Por otro lado, la pared celular le brinda a la célula soporte mecánico y protección y se encuentra formada por el complejo micolilarabinogalactano peptidoglicano que consta de peptidoglicano unido a arabinogalactano esterificado en su extremo distal por ácidos micólicos (Misaki, 1966; Lederer, 1975; Petit y Lederer, 1984; Daffé et al., 1990; McNeil, 1991). Por fuera de esta estructura las micobacterias poseen una cápsula cuyo espesor varía de acuerdo a la especie (Rastogi et al., 1986; Paul y Beveridge, 1992, 1994). Esta estructura se encuentra unida no covalentemente, y en el caso de MTB está compuesta mayoritariamente por proteínas, lipopolisacáridos y un bajo porcentaje menor de lípidos (2-3%) (Ortalo-Magné et al., 1995). Algunos de los componentes capsulares participan activamente en la patogénesis del bacilo, como es el caso de ciertos glicanos que participan en la adhesión y penetración en las células del huésped. También se han encontrado en la cápsula lípidos tóxicos y sustancias líticas, así como inhibidores de la activación de macrófagos y la proliferación de linfocitos (Daffé y Etienne, 1999).

2.3.1. Ácidos micólicos: estructura y biosíntesis

Los ácidos micólicos son ácidos grasos α -alquil β -hidroxilados de cadena larga (hasta C86) comunes a todas las micobacterias. Se presentan en la envoltura celular micobacteriana esterificando a las moléculas de arabinogalactano formando complejos tetramicolil pentaarabinanos y también pueden encontrarse como lípidos extraíbles, mayoritariamente trehalosa 6,6 dimicolato (TDM o factor cord) (Brennan y Nikaido, 1995). Los ácidos micólicos resultan de una condensación de tipo Claisen de un ácido graso de cadena media (C24-C26) y una cadena meromicolato de más de 56 átomos de carbono con diversas modificaciones bioquímicas (Kremer et al., 2000a; Asselineau et al., 2002) que han sido utilizadas para su clasificación. Los ácidos α -micólicos presentan dobles enlaces y/o ciclopropanaciones en la cadena meromicolato y hasta el momento han sido encontrados en todas las especies micobacterianas. Los ácidos micólicos oxigenados poseen adición de grupos ceto, metoxi o epoxi recibiendo el nombre de, ácidos ceto-micólicos, ácidos metoxi-micólicos y ácidos ϵ -micólicos respectivamente (Barry, et al., 1998). Los ácidos ceto-micólicos se encuentran ampliamente distribuidos en las diferentes especies del género, en contraste con los ácidos metoxi-micólicos, que con muy pocas

excepciones, solo se encuentran presentes en micobacterias patógenas. Los ácidos ϵ -micólicos se observan en micobacterias de crecimiento rápido y especies saprófitas. Un grupo de micobacterias no patógenas (*M. smegmatis*) y patógenas oportunistas (*M. chelonae*, *M. fortuitum* y *M. abscessus*) contiene una familia de ácidos micólicos monoinsaturados de menor longitud (C60), denominados α' -micólicos. Estos compuestos constituyen un 25% del total de ácidos micólicos de la célula (Asselineau y Lanéelle, 1998) y su presencia aumenta aún más la elevada resistencia intrínseca a drogas característica de las micobacterias, por lo cual las infecciones por las especies nombradas son marcadamente difíciles de tratar. En la figura 1.1 se muestra la estructura de los ácidos micólicos mayoritarios presentes en MTB y *M. smegmatis*.

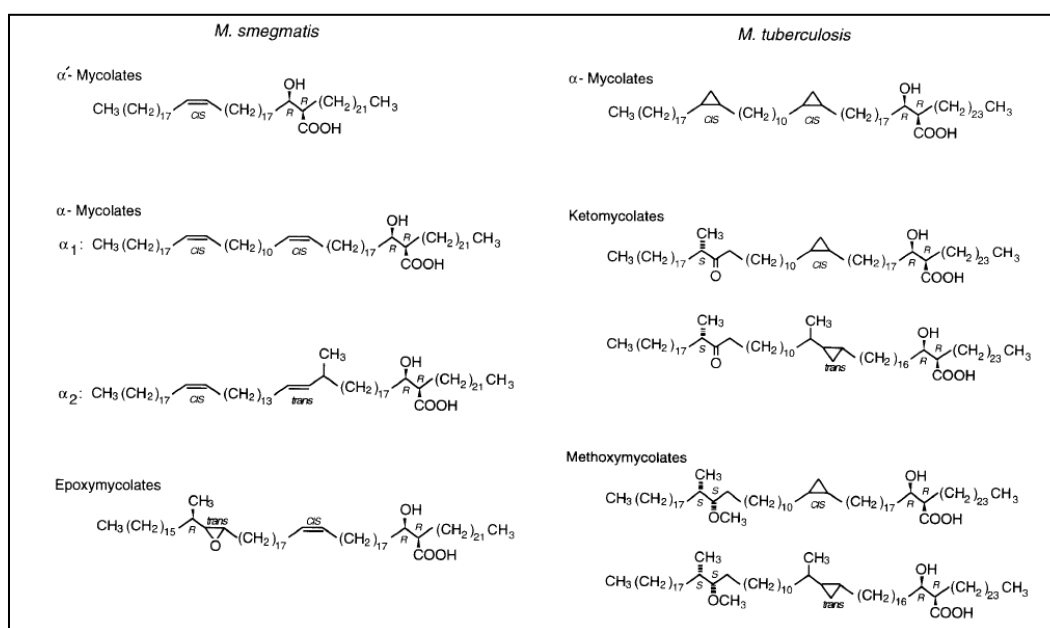


Fig.1.1. Estructura de los ácidos micólicos mayoritarios en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*. Tomado de Slayden et al., (1996).

Las diversas modificaciones químicas presentes en los ácidos micólicos son realizadas de manera sitio específica a partir de los dobles enlaces-*cis* presentes la cadena meromicolato (Yuan et al., 1995; Yuan, 1996; Dubnau et al., 2000). La formación de estos dobles enlaces es un punto de controversia y se han propuestos varias hipótesis al respecto, en una de ellas se postula que en la biosíntesis de ácidos micólicos participarían enzimas desaturantes de ácidos grasos. Esta hipótesis fue avalada por estudios de espectrometría de masa de los ácidos micólicos de *M. tuberculosis* H37Rv y sus intermediarios, mediante los

cuales se determinó que el ácido graso C24:0 es desaturado a *cis* Δ^5 24:1, elongado y luego desaturado para formar *cis* Δ^3 , *cis* Δ^{15} 34:2 (Watanabe et al., 2002). En MTB existen dos genes (*desA1-rv0824c* y *desA2-rv1094*) anotados como acil-acil carrier protein (ACP) desaturasas hipotéticas (Cole et al., 1998). Las acil-ACP desaturasas son proteínas solubles que catalizan la formación de un doble enlace en un grupo acilo esterificado a una ACP y se caracterizan por la presencia de un centro doble hierro en su sitio catalítico que capta el poder oxidativo del oxígeno molecular (Shanklin y Cahoon, 1998). En el trabajo realizado por Dyer et al., (2005) se clonaron y expresaron *desA1* y *desA2* de MTB en *Escherichia coli*, aunque solo el producto de *desA2* se obtuvo de forma soluble y pudo ser cristalizado. DesA1 y DesA2 presentan el motivo de unión a metal (D/E)X₂HX₋₁₀₀(D/E)X₂H, característico de la super familia de enzimas con centro doble hierro (Dyer et al., 2005). En el cristal de DesA2, se observaron características estructurales comunes con la extensamente estudiada y cristalizada Δ^9 ACP-desaturasa de ricino (*Ricinus communis*) (Schneider et al., 1992; Lindqvist et al., 1996), sin embargo presenta variaciones en las proximidades del centro doble hierro así como en la región entre subunidades, se postula que esto podría estar asociado a diferencias catalíticas como por ejemplo la longitud del sustrato. Aunque los roles de estas enzimas no se han confirmado hasta el momento, se proponen como desaturasas de ácidos micólicos y serían esenciales para el crecimiento de MTB (Sasseti et al., 2003). También se identificaron, mediante fusiones al gen *phoA*, motivos presentes en estearoil-ACP desaturasas entre fragmentos codificantes para proteínas secretadas (Lim et al., 1995). Más tarde esta información se utilizó para la identificación de una proteína exportada, altamente inmunogénica, que se denominó Des (Jackson et al., 1997).

A pesar del interés concitado por el estudio de la síntesis de los ácidos micólicos, la mayoría de los pasos biosintéticos involucrados en ella son pobremente entendidos hasta el momento. Las sintetasas de ácidos grasos (FAS, del inglés Fatty acid synthases) son las enzimas encargadas de la biosíntesis de ácidos grasos en todos los seres vivos. Existen dos tipos de FAS: las de tipo I, presentes en organismos eucariotas como enzimas multifuncionales y las de tipo II, presentes en organelas y organismos procariotas compuestas por enzimas monofuncionales. Las micobacterias sintetizan sus ácidos grasos de longitud de cadena normal y ácidos micólicos, utilizando un sistema multifuncional

FAS-I (homólogo al eucariota), y un sistema FAS-II disociado (Barry et al., 1998). El sistema FAS-I, que en MTB es codificado por el gen *Rv2524c* (Cole 1998), lleva a cabo la síntesis *de novo* de ácidos grasos C16-C18 y C24-C26 de manera bimodal a partir de acetil-Coenzima A (CoA). Se postula que los productos C-26 forman las cadenas α -alquilo de los ácidos micólicos. Los productos C16-C18 son utilizados para la síntesis de fosfolípidos de membrana y como cebadores para el sistema FAS-II en la síntesis del meromicolato dado que FAS-II es incapaz de sintetizar ácidos grasos *de novo* y funciona como un complejo de elongación. La composición de ácidos grasos de las micobacterias es sumamente compleja. En *M. phlei* se identificaron más de 30 ésteres de ácidos grasos producidos por metanólisis sólo de sus lípidos no polares, entre los que se encuentran 9 ácidos monoenoicos, 24 ácidos grasos saturados normales y ácidos grasos ramificados de configuración iso y anteiso (Goren, 1972). Uno de los constituyentes esenciales de los fosfolípidos y triglicéridos de las membranas micobacterianas es el ácido *cis*-9-octadecenoico u oleico (C18:1 *cis* Δ^9) (Okuyama, et al., 1967; Hung y Walker, 1970; Walker et al., 1970). En MTB la conversión del ácido octanoico o esteárico (C18:0) C18:1 *cis* Δ^9 es llevada a cabo por una esteroil CoA desaturasa de membrana denominada DesA3 y codificada por *Rv3229c* (Phetsuksiri et al., 2003), gen identificado como esencial para la supervivencia durante la infección en modelo ratón de MTB (Sasseti y Rubin, 2003). Las acil-CoA desaturasas trabajan conjuntamente con un sistema transportador de electrones formado por citocromo *b5* y una citocromo *b5* oxidoreductasa dependiente de NADH (Los, 1998). En MTB se identificó a la oxidoreductasa dependiente de NADPH (codificada por *rv3230c*) que forma parte del complejo DesA3, aunque se desconoce la participación de un transportador de electrones intermedio (Chang y Fox, 2006).

El primer paso de la síntesis de ácidos micólicos es una reacción de condensación llevada a cabo por FAS-II en la que participan como sustratos *i*) malonil-ACP derivado de malonil-CoA por la reacción catalizada por malonil-CoA:ACP transacilasa (FabD en MTB) y *ii*) acil-CoA proveniente de FasI. Esta reacción es llevada a cabo por una β -cetoacil-ACP sintetasa de clase III, que en MTB se denomina mtFabH y posee la triada catalítica, Cys-His-Asn, característica de esta familia de enzimas (Choi et al., 2000). Al finalizar la condensación, el acil-ACP generado inicia un ciclo de ceto-reducción, deshidratación y enoil-reducción catalizados por las enzimas β -cetoacil-ACP reductasa (MabA), β -

hidroxiacil-ACP deshidratasa y enoil-ACP reductasa (InhA) respectivamente (Bhatt et al., 2007). De este modo, el sustrato acil-ACP de inicio es dos carbonos más largo e ingresa nuevamente al ciclo de reacciones de FAS-II. En este punto mtFabH es reemplazada por las β -cetoacil-ACP sintetasas KasA o KasB. En MTB estas enzimas forman parte de un mismo operón y catalizan la condensación de un acil-ACP y malonil-ACP, elongando de este modo, dos carbonos la cadena meromicolato en crecimiento (Schaeffer et al., 2001). Ambas enzimas muestran preferencia por acil-ACP de cadena larga (mínimo de 16C), son sensibles a la cerulenina y poseen la triada catalítica Cys-His-His, estas dos últimas características las incluyen en la clase I/II de enzimas KAS (Schaeffer et al., 2001). Se supone que KasA participa de elongación inicial del meromicolato, mientras que KasB llevaría a cabo la elongación final (últimas dos unidades de elongación) del mismo, hasta lograr el largo total de la cadena. Esta hipótesis se avaló por las observaciones de Slayden (2002) quien describió que la sobre-expresión de KasA de MTB en *M. smegmatis* produce una acumulación de ácidos grasos mono-insaturados de longitud C-40, mientras que cuando se sobre-expresa a KasB junto a KasA, se acumulan ácidos grasos multi-insaturados de longitud C-56. Bhatt et al., (2007), demostraron también, que KasB es necesaria para que se alcance la longitud total del ácido micólico maduro. De acuerdo a lo descrito, se puede suponer que estas enzimas juegan un rol de suma importancia para las bacterias de este género. Esto se comprobó al determinarse que KasA es esencial para las micobacterias y su ausencia lleva a la lisis celular (Bhatt et al., 2005) y afecta la formación de biopelículas en especies de crecimiento rápido (Ojha et al., 2005); sin embargo KasB no comparte esta característica (Bhatt et al., 2005). En este sentido, la ausencia de KasB en MTB produce múltiples efectos fenotípicos en la bacteria, como la pérdida de la ácido alcohol resistencia y de la *trans* ciclopropanación de ácidos ceto- y metoxi-micólicos, así como una incapacidad de causar enfermedad en ratones inmunocomprometidos (Bhatt et al., 2007).

El último paso de la biosíntesis del ácido micólico es la condensación del meromicolato y un ácido graso ácido graso de cadena media. Esta reacción es llevada a cabo por la enzima Pks13 en micobacterias y otros actinomicetes que también poseen ácidos micólicos (Portevin et al., 2004).

Mediante estudios genéticos, enzimáticos y bioinformáticos se han identificado los genes correspondientes a este sistema de síntesis de ácidos micólicos, *inhA* codifica para la

enoil-ACP reductasa, *kasA* y *kasB* codifica para las β -cetoacil-ACP sintetasas y *mabA* para la β -cetoacil-ACP reductasa. Más recientemente se identificó la pieza faltante del ciclo, la (3R)-hidroxiacil-ACP deshidratasa, un heterodímero cuyas subunidades se denominaron HadAB y HadBC y son codificadas por los genes *hadAB* y *hadBC* (Sacco et al., 2007). HadAB actuaría, al igual que KasA, en los ciclos tempranos de elongación del micolato y HadBC, análogamente a KasB, en la elongación final del mismo (Sacco et al., 2007). Los genes implicados en la reacción de condensación de Claisen del grupo alquilo en la posición α - del ácidos meromicólico se encuentran ubicados en el cluster *fad32-pks13-accD4* (Gabalda et al., 2009; Leger et al., 2009; Cantaloube et al., 2011).

Existe evidencia de que la organización del ciclo FAS II sería en base a módulos constituidos por enzimas compartidas y enzimas particulares definidas por su especificidad de sustrato (longitud de cadena del ácido micólico en crecimiento) (Veyron- Churlet et al., 2004). Estos módulos estarían constituidos por un “core” común, del que formarían parte MabA, InhA y (3R)-hidroxiacil-ACP deshidratasa, en el módulo de iniciación (I FAS-II) a este core se sumaría mtFabH, al de elongación 1 (E1-FAS-II) KasA y al de elongación 2 (E2-FAS-II) KasB. Por último, se postula la existencia hipotética de un cuarto complejo (complejo de terminación, T-FAS-II) formado por el core común y la enzima Pks13. Recientemente se comprobó, mediante ensayos con sistemas de dos y tres híbridos en levadura y de co-inmunoprecipitación *in vitro*, que HadAB/BC forman parte de los complejos FAS-II de elongación en la síntesis de ácidos micólicos y que serían el nexo de unión entre los componentes del core FAS-II (InhA, FabD y MabA) y las enzimas condensantes. Además se comprobó que las MtfSAM (metiltransferasas de ácidos micólicos) interaccionarían con cada tipo de complejo de elongación, demostrando su acción coordinada durante la síntesis de ácidos micólicos (Cantaloube et al., 2011). En la figura 1.2 se presenta el esquema de las interacciones proteína-proteína del complejo FAS-II (Cantaloube et al., 2011). Las MtfSAM pertenecen a la familia de metiltransferasas S-adenosilmetionina (SAM)-dependientes y poseen un alto grado de homología estructural y funcional (Yuan, 1996, Huang et al., 2002). MTB posee ocho metiltransferasas SAM-dependientes, seis de las cuales se encuentran involucradas en la modificación de ácidos micólicos (en este trabajo de tesis serán nombradas como MtfSAM). MmaA2 y PcaA convierten los dobles enlaces distales y proximales del ácido mero-micólico en anillos

ciclopropanos respectivamente (Glickman et al., 2000; Glickman, 2003). CmaA2 y MmaA1 actúan en la trans ciclopropanación de los ácidos ceto- y metoxi-micólicos (Barkan et al., 2010; Glickman et al., 2001). MmaA2 y CmaA2 poseen funciones redundantes en la ciclopropanación de ácidos micólicos oxigenados (Barkan et al., 2010). Por otra parte, MmaA4 produce el precursor hidroxilado de los ácidos micólicos oxigenados (Dubnau et al., 2000), mientras que MmaA3 lleva a cabo la O-metilación de este precursor para formar los ácido metoxi-micólicos (Yuan, 2006). Recientemente, Barkan et al., (2010) lograron obtener mutantes delecionales en todas las metiltransferasas SAM-dependientes o bien únicamente en las involucradas en la ciclopropanación de ácidos micólicos de MTB. En este trabajo se determinó que si las deleciones de estas enzimas son realizadas secuencialmente, los dos genotipos nombrados no son letales para MTB, ya que de este modo, la bacteria se adaptaría gradualmente a los cambios que se van produciendo en su pared celular. Por otro lado, se comprobó también, que la ausencia de ácidos micólicos ciclopropanados y de metiltransferasas SAM-dependientes (con consecuente pérdida de ácidos micólicos oxigenados) confieren un fenotipo atenuado de la bacteria durante la infección en ratones, por lo que estas enzimas representarían blancos atractivos para el diseño de drogas anti-tuberculosas. La presencia de ácidos micólicos ciclopropanados en la pared celular es una característica de las micobacterias patógenas, sin embargo se demostró que a bajas temperaturas (25°C) se induce la ciclopropanación de ácidos micólicos en *M. smegmatis* y se identificó al gen *MSMEG_1351* (homologo a *pcaA* de MTB) como responsable de la *cis* ciclopropanación proximal de los ácidos α -micólicos (Alibaud et al., 2010).

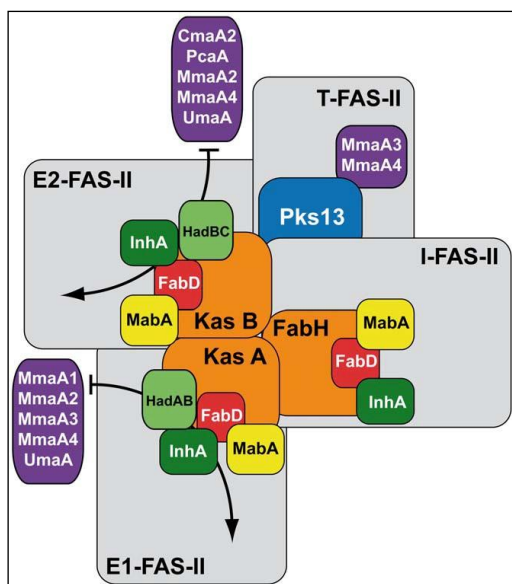


Figura 1.2. Representación esquemática de la red de interacciones proteína-proteína en la ruta de biosíntesis de ácidos micólicos. Cada complejo FAS-II se encuentra una caja celeste: I-FAS-II (FAS-II de inicio), E1-FAS-II (FAS-II de elongación tipo 1) y E2-FAS-II (FAS-II de elongación tipo 2). T-FAS-II (FAS-II de terminación). Las enzimas condensantes FabH, KasA y KasB se encuentran en las cajas naranjas interactuando entre ellas y con el “core” compuesto por FabD (rojo), InhA (verde oscuro) y MabA (amarillo). KasA y KasB interactuarían potencialmente con HadAB y HadBC (verde claro) respectivamente. Las flechas curvas representan la interacción de las MtfsAM (en violeta) KasA, HadAB, InhA y FabD o KasB, HadBC, InhA y FabD. Pks13 (en azul) interactúa con KasB y con las MtfsAM MmaA3 y MmaA4. Tomado de (Cantaloube et al., 2011).

2.3.2. Regulación de la síntesis de ácidos micólicos por Serina/Treonina quinasas

La fosforilación de proteínas llevada a cabo por proteína quinasas, junto a las reacciones de defosforilación acopladas, son uno de los principales mecanismos que median la transducción de señales desde el medio extracelular al interior de la célula. En este sentido, las micobacterias poseen en su genoma numerosos genes que codifican para serina/treonina quinasas (STPK, del inglés serine/threonine protein kinases) homólogas a las encontradas en organismos eucariotas (Av-Gay, 2000; Narayan et al., 2007) que se encuentran involucradas en la regulación del desarrollo, respuesta a estrés y ciclo celular. MTB posee once STPKs (Cole et al., 1998) que se denominan PknA-L, algunas de las cuales se encontraron involucradas en la regulación de la biosíntesis de ácidos micólicos (Molle et al., 2006; Veyron-Churlet et al., 2009; Molle et al., 2010; Veyron-Churlet et al., 2010). PknA actúa fosforilando a las enzimas de FAS-II mtFabD, KasA y KasB (Molle et al., 2006). Producto de esta fosforilación, la actividad condensante de KasA es regulada negativamente, mientras que en KasB esta regulación es positiva de modo de asegurar la producción de meromicolatos de longitud completa (Molle et al., 2006). Al igual que en el caso de KasA, la actividad catalítica de mtFabH es inhibida por fosforilación y las STPKs involucradas en este caso son PknA y PknF, (Veyron-Churlet et al., 2009); este punto de control es de suma importancia dado que esta enzima representa un punto de unión entre FAS-I y FAS-II. Finalmente, podemos citar como otro ejemplo de regulación negativa de la

síntesis de ácidos micólicos a la β -cetoacil-ACP reductasa MabA, cuya fosforilación por varias STPKs (incluida PknB) se demostró *in vitro* (Veyron-Churlet et al., 2010).

2.4. LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS MICÓLICOS COMO BLANCO DE ACCIÓN DE DROGAS ANTI-TUBERCULARES

El estudio de los blancos moleculares de acción de las drogas anti-tuberculares corrientemente en uso identificó a la síntesis de ácidos micólicos como una ruta biosintética esencial afectada por estas, destacando de este modo su importancia. INH y su análogo estructural Etionamida (ETH), son dos drogas anti-tuberculares de primera y segunda línea respectivamente, que inhiben a la enoil-ACP reductasa InhA de FAS-II (Banerjee et al., 1994). Ambos compuestos son pro-drogas que requieren de una activación intracelular para que su acción inhibitoria sea efectiva. La catalasa- peroxidasa codificada por el gen *katG* es la enzima activadora de INH (Zhang et al., 1992; Heym et al., 1995), mientras que ETH es activada por una flavin- monooxigenasa codificada por *ethA* (Baulard et al., 2000; Vannelli et al., 2002). Esta última enzima también es responsable de la activación de otras dos drogas activas sobre MTB, Tiacetazona (TAC) e Isoxil (ISO) (Dover et al., 2007; Korduláková et al., 2007; Nishida y Ortiz de Montellano, 2011). TAC es un tiosemicarbazona de bajo costo con acción bacteriostática que se utilizó en el tratamiento para la TB en África y sud-América (Davidson, 1992) sin embargo, su uso fue interrumpido debido a los efectos tóxicos en la piel producidos en pacientes HIV positivos (Watkins et al., 1996). Se demostró que TAC actúa sobre la biosíntesis de ácidos micólicos inhibiendo su ciclopropanación (Dover et al., 2007; Alahari et al., 2007). Como se mencionó previamente, MTB posee ocho metiltransferasas SAM-dependientes, seis de las cuales se encuentran involucradas en la modificación de ácidos micólicos. De acuerdo con lo observado en *M. bovis* var BCG Pasteur, *M. chelonae* y *M. marinum*, TAC inhibiría a las MtfSAM CmaA2, MmaA2, PcaA, sin embargo la actividad de MmaA4 no se vería afectada por esta droga (Alahari et al., 2007). En este sentido, se propuso un mecanismo de activación de TAC en el que MmaA4 actuaría secundariamente a EthA (Alahari et al., 2009). Las MtfSAM no son blancos esenciales de la droga y su efecto en la síntesis de ácidos micólicos ciclopropanados se mostró variable de acuerdo a la cepa utilizada para su análisis. Recientemente, se determinó que la sobre-expresión del operón *hadABC*, que

codifica para la (3R)-hidroxiacil-ACP deshidratasa de FAS-II, confiere una elevada resistencia a TAC en MTB (Belardinelli, 2012). Conjuntamente, se aislaron y caracterizaron mutantes espontáneas resistentes a TAC de MTB y *M. kansasii*, observándose en ellas mutaciones puntuales prevalentes en los genes *hadA* y *hadC* (Belardinelli, 2012), que de acuerdo con lo publicado por Sacco et al., (2007) codifican para las subunidades de la enzima con dominio catalítico. Se observó además, que la droga ejercería una acción diferencial sobre los heterodímeros HadAB y HadBC, ya que se encontró mayor resistencia a la misma cuando se sobre expresó este último en MTB. A su vez, se determinó que los niveles de resistencia a la droga en MTB son iguales cuando: *i*) se sobre-expresan *ethA* y *mmaA4* conjuntamente y por separado y *ii*) producto de la inactivación de MmaA4 o EthA por mutaciones espontáneas; estas observaciones permitieron sugerir que si bien el rol de MmaA4 es importante en el mecanismo de acción de TAC, no sería el propuesto por Alahari et al., (2009). En lo que respecta a ISO, se demostró que es un inhibidor de la síntesis de ácido oleico y ácidos micólicos y se propuso como uno de sus blancos de acción en MTB a la estearoil-CoA Δ^9 desaturasa codificada por el gen *desA3* (Phetsuksiri et al., 2003; Winder et al., 1971). Recientemente, sumando evidencias a lo descrito por Belardinelli (2012), Grzegorzewicz et al., (2012) observaron que: *i*) tras el tratamiento de MTB con TAC o ISO se produce la acumulación de precursores ácidos grasos 3-hidroxi C18, C20 and C22, lo que coincide con una inhibición de la deshidratasa, *ii*) se produce un aumento en la resistencia de MTB a dichas drogas cuando se sobre expresa el operón *hadABC* y *iii*) mutantes espontáneas resistentes a TAC e ISO MTB y *M. kansasii* presentan mutaciones en los genes *hadA* y *hadC*. Esto demostró que existiría un mecanismo común de inhibición de la (3R)-hidroxiacil-ACP deshidratasa por TAC e ISO. Sin embargo, a diferencia de lo descrito para TAC (Belardinelli, 2012), la sobre-expresión de HadAB no causó efecto detectable en la susceptibilidad a ISO, dicha susceptibilidad también se vió afectada diferencialmente por las mutaciones espontáneas presentes en HadA. Por otro lado, ISO no necesitaría la presencia de MmaA4 activa para su acción bactericida sobre MTB. Por lo tanto, se propone que TAC e ISO se unirían al interactoma FAS-II en sitios diferentes, y en el caso de TAC este sitio de unión le permitiría interactuar con MmaA4 (necesaria para su acción) y ejercer su actividad inhibitoria sobre las MtfSAM.

Otro exponente de las drogas que actúan inhibiendo la biosíntesis de los ácidos micólicos en micobacterias es la tiolactomicina (TLM), una tiolactona de acción bactericida comprobada en *M. smegmatis* y MTB (Slayden et al., 1996). Se observó que el tratamiento de *M. smegmatis* con este antibiótico causa inhibición de la síntesis de ácidos grasos y de los ácidos α - y ϵ -micólicos sin embargo, la síntesis de los ácidos α' -micólicos no se ve afectada (Slayden et al., 1996). El mismo resultado se obtuvo con la inactivación condicional de KasA (Bhatt et al., 2005). TLM posee como blancos de acción en el sistema FAS-II micobacteriano a las enzimas KasA y KasB (Kremer et al., 2000b). Ambas enzimas fueron purificadas y sus actividades mostraron ser inhibidas por la droga; KasA presentó una inhibición mayor (90%) que la observada en KasB (60%) (Schaeffer et al., 2001).

2.5. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES DEFICIENTES EN LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS MICÓLICOS

Una herramienta útil para la caracterización de los componentes de la vía de síntesis de los ácidos micólicos ha sido el aislamiento de mutantes químicas deficientes en la síntesis de micolatos, mediante su identificación por un aumento en su permeabilidad a drogas hidrofóbicas (Liu y Nikaido, 1998). En el laboratorio se aislaron, por medio de mutagénesis química, mutantes termosensibles (TS) de *M. smegmatis* mc²155 con sensibilidad aumentada a drogas (SAD) y deficientes en diferentes tipos de ácidos grasos y micólicos (Belardinelli Tesina de grado, 2007; Carignano Tesina de grado, 2009). Algunas de estas mutantes son UNR1 y 3B6, deficientes en ácido oleico, UNR18 deficiente en una subfamilia de ácidos α -micólicos y UNR21 en ácidos α' -micólicos. Estas mutantes, serían las primeras descritas que muestran una separación en estas rutas de biosíntesis, por lo que se emprendió la identificación genética de estas mutaciones. En el caso de las mutantes UNR1 (deficiente en ácidos ϵ -micólicos y ácido oleico) y 3B6 (deficiente en ácido oleico), se halló que ambas poseían una mutación en el gen que codifica para DesA3 (anotado como *MSMEG_1886*), pero ubicada en diferentes posiciones (UNR1: C1006T y 3B6: G170A) (Belardinelli, datos no publicados). Sorprendentemente ambas mutantes revertían todos los fenotipos con una frecuencia compatible con una única mutación ($3,3 \cdot 10^{-5}$ para la cepa UNR1 y $3,8 \cdot 10^{-8}$ para la cepa 3B3); en la misma dirección, experimentos preliminares mostraron que el ácido oleico no es precursor de los ácidos ϵ -micólicos. A partir de estos

datos, surgió un interés particular en indagar la relación entre las vías de síntesis de ácido oleico y ácidos ϵ -micólicos, mediante el estudio de las mutaciones encontradas en las mutantes UNR1 y 3B6.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS Y VECTORES

Para la realización de este trabajo de tesis se utilizaron los vectores detallados en la tabla 3.1 y las siguientes cepas:

- *E. coli*:

DH5 α : F⁻, $\Delta(argF-lac)169$, $\phi80dlacZ58(M15)$, $\Delta phoA8$, $glnV44(AS)$, λ^- , *deoR481*, *rfbC1?*, *gyrA96(NalR)*, *recA1*, *endA1*, *thiE1*, *hsdR17*

GM33: F⁻, λ^- , *IN (rrnD-rrnE)1*, *dam-3*, *sup-85*

- *M. smegmatis*:

mc²155: Mutante de alta eficiencia de transformación de plásmidos (fenotipo *ept*, del inglés efficient plasmid transformation) derivada de la cepa *M. smegmatis* mc²6 (Snapper et al., 1990).

Mutantes de la cepa mc²155 aisladas por medio de mutagénesis química (NTG): presentan fenotipos temperatura sensible. **UNR1** (deficiente en la síntesis de ácidos grasos insaturados y ácidos ϵ -micólicos). **UNR18** (deficiente en la subfamilia de ácidos micólicos α 1). **UNR21** (deficiente en la familia de ácidos micólicos α'). (Belardinelli Tesina de grado, 2007; Carignano Tesina de grado, 2009)

VECTOR	CARACTERÍSTICA	FUENTE O REFERENCIA
pCR2.1 TOPO Zero Blunt	Ap ^r Vector de clonado.	Invitrogen
pGEM-T Easy	Ap ^r Vector de clonado TA	Promega
pLitmus28G	Ap ^r Vector de clonado	NEB
pBluescript SK+	Ap ^r Vector de expresión <i>E. coli</i>	Stratagene
pHP45Ωhyg	Contiene el casete Ω hyg que confiere resistencia a higromicina	Blondelet-Rouault et al., 1997
pMV261	Km ^r Vector de expresión para micobacterias. Contiene el promotor constitutivo <i>hsp60</i>	Stover et al., 1991

pML1342	Hyg ^r Vector integrativo de simple copia para micobacterias. Se integra en el sitio <i>attB</i> del micobacteriofago L5	Huff et al., 2010
pCresacBI	Km ^r vector que posee la recombinasa Cre que remueve el esqueleto del plásmido pML1342 integrado en el cromosoma	Huff et al., 2010
pJV53	Km ^r Vector que contiene los genes <i>che9c</i> expresados bajo control de un promotor inducible por acetamida.	Van kessel y Hatfull, 2007
pFra42B	Str ^r . Vector integrativo que contiene los genes <i>tetR</i> bajo control de un promotor constitutivo y <i>pip</i> bajo control de un promotor reprimible por TetR	Boldrin et al., 2010
pFra50	Hyg ^r Vector suicida para <i>M. smegmatis</i> con origen de replicación para <i>E. coli</i> que contiene al promotor PIP dependiente, <i>Pptr</i>	Boldrin et al., 2010

Tabla 3.1. Plásmidos utilizados en este trabajo de tesis. En la tabla se muestran las características principales de cada vector junto a su fuente o referencia

3.2. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Las cepas de *E. coli* se crecieron a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) líquido o sólido. Para la preparación de células electrocompetentes se utilizó el medio Glucosa-Extracto de levadura- Triptona (GYT del inglés Glucose-yeast extract-triptone) (Sambrook y Russel, 2001).

Las distintas especies micobacterianas se cultivaron rutinariamente en el medio Middlebrook 7H9 glicerol líquido o sólido. Estos medios fueron suplementados con ADS u OADS (albúmina- dextrosa- cloruro de sodio o ácido oleico albúmina- dextrosa-cloruro de sodio respectivamente) al 10% v/v. En los experimentos de inducción de la técnica de “Recombineering” se utilizó medio 7H9 succinato-acetamida líquido, sin el agregado de ADS u OADS. En los ensayos de expresión de proteínas las cepas fueron cultivadas en medio Sauton preparado de acuerdo a lo publicado por Jacobs y Hatfull (2000). Dado que las células micobacterianas poseen una notoria capacidad de agregación, los medios de cultivo líquidos fueron adicionados con los agentes tensioactivos Tritón WR 1339 (0,25 % v/v) o Tween 80 (0,02 % v/v) con el objetivo de obtener cultivos homogéneos.

Los antibióticos y concentraciones empleados para el crecimiento de las cepas que así lo requerían se detallan en la tabla 3.2 y fueron preparados según Sambrook y Russell (2001). Las soluciones acuosas de antibiótico se esterilizaron por filtración a través de membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0,22 μm .

ANTIBIOTICO	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>E. coli</i>	<i>M. smegmatis</i>
Ampicilina (Ap)	100	-----
Km	20	20
Higromicina (Hyg)	150	50
Estreptomicina (Str)	10	20
Gentamicina (Gm).	10	5

Tabla 3.2. Concentraciones de antibiótico utilizadas en los experimentos con las diferentes cepas de *E. coli* y *M. smegmatis*

En el caso de las drogas anti-tuberculares TAC e INH se diluyeron en dimetil sulfóxido (DMSO) y agua, respectivamente, y se utilizaron en diferentes concentraciones de acuerdo con el objetivo del experimento.

A continuación se describe la formulación de los medios de cultivo utilizados.

3.2.1. Medios de cultivo para *E. coli*

Luria-Bertani (LB)

Agua destilada	1000 ml
NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g

Medio GYT (para preparación de células electrocompetentes)

Agua destilada	900 ml
----------------	--------

Glicerol	100 ml
Extracto de levadura	1,25 g
Triptona	2,5 g

3.2.2. Medios de cultivo para micobacterias

Caldo Middlebrook 7H9, (composición en g/l)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,50
Na ₂ (HPO ₄)	2,50
K(H ₂ PO ₄)	1,00
Citrato de sodio	0,10
MgSO ₄	0,05
CaCl ₂	0,005
ZnSO ₄	0,001
CuSO ₄	0,001
Citrato férrico amónico	0,04
Acido l-glutámico	0,50
Piridoxina	0,001
Biotina	0,0005

ADS

Albúmina	5% p/v
Dextrosa	2% p/v
NaCl	0,81% p/v

OADS

Albúmina	5% p/v
Dextrosa	2% p/v
NaCl	0,81% p/v
Acido oleico	0,06% v/v

Preparación de un litro de medio 7H9 ADS sólido:

Agua destilada	890 ml
----------------	--------

7H9	4,7 g
ADS	100 ml
Glicerol 50%	10 ml
Agar	15 g

(Para preparar 7H9 OADS se reemplaza el ADS por OADS)

Medio líquido 7H9 ADS Glicerol Tritón WR1339/Tween 80 (7H9 ADS-GT/7H9 GTw), su composición por litro es la siguiente:

Agua destilada	890 ml/880 ml
7H9	4,7 g
ADS	100 ml
Glicerol 50% v/v	10 ml
Tritón WR1339 25%	
/Tween 80 20%	1 ml/10 ml

Medio líquido 7H9 Succinato Tween 80 (7H9 STw), su composición por litro es la siguiente:

Agua destilada	970 ml
7H9	4,7 g
Succinato 20% v/v	10 ml
Tween 80 20% v/v	10 ml

Este medio se adicionó con el inductor:

Acetamida 20% p/v	10 ml
-------------------	-------

Caldo Sauton (composición por l)

KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄	0,5 g
L-Asparragina	4 g
Glicerol	60 ml
Citrato férrico de amonio	0,05 g

Ácido cítrico	2 g
ZnSO ₄ 1%	0,1 ml

3.3. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA 99% (CIM₉₉)

La CIM₉₉ -cantidad mínima de droga que inhibe el crecimiento del 99% del inóculo sembrado- se determinó sembrando una dilución (equivalente a 10³ células aproximadamente) de cultivos saturados de las distintas cepas crecidos a 37°C, en medio sólido 7H9 ADS sin antibióticos o suplementado con concentraciones crecientes de los antibióticos en estudio. Los resultados fueron leídos luego de incubar las placas durante 5 días a 30°C. La concentración considerada como CIM₉₉ fue aquella que causó una reducción del 99% en los recuentos de células viables respecto a la cantidad de células presentes en medio de cultivo sin el agregado de antibióticos. Asimismo se evaluó la actividad a lo largo de las concentraciones utilizadas determinando alteraciones en el tamaño de las colonias sin pérdida del número de las mismas respecto a placas control.

3.4. MANIPULACIÓN DE ADN

3.4.1. Extracción de ADN cromosomal

Las extracciones de ADN cromosomal de *M. smegmatis* se realizaron de acuerdo al protocolo publicado por Jacobs y Hatfull (2000). Se centrifugaron 10 ml de un cultivo saturado de la bacteria a 4000 revoluciones por minuto (rpm) durante veinte minutos. El pellet obtenido se transfirió a un tubo eppendorf y se resuspendió en 1 ml de buffer de lisis (GTE, 50mM glucosa, 25mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA y 5 lisozima mg/ml). A esta mezcla se le agregaron 50 µl de una solución 10 mg/ml de Lisozima y luego se incubó a 37°C durante toda la noche. Una vez realizada la incubación se adicionaron 100 µl de SDS al 10% p/v y 50 µl de una solución 20 mg/ml de proteinasa K, se mezcló por inversión y se incubó a 55°C entre 20 a 40 minutos. Luego se adicionaron 300 µl de una solución 6M de CINa (o bien 0,12 gr de la droga sólida), se mezcló por inversión y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm. Se tomó el sobrenadante y se le agregó 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 v/v, se mezcló y luego se centrifugó durante 5 minutos a 10000

rpm. Se separó la fase acuosa (superior) y se repitió el paso anterior. En este punto a la fase acuosa obtenida se le agregaron entre 0,7 y 1 volumen de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se centrifugó a velocidad máxima durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet obtenido fue lavado con una solución de alcohol etílico al 70% v/v y se colocó en estufa de secado durante unos minutos para obtener una muestra de ADN libre de alcohol. Por último el pellet se resuspendió en 50 µl de agua mili Q, se colocó a 4°C para favorecer la hidratación y se confirmó su contenido en gel de agarosa al 0,8% p/v.

En el caso de las muestras enviadas al servicio de secuenciación del Instituto de Agronomía y biotecnología de Rosario (INDEAR) se realizó, una vez obtenida la muestra de DNA, un paso de purificación en una columna del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

3.4.2. Extracción de ADN para la realización de PCR de colonia

La técnica de PCR de colonia se realizó para la confirmación de clones transformantes. Se tomó la colonia crecida en medio sólido mediante ansa estéril y se colocó en un tubo eppendorf al que previamente se le habían agregado 100 µl de agua deionizada estéril. Se homogeneizó la mezcla agua-colonia y se llevó el tubo a incubación en baño termostático a 100°C durante 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó a velocidad máxima durante 5 minutos y se tomó del sobrenadante la alícuota necesaria para la reacción de PCR (entre 5 y 10 µl).

3.4.3. Preparación de ADN plasmídico

Para las extracciones de ADN plasmídico en pequeña escala de *E. coli* se siguió el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y Russell (2001). Se inoculó una colonia de *E. coli* en 2,5 ml de medio LB en un tubo de 15 ml con el antibiótico adecuado. Se incubó toda la noche a 37 °C con agitación. Se tomaron 2 ml de la suspensión en un tubo eppendorf y se centrifugó a 12.500 rpm por 1 minuto. Se removió el sobrenadante y se centrifugó a la misma velocidad por 2 segundos, descartando el exceso de líquido. Se resuspendió el pellet en 200 µl de buffer de lisis GTE (Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris- HCl pH 8 25 mM), se agitó mecánicamente por 5 segundos e incubó a temperatura

ambiente por 5 minutos. Se agregaron 400 µl de solución alcalina fresca (0,2 N NaOH, 1% v/v SDS), se mezcló por inversión 5 veces y se colocó el tubo en baño de agua helada por 5 minutos. Se agregaron 300 µl de acetato de amonio 7,5 M helado (pH 7.6) a la solución, se mezcló por inversión suave 5 veces y se colocó el tubo en baño de agua helada por 5 minutos. Se centrifugó la mezcla a 12500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf. Se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó la mezcla a 12500 rpm a temperatura ambiente por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 100 µl de acetato de amonio 2 M (pH 7,4) al pellet, se agitó mecánicamente y se incubó en baño de agua helada por 5 minutos. Se centrifugó la mezcla a 12500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y se separó el sobrenadante. Se agregaron 100 µl de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó la mezcla 12500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con etanol 70% v/v. Se removió el etanol por centrifugación y se dejó secar el pellet. Finalmente, se disolvió el pellet en 50 µl de agua destilada.

Las preparaciones de ADN plasmídico utilizadas para las reacciones de secuenciación se obtuvieron a partir del equipo provisto por Promega (Wizard Kit, Promega) siguiendo las indicaciones del laboratorio fabricante.

Las extracciones de ADN plasmídico de micobacterias, se realizaron según Jacobs y Hatfull (2000). Se cosecharon las células de un cultivo de 10 ml saturado de la bacteria mediante centrifugación. El pellet obtenido se resuspendió en 120 µl de buffer de lisis GTE y se transfirió a un tubo de 2 ml agregaron. Se agregaron 30 µl de lizozima 50 mg/ml (concentración final 10 mg/ml) a la mezcla y se incubó durante toda la noche. Posteriormente se agregaron dos volúmenes de una solución NaOH 0,2M-1% SDS recién preparada, se mezcló por inversión y se incubó a 4°C durante diez minutos. Luego se agregaron 225 µl de acetato de potasio (AcK) 5M, se mezcló por inversión, se incubó a 4°C durante diez minutos y se centrifugó en microcentrífuga a 12500 rpm durante 1 hora. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó igual volumen de una mezcla cloroformo-fenol-alcohol isoamílico (24:25:1 v/v). Se centrifugo a 10000 rpm durante 5 minutos y la fase acuosa obtenida se trasvasó a un nuevo tubo. La precipitación de plásmidos se hizo en este punto agregando a esta fase dos volúmenes de alcohol etílico

95% v/v e incubando a temperatura ambiente durante cinco minutos. La mezcla se centrifugó a 13500 rpm durante diez minutos, el pellet que contenía el ADN se lavó con alcohol al 70% v/v y por último se resuspendió en 50 µl de agua.

En todos los casos se confirmó la presencia de ADN plasmidico en las muestras mediante electroforesis de geles de agarosa 0,8% p/v.

3.4.4. Tratamiento con enzimas de restricción, ligasas y fosfatasas alcalinas

Las digestiones con diferentes endonucleasas de restricción, ligaciones y tratamientos con fosfatasa alcalina de ADN plasmídico y genómico se realizaron en las condiciones recomendadas por los fabricantes (Invitrogen, Thermo, Promega y NEB).

3.4.5. Separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa

El ADN se mezcló con buffer de carga (6:1 v/v) tipo III y se depositó en los pocillos de un gel, sumergido en una cubeta con buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8).

El gel se preparó con agarosa al 0,8-1,5 % (p/v), según el tamaño del fragmento a separar, en TAE 1X. La electroforesis horizontal de ADN se realizó entre 50 y 100 voltios. Posteriormente el gel se tiñó en solución de Bromuro de etidio y se visualizó por exposición del gel a luz ultravioleta (260 nm). El tamaño de los fragmentos se determinó utilizando como patrón el ADN del fago λ , digerido por restricción enzimática con *HindIII* o *EcoRI/HindIII*. (Sambrock y Russel, 2001) o marcadores comerciales como 100 pb (PB-L). La concentración del ADN se estimó por comparación visual de las fluorescencias obtenidas para las muestras, con la obtenida para el marcador de peso molecular.

3.4.6. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN obtenidos de las digestiones enzimáticas y de las reacciones de PCR fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.7. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN de plásmidos y de fragmentos amplificados por PCR fueron determinadas en el servicio de secuenciación de la Universidad de Maine, ME, EE.UU. El análisis de las secuencias se realizó utilizando el programa SeqManII (DNASTAR Inc.).

La secuenciación de genomas completos se realizó en la plataforma de Genómica y Bioinformática del INDEAR, la cual se encuentra equipada con el sistema de secuenciación de alto rendimiento *454 GS FLX+ Roche*. El servicio entregó la anotación de todos los genes y se analizaron los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, del inglés single nucleotide polymorphism).

3.5. CLONADO DE GENES

3.5.1. Reacciones de PCR

Para el clonado de genes en los diferentes vectores de clonado utilizados en un primer paso se amplificó el fragmento de DNA de interés por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés Polymerase chain reaction).

La mezcla general de reacción utilizada fue la siguiente:

- 2,5 μl de DMSO
- 1,0 de dNTPs (stock 10 mM)
- 5,0 μl de *Taq* buffer (stock 10X)
- 1,5 μl de MgCl_2 (stock 50 mM)
- 1,0 μl de oligo Fw (stock 30 pmol x μl^{-1})
- 1,0 μl de oligo Rv (stock 30 pmol x μl^{-1})
- 0,2 μl de *Taq* polimerasa (stock 5 U x μl^{-1})

Llevar a volumen final de 50 μl con agua Mili Q.

En el caso de las reacciones de PCR llevadas a cabo con enzimas PFU (PB-L) o Pfx (Invitrogen) no fue necesaria la adición de MgCl_2 a la mezcla de reacción dado que las soluciones buffer de estas enzimas contienen SO_4Mg .

Los oligonucleótidos que se utilizaron para las diferentes reacciones de PCR se diseñaron a partir del banco de datos de la secuencia completa de *M. smegmatis* mc²155

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=mycobacterium+smegmatis+mc2+155>)

teniendo en cuenta una serie de parámetros que se relacionan con su especificidad y eficiencia según Sambrook y Russell (2001) y mediante la utilización del software Clone Manager suite (Sci-Ed Software for the Molecular Biologist).

En el caso de requerirse, los oligonucleótidos fueron modificados agregando sitios de corte para enzimas restricción en su extremo 5' o, de ser posible, introduciendo cambios en la secuencia del mismo para lograr igualar la secuencia a aquella reconocida por la enzima a emplear.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por IDT (Integrated ADN Technologies, EE.UU) y se detallan en la tabla 3.3

3.5.2. Clonado de productos de PCR

Para el clonado de productos de PCR se utilizó el sistemas de clonado TA de Promega en el plásmido pGEM[®]-T-Easy, o el sistema de clonado para extremos romos de Invitrogen en el plásmidos pCR2.1 ZERO blunt TOPO.

La ligación de los productos de PCR purificados al vector, se realizó siguiendo el protocolo recomendado por los fabricantes (Promega o Invitrogen). Los productos de esta ligación fueron utilizados para transformar células competentes de *E.coli* DH5 α o GM33. Los clones que contenían los productos de PCR generaron colonias blancas en placas indicadoras de LB Ap, suplementadas con IPTG y X-gal.

Primer	Secuencia	Sitio de Corte	Descripción
MSMEG_1204 UP	AAGAATCCCCATGGTTGCGA	<i>EcoR1</i>	para clonar en pMV261
MSMEG_1204 DN	GTAAAGCTTCACGAAGAGCGG	<i>HindIII</i>	para clonar en pMV261
Interno Up MSMEG_1204	GATCTGCGGCGGTGTRCGA		para secuenciar <i>MSMEG_1204</i>
Interno Dn MSMEG_1204	CCATGCCGTCGCGGTCCTTG		para secuenciar <i>MSMEG_1204</i>
FwUPSTREAM	ACTAGTCTGCAGCACTTGGAGGTCGG	<i>Spe1</i>	Construcción mutante UNR1
RvUPSTREAM	AAGCTTTGCTGGAGAACCAGGCGTACC	<i>HindIII</i>	Construcción mutante UNR1
FwDNSTREAM	AAGCTTCCCTCGGTGTTCTGCTGTCGC	<i>HindIII</i>	Construcción mutante UNR1
RvDNSTREAM	TCTAGACTCGGAGCAGACGGCGCACG	<i>Xba1</i>	Construcción mutante UNR1
Fw1886-Hyg	CAAGTACGACCTGTCCTACAC		Chequeo mutación UNR1
Rv Hyg-1888	CAGCAGCACCGTGTCGGTGAC		Chequeo mutación UNR1
Rv 1886-Hyg	GACGTTCTCGGTGGTGCTGC		Chequeo inserción casete Hyg
Fw Hyg-1888	GCGAGATCACCAAGGTAGTCGGC		Chequeo inserción casete Hyg
pMV261 Fw	TTGAGCCGTCCGTCGCGGGCACT		para chequear pMV261
P1886ScaI	AGTACTTTGCCGACGAGGTTCCCGACTG	<i>Sac1</i>	para secuenciar <i>MSMEG_1886</i>
1885-86 Rv	AAGCTTGGAGAACCAGGCGTACCTAGGC	<i>HindIII</i>	para secuenciar <i>MSMEG_1886</i>
85-86 seq Fw2	GTCGGCCTGCAGCACTTGGAG		para secuenciar <i>MSMEG_1886</i>
85-86 seq Rv2	GCGACGTAATCCTTGAACAC		para secuenciar <i>MSMEG_1886</i>

DA1 KO 5'Fw	TCTAGAAGTTCAGCGACACCATCACCACAC	<i>Xba</i> 1	Delección <i>desA1</i>
DA1 KO 5'Rv	AAGCTTCCAGTCCTTGCACATCCGCATGTG	<i>Hind</i> III	Delección <i>desA1</i>
DA1 KO 3' Rv	AAGCTTCAGGAGCTCGCGACCCGCGTGTCG	<i>Hind</i> III	Delección <i>desA1</i>
DA1 KO 3' Fw	ATCGATTCACGAAGAAGAAGACGAGACGAG	<i>Cla</i> 1	Delección <i>desA1</i>
DA2 KO 5'Fw	TCTAGATCGTCAAGCGCGACGCCGGCCTGG	<i>Xba</i> 1	Delección <i>desA2</i>
DA2 KO 5'Rv	GGATCCCAGTCCGTGCCGCCGAGGAAGGCG	<i>Bam</i> H1	Delección <i>desA2</i>
DA2 KO 3'Fw	GGATCCGCTTCCTCGGCCGCTGGACCGCTG	<i>Bam</i> H1	Delección <i>desA2</i>
DA2 KO 3'Rv	GAATTCTCAGGCCAGGACGAAGTCCTTCAG	<i>Eco</i> R1	Delección <i>desA2</i>
DdesA1ExtCheck Rv	GCGGTCACCATCTCGCACAC		Chequeo delección <i>desA1</i>
DdesA2ExtCheck Fw	CAACTCACTGATGACGACCAGC		Chequeo delección <i>desA2</i>
DdesA2ExtCheck RV	CCACGACCACGCACAAGTCGC		Chequeo delección <i>desA2</i>
MSMEG_5773 Up	GAATTCGCGATGTCGACCGACGATTAC	<i>Eco</i> R1	para clonar <i>desA1</i> en pMV261
MSMEG_5773 Dn	AAGCTTCGAGGGCTGTCAGGCTCAC	<i>Hind</i> III	para clonar <i>desA1</i> en pMV261
MSMEG_5248 Up	GAATTCACGCTCTGAGCTGCGCACAAC	<i>Eco</i> R1	para clonar <i>desA2</i> en pMV261
MSMEG_5248 Dn	AAGCTTGGTGTGACCACCAGCGCCACG	<i>Hind</i> III	para clonar <i>desA2</i> en pMV261
DesA1 TET PIP Fw	ATGCATACCGACGATTACACC	<i>Nsi</i> 1	para clonar <i>desA1</i> en pFra50
DesA1 TET PIP Rv	ACTAGTCTCCTCGTGACGCTCCTC	<i>Spe</i> 1	para clonar <i>desA1</i> en pFra50
DesA2 TET PIP Fw	ATGCATCAGAAACCTGTCCC	<i>Nsi</i> 1	para clonar <i>desA2</i> en pFra50
DesA2 TET PIP Rv	ACTAGTGGCCTGGTTCGGCGCGATG	<i>Spe</i> 1	para clonar <i>desA2</i> en pFra50

0902 Fw	GAATTCGTGCGCGAGACGCTCACTCC	<i>EcoR1</i>	para clonar <i>MSMEG_0902</i> en pMV261
0902 Rv	AAGCTTGATCAGCGCCCTTTCTGCAGGGTG	<i>HindIII</i>	para clonar <i>MSMEG_0902</i> en pMV261
0913 Fw	GGATCCCATGTCAAACGTCGAGTCCGAAGT	<i>BamH1</i>	para clonar <i>MSMEG_0913</i> en pMV261
0913 Rv	AAGCTTCGGCGACGGAAAAACCTACTTGAC	<i>HindIII</i>	para clonar <i>MSMEG_0913</i> en pMV261
1203 Fw	GAATTCATGGCTGACGGCGTCGGCAC	<i>EcoR1</i>	para clonar <i>MSMEG_1203</i> en pMV261
1203 Rv	AAGCTTGGGCGGCCTAACCGCTGTTCG	<i>HindIII</i>	para clonar <i>MSMEG_1203</i> en pMV261
1205 Fw	GAATTCGTGAAAGAAACGCCACAGAAATCG	<i>EcoR1</i>	para clonar <i>MSMEG_1205</i> en pMV261
1205 Rv	AAGCTTAGCCATCAGGCCACGCTCTTC	<i>HindIII</i>	para clonar <i>MSMEG_1205</i> en pMV261
1350 Fw	GAATTCATGTCTAAATTGACACCCAAATACG	<i>EcoR1</i>	para clonar <i>MSMEG_1350</i> en pMV261
1350 Rv	AAGCTTACACCTTTACTTCTGCAGCGTGAAC	<i>HindIII</i>	para clonar <i>MSMEG_1350</i> en pMV261
1351 Fw	GAATTCGTGACCAAGCAGCCCGGAAAG	<i>EcoR1</i>	para clonar <i>MSMEG_1351</i> en pMV261
1351 Rv	AAGCTTCGCTACTTCGCCAGGGTGAAC	<i>HindIII</i>	para clonar <i>MSMEG_1351</i> en pMV261
3538 Fw	GAATTCGTGGCACTTCAACCGCACTTCG	<i>EcoR1</i>	para clonar <i>MSMEG_3538</i> en pMV261
3538 Rv	AAGCTTGATCAGGCCTTGACGAGGGTGAAC	<i>HindIII</i>	para clonar <i>MSMEG_3538</i> en pMV261
FwInt1350	GATCGGCGCCTTCGAGCA		para secuenciar el ORF <i>MSMEG_1350</i>
RvInt1350	GTAGGCCATGTCTGAACGC		para secuenciar el ORF <i>MSMEG_1350</i>

Tabla 3.3. Oligonucleótidos utilizados en la realización de las diferentes construcciones de este trabajo de tesis. En la tabla se muestra la secuencia de cada cebador, su/s sitio/s de corte con enzima de restricción (si lo posee) y su descripción.

3.6. PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES Y ELECTROPORACIÓN

3.6.1. *E. coli*

Para la preparación de células electrocompetentes de *E. coli* se siguió el protocolo publicado por Sambrook y Russell (2001). Se inocularon 25 ml de medio LB con una colonia de *E. coli* y se incubó durante toda la noche a 37°C. Luego, estos 25 ml de cultivo se diluyeron en 500 ml de LB fresco que se incubaron hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,35-0,4. En este punto el cultivo se colocó en hielo por 15 minutos. A partir de aquí todos los procedimientos se realizaron a 4°C. Se centrifugó 15 minutos a 1000 g, se recuperó el pellet y se resuspendió en 500 ml de agua (volumen de cultivo de partida). Se centrifugó 20 minutos a 1000 g, se recuperó el pellet y se resuspendió en 250 ml de glicerol 10% v/v (mitad del volumen de cultivo de partida). Se centrifugó durante 20 minutos a 1000 g, se repitió el paso anterior utilizando 10ml de glicerol 10%. Por último, el pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de medio medio GYT frío. Se midió la DO_{600nm} de una dilución 1 en 100 de esta última solución de células y se llevó a una DO_{600nm} de 80-120 en caso de ser necesario. La solución se alícuotó en fracciones de 40 μ l en tubos eppendorf que fueron mantenidos a -20°C para su posterior utilización.

Para la transformación se utilizaron cubetas de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad) previamente enfriadas, donde se colocaron las células con 10 a 100 ng de ADN en un volumen de 2 μ l. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador MicroPulser™ (Bio-Rad), fijando el pulso programado EC2 (2,5 kV). Luego de realizado el pulso se agregó 1 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante 1 hora. Finalizada la incubación las células se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 100 μ l de medio que se sembraron en placas de medio LB sólido con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

3.6.2. *M. smegmatis*

La preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis* se realizó según Jacobs y Hatfull (2000). Se inocularon 50 ml de medio 7H9 ADS-GT/7H9 ADS-GT_w con un volumen de cultivo saturado de la bacteria tal que luego de ser incubado durante toda la

noche a 37°C se encuentre a una DO_{600nm} de 0,5-1. En este punto el cultivo se colocó en hielo por un mínimo de 10 minutos y no sin exceder las 2 horas. A partir de aquí todos los procedimientos se realizaron a 4°C. Se centrifugó 15 minutos a 1000 g, se recuperó el pellet y se resuspendió en 40 ml glicerol 10% v/v. Este procedimiento se repitió dos veces. Por último, el pellet obtenido se resuspendió en 5 ml de glicerol 10% y la solución se alicuotó en fracciones de 400 µl en tubos eppendorf que fueron mantenidos a -20°C para su posterior utilización

Para la transformación se utilizaron cubetas de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad) previamente enfriadas, donde se colocaron las células con 100 ng a 1 µg de ADN en un volumen que no superó los 10 µl. La electroporación se llevó a cabo en electroporador de Bio-Rad fijando el pulso de 2,5V y 25 µF, con una resistencia de 1000Ω. Inmediatamente después de realizado el pulso, se agregaron en la cubeta 2 ml de medio 7H9 ADS-GT/7H9 ADS-GTw que se trasvasaron a un tubo de 15ml. El tubo se incubó posteriormente con agitación durante 2 a 4 horas a 30°C o 37°C dependiendo de las condiciones del experimento. Pasado este tiempo se recuperaron las células por centrifugación y se resuspendieron en 100 µl de medio que se sembraron en placas de 7H9 ADS sólido con los antibióticos correspondientes. Las placas fueron incubadas a 30 o 37°C durante 3 a 5 días.

3.7. MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

3.7.1. Preparación de extractos proteicos de *M. smegmatis*

Para la preparación de extractos proteicos de *M. smegmatis* se siguió el protocolo descrito por Jacobs y Hatfull (2000). Se partió de 100 ml de cultivo bacteriano crecido en medio de cultivo Sauton a una DO_{600nm} aproximada de 1.0 (fase exponencial tardía). Las células se cosecharon por centrifugación a 2000 g durante 20 minutos y se lavaron una vez con buffer fosfato salino (PBS). Se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones de velocidad y tiempo. En este punto el pellet se transfirió a un tubo con tapa rosca de 15 ml, se resuspendió en 10 ml de PBS helado y se centrifugó nuevamente. Luego se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1,5 ml de PBS helado y se transfirió a un tubo de 2 ml. Se centrifugó en microcentrífuga durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 µl de buffer de extracción. A esta mezcla se le adicionó un volumen de 100 µl de esferas de Zirconio (106 µm Sigma) y se agitó mecánicamente a

velocidad máxima durante 5 minutos. Se centrifugó durante 5 minutos a velocidad máxima y se recolectó la muestra del fondo del tubo. Se adicionaron 100 µl de Buffer de muestra para SDS-PAGE (ver más adelante) y se resuspendió con pipeta. Finalmente la muestra se incubó durante 5 minutos en baño de agua a 100°C y luego se guardó a -20°C para su uso posterior.

Buffer de extracción

Tris HCl (pH 7,5)	50 mM
EDTA	5 mM
SDS	0,06%
NaPO ₄	10 mM

2X SDS-PAGE Buffer de muestra

Tris HCl (pH 6,85)	125 mM
SDS	4%
Glicerol	20%
2-mercaptoetanol	5%
Azul de bromofenol	0.005%

3.7.2. Preparación de geles de proteína y condiciones de electroforesis

Los extractos proteicos de *M. smegmatis* se analizaron mediante electroforesis en geles discontinuos de Poliacrilamida-Dodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE, del inglés sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis), siguiendo la metodología de Laemmli (1970). La composición final de los geles fue de 12,5% de acrilamida y 0,22% de bis-acrilamida en tampón Tris-HCl 1,5M; pH 8,0 para el gel separador. La polimerización se realizó con TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina) al 0,4% (gel concentrador) y al 0,03% (gel separador) y persulfato amónico al 0,02% como agente catalizador. El tampón de corrida fue Tris-Glicina-SDS, pH 8,3. El proceso se desarrolló a una corriente constante de 30 mA.

3.7.3. Tinción de proteínas

Para la observación del perfil proteico se utilizó la tinción de Azul de Coomassie según Sambrook et al., (1989). Las soluciones para las tinciones se prepararon de acuerdo a especificaciones, empleando reactivos de grado analítico.

3.8. ANÁLISIS DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS Y ÁCIDOS MICÓLICOS

La síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos en las distintas cepas micobacterianas se analizó mediante la incorporación del precursor radiactivo ácido [1-¹⁴C] acético. Con este objetivo, las distantes cepas se crecieron en medio 7H9 ADS-GT/7H9 ADS-GTw hasta una DO_{600nm} de aproximadamente 0,6. En este punto se agregó ácido [1-¹⁴C] acético y se continuó la incubación por 1h a 37°C. Luego de la marcación las células se colectaron por centrifugación, se lavaron dos veces con agua y se sometieron a hidrólisis alcalina con hidróxido de tetrabutilamonio (TBAH, Aldrich) al 15% (v/v) a 100°C por 12hs. Posteriormente se adicionaron a la mezcla 2ml de CH₂Cl₂ y 100µl de CH₃I y se mezcló por rotación a temperatura ambiente durante 1h. Se separaron las fases acuosa y orgánica por centrifugación a baja velocidad y la fase orgánica fue extraída y secada a 55°C bajo atmósfera de nitrógeno. De este modo se generaron y separaron los metil esteres de ácidos grasos

Los MEAMs (metil-ésteres de ácidos micólicos) y MEAGs (metil-ésteres de ácidos grasos) fueron separados por cromatografía en capa delgada (TLC) utilizando sílica G 60 como soporte. Para la TLC mono-dimensional (1D) se utilizó éter de petróleo:éter etílico (85:15 v/v) como fase móvil (Sistema A). Las muestras (aproximadamente 40.000 cpm) fueron sembradas y desarrolladas tres veces en el sistema A. Para las TLC 1D con Ag⁺ se impregnaron las placas con una solución de AgNO₃ 10% p/v y se utilizó el mismo sistema de solventes. Para la TLC bidimensional (2D) las muestras (aproximadamente 100.000 cpm) fueron sembradas en placas de sílica previamente tratadas con una solución de AgNO₃ 10% p/v y desarrolladas dos veces en hexano-acetato de etilo (95:5 v/v) en la primer dirección y tres veces en éter de petróleo-éter etílico (85:15 v/v) en la segunda dirección. En ambos casos la radioactividad presente fue evidenciada por autoradiografía en

placas Kodak X-Omat AR a -80°C durante 16 horas o bien mediante visualización y digitalización con un scanner Storm 840 (Amersham).

Los perfiles de MEAGs se analizaron mediante espectrometría de masas unida a cromatografía de gases (GC-MS, del inglés gas chromatography linked to mass spectrometer) realizada en el equipo Shimadzu GCMS-QP2010 *Plus* (Instituto de química de Rosario– IQUIR, Facultad de ciencias bioquímicas y farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario). Las cepas analizadas se hicieron crecer en medio de cultivo 7H9, con los suplementos adecuados para cada experimento, hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1, aproximadamente. En este punto, las células se colectaron por centrifugación y se siguió el protocolo de extracción de MAMEs y FAMEs ya descrito.

3.8.1. Análisis del efecto de TAC en los perfiles de MEAMs y MEAGs de micobacterias

El efecto de TAC en la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos se evaluó mediante experimentos de incorporación del precursor radiactivo ácido $[1-^{14}\text{C}]$ acético. Para lo cual las cepas analizadas, se hicieron crecer en medio 7H9 ADS-GT/7H9 ADS-GTw hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 0,3. En este punto se dividieron los cultivos en alícuotas, a las que se trató con distintas concentraciones de la droga y luego se incubaron por 3h a 37°C . Transcurrido este tiempo se les agregó ácido $[1-^{14}\text{C}]$ acético y se continuó la incubación por 1h a 37°C . Los MEAGs y MEAMs se obtuvieron siguiendo el protocolo ya descrito.

3.9. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS MUTANTES MEDIANTE EL SISTEMA DE RECOMBINEERING

El sistema de intercambio alélico “Recombineering” fue desarrollado en micobacterias por Van Kessel y Hatfull (2007) y Van Kessel (2008). Este sistema promueve la recombinación homóloga y hace más eficaz el intercambio alélico en cepas micobacterianas de crecimiento lento y rápido. Esto se logra mediante la expresión, por medio de un sistema inducible, de las proteínas homólogas a las proteínas de recombinación RecE y RecT de *E. coli* presentes en el micobacteriofago Che9c (Van Kessel y Hatfull, 2007). De este modo, se logran frecuencias de recombinación elevadas y

se facilita el intercambio alélico utilizando sustratos de ADN lineales (sustratos recombinogénicos). El protocolo publicado por Van Kessel (2008) consiste en: *i*) preparación de la cepa recombinogénica *ii*) generación del sustrato recombinogénico (zona flanqueante del gen de interés río arriba- marcador de resistencia- zona flanqueante del gen de interés río abajo) y *iii*) electroporación del sustrato en la cepa recombinogénica.

Para la preparación de la cepa recombinogénica se transformaron con el plásmido pJV53 (portador de las proteínas del fago Che9c, cuya expresión se encuentra bajo control de un promotor inducible por acetamida) las cepas de *M. smegmatis* a recombinar, según el protocolo de preparación de electrocompetentes y transformación ya descrito en este trabajo. La selección de clones transformados se realizó en placas de 7H9 ADS sólido suplementadas con km. Posteriormente se comprobó la presencia del plásmido mediante extracción ADN plasmídico de varios clones y se analizó la expresión de las proteínas de recombinación en los clones positivos mediante las técnicas ya descrita en esta sección.

El sustrato recombinogénico se construyó de acuerdo con el tipo de mutante que se buscaba obtener. En este trabajo de tesis se planteó la construcción de las siguientes mutantes:

- **Mutante puntual en el marco de lectura abierto (ORF, del inglés Open Reading Frame) MSMEG_1886.** Esta mutación se encuentra presente en la cepa UNR1 y el gen *MSMEG_1886* codifica para una proteína homóloga a DesA3 de MTB. Para su construcción se amplificó la que posee dicha mutación en la cepa UNR1 (últimas 600 pb del gen *MSMEG_1886*) y este fragmento se utilizó como zona flanqueante río arriba. La zona flanqueante río abajo de 600 pb corresponde al gen *MSMEG_1887* completo y parte del ORF *MSMEG_1888*. Los fragmentos se clonaron a ambos lados de un marcador de resistencia en el vector soporte pLitmus28G. Por último, la construcción se digirió con enzimas de restricción y por electroforesis en geles de agarosa y posterior elución de la banda de DNA se separó el sustrato de recombinación. El sustrato se diseñó de este modo para que al realizarse la recombinación homóloga el gen de resistencia a antibiótico quedase ubicado en la región intergénica *MSMEG_1886-MSMEG_1887*.

- **Mutantes delecionales en los genes *desA1* o *desA2*.** los ORF *MSMEG_5773* y *MSMEG_5248* son genes de *M. smegmatis* homólogos a los genes *desA1* y *desA2* de MTB respectivamente. Para la construcción de la cepa delecional en el gen *desA1*: i) se amplificaron aproximadamente 500 pb corriente arriba y 500 pb corriente abajo del gen *MSMEG_5773* presente en la cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155, ii) los fragmentos se clonaron a ambos lados de un marcador de resistencia en el vector soporte pLitmus28G, iii) la construcción se digirió con enzimas de restricción y por electroforesis en geles de agarosa y posterior elución de la banda de DNA se separó el sustrato de recombinación. El mismo procedimiento se realizó con el ORF *MSMEG_5248*, utilizando al vector pBluescript como plásmido soporte.

En las tres construcciones se utilizó el casete de resistencia a Hyg obtenido del plásmido pHP45Ω*hyg* por medio de corte con enzimas de restricción (*HindIII* en el caso de la mutante puntual y la mutante en *desA1* o bien, *BamHI* en el caso de la mutante en *desA2*) y posterior electroforesis en gel de agarosa y elución de la banda de DNA.

La preparación de células electrocompetentes de las diferentes cepas portando el vector pJV53 se realizó según Jacobs y Hatfull (2000) con las modificaciones introducidas a partir del protocolo de Recombineering (Van Kessel, 2008). Se inocularon 50 ml de medio 7H9 STw con un volumen de cultivo saturado de la batería tal que luego de ser incubado durante toda la noche a 37°C se encuentre a una DO_{600nm} de 0,5. En este punto se adicionó acetamida y el cultivo se incubó a 37°C durante 3 hs para la inducción de las proteínas de recombinación. Transcurrido este tiempo se colocó en hielo por un mínimo de 10 minutos (sin exceder las 2 horas). A partir de aquí todos los procedimientos se realizaron a 4°C. Se centrifugó 15 minutos a 1000 g, se recuperó el pellet y se resuspendió en 40 ml glicerol 10% v/v. Este procedimiento se repitió dos veces. Por último, el pellet obtenido se resuspendió en 5 ml de glicerol 10% y la solución se alicuotó en fracciones de 400 µl en tubos eppendorf que fueron mantenidos a -20°C para su posterior utilización.

Para la transformación se utilizaron cubetas de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad) previamente enfriadas, donde se colocaron las células con 500 ng a 1 µg de ADN en un volumen que no superó los 10 µl. La electroporación se llevó a cabo en electroporador de Bio-Rad fijando el pulso de 2,5V y 25µF, con una resistencia de 1000Ω. Inmediatamente después de realizado el pulso, se agregaron en la cubeta 2 ml de medio 7H9 ADS-GT/7H9

GTw que se trasvasaron a un tubo de 15ml. El tubo se incubó posteriormente con agitación durante 4 horas a 30°C o 37°C dependiendo de las condiciones del experimento. Pasado este tiempo las células se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 100ul de medio que se sembraron en placas de 7H9 ADS-G Hyg sólido. Las placas fueron incubadas a 30 o 37°C hasta la aparición de colonias visibles.

4. RESULTADOS

4.1. Capítulo 1

Cepa mutante UNR21: síntesis de ácidos α' -micólicos en M. smegmatis

4.1.1. INTRODUCCIÓN

Las evidencias bioquímicas y la disponibilidad de varios genomas micobacterianos no han brindado suficiente información para permitir conocer el grado de exclusividad o superposición de las vías de síntesis de los ácidos α y α' -micólicos. Los análisis bioinformáticos realizados tampoco han resultado efectivos, ya que varias de las actividades enzimáticas son específicas de micobacterias y no tienen correlato con otras especies. Como se mencionó en la introducción de este trabajo de tesis, existen drogas experimentales como TLM y derivados (Kremer et al., 2000b; Slayden et al., 1996), que son inhibitorias de las enzimas β -cetoacil-ACP sintetasas KasA y KasB (Kremer et al., 2000b) con la consecuente pérdida de la síntesis de los ácidos α -micólicos y ácidos micólicos oxigenados. Sin embargo, la síntesis de los ácidos α' -micólicos no se ve afectada por el tratamiento con TLM (Slayden et al., 1996). Este mismo resultado se obtuvo con la inactivación condicional de *kasA* (Bhatt et al., 2005). Una de las hipótesis planteadas acerca de la vía de síntesis de los ácidos micólicos afirma que los α' -micólicos serían precursores de los ácidos α -micólicos y ácidos micólicos oxigenados, que por elongación darían origen a estos últimos. Sin embargo, también se ha propuesto que los ácidos α' -micólicos pueden ser formados por una ruta independiente a la que origina los ácidos α -micólicos (Asselineau et al., 2002). Esto último coincidiría con el fenotipo observado en la mutante TS UNR21, que es incapaz de sintetizar ácidos α' -micólicos a 30°C y 42°C, aún cuando su síntesis de ácidos α -micólicos aparenta ser normal. A la temperatura no permisiva presenta un arresto del crecimiento con efecto bacteriostático, lo que indica que la mutación no es letal, sin embargo, es evidencia de que la falta de esta familia de ácidos micólicos altera la fluidez y permeabilidad de la pared celular micobacteriana; este defecto no puede ser compensado por las otras familias de ácidos micólicos. En la figura 1.1 se presenta una Autoradiografía de TLC 1D de MEAGs y MEAMs extraídos de las diferentes mutantes químicas del laboratorio, entre las cuales se encuentra la UNR21, marcadas con [$1\text{-}^{14}\text{C}$] ácido acético a 30°C y 42°C (Carignano Tesina de grado, 2009). A partir de la información disponible se planteó como objetivo la búsqueda de la mutación responsable de este fenotipo.

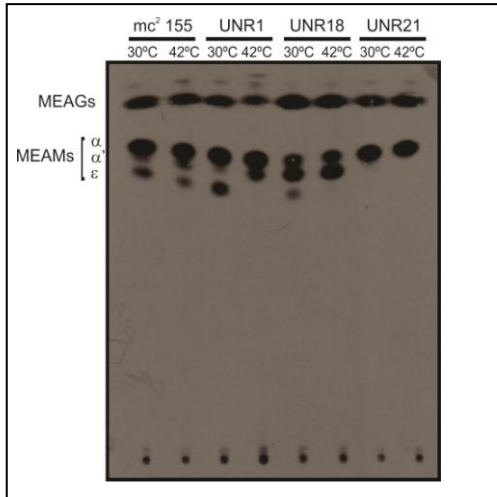


Figura 1.1. Análisis de los perfiles de MEAGs y MEAMs de *M. smegmatis mc²155* (*mc²155*) y las mutantes *M. smegmatis* UNR1, UNR18 y UNR21 a 30°C o 42°C. Se muestra una autoradiografía de TLC 1D en placa de sílica gel, sembrada con 40.000 cpm de cada muestra y desarrollada 3 veces con hexano-acetato de etilo (95:5 v/v). Las muestras se obtuvieron por marcación de cada cepa con [1-¹⁴C] ácido acético a las dos temperaturas y posterior extracción de MEAGs (metil-ésteres de ácidos grasos) y MEAMs (metil-ésteres de ácidos micólicos). α': ácidos α'-micólicos; α: ácidos α-micólicos; ε: ácidos epoxi-micólicos. Tomado de Belardinelli (datos no publicados).

KasA y KasB se encuentran presentes en todos los genomas micobacterianos y están localizadas una a continuación de la otra en un operón que contiene varios de los genes relacionados con el sistema FAS-II. Sin embargo, una búsqueda bioinformática en el genoma de *M. smegmatis mc²155* utilizando a KasA como plantilla, reveló la existencia de una tercer β-cetoacil-ACP sintetasa con un 57% de identidad (ORF *MSMEG_1204* anotado como 3-oxoacil-ACP sintetasa) y ubicada en cercanía de otros genes posiblemente involucrados en la modificación de ácidos micólicos (Figura 1.2). Se denominó KasC a la β-cetoacil-ACP sintetasa hipotética y *kasC* al gen que la codifica.

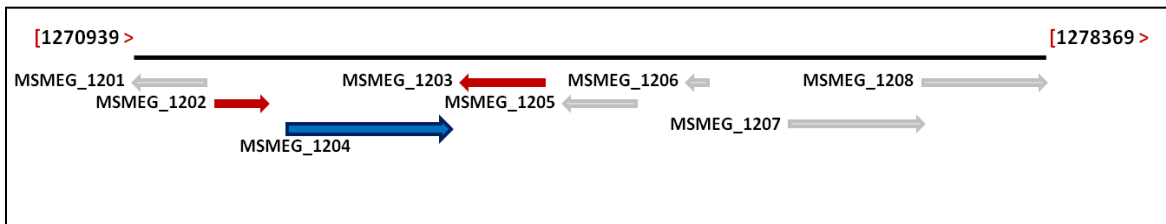


Figura 1.2. Esquema de la organización génica presente en *M. smegmatis mc²155* en torno a *MSMEG_1204* (*kasC*). La flecha color azul representa a *MSMEG_1204* y las flechas color rojo a sus genes vecinos corriente arriba (*MSMEG_1202*) y corriente abajo (*MSMEG_1203*). Las flechas en color gris representan a los genes restantes del entorno génico de *MSMEG_1204*, comprendidos entre las bases 1270939 y 1278369 del genoma de *M. smegmatis mc²155*.

Dada la hipótesis acerca de una ruta independiente de síntesis de los ácidos α'-micólicos, se planteó la *i*) sobre-expresión y *ii*) delección de *MSMEG_1204* en la cepa *M. smegmatis mc²155*, a fin de determinar si KasC estaba involucrada en esta nueva vía.

4.1.2. RESULTADOS

4.1.2.1. Sobre-expresión del gen *kasC*

Se sobre-expresó el ORF *MSMEG_1204* en la cepa *M. smegmatis* mc² 155, para lo cual en un primer paso, se amplificó el gen por PCR utilizando los oligonucleótidos *MSMEG_1204 UP* y *MSMEG_1204 DN*. Posteriormente, este producto se clonó en el vector pCR-Blunt II-TOPO y se sub-clonó bajo control del promotor constitutivo *Phsp60* en el vector de expresión pMV261.

La construcción pMV261::*kasC* se transformó en *M. smegmatis* mc²155 y se obtuvieron clones que sobre-expresaron una proteína de aproximadamente 41,9 KDa de peso molecular (PM) que coincide con el esperado para KasC (figura 1.3).

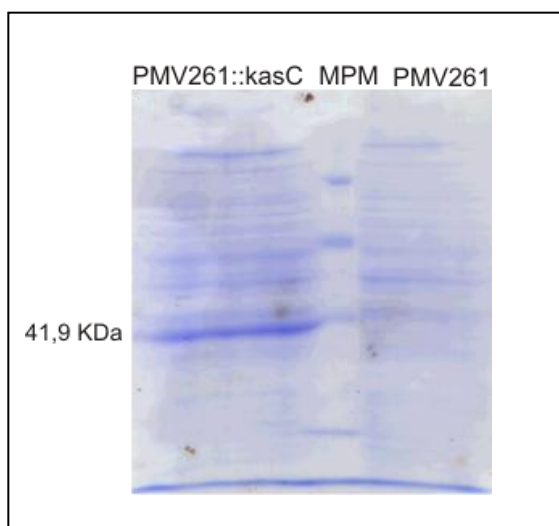


Figura 1.3: Confirmación de la sobre-expresión del gen *kasC*. En la figura se presenta un gel de poliacrilamida PAGE-SDS. Las muestras analizadas corresponden a extractos proteicos de las cepas *M. smegmatis* pMV261 (calle pMV261) y pMV261::*kasC* (calle pMV261::*kasC*) crecidas a 37°C. Se señala una banda de sobre-expresión de aproximadamente 41,9 KDa, peso molecular esperado para KasC. Se analizaron los pesos moleculares mediante un marcador de peso molecular comercial (MPM).

Posteriormente se analizó, mediante ensayos de incorporación del precursor [1-¹⁴C] ácido acético, el efecto que produce en el perfil de ácidos micólicos de esta cepa la sobre-expresión de *kasC*. Se aislaron y purificaron los MEAGs y MEAMs marcados por medio de hidrólisis alcalina y metilación y se analizaron por medio de TLC 1D 2D y autoradiografía según lo descrito en materiales y métodos. Como se puede observar en la figura 1.4 los perfiles de MEAMs presentados por la cepa *M. smegmatis* pMV261::*kasC* fueron comparables a los de la cepa control que no sobre-expresaba a la proteína. Por lo tanto, podemos asumir que la síntesis de ácidos α' -micólicos no se encuentra afectada por la sobre-expresión de esta proteína.

Además de analizarse el efecto de la sobre-expresión de *kasC* en la cepa silvestre, se transformó la construcción pMV261::*kasC* en la mutante *M. smegmatis* UNR21 y se estudió la sensibilidad a temperatura y la pérdida de ácidos α' -micólicos en la cepa resultante. En ambos casos la cepa mantuvo el fenotipo de la cepa parental.

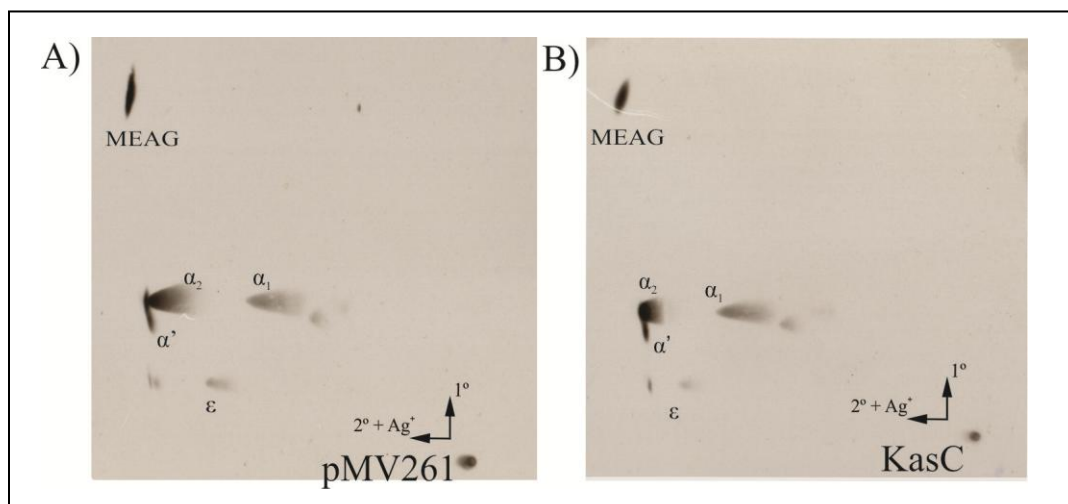


Figura 1.3. Análisis de los perfiles de MEAGs y MEAMs de *M. smegmatis* mc²155 pMV261 (A) y pMV261::*kasC* (B). En la figura se muestran Autorradiografías de TLCs 2D en placas de silica gel impregnadas con AgNO₃ al 10%, sembradas cada una con 100.000 cuentas por millón (cpm) de las muestras correspondientes y desarrolladas dos veces en hexano-acetato de etilo (95:5 v/v) en la primer dirección y tres veces en éter de petróleo-éter etílico (85:15 v/v) en la segunda dirección. Las muestras de MEAGs y MEAMs se obtuvieron por marcación de las cepas con [1-¹⁴C] ácido acético a 37°C. **MEAG:** metil-ésteres de ácidos grasos; **α' :** ácidos α' -micólicos; **α_1 :** ácidos α_1 -micólicos; **α_2 :** ácidos α_2 -micólicos; **ϵ :** ácidos epoxi-micólicos.

Para comprender esta serie de resultados, se realizó un nuevo análisis informático de los apilamientos de las secuencias proteicas de KasA, KasB y KasC de *M. smegmatis* mc²155 (Figura 1.5). Los aminoácidos C170, H311 y H346 se encuentran conservados en KasA y KasB y se ha descrito que forman parte de la triada catalítica de estas enzimas (Sridharan et al., 2007). Sin embargo, en KasC solo se encuentran conservados los residuos H311, H346, estando sustituida la C170 por ácido glutámico (D). Esta cisteína es esencial en el mecanismo de catálisis de las enzimas β -cetoacil-ACP sintetasas, dado que es la receptora del grupo acilo que será elongado (Kauppinen et al., 1988; Funabashi et al., 1989). Este hallazgo se corrobora con la ausencia de efectos observables cuando se sobre-expresó de KasC en la cepa silvestre.

KasA	RAGVITPVSACSSGSEATAHAWRQIVMGDADFAVCGGVEGGIEALPIAAFSMMR-AMSTRNDDPQGASRPFDKDRDGFVF	239
KasB	KAGVCTSISACASGSEAIANAWRNIVLGEADIAICGGVETKIEAVPIAGFAQMRIVLSNSNDDPEGACKPFDKDRNGFVF	239
KasC	KAGIMSPIMADASGAAATAHAWREIILGDADIAICGGVETWIEAVPVGAFSQLG-MLSTYNDDPPAACRPFDKDRDGMVL	238
KasA	GEAGAMMIETEEHAKARGAKPLARLMGAGITSDAFHMVAPADGLRAGQAMKRAMETAGLDPKIDIDHVNAHATATPIGD	319
KasB	GEAGALMVIETEEHAKARGANILGRLMGASVTSDDYHIVAPDPNQEAGYAMTRAIELAGLKPTDIDHVNAHATGTNVGD	319
KasC	GEAGALMLVETEEHAKARGAPILARLMGAGMTNDCYDIVKPPDQQLAGDAIRRAIELAGLAPGDIDHINAHATGTDGFD	318
KasA	TAEANALRVA-GVEHAAVYAPKSALGHSIGAVGALESILTVLALRDGVIPTLNLYETPDPEIDLDDIVAGEPRYGEYKYAI	398
KasB	VAESKAINNAMGGHKPAVYAPKALGHSVGVAVGAVESILTVLALRDGIIPPTRNLDPEIDLDDVIVAGEPRQGDYKYAI	399
KasC	LAEARAIHNVLGSHRPSVYASKAALGHSLSGAGAVEAVLTVQTLRDGIVPATLNKVPDPQIDLDDVVTDPQSEHYRYAL	398

Figura 1.5. Apilamiento de secuencias de aminoácidos de los sitios activos de las proteínas KasA, KasB y KasC de *M. smegmatis* mc²155. Los aminoácidos marcados con (•) son esenciales para la actividad catalítica de KasA y KasB, los cuales son conservados en KasC con excepción del aminoácido cisteína (C) que se encuentra sustituido por ácido aspártico (D, en color rojo). Los alineamientos de secuencias múltiples se realizaron mediante el programa ClustalW2 disponible en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

Los resultados que se obtuvieron en los experimentos de sobre-expresión y los análisis bioinformáticos brindaron evidencia suficiente para que en este punto se detuvieran los estudios del gen *kasC*. Sin embargo, se continuó el estudio de la cepa UNR21 y recientemente se secuenció su genoma. El análisis de los datos de este procedimiento arrojó un total de 270 polimorfismos de nucleótidos simple (SNPs, del inglés single nucleotide polymorphism) en distintos ORFs, los cuales se identificaron utilizando la base de datos del genoma de *M. smegmatis* mc²155 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=mycobacterium+smegmatis+mc2155>). Cabe destacar que no se encontraron polimorfismos en ninguna de las proteínas identificadas como parte de FAS-II, como tampoco se halló ninguno en la hipotética *kasC*. Una vez identificados los ORFs que presentaron SNPs se realizaron búsquedas de homología usando el programa BLASTn (secuencia nucleotídica). De estas búsquedas se identificaron mutaciones en 49 proteínas hipotéticas a las que no se les asoció una función conocida y también nueve mutaciones ubicadas en reguladores transcripcionales hipotéticos. Sin embargo, dado el volumen de información que generó este procedimiento se hizo imposible su análisis completo en el lapso de tiempo de esta tesis, por lo que permanecerá disponible para proyectos de tesis posteriores.

4.1.3. DISCUSIÓN

La vía de síntesis de los ácidos micólicos en micobacterias ha sido objeto preferencial de estudio debido a que representa uno de los principales blancos de acción de las drogas anti-micobacterianas. Diversas especies de micobacterias no patógenas y/o patógenas oportunistas, entre las que se encuentra *M. smegmatis*, contienen en sus envolturas celulares a la familia α' de ácidos micólicos (Barry et al., 1998). La presencia de este tipo de ácidos micólicos aumenta la elevada resistencia intrínseca a drogas de estas especies ocasionando que las infecciones que producen sean marcadamente difíciles de tratar. Con el paso de los años se han propuesto diversas hipótesis con respecto al origen biosintético de los ácidos α' -micólicos, sin embargo aún no se ha presentado evidencia alguna que demuestre fehacientemente alguna de ellas. La cepa de *M. smegmatis* UNR21 constituye por sí misma una herramienta de extrema utilidad en el análisis de la vía de síntesis de los ácidos α' -micólicos. En este sentido, el fenotipo observado en esta cepa se opone a la hipótesis propuesta por Slayden et al., (1996) y Kremer et al., (2002), quienes mediante diversas observaciones postularon que los ácidos α' -micólicos serían precursores biosintéticos de los ácidos α -micólicos.

En los primeros análisis realizados con la cepa UNR21 se descartó la hipótesis de posibles mutaciones en los genes *kasA* o *kasB*, debido a que las mutantes delecionales en estos genes (Bath et al., 2005; Gao et al., 2003) no presentaban un fenotipo compatible con el presentado por la mutante. Esto fue comprobado más tarde con la secuenciación de la cepa UNR21. El ORF *MSMEG_1204* de *M. smegmatis* se encuentra anotado en el genoma de esta especie como una β -cetoacil-ACP sintetasa, sin embargo su sobre-expresión no modificó el perfil de ácidos micólicos. Esta observación coincidió con los análisis de secuencia aminoacídica realizados posteriormente en este trabajo en los que se observó que esta enzima carece del residuo C170 esencial para la catálisis de este tipo de sintetasa (Kauppinen et al., 1988; Funabashi et al., 1989). Con la secuenciación de la mutante se corroboró también este resultado y se determinó además que la cepa no presentaba mutaciones en ninguno de los componentes enzimáticos de FAS-II descritos hasta el momento, por lo que la mutación responsable de este fenotipo estaría localizada en un gen cuya participación en la síntesis de ácidos micólicos no se ha descrito.

4.1.4. CONCLUSIONES

Los estudios realizados a partir del fenotipo de la cepa UNR21 permitieron obtener las siguientes conclusiones:

- El ORF *MSMEG_1204* se encuentra anotado incorrectamente como β -cetoacil-ACP sintetasa ya que no presenta la triada catalítica característica de este grupo de enzimas y presuntivamente su expresión no modificaría el perfil de ácidos grasos de *M. smegmatis*.
- La mutación asociada a la ausencia de ácidos α' -micólicos en la cepa UNR21 no se encuentra localizada en ninguno de los genes asociados a la biosíntesis de ácidos micólicos.

4.2. Capítulo 2

Cepa mutante UNR18: Estudio de los blancos de acción de TAC en M. smegmatis

4.2.1. INTRODUCCIÓN

La cepa UNR18 se encuentra, junto a la UNR21, en el grupo de mutantes químicas deficientes en la síntesis de ácidos α - o α' -micólicos. Esta cepa mostró un defecto en la síntesis de la subfamilia α_1 de ácidos micólicos a 42°C (Figura 2.1) (Carignano Tesina de grado, 2009) y contrariamente a la cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 de la cual deriva, es sensible a TAC (CIM de *M. smegmatis* mc²155 \geq 200 μ g/ml, CIM cepa UNR18: 50 μ g/ml). En el laboratorio se analizaron los perfiles de ácidos micólicos de la cepa *M. smegmatis* mc²155 y UNR18 tratadas con TAC a 30°C y se observó una inhibición casi del 100% en la síntesis de la sub-familia α_2 de ácidos micólicos (Figura 2.2, Belardinelli resultados no publicados). De acuerdo con lo publicado por Slayden et al., (1996) los ácidos micólicos α_1 son *cis*, *cis* doble etilénicos y los α_2 son *cis*, *trans* doble etilénicos. Los efectos de TAC observados en las cepas *M. smegmatis* mc²155 y UNR18 evidencian la presencia de los blancos de acción de TAC en *M. smegmatis* mc²155, bacteria considerada naturalmente resistente a este antibiótico. Como ya se mencionó en la introducción de este trabajo, el complejo HadABC y las MtfSAM se encuentran involucrados en la resistencia a TAC de MTB (Belardinelli, 2012; Alahari et al., 2007; Alahari et al., 2009). El complejo HadABC también se encuentra involucrado en la resistencia a ISO (Grzegorzewicz et al., 2012). Sin embargo, la cepa UNR18 sólo presentó sensibilidad aumentada a TAC, lo que direccionó los estudios de este fenotipo hacia el análisis de las MtfSAM. *M. smegmatis* mc²155 posee por lo menos siete genes MtfSAM parálogos que presentan entre un 70-73 % de similitud (Laval et al., 2008). Estos ORFs se encuentran anotados como *MSMEG_0902*, *MSMEG_0913*, *MSMEG_1203*, *MSMEG_1205*, *MSMEG_1350*, *MSMEG_1351*, *MSMEG_3538* en la base de datos del genoma de *M. smegmatis* mc²155. De acuerdo con lo descrito por Laval et al., (2008), la proteína codificada por *MSMEG_0913* tiene como función la adición de un grupo metilo en la vecindad del doble enlace *cis* y del grupo ciclopropilo, en la porción proximal de los ácidos α - y ϵ -micólicos para producir los homólogos *trans* de estas funciones. En el caso del ORF *MSMEG_1351*, se demostró que su expresión es regulada por temperatura y codifica para una proteína que realiza la *cis* ciclopropanación de los ácidos α -micólicos en su porción proximal (Alibaud et al., 2010).

Con la información disponible se inició el análisis de la cepa UNR18.

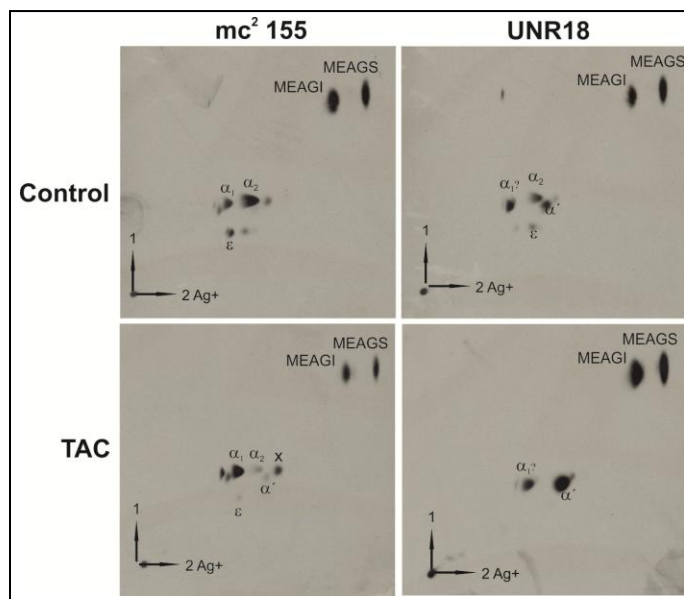


Figura 2.1. Análisis del efecto del tratamiento con TAC en la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos de las cepas de *M. smegmatis* mc²155 (mc²155) y UNR18 a 30°C. Se muestran TLCs 2D en placas de sílica gel impregnadas con AgNO₃ al 10%, sembrada con 100.000 cpm de cada muestra y desarrollada dos veces en hexano-acetato de etilo (95:5 v/v) en la primera dirección y tres veces en éter de petróleo-éter etílico (85:15 v/v) en la segunda dirección. Las muestras se obtuvieron por marcación con [1-¹⁴C] ácido acético de cada cepa previamente tratada con TAC o sin tratar (control) y posterior extracción de MEAGs y MEAMs. **MEAGI:** metil-ésteres de ácidos grasos insaturados; **MEAGS:** metil-ésteres de ácidos grasos saturados; **α'**: ácidos α'-micólicos; **α₁**: ácidos α₁-micólicos; **α₂**: ácidos α₂-micólicos; **ε**: ácidos epoxi-micólicos. Tomado de Belardinelli (datos no publicados).

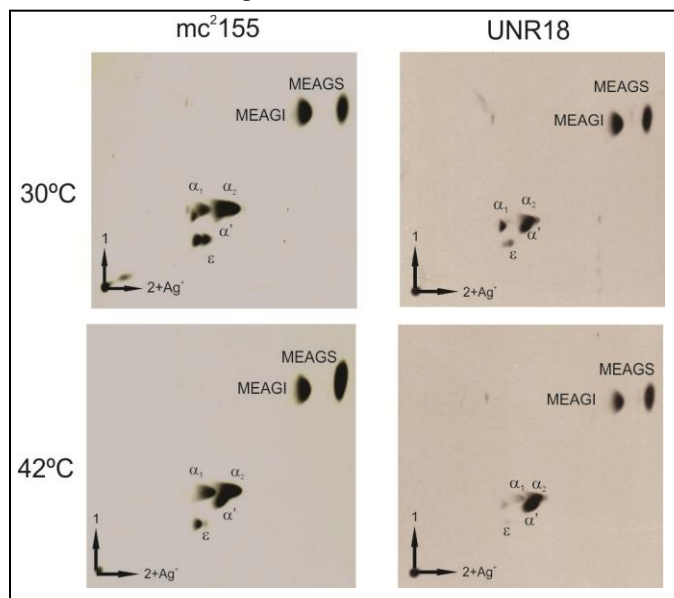


Figura 2.2. Análisis de los perfiles de ácidos grasos (MEAMs) y ácidos micólicos (MEAGs) de las cepas de *M. smegmatis* mc²155 (mc²155) y UNR18 a 30°C o 42°C. Se presentan TLCs 2D en placas de sílica gel impregnadas con AgNO₃ al 10%, sembradas con 100.000 cpm de la muestra correspondiente y desarrollada dos veces en hexano-acetato de etilo (95:5 v/v) en la primera dirección y tres veces en éter de petróleo-éter etílico (85:15 v/v) en la segunda dirección. **MEAGI:** metil-ésteres de ácidos grasos insaturados; **MEAGS:** metil-ésteres de ácidos grasos saturados; **α'**: ácidos α'-micólicos; **α₁**: ácidos α₁-micólicos; **α₂**: ácidos α₂-micólicos; **ε**: ácidos epoxi-micólicos. Tomado de Carignano Tesina de grado (2009).

4.2.2. RESULTADOS

4.2.2.1. Transformación de la cepa UNR18 con las MtfSAM de *M. smegmatis* mc²155

En primer lugar, se intentó la complementación de la cepa 18 mediante la sobre-expresión de los ORFs que codifican para las MtfSAM de *M. smegmatis* mc²155. Para la construcción de los vectores de expresión utilizados en estos ensayos, se amplificó por PCR cada ORF con oligonucleótidos específicos (materiales y métodos) y los productos de reacción obtenidos se clonaron en el vector pCR2.1 Zero Blunt TOPO a partir de donde se sub-clonaron en el plásmido de expresión pMV261. Con cada una de estas construcciones, y el plásmido pMV261 vacío como control negativo de expresión, se electroporaron las cepas UNR18 y silvestre (control positivo de crecimiento). En cada una de las cepas obtenidas se confirmó la sobre-expresión de las proteínas en cuestión mediante SDS-PAGE (información no mostrada) y se analizó su capacidad de crecimiento a 42°C y los valores de concentraciones inhibitorias mínimas 99% (CIM₉₉) de TAC. Los valores de CIM₉₉ se obtuvieron inoculando ~1,000 unidades formadoras de colonia (UFC) en medio sólido 7H9 ADS-G adicionado con: *i*) 25 µg/ml, *ii*) 50 µg/ml, *iii*) 100 µg/ml, *iv*) 200 µg/ml de la droga. En estos experimentos se determinó que la sobre-expresión de las MtfSAM no complementa el defecto de crecimiento a alta temperatura ni modifica la CIM a TAC de la cepa UNR18 (Tabla 2.1).

Gen sobre-expresado	Concentración inhibitoria mínima 99%	
	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	UNR18
Control	>200 µg/ml	50 µg/ml
<i>MSMEG_0902</i>	>200 µg/ml	50 µg/ml
<i>MSMEG_0913</i>	>200 µg/ml	50 µg/ml
<i>MSMEG_1203</i>	>200 µg/ml	50 µg/ml
<i>MSMEG_1205</i>	>200 µg/ml	50 µg/ml
<i>MSMEG_1350</i>	>200 µg/ml	50 µg/ml
<i>MSMEG_1351</i>	>200 µg/ml	50 µg/ml
<i>MSMEG_3538</i>	>200 µg/ml	50 µg/ml

Tabla 2.1. Valores de concentración inhibitoria mínima 99% (CIM₉₉) de TAC en las cepas *M. smegmatis* mc²155 y UNR18 que sobre-expresan los ORFs de MtfSAM: *MSMEG_0902*, *MSMEG_0913*, *MSMEG_1203*, *MSMEG_1205*, *MSMEG_1350*, *MSMEG_1351*, *MSMEG_3538*. Los valores de la CIM₉₉ se determinaron utilizando las siguientes concentraciones de TAC *i*) 25 µg/ml, *ii*) 50 µg/ml, *iii*) 100 µg/ml, *iv*) 200 µg/ml. Como controles se utilizaron ambas cepas transformadas con el vector vacío. Las determinaciones se realizaron a 30°C.

4.2.2.2. Secuenciación de los ORFs que codifican para MtfSAM en la cepa UNR18

Cuando en una célula se encuentran simultáneamente el alelo mutado y el silvestre de un gen puede que el primero ejerza un efecto dominante (mutación dominante negativa) sobre este último provocando que el fenotipo observado sea el mutante. Debido a que en los ensayos de complementación no se obtuvieron resultados positivos y para descartar que la mutación de la cepa 18 fuese del tipo dominante negativa, se secuenciaron los 7 ORFs de MtfSAM de esta cepa. Para el experimento, se amplificaron los ORFs mediante PCR y los productos de reacción se enviaron al servicio de secuenciación para su análisis. En las reacciones de PCR y de secuenciación se utilizaron los mismos oligonucleótidos específicos (materiales y métodos). Los resultados obtenidos se analizaron tomando como patrón silvestre a las secuencias de la base de datos del genoma de *M. smegmatis* mc²155 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=mycobacterium+smegmatis+mc2155>). En los alineamientos de los genes *mtfAM*-cepa UNR18 vs *mtfAM*-cepa mc²155 no se observaron diferencias de secuencia, por lo que la mutante presenta alelos silvestres de estos genes.

4.2.2.3. Efecto del tratamiento con TAC en las cepas de *M. smegmatis* mc²155 que sobre-expresan las MtfSAM

En paralelo a los estudios realizados en la cepa UNR18 y con el objetivo de contribuir al entendimiento de la resistencia de *M. smegmatis* a TAC, se analizó el efecto del tratamiento con la droga en los perfiles de ácidos micólicos de las cepas silvestres que sobre-expresaban a las MtfSAM, obtenidas previamente. En este sentido, se realizaron ensayos de incorporación del precursor [1-¹⁴C] ácido acético en las diferentes cepas previamente tratadas con TAC según lo descrito en materiales y métodos. Se aislaron y purificaron los MEAGs y MEAMs y posteriormente se analizaron por medio de TLC 1D en placa de sílica gel impregnada con AgNO₃ al 10%. En la figura 2.3 se presenta la autoradiografía de esta TLC, en donde se puede observar que la sobre-expresión de los ORFs en estudio genera una variación en los perfiles de ácidos micólicos con respecto al perfil presentado por la cepa control (transformada con el plásmido vacío); lo que representa una nueva confirmación de la correcta expresión de las MtfSAM. En el caso de las cepas que sobre-expresan los ORFs *MSMEG_0902* y *MSMEG_1351*, se puede observar que con el tratamiento con TAC no se ven modificados sus perfiles lipídicos con respecto al

control sin tratamiento, mientras que en los perfiles de lípidos de las cepas que sobre-expresan los ORFs *MSMEG_0913*, *MSMEG_3538*, *MSMEG_1203*, *MSMEG_1205*, *MSMEG_1350* se observan cambios. Se puede sugerir que en el entorno de sobre-expresión de estos ORFs se hacen evidentes los efectos de TAC en la síntesis de ácidos micólicos. Cabe aclarar en este punto que se aplica la expresión “cambio en el perfil” cuando se observa la aparición o desaparición de manchas en la TLC.

Estas observaciones, suman evidencia con respecto al efecto de TAC en el metabolismo de lípidos de la bacteria y puntualmente en la vía de síntesis de ácidos micólicos, a pesar de que *M. smegmatis* es resistente natural a la droga. Sin embargo, la información que se presentó en esta sección no es suficiente para asociar fehacientemente estos efectos a alguno de los blancos de TAC propuestos en MTB.

4.2.2.4. El ORF *MSMEG_0902* se encuentra involucrado en la síntesis de ácidos micólicos diciticlopropanados

En el perfil de MAMEs de la cepa *M. smegmatis* mc²155 pMV261::*MSMEG_0902* se observa una única mancha de marcada intensidad que coincide en la distancia de corrida con una de las especies presentes en el perfil de la cepa *M. smegmatis* pMV261::*MSMEG_1351*. El ORF *MSMEG_1351* se asoció a la producción de ácidos micólicos mono-insaturados *cis* ciclopropanados (Alibaud et al., 2010) que de acuerdo a los Rf (factor de movilidad) citados en la bibliografía se encontraría debajo de la mancha compartida con la cepa *M. smegmatis* pMV261::*MSMEG_0902*. Debido a que la TLC 1D mostrada en la figura 2.1 se realizó con AgNO₃, las especies con insaturaciones se observan retardadas en la corrida con respecto a las que no poseen o poseen menos grupos etilénicos. Por lo tanto, se puede suponer que la cepa *M. smegmatis* mc²155 pMV261::*MSMEG_0902* sobre-produce un ácido micólico di-ciclopropanado (sin insaturaciones en la cadena meromicolato). Para comprobar esta hipótesis se debería realizar un análisis estructural de la especie, lo que supera los objetivos de esta tesis.

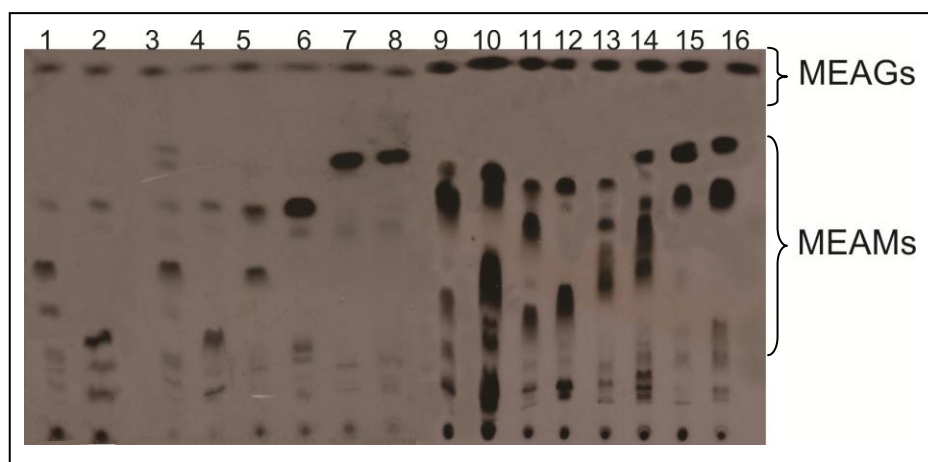


Figura 2.1: Efecto del tratamiento con TAC en el perfil de ácidos micólicos de las cepas de *M. smegmatis* mc²155 que sobre-expresan las MtfSAM presentes en su genoma. En la figura se presenta la autoradiografía de una TLC 1D de MEAGs y MEAMs en placa de silica gel impregnada con AgNO₃ al 10%. La placa se sembró con 40.000 cuentas por millón (cpm) de cada muestra obtenida por marcación con [1-¹⁴C] ácido acético a 37°C de las cepas de *M. smegmatis*: sin tratamiento con TAC, (1) pMV261-control plásmido vacío-, (3) pMV261::MSMEG_0913, (5) MSMEG_3538 (7) MSMEG_0902, (9) MSMEG_1203, (11) MSMEG_1205, (13) MSMEG_1350, (15) MSMEG_1351 y con tratamiento con TAC, (2) pMV261-control plásmido vacío-, (4) pMV261::MSMEG_0913, (6) MSMEG_3538 (8) MSMEG_0902, (10) MSMEG_1203, (12) MSMEG_1205, (14) MSMEG_1350, (16) MSMEG_1351. La placa se desarrolló tres veces en éter de petróleo-éter etílico (85:15 v/v). **MEAG:** metil-ésteres de ácidos grasos y **MEAM:** metil-ésteres de ácidos micólicos.

4.2.3. DISCUSIÓN

La emergencia de las cepas de MTB MDR, y posteriormente las cepas XDR y TDR (Velayati et al., 2009; Udhwadia et al., 2011) constituye en estos días uno de los problemas más graves a los que se que enfrentan los sistemas de salud a nivel mundial. De acuerdo con las estadísticas publicadas por la OMS los casos de TB por estas cepas aumentan año tras año, haciendo cada vez más acotado el portfolio de antibióticos utilizables en estos casos. En consecuencia, uno de los objetivos más urgentes que persiguen los grupos de investigación en TB es el descubrimiento de nuevas drogas o bien el estudio, para su posterior modificación o adyuvación, de drogas ya conocidas y utilizadas en los tratamientos. TAC se encuentra dentro de este último grupo; en años recientes, han sido descritos en parte sus blancos moleculares y mecanismo de acción en MTB (Dover et al., 2007; Alahari et al., 2007; Alahari et al., 2009; Belardinelli, 2012; Grzegorzewicz et al., 2012). *M. smegmatis* mc²155 es resistente a esta droga, sin embargo la cepa mutante TS UNR18 presenta deficiencia en la familia de α_1 de ácidos micólicos y es sensible a TAC. De acuerdo con este fenotipo se podría asociar la sensibilidad a TAC de esta cepa con los

defectos en la permeabilidad de membrana producto de la deficiencia en ácidos micólicos, sin embargo los análisis realizados por Belardinelli (resultados no publicados) confirmaron que la cepa mantiene la resistencia a otras drogas de este tipo, como por ejemplo ISO. Alahari et al., (2007; 2009) comprobaron que las MtfSAM CmaA2, MmaA2 y PcaA son blancos no esenciales de TAC, mientras que MmaA4 es necesaria para su actividad completa (Alahari et al., 2009; Belardinelli, 2012). En este trabajo de tesis se obtuvieron las 7 cepas de la mutante UNR18 sobre-expresantes de los genes de *M. smegmatis* mc²155 con homología a las MtfSAM de MTB (de acuerdo con lo publicado por Laval et al., (2010)), no habiéndose encontrado reversión del fenotipo TS o de la sensibilidad a TAC en ninguno de los casos analizados. Además se descartó la posibilidad de que la cepa presentara una mutación dominante negativa en alguno de estos ORFs mediante secuenciación. Recientemente, se asoció a la (3R)-hidroxiacil-ACP deshidratasa de FAS-II (codificada por el ORF *hadABC*) con el mecanismo de TAC y se propuso a esta enzima como blanco esencial de la droga (Belardinelli, 2012). En el caso de la cepa UNR18, se descartó la presencia de posibles mutaciones en este gen debido a que también ha sido propuesto como blanco de acción de la droga ISO (Grzegorzewicz et al., 2012) y por otro lado cualquier mutación TS en este ORF afectaría indefectiblemente a la vía completa de biosíntesis de ácidos micólicos. El mismo razonamiento lleva a no considerar al activador de TAC EthA, debido a que de presentar mutaciones también se observaría sensibilidad a ETH (ambas drogas comparten el mecanismo de activación (Baulard et al., 2000; Vannelli et al., 2002; Dover et al., 2007). Probablemente la mutación se encuentre en algún participante de la red de acción aún no identificado.

A pesar de los esfuerzos realizados, no se pudo identificar a la mutación responsable del fenotipo TS y la sensibilidad a TAC en esta cepa. Sin embargo, los resultados obtenidos en los diferentes experimentos resultaron de valor en el análisis del mecanismo de acción de TAC ya que hasta el momento no se han presentado evidencias de la actividad de esta droga en *M. smegmatis* u otras micobacterias no tuberculosas naturalmente resistentes a la droga, como por ejemplo *M. ulcerans*. El fenotipo mostrado por la cepa UNR18 es *per se* una evidencia de la presencia de los blancos de acción de TAC en *M. smegmatis*; aún cuando la droga en condiciones normales no es capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria. Resultados aun no publicados de Belardinelli, muestran la presencia, en *M.*

smegmatis y otras micobacterias resistentes, de polimorfismos de *hadABC* asociados previamente a la resistencia a TAC en MTB (Belardinelli, 2012); lo que demostraría, en parte, que la falta de letalidad de la droga en estas bacterias se debe a diferencias probablemente estructurales en el blanco esencial propuesto. Por otro lado, en este trabajo de tesis también se presentaron evidencias de que, en *M. smegmatis*, TAC afectaría vías de síntesis de ácidos micólicos diferentes a las afectadas en MTB. En esta bacteria, uno de los blancos de acción de TAC es la inhibición de la ciclopropanación de ácidos micólicos (Dover et al., 2007; Alahari et al., 2007), siendo este efecto atribuible a su acción sobre las MtfSAM ya nombradas. Contrariamente, en *M. smegmatis* se observó que la droga no modifica los perfiles de ácidos micólicos de las cepas que sobre-expresan MtfSAM relacionadas con la síntesis de ácidos micólicos ciclopropanados. El ORF *MSMEG_1351* se asoció con la síntesis de ácidos micólicos mono insaturados *cis* ciclopropanados (Alibaud et al., 2010), y los resultados obtenidos permitirían asociar la sobre-expresión del ORF *MSMEG_0902* con la aparición de una mancha compatible en Rf con un ácido micólico diciticlopropanado. Recientemente, se realizó una descripción de las subfamilias de ácidos micólicos de esta bacteria, entre las cuales se encuentra la α_1 formada por ácidos micólicos *cis*, *trans* diciticlopropanados (Laval et al., 2008). De acuerdo con lo observado previamente en el laboratorio, en *M. smegmatis*, TAC actuaría en la síntesis de la subfamilia de ácidos micólicos *cis*, *trans* dietilénicos (subfamilia α_2 observada en TLC 2D) y al inhibir esta vía se acumularía la subfamilia de ácidos micólicos *cis*, *cis* dietilénicos (α_2 en TLC 2D). Esta acumulación lleva consecuentemente a un aumento en la síntesis de ácidos ciclopropanados debido a que las *cis* ciclopropanaciones son llevadas a cabo a partir de dobles enlaces en configuración *cis* (Lederer, 1969; Watanabe et al., 2002). En este escenario se puede proponer como blanco de acción de TAC en *M. smegmatis* a la MtfSAM codificada por el ORF *MSMEG_0913*, la cual se identificó como responsable de la síntesis de un grupo metilo en la vecindad de dobles enlaces *cis* y ciclopropanos en la región proximal de α y ϵ micolatos, para producir sus respectivos isómeros en conformación *trans*. Sin embargo, al sobre-expresar este ORF, tras el tratamiento con TAC de la cepa, no se observaron cambios en los perfiles de ácidos micólicos que puedan relacionarse con un efecto compensatorio. Pese a este resultado, el análisis de una cepa delecional en el ORF daría un panorama más concreto de su participación en el mecanismo de acción de la droga.

4.2.4. CONCLUSIONES

Los estudios efectuados en este capítulo permiten concluir que:

- La mutación asociada a la deficiencia en la familia de ácidos α_1 -micólicos y a la sensibilidad a TAC de la cepa UNR18, no se encuentra en ninguno de los ORFs homólogos a los que participan en el mecanismo de acción propuesto para TAC en MTB.
- La micobacteria *M. smegmatis* posee blancos de acción para TAC a pesar de ser naturalmente resistente a la droga. Sin embargo, el mecanismo de inhibición de la síntesis de ácidos micólicos en esta especie sería diferente al propuesto para MTB.
- El ORF *MSMEG_0902* codifica para una MtfSAM involucrada en la síntesis de ácidos micólicos diciticlopropanados.

4.3. Capítulo 3

*Cepa mutante UNR1: una posible conexión entre la síntesis de ácidos grasos insaturados y ácidos ϵ -micólicos en *M. smegmatis**

4.3.1. INTRODUCCIÓN

La mutante UNR1 es incapaz de crecer a 42°C debido a que a esta temperatura presenta una deficiencia en ácidos ϵ -micólicos y ácidos grasos insaturados (Figura 3.1, Belardinelli Tesina de grado, 2007). Esta mutante pertenece a un grupo aislado conjuntamente por su incapacidad de crecer en ausencia de ácido oleico a 42°C. La cepa 3B6 es otra mutante auxótrofa para ácido oleico pero con contenidos normales de ácidos ϵ -micólicos. Dado que DesA3 es la enzima encargada de la síntesis de ácido oleico en MTB, se secuenció el ORF *MSMEG_1886* (homólogo a *desA3* en *M. smegmatis* mc²155) en estas dos cepas. De este modo, se determinó que ambas mutantes poseían una mutación puntual en este gen, pero ubicada en diferentes posiciones (UNR1: C1006T y 3B6: G170A). Sorprendentemente, tanto la cepa UNR1 como la 3B6 revertían el fenotipo TS y la auxotrofia para oleico con una frecuencia compatible con una única mutación y en el caso de la cepa UNR1, se observaba también la reversión de la pérdida de ácidos ϵ -micólicos. Datos obtenidos de experimentos realizados preliminarmente en el laboratorio, mostraron que el ácido oleico no es precursor de los ácidos ϵ -micólicos.

A partir de esta información, fue de interés indagar la relación entre las vías de síntesis de ácido oleico y ácidos ϵ -micólicos mediante el estudio de la mutación encontrada en la cepa UNR1. Con este objetivo se construyó por recombinación (técnica de “Recombineering” descrita en materiales y métodos) una cepa de *M. smegmatis* mc²155 con la mutación presente en la cepa UNR1 y se analizó su capacidad de síntesis de ácidos ϵ -micólicos y ácido grasos insaturados.

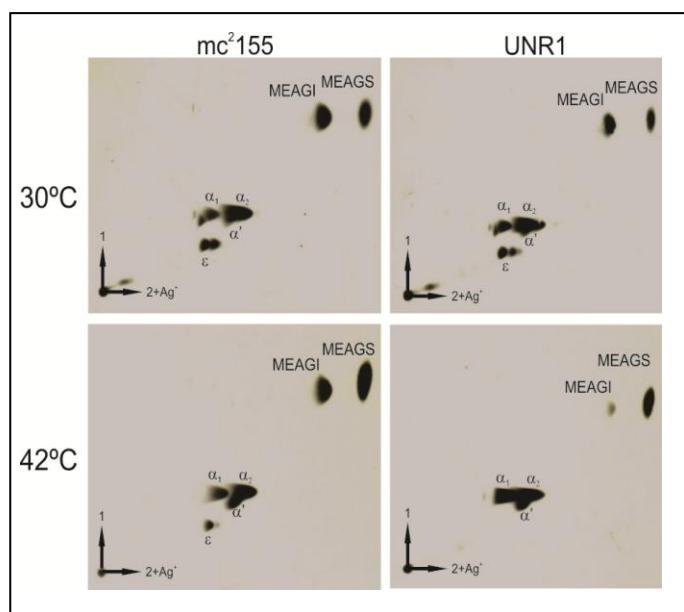


Figura 3.1. Análisis de los perfiles de ácidos grasos (MEAMs) y ácidos micólicos (MEAGs) de las cepas de *M. smegmatis* mc²155 (mc²155) y UNR1 a 30°C o 42°C. Se presentan Autorradiografías de TLCs 2D en placas de silica gel impregnadas con AgNO₃ al 10%. Cada una se sembró con 100.000 cpm de la muestra correspondiente y se desarrolló dos veces en hexano-acetato de etilo (95:5 v/v) en la primera dirección y tres veces en éter de petróleo-éter etílico (85:15 v/v) en la segunda dirección. Las muestras se obtuvieron por marcación de cada cepa con [1-¹⁴C] ácido acético a las dos temperaturas y posterior extracción de MEAMs y MEAGs. **MEAGI**: métil-ésteres de ácidos grasos insaturados; **MEAGS**: métil-ésteres de ácidos grasos saturados; **α'**: ácidos α'-micólicos; **α₁**: ácidos α₁-micólicos; **α₂**: ácidos α₂-micólicos; **ε**: ácidos époxi-micólicos. Tomado de Belardinelli Tesina de grado (2007).

4.3.2. RESULTADOS

4.3.2.1. Construcción de la mutante puntual en *desA3* (C1006T) de *M. smegmatis* mc²155

La cepa *M. smegmatis* mc²155 *desA3* (C1006T), denominada en este trabajo de tesis UNR1 Re, se construyó de acuerdo con lo descrito en materiales y métodos. En un primer paso se amplificaron y clonaron las zonas flanqueantes al gen de interés de acuerdo al siguiente esquema: *i*) se amplificó por PCR (oligonucleótidos FwUPSTREAM y RvUPSTREAM, Materiales y métodos) la zona que posee la mutación en la cepa UNR1 (últimas 600 pb del gen *desA3*) y este fragmento se utilizó como zona flanqueante río arriba; *ii*) la zona flanqueante río abajo de 600 pb correspondió al gen *MSMEG_1887* completo y parte del ORF *MSMEG_1888*, tal que al realizarse la recombinación el gen de resistencia a Hyg quedase ubicado en la región intergénica *MSMEG_1886-MSMEG_1887*. Como vector de clonado se utilizó el plásmido pLitmus 28G (materiales y métodos). De este modo se obtuvo la construcción de 3,7 kb “zona flanqueante río arriba- marcador de

resistencia- zona flanqueante río abajo” (sustrato recombinogénico) que se digirió con enzimas de restricción, se separó por electroforesis en geles de agarosa y se purificó de la banda de DNA. Posteriormente este sustrato se electroporó en la cepa de *M. smegmatis* mc²155 previamente transformada con el plásmido pJV53 (Km^r). Las reacciones de PCR, los oligonucleótidos y plásmidos utilizados en la realización de las construcciones se encuentran detallados en materiales y métodos. En la figura 3.2 se muestra esquemáticamente lo anteriormente descrito.

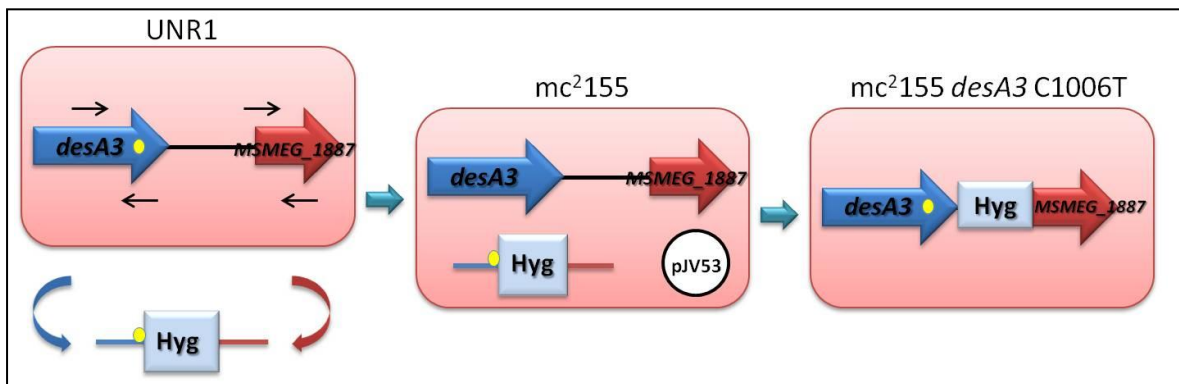


Figura 3.2. Esquema de la obtención de la cepa *M. smegmatis* mc²155 *desA3* C100T mediante la técnica Recombineering. Las flechas de colores representan marcos de lectura abiertos (ORFs) y las negras Oligonucleótidos, la línea negra esquematiza a la región intergénica y las de colores a los fragmentos amplificados por PCR. Con un círculo lleno amarillo se esquematiza la mutación puntual en el gen *desA3* de la cepa UNR1 y con círculo vacío color negro el plásmido pJV53 que codifica a las proteínas del sistema de Recombinación. El casete de que codifica para la resistencia a Hyg se encuentra representado por un rectángulo color celeste.

Las transformaciones con el sustrato recombinogénico se sembraron e incubaron en diferentes combinaciones de medio de cultivo/ temperatura teniendo en cuenta el fenotipo presentado por la cepa UNR1 y con el fin de facilitar la obtención de la mutante por recombinación. Se obtuvo un resultado positivo luego de numerosos intentos, en medio 7H9 ADS-G (Hyg) y una temperatura de incubación de 30°C (temperatura permisiva para la cepa UNR1). En los clones obtenidos se confirmó la mutación mediante una reacción PCR de colonia en la que se utilizaron los oligonucleótidos Fw1886-Hyg y Fw Hyg-1888 (materiales y métodos) diseñados para determinar la presencia del casete de Hyg en la región intergénica *MSMEG_1886-MSMEG_1887*. El primer oligonucleótido nombrado hibrida en cercanías de la mutación de interés (dentro de las últimas 600 pb del gen *desA3*) y el segundo lo hace dentro del casete de resistencia a antibiótico. De este modo, solo en los

clones que recombinaron se observó la presencia de una banda de amplificación, como se muestra en la figura 3.3. Como un control alternativo se realizó una reacción de PCR con oligonucleótidos que hibridan en la región interna de las zonas: flanqueante río arriba y flanqueante río abajo (Fw 1886-Hyg y Rv Hyg-1888, materiales y métodos) y con un tiempo de extensión que permitió solo la formación de producto en la cepa silvestre. Finalmente, se confirmó la mutación C1006T mediante la amplificación por PCR del fragmento del gen *desA3* que la contiene (oligonucleótidos utilizados en *i*) y su posterior secuenciación. Este es el primer reporte de construcción de una mutante puntual en micobacterias por este método.

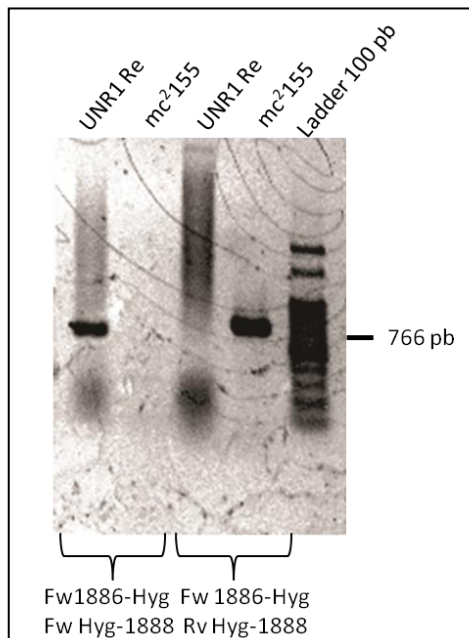


Figura 3.3. Confirmación de la presencia del casete de resistencia a Hyg en la región intergénica *MSMEG_1886-MSMEG_1887* mediante PCR de colonia. Se muestran los resultados de PCRs de colonia realizadas con ADN de *M. smegmatis* UNR1 Re y mc²155. Para la reacción de confirmación se utilizaron los oligonucleótidos Fw1886-Hyg/Fw Hyg-1888 y para la reacción control, Fw1886-Hyg/Hyg-1888.

Se marca una banda de 766 pb correspondiente al producto de amplificación en el clon UNR1Re. Se utilizó el marcador de peso molecular comercial Ladder 100 pb.

4.3.2.2. Análisis de las características fenotípicas de la cepa UNR1 Re

4.3.2.2.1. Crecimiento, morfología y resistencia a drogas

Se analizaron las características fenotípicas de la cepa UNR1 Re para confirmar si presentaba, al igual que la cepa UNR1 original, incapacidad de crecer a 42°C y si a esta temperatura se mantenían las deficiencias en ácidos ϵ -micólicos y ácidos grasos insaturados. En un primer paso se estudió la capacidad de crecimiento a 42°C en medio sólido con y sin suplemento de ácido oleico. A su vez, también se analizaron las características morfológicas de las colonias de la cepa. Como cepas control se utilizó a *M.*

smegmatis mc²155 y a la mutante UNR1. Se sembraron aproximadamente 100 UFC de cada cepa (provenientes de cultivos líquidos saturados a 30°C en medio 7H9 ADS-G) en placas con los medios de cultivo sólido 7H9 OADS-G y 7H9 ADS-G que se incubaron a 42°C durante 2 días; como control de crecimiento se incubaron duplicados de estas placas a 30°C durante 5 días (temperatura permisiva para la mutante UNR1). Simultáneamente y con el objetivo de analizar las características morfológicas de la cepa UNR1 Re, se sembraron aproximadamente 100 UFC en medio de cultivo 7H9 ADS-G y 7H9 ADS-G Rojo congo (100 µg/ml) y se incubaron a 42°C durante 2 días; el colorante utilizado permite una mejor visualización de las colonias. En la figura 3.4 se presentan los resultados de los experimentos realizados a 42°C. Se puede observar que la mutante UNR1 Re es capaz de crecer a 42°C sin la presencia de ácido oleico en el medio de cultivo y que las colonias de esta cepa y de la cepa silvestre claramente presentan diferencias en su morfología.

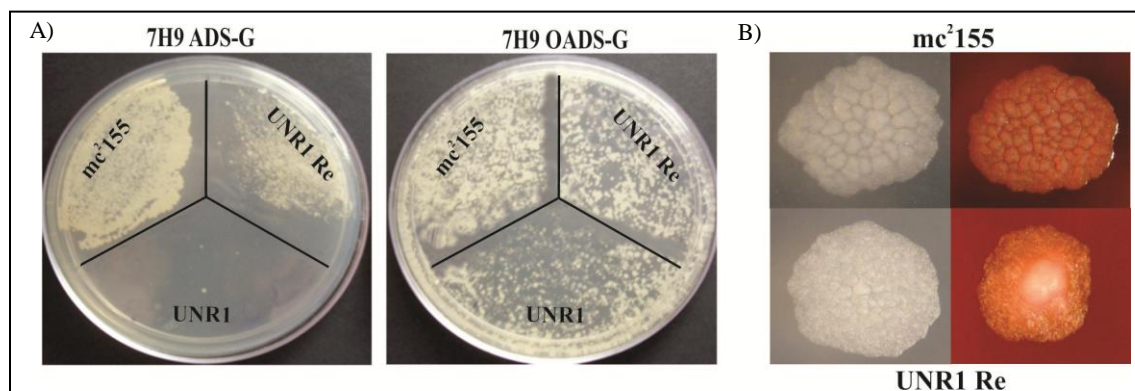


Figura 3.4. Determinación de la capacidad de crecimiento de la cepa UNR1 Re en medio sólido con o sin suplemento de ácido oleico a 42°C. En el panel A) se presentan placas sembradas con ~ 100 UFC de las cepas *M. smegmatis* mc²155 (mc²155), UNR1 y UNR Re en medio sólido 7H9 ADS-G o 7H9 OADS-G a 42°C. En el panel B) se muestran fotografías de colonias de la cepa UNR1 Re y de la cepa silvestre crecidas a 42°C en medio 7H9 ADS-G (izquierda) o en medio 7H9 ADS-G rojo congo 100 µg/ml (en color rojo a la derecha) Las colonias se observaron y fotografiaron con una lupa Zeiss- Stemi 2000. Aumento 2x.

En la figura 3.5 se muestran las curvas de crecimiento realizadas para corroborar los resultados obtenidos en medio de cultivo sólido. Para la realización de este experimento se partió de cultivos líquidos saturados a 30°C de la cepa UNR1 Re y de las cepas control *M. smegmatis* mc²155 y UNR1 en medio 7H9 ADS-GT; a partir de los cuales se inoculó medio

fresco y se incubó hasta una DO_{600nm} de 1. A partir de cada uno de estos cultivos se obtuvieron las alícuotas con las que, previa centrifugación, se inoculó por duplicado medio de cultivo 7H9 ADS-GT y 7H9 OADS-GT fresco, tal que la DO_{600nm} inicial de cada uno fuera $\sim 0,1$. Se incubó un cultivo en medio 7H9 ADS-GT y uno en 7H9 OADS-GT a $30^{\circ}C$ (temperatura permisiva para la cepa UNR1) y sus respectivos duplicados a $42^{\circ}C$ (temperatura no permisiva para la cepa UNR1) por cepa. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos de los cultivos y se determinó la DO_{600nm} .

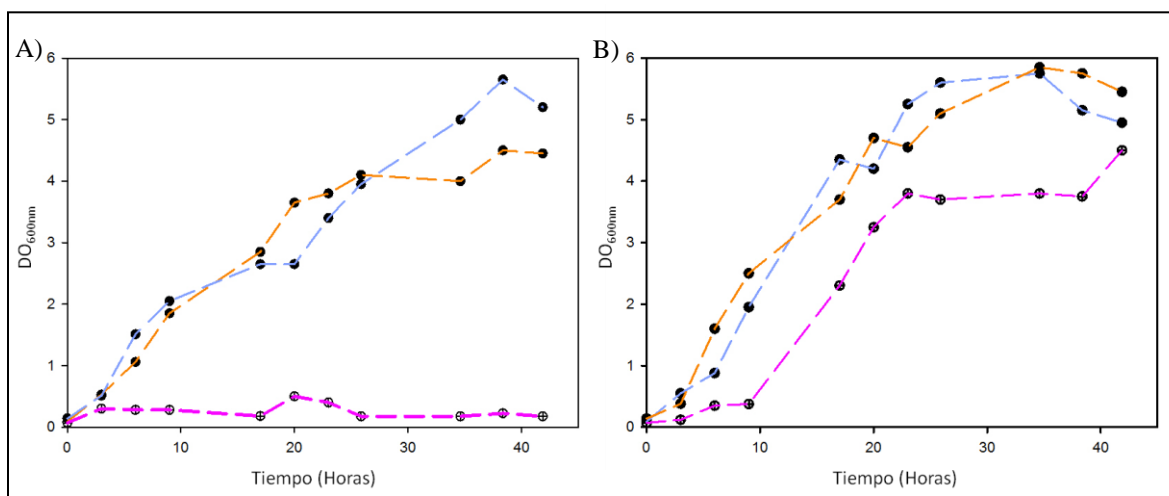


Figura 3.5. Crecimiento de *M. smegmatis* UNR1 Re a $42^{\circ}C$. En la figura se muestran las curvas de crecimiento de la cepa (---●---) en medio líquido 7H9 ADS-GT suplementado con ADS (A) u OADS (B). Como controles de este experimento se utilizó a *M. smegmatis*: mc²155 (---●---) y UNR1 (---●---). Como inóculos se emplearon alícuotas de células de cultivos a $DO_{600nm}=1$ crecidos en medio 7H9 ADS-GT a $30^{\circ}C$ tal que la $DO_{inicial}$ fuera 0,1. A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras, determinando crecimiento por DO_{600nm} . El gráfico muestra el promedio de tres experimentos independientes ($n \geq 3$).

Por otro lado, en el trabajo realizado por Belardinelli (Belardinelli Tesina de grado, 2007) se determinó que la mutante UNR1 presenta sensibilidad aumentada a drogas cuando crece a la temperatura permisiva ($30^{\circ}C$) en presencia de ácido oleico, por lo que se decidió confirmar si la cepa UNR1 Re mantenía esta condición. Los ensayos se realizaron con cristal violeta y novobiocina, tomando como base los datos mostrados en la tabla 3.1 (CIMs para estas drogas de la cepas *M. smegmatis* mc² 155 y UNR1 a $30^{\circ}C$ y $42^{\circ}C$ en medio de cultivo con o sin suplemento de ácido oleico) (Belardinelli Tesina de grado, 2007).

	CIM en 7H9 ADS-GT				CIM en 7H9 OADS-GT			
	30°C		42°C		30°C		42°C	
	mc ² 155	UNR1	mc ² 155	UNR1	mc ² 155	UNR1	mc ² 155	UNR1
CV	16	8	8	ND	16	8	8	2
Novobiocina	128	128	16	ND	128	128	2	≤0,25

Tabla 3.1. CIMs para cristal violeta y novobiocina de la cepa parental *M. smegmatis* mc² 155 y la mutante UNR1 determinadas en medio sólido 7H9 ADS-GT y 7H9 OADS-GT a 30°C y 42°C. Tomado de Belardinelli Tesina de grado (2007).

Para la realización del ensayo se sembraron aproximadamente 100 UFC de la cepa UNR1 Re y de los controles UNR1 y *M. smegmatis* mc²155 (provenientes de cultivos líquidos saturados a 30°C en medio 7H9 ADS-G) en placas con medio de cultivo sólido 7H9 ADS-G o 7H9 OADS-G que se adicionaron con novobiocina (2 µg/ml) o con cristal violeta (8 µg/ml) y se incubaron a 42°C durante 2 días. Como control de crecimiento se sembraron placas de los diferentes medios sin adición de drogas. En la figura 3.6 se muestra este ensayo. La cepa UNR1 no presentó desarrollo en medio 7H9 ADS-G dado que el experimento se realizó a la temperatura no permisiva, lo cual se revirtió con el agregado de OADS al medio de cultivo. Este efecto de complementación con ácido oleico no se observó en el caso de los medios suplementados con novobiocina y cristal violeta dada la hipersensibilidad a estos compuestos que presenta la cepa. Los dos compuestos ejercieron una inhibición parcial del crecimiento de la cepa UNR1Re, que en estas condiciones presentó colonias más pequeñas y en menor cantidad con respecto a la cepa silvestre. Estas dos cepas crecieron con normalidad en los dos medios control utilizados en esta determinación. Es necesario aclarar que en la realización de estos experimentos se utilizaron concentraciones de cristal violeta y novobiocina que coinciden con las CIM para estos compuestos publicadas por Liu y Nikaido (1999) y las obtenidas en los experimentos previos realizados en el laboratorio. Inesperadamente, la cepa silvestre que se utilizó en estas determinaciones tendría CIMs superiores a las reportadas.

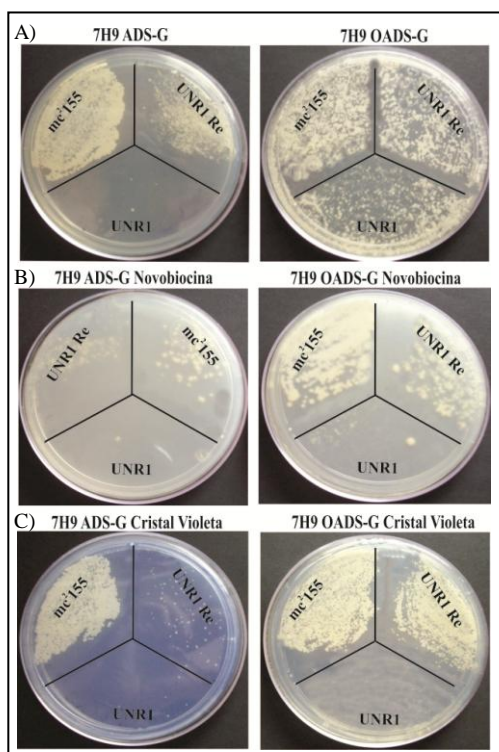


Figura 3.6. Sensibilidad de la cepa UNR1 Re a novobiocina y cristal violeta a 42°C. En la figura se muestran placas de medio sólido 7H9 ADS-G o 7H9 OADS-G: sin suplemento (A) o adicionadas con novobiocina 2 $\mu\text{g/ml}$ (B) o cristal violeta (cv) 8 $\mu\text{g/ml}$ (C). Cada placa se sembró con aproximadamente 100 UFC de la cepa de *M. smegmatis*: UNR1 Re, mc²155 y UNR1 y se incubó a 42°C durante dos días.

4.3.2.2.2. Ácidos grasos insaturados y ácidos ϵ -micólicos

Como objetivo principal de este capítulo se planteó indagar la relación entre las vías de síntesis de ácido oleico y ácidos ϵ -micólicos, por lo tanto para comenzar este estudio se analizaron los perfiles de ácidos grasos de la cepa UNR1 Re mediante GC-MS. Las muestras se obtuvieron mediante el protocolo de extracción descrito en materiales y métodos a partir de cultivos (cepas: UNR1 Re, control silvestre y UNR1) que se crecieron a 30°C en medio 7H9 ADS-GT hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,4 y luego se colocaron en incubación a 42°C durante 4 horas.

Las diferentes muestras se procesaron en el cromatógrafo de gases asociado a un espectrómetro de masas (materiales y métodos) y se obtuvieron los espectros de cada una de ellas. Estos espectros se analizaron con el programa GC-MS solution (Shimadzu Corporation) a fin de determinar los constituyentes individuales de cada muestra. Una vez identificado cada componente, se asoció a un área en el espectro y se calculó de este modo su abundancia relativa al total de especies presentes en la muestra. A partir de estos resultados se construyeron los gráficos de barra mostrados en la figura 3.7 A. Como se puede observar en esta figura, los valores totales de C16:1 presentados por la cepa UNR1 no variaron apreciablemente con respecto a los presentados por la cepa silvestre.

En investigaciones simultáneas con este trabajo de Tesis (Doprado Tesis doctoral, 2013) se determinó la posición de los dobles enlaces en los ácidos grasos insaturados mediante GC-MS de MEAGs convertidos en aductos de dimetil-disulfuro (DMDS). A partir de estos resultado se sabe que *M. smegmatis* posee los siguientes ácidos grasos insaturados: C16:1 Δ^7 , C16:1 Δ^9 , C16:1 Δ^{10} , C17:1 Δ^9 , C18:1 Δ^9 , C20:1 Δ^{11} , C22:1 Δ^{13} y C24:1 Δ^{15} . Teniendo en cuenta que el ácido graso insaturado 16:1 posee tres isómeros entre los cuales varía la posición del doble enlace, se analizó la abundancia relativa de cada uno sobre el total de C16:1 presente en las muestras analizadas. Como puede observarse en la Figura 3.7 B el isómero C16:1 Δ^9 es indetectable en la cepa UNR1, mientras que el isómero C16:1 Δ^7 se encuentra aumentado 2 veces con respecto a la cepa silvestre (C16:1 Δ^7 -mutante UNR1: 33,12% vs C16:1 Δ^7 -silvestre: 16,79%). En lo que respecta a la cepa UNR1 Re, se observa un porcentaje de C16:1 Δ^9 levemente menor al presentado por la cepa silvestre (C16:1 Δ^9 -mutante UNR1Re: 13,29% vs C16:1 Δ^9 -silvestre: 9,64%), mientras que el isómero C16:1 Δ^7 se observa disminuido unas tres veces con respecto a la cantidad relativa presentada por la cepa silvestre (C16:1 Δ^7 -mutante UNR1Re: 6% vs C16:1 Δ^7 -silvestre: 16,7%). Las tres cepas presentaron porcentajes similares del isómero C16:1 Δ^{10} . Además, las cepas mostraron diferencias en los porcentajes de ácido graso insaturado C18:1 Δ^9 . En la mutante UNR1 este ácido graso se encuentra 1,5 veces aumentado con respecto al control, mientras que en la cepa UNR1 Re se observan porcentajes comparables a los de la cepa silvestre. Cabe destacar que en los espectros de GC-MS de la mutante UNR1 se observa la presencia de un pico que se presenta posteriormente a los de los 3 isómeros 16:1 (Δ^7 , Δ^9 , Δ^{10}) que presenta una fragmentación iónica comparable a un ácido graso insaturado 16:1, sin embargo para la correcta identificación de esta especie sería necesaria la preparación de aductos a partir de MEAGs con DMDS e Iodo. En la cepa UNR1 Re o cepa control no se detecta este ácido graso insaturado. De acuerdo con estos análisis, la mutación presente en *desA3* de la cepa UNR1 se asocia a *i*) una disminución en la abundancia del isómero Δ^9 del ácido graso C16:1 y un aumento de la misma en el caso del isómero Δ^7 y *ii*) un aumento de C18:1 Δ^9 . Sin embargo, debido a las diferencias observadas entre la cepa UNR1 y UNR1 Re probablemente el fenotipo observado en la mutante química sea sumatoria de efectos producidos por otra/s mutacion/es.

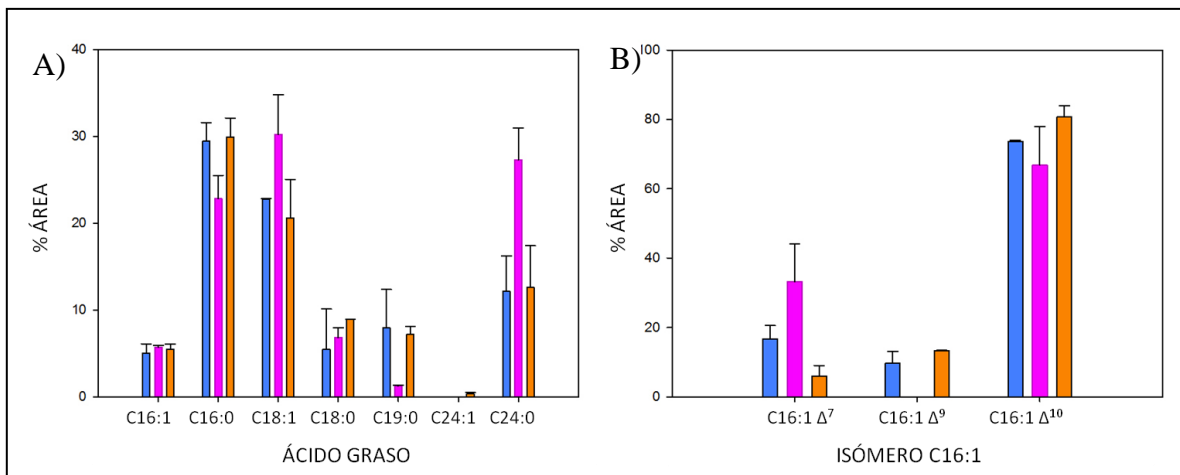


Figura 3.7. Análisis de los perfiles de MEAGs de la cepa UNR1 Re mediante Cromatografía de gases espectrometría de masas (GC-MS). Las muestras de MEAGs se obtuvieron a partir de cultivos de *M. smegmatis* mc²155 (■), *M. smegmatis* UNR1 (■) y *M. smegmatis* UNR1 Re (■) crecidos en medio 7H9 ADS-GT a 30°C hasta DO_{600nm}=0,4 que luego se incubaron durante 4 hs a 42°C. En A) se muestran los porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios en las muestras, y en B), los porcentajes de los isómeros C16:1 Δ⁷; Δ⁹; Δ¹⁰ con respecto al total de C16:1. En las gráficas se muestra el promedio de tres experimentos independientes (n≥3) y las desviaciones estándar correspondientes.

Hasta este punto los análisis de la cepa UNR1 Re se enfocaron en lo referido a síntesis de ácidos grasos insaturados, sin embargo como objetivo de esta sección se planteó investigar la relación entre las vías de síntesis de ácido oleico y ácidos ε-micólicos. Por lo tanto, se llevó a cabo un ensayo de incorporación del precursor [1-¹⁴C] ácido acético para analizar la composición de ácidos micólicos de esta cepa. Los cultivos de la cepa UNR1 Re y de las cepas control (*M. smegmatis* mc²155 y UNR1) se crecieron hasta una DO_{600nm} de 0,4 a 30°C en medio 7H9 ADS-GT, momento en el que se continuó la incubación a 42°C (temperatura no permisiva para la cepa UNR1) durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se adicionó igual cantidad de [1-¹⁴C] ácido acético a todos los cultivos y se reincubaron a la misma temperatura durante 2 horas más. Los MEAGs y MEAMs marcados se extrajeron de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos y se analizaron mediante TLCs 1D y 2D siguiendo los protocolos ya descritos, exceptuando a la TLC 1D, que en este experimento se impregnó con AgNO₃ para que la separación de las especies ocurriera de acuerdo a su cantidad de insaturaciones. Como se puede observar en la figura 3.8 los perfiles de MEAMs y de MEAGs presentados por las dos cepas mutantes son comparables a los de la cepa control, lo cual no concuerda con los resultados previamente obtenidos en el laboratorio (Belardinelli Tesina de grado, 2007). Sin embargo, este efecto se pudo deber

al cambio en el método de revelado debido a la carencia de placas autorradiográficas por motivos ajenos al laboratorio. El equipo que se comenzó a utilizar a partir de estos experimentos no posee la misma sensibilidad que el método que se utilizó en determinaciones anteriores. Por lo tanto no se puede llegar a ninguna conclusión a partir de estos análisis.

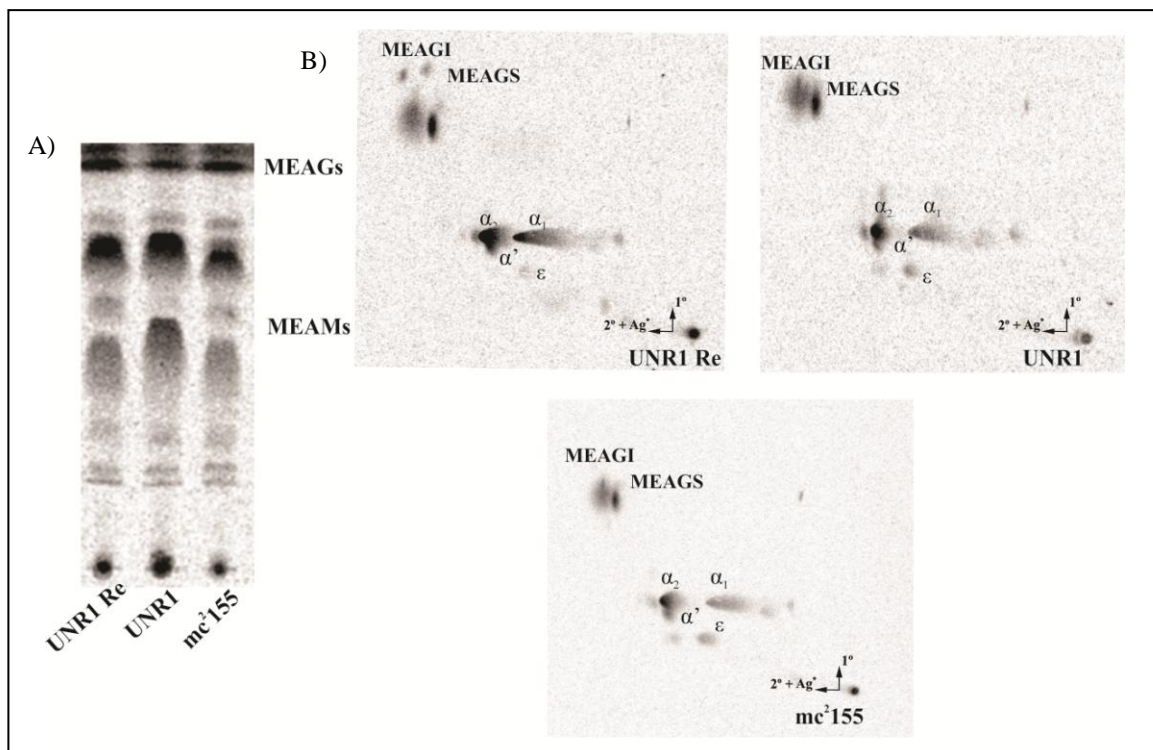


Figura 3.8. Análisis de los perfiles de MEAGs y MEAMs de las cepas *M. smegmatis* UNR1 Re (UNR1 Re), *M. smegmatis* UNR1 (UNR1) y *M. smegmatis* mc²155 (mc²155). A) TLC 1D, impregnada con AgNO₃ al 10% sembrada con 30000 cpm de cada muestra y corrida 3 veces con éter de petróleo-éter etílico (85:15 v/v) y B) TLC 2D, impregnada con AgNO₃ al 10% sembrada con 100000 cpm de cada muestra y corrida dos veces con hexano-acetato de etilo (95:5 v/v) en la primera dimensión y tres veces con éter de petróleo-éter etílico (85:15) en la segunda. AG: ácidos grasos; α': ácidos α'-micólicos; α₁: ácidos α₁-micólicos; α₂: ácidos α₂-micólicos ε: ácidos épxi-micólicos. MEAGs: metil ésteres de ácidos grasos. MEAGI: metil ésteres de ácidos grasos insaturados. MEAGS: metil ésteres de ácidos grasos saturados. MEAM: metil ésteres de ácidos micólicos

Por otro lado, en los análisis de sobre-expresión de las MtfSAM en *M. smegmatis* mc²155 que se detallan en el capítulo 2 se observó que con la sobre-expresión del ORF *MSMEG_1350* se producía un aumento en la cantidad de ácidos ε-micólicos (información no mostrada). Se llevó a cabo la delección de este ORF concluyéndose que era el encargado de la síntesis de ácidos ε-micólicos (Belardinelli y Buchieri, datos no publicados). A partir de este resultado se decidió secuenciar este gen en la cepa UNR1, para lo cual se

amplificaron por PCR dos fragmentos del ORF que se solapan, con los oligonucleótidos RVInt1350/1350Fw y FwInt1350/1350 Rv (materiales y métodos) y los productos se enviaron al servicio de secuenciación. Los resultados confirmaron que la cepa UNR1 no posee mutaciones en este gen, con lo cual su carencia de ácidos ϵ -micólicos no se relaciona con este ORF.

4.3.2.3. Aislamiento y caracterización de clones revertantes de la mutante UNR1

Las pruebas de reversión son uno de los métodos más utilizados en la caracterización genética de una mutación. Las mutaciones puntuales pueden revertir o ser suprimidas por una segunda mutación. Esta mutación puede ser una reversión (en sentido estricto) o retro-mutación que restaura el genotipo original, o bien una supresión, en la que la segunda mutación suprime los efectos de la primera pero no restaura el genotipo original (la célula queda con dos mutaciones). La supresión se clasifica a su vez en supresión indirecta, cuando no se corrige el producto del primer gen pero la segunda mutación anula las consecuencias fenotípicas, y supresión directa, cuando la segunda mutación corrige el producto del primer gen mutado. La supresión directa puede ser de dos tipos principales: *i*) supresión intragénica (la segunda mutación ocurre en el mismo gen donde ocurrió la primera) y *ii*) supresión intergénica o extragénica (la mutación supresora afecta a otro gen, que suele ser uno de los genes implicados en la maquinaria de traducción del ARNm).

En este sentido y teniendo como objetivo la complementación de la información obtenida de los experimentos realizados con la cepa UNR1 Re, se aislaron revertantes de esta mutante, sembrando ~ 1000 UFC de la cepa, provenientes de cultivos líquidos saturados a 30°C (logrados a partir de un inóculo inicial de $\sim 1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^4$ UFC), en placas de 7H9 ADS-GT que posteriormente se incubaron a 42°C hasta la aparición de colonias visibles. Las colonias se repicaron en placas con cristal violeta y novobiocina y se seleccionaron un total de 5 clones (denominados R1V, R3V, R5V, R6V, R9V) que hubieran recuperado la resistencia a estos compuestos a concentraciones toleradas por la cepa silvestre. Estos revertantes junto a otros tres (R1J, R2J y R3J), aislados previamente en el laboratorio mediante la misma metodología usada en este trabajo (Belardinelli Tesina de grado, 2007), se caracterizaron genotípica y fenotípicamente mediante la secuenciación

del gen *desA3* y el análisis de los perfiles de MEAGs y MEAMs por medio de GC-MS y TLC, respectivamente.

4.3.2.3.1. Secuenciación del gen *desA3*

Se extrajo ADN de cada clon revertante seleccionado y se amplificó el gen *desA3* por PCR (oligonucleótidos utilizados: P1886Sac1- 1886 HindIII) para su secuenciación. Para este último procedimiento se utilizaron los oligonucleótidos P1886Sac1, 85-86 Fw2, 1885-1886 RvHindIII y 85-86 Rv2. Posteriormente, los resultados de las reacciones de secuenciación se analizaron a fin de determinar si la reversión presente en los clones era una reversión verdadera o una supresión. En la tabla 3.2 se presentan los resultados de estas determinaciones. Como se puede observar dos clones presentaron reversiones verdaderas, mientras que el resto aparentemente posee supresiones tanto del tipo intragénicas (R1V) como extragénicas (R3V, R5V, R6V y R9V). En el caso del clon R1V como producto del cambio **C979T**, el codón original CGC que codifica para el aminoácido arginina se transformó en TGC que codifica para el aminoácido cisteína. En el caso del clon R9V, se encontró una inserción de A inmediatamente antes del ATG, lo cual no afecta el marco de lectura.

Clon Revertante	Mutación <i>MSMEG_1886</i> C1006T	Otra mutación en <i>MSMEG_1886</i>
R1J	Ausente	T1006C
R2J	Ausente	T1006C
R3J	Presente	Sin cambios
R1V	Presente	C979T
R3V	Presente	Sin cambios
R5V	Presente	Sin cambios
R6V	Presente	Sin cambios
R9V	Presente	Sin cambios

Tabla 3.2. Resultados de la secuenciación del gen *desA3* (*MSMEG_1886*) en los clones revertantes R1J, R2J, R3J, R1V, R3V, R5V, R6V, R9V. En la tabla se muestran los nombres de cada clon (primera columna) y si cada uno de ellos presenta o no la mutación, presente en la cepa UNR1, C1006T (segunda columna) u otra mutación (tercera columna) en el ORF *MSMEG_1886*.

4.3.2.3.2. GC-MS

Para los experimentos de GC-MS se eligieron los clones R2J y R9V. El análisis de los clones restantes quedará pendientes debido a que por el número de muestras a analizar el costo del experimento se hacía elevado. Para esta selección se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en la secuenciación del gen *desA3*. El clon R2J es un revertante verdadero, mientras que el R9V presentó una mutación dentro del ORF que aparentemente no ocasionaría modificaciones en su producto por estar fuera del marco de lectura, aunque si podría causar diferencias en la expresión del gen, por lo que su análisis generó interés particularmente. Como cepas control de este experimento se utilizó a *M. smegmatis* mc²155 y UNR1. Para estas determinaciones las cepas se crecieron en medio de cultivo 7H9 ADS-GT hasta una DO_{600nm} de 1, aproximadamente. En este punto, las células se colectaron por centrifugación, se realizó la extracción de MEAGs y las muestras obtenidas se analizaron por GC-MS (procedimientos descritos en materiales y métodos). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3.9. Los resultados en este experimento resultaron contradictorios ya que las variaciones en los perfiles de MEAGs de los revertantes no se condicen lógicamente considerando las reversiones a nivel genético que presentaron. Ambos revertantes presentaron niveles de C16:1 Δ^7 comparables a los de la mutante y en el caso del isómero Δ^9 , el clon R9V presentó aproximadamente 1,5 veces menos abundancia de esta especie que la cepa silvestre, mientras que para el clon R2J y la mutante UNR1 fue indetectable. Como en todos los casos analizados hasta el momento las proporciones del isómero Δ^{10} se mostraron invariables en las 4 cepas. En este caso, el aislamiento de clones revertantes no aportó información clara, sin embargo en el laboratorio aún restan clones revertantes por analizar.

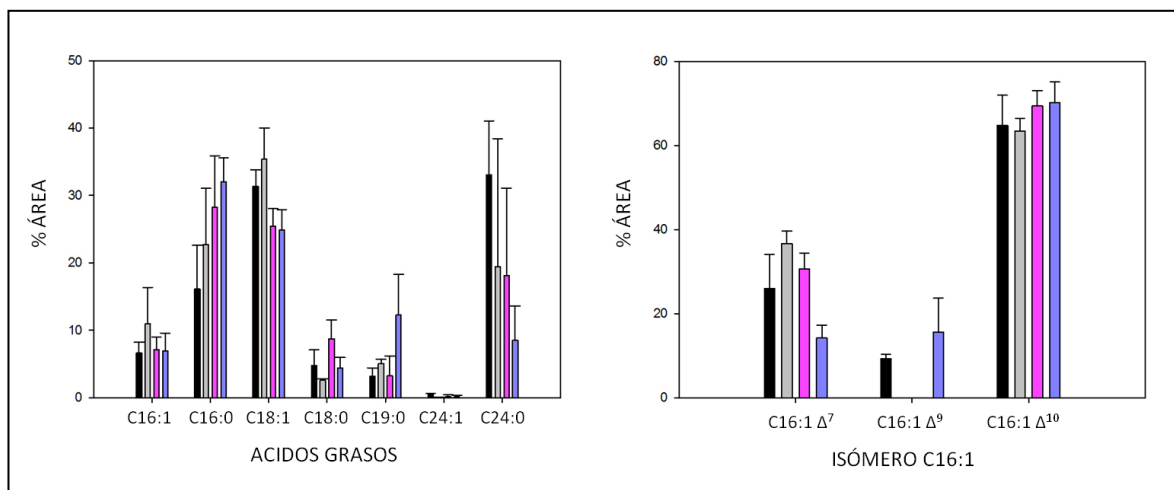


Figura 3.9. Análisis de los perfiles de MEAGs de clones revertantes de la mutante UNR1 mediante GC-MS. Se analizaron muestras de MEAGs obtenidas de cultivos de *M. smegmatis* mc²155 (■), *M. smegmatis* UNR1 (■) y de los clones revertantes de esta última R9V (■) y R2J (■), crecidos en medio 7H9 ADS-GT a 30°C hasta DO_{600nm}=0,4 que luego se incubaron durante 4 hs a 42°C. En A) se presentan los porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios en las muestras, y en B) los porcentajes de los isómeros C16:1Δ⁷; C16:1Δ⁹; C16:1Δ¹⁰ con respecto al total de C16:1. Se presenta un promedio de tres experimentos independientes (n≥3) y las desviaciones estándar correspondientes.

4.3.3. DISCUSIÓN

La composición lipídica de la envoltura celular micobacteriana es sumamente compleja. Las membranas celulares se encuentran constituidas principalmente por el ácido C18:1 *cis* Δ⁹ (Okuyama, et al., 1967; Hung y Walker, 1970; Walker et al., 1970), que en MTB es sintetizado a partir de C18:0 por DesA3 (estearoil CoA desaturasa de membrana) (Phetsuksiri et al., 2003). En lo que a las paredes celulares respecta, su composición de ácidos micólicos varía de acuerdo a la especie en análisis, pudiéndose encontrar diferentes familias y sub-familias (Barry et al., 1998); *M. smegmatis* sintetiza a las familias α, α' y ε. Las micobacterias sintetizan sus ácidos grasos mediante dos sistemas de síntesis FAS-I y FAS-II (Barry et al., 1998). El sistema FAS-I lleva a cabo la síntesis *de novo* de ácidos grasos de cadena corta (C16-C18 y C24-C26), mientras que FAS-II sintetiza a los ácidos micólicos (hasta 86 átomos de C). Este último sistema lleva a cabo su función por elongación de ácidos grasos pre-formados provenientes de FAS-I. A pesar de que existen varias hipótesis al respecto, aún se desconoce la longitud de cadena exacta de los ácidos grasos que ingresan a FAS-II. En este sentido son muchos los puntos de la biosíntesis de ácidos grasos que no han sido esclarecidos. Con el objetivo de dilucidar alguno de estos

puntos, en el laboratorio se aislaron mutantes TS deficientes en la síntesis de ácidos micólicos, utilizando como método de selección el fenotipo SAD. De este modo se obtuvo a la UNR1 deficiente en ácidos grasos insaturados y ácidos ϵ -micólicos. Dadas las características y frecuencia de reversión de la mutante, estos fenotipos se asociaron con la presencia de una única mutación, que posteriormente se localizó en el gen *MSMEG_1886* (C1006T) (homólogo a *desA3* en *M. smegmatis* mc²155) (Bellardinelli, resultados no publicados). Doprado en su Tesis doctoral (2013) describió que este ORF sería una desaturasa de ácidos grasos, con especificidad aparente para cadenas carbonadas de 16 y 18 átomos de carbono.

En este trabajo de tesis se obtuvo mediante la técnica de Recombineering (Van Kessel y Hatfull, 2007; Van Kessel, 2008) la cepa *M. smegmatis* mc²155 (denominada UNR1 Re) con la mutación puntual C1006T en *MSMEG_1886* (presente en la cepa UNR1). Este es el primer reporte de una mutante puntual construida por esta técnica en micobacterias. Recientemente se publicó un sistema de construcción de mutantes puntuales en los cromosomas de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* mediante Recombineering, sin embargo este nuevo protocolo utiliza como sustrato recombinogénico ADN simple hebra (Van Kessel y Hatfull, 2008). Los resultados de los análisis de la cepa UNR1 Re arrojaron datos contradictorios ya que no mantenía el fenotipo TS asociado a SAD, la cepa era capaz de crecer a la temperatura no permisiva y presentaba valores intermedios de CIM a novobiocina y cristal violeta con respecto a la cepa silvestre y la cepa UNR1 (hipersensible estos antibióticos). En relación a estos experimentos, se observaron diferencias en las CIMs a cristal violeta y Novobiocina de la cepa silvestre del laboratorio con respecto a aquellas publicadas por Liu y Nikaido (1999), sin embargo estos efectos suelen observarse tras sucesivos repiques de la misma cepa en los laboratorios ya que muchas veces se producen mutaciones que se seleccionan al azar y llevan a una microevolución de la bacteria.

En los experimentos de GC-MS, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en los análisis anteriormente descritos, la presencia de esta mutación en la cepa silvestre no produjo el perfil lipídico observado en la cepa parental UNR1. En ambas cepas variaron los porcentajes de los isómeros del ácido graso C16:1: observándose un aumento del C16:1 Δ^7 y una disminución del C16:1 Δ^9 , por otro lado la síntesis del ácido graso C18:1 Δ^9 se encontró aumentada; siendo estos efectos más marcados en la mutante UNR1 que en la UNR1Re. Se

puede afirmar entonces que, el entorno genético producido por la mutagénesis química sumaría efectos en el fenotipo observado en UNR1. Por otro lado, resultó interesante analizar los efectos de la mutación presente en DesA3 en el perfil lipídico de la célula. Los resultados obtenidos se pueden asociar claramente a la función descrita para DesA3 a partir del análisis de *M. smegmatis* $\Delta desA3$, que como ya se expuso, presentaría especificidad para cadenas carbonadas de 16 y 18 átomos de carbono (Doprado Tesis doctoral, 2013). Sin embargo, esta mutante delecional presentó una disminución de los tres isómeros C16:1 y de C18:1 Δ^9 . En su trabajo de tesis doctoral, Doprado propone que DesA3 sintetizaría C18:1 Δ^9 a partir de C18:0, pero que éste ácido graso provendría además de la elongación de C16:1 Δ^7 , esto coincide con lo observado en las mutantes puntuales que presentaron un aumento asociado de C16:1 Δ^7 y C18:1 Δ^9 . Un punto de discrepancia entre la mutante $\Delta desA3$ y UNR1 se relaciona con los isómeros C16:1 Δ^9 y C16:1 Δ^{10} , de acuerdo con los resultados de Doprado (Tesis doctoral, 2013) la mutante delecional probablemente sintetizaría uno de los dos isómeros, Δ^9 o Δ^{10} y una actividad isomerasa produciría el otro a partir del sintetizado en primera instancia y en caso del isómero Δ^7 podría ser sintetizado por DesA3 o por otra desaturasa. Sin embargo, los resultados asociados a la mutación C1006T en *MSMEG_1886* muestran una drástica disminución del isómero Δ^9 mientras que el Δ^{10} permanece invariable. Esto puede significar que parte de este último provenga de otra actividad desaturante también, y que en el entorno lipídico deficiente generado por la mutagénesis química ejerza un efecto compensatorio. Por lo tanto se puede suponer que la mutación C1006T en *MSMEG_1886* puede afectar estructuralmente a la enzima y de este modo a su regioselectividad, que de este modo no produciría C16:1 Δ^9 y si C16:1 Δ^7 que a su vez se vería aumentado en proporción dada la mayor disponibilidad de precursor C16:0. Este punto es sumamente complejo de determinar ya que no se dispone de estructuras cristalizadas de la enzima.

A pesar de que los resultados desviaron la atención hacia la función de DesA3 en *M. smegmatis*, el objetivo de este trabajo fue comprobar que la mutación C1006T en *MSMEG_1886* era responsable del fenotipo observado en la mutante UNR1. De acuerdo con lo expuesto el perfil de ácidos grasos insaturados presente en esta cepa no sólo sería producto de la mutación puntual en *desA3*, si no que se vería afectado por el resto del entorno genético de la mutante. En el análisis de ácidos ϵ -micólicos se presentaron

problemas técnicos que impidieron las comparaciones entre la cepa UNR1 y la cepa UNR1 Re. En el laboratorio se realizaban rutinariamente TLC con ácidos grasos radioactivos en placa de sílica gel que se exponían sobre placas autorradiográficas, pero dado que estas últimas no se encuentran actualmente disponibles en el país, se debió cambiar el método de análisis. En estos experimentos, como en otros de este trabajo, las placas de TLC se visualizaron y digitalizaron mediante un scanner Storm 840. Debido a este cambio los resultados no fueron consistentes con las observaciones previas y la comparación entre experimentos sería poco confiable, por lo que no se pudieron obtener conclusiones sobre la implicancia de la mutación C1006T en *MSMEG_1886* en el metabolismo de ácidos ϵ -micólicos. Por esta razón, la ausencia de la TS y modificación del fenotipo SAD de la mutante UNR1 Re puede ser asociada con *i*) una deficiencia menor en ácidos grasos insaturados con déficit de ácidos ϵ -micólicos (la mutación en *MSMEG_1886* es responsable de ambos fenotipos) o bien *ii*) una cantidad normal de ácidos ϵ -micólicos (la cepa UNR1 debería tener una segunda mutación puntual fuera del ORF *MSMEG_1886*). Existen evidencias para pensar que esta última afirmación podría ser la correcta, ya que el fenotipo TS asociado a SAD estaría determinado por la deficiencia en ácidos ϵ -micólicos que serían esenciales para la viabilidad a la temperatura no permisiva. En las determinaciones de CIM a novobiocina y cristal violeta se observó que el agregado de OADS al medio no restituía en la cepa UNR1 la sensibilidad normal a estos compuestos y Belardinelli en su Tesina de grado (2007) obtuvo resultados similares cuando analizó el crecimiento de la bacteria a 42°C en presencia de OADS. Además, la mutante $\Delta desA3$ es viable (aunque crece a menor velocidad que la cepa silvestre) tanto a 25°C, como a 37°C y 42°C (Doprado Tesis doctoral, 2013). Esto evidenciaría que en la mutante UNR1 la carencia de ácidos ϵ -micólicos es determinante para su viabilidad. Si bien la familia ϵ comprende alrededor de un 15% del total de ácidos micólicos de la envoltura de *M. smegmatis* (Dubnau et al., 1998; Slayden et al., 1996), no existen evidencias que indiquen que la disposición de cada familia de ácidos micólicos sea selectiva sobre zonas determinadas del arabinogalactano por lo que la pérdida de una especie, aún cuando esta sea de poca relevancia en el total, pueda causar serias e inesperadas consecuencias sobre la viabilidad celular y sobre la sensibilidad a drogas.

4.3.4. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este capítulo se puede concluir que:

- La técnica de Recombineering descrita en Van Kessel y Hatfull (2007) permitió la construcción de la cepa mutante puntual C1006T en *MSMEG_1886* de *M. smegmatis*, denominada UNR1 Re.
- El fenotipo TS/SAD de la mutante UNR1 no se asocia directamente con la mutación C1006T en *MSMEG_1886*.
- Debido a problemas técnicos no se pudieron obtener conclusiones acerca de la conexión de la vía de ácidos ϵ -micólicos con la deficiencia en ácidos grasos insaturados que presenta la mutante. Sin embargo con la información disponible se puede proponer que este fenotipo se encuentra asociado a otra mutación cromosomal fuera del ORF *MSMEG_1886* de la mutante UNR1.
- La mutación C1006T en *MSMEG_1886* afecta la síntesis de ácidos grasos de cadena C16 y C18, por lo que en este trabajo se aportaron evidencias que sustentan la función propuesta para DesA3 por Doprado (Tesis Doctoral, 2013) como desaturasa con especificidad para cadenas carbonadas de esa longitud. En este sentido, a partir de los resultados obtenidos se puede proponer además que en esta vía de síntesis de ácidos grasos insaturados participarían otras enzimas desaturasas y que la mutación C1006T en *MSMEG_1886* probablemente afecte la regioselectividad de DesA3.

4.4. Capítulo 4

Estudio de los genes desA1 y desA2 y su relación con la síntesis de los ácidos micólicos

4.4.1. INTRODUCCIÓN

A pesar de que la vía de síntesis de los ácidos micólicos ha sido extensamente estudiada, existe escasa información sobre los pasos de desaturación que serían necesarios para la formación de sus precursores di-etilénicos (*cis* Δ^5 24:1 y *cis* Δ^3 , *cis* Δ^{15} 34:2, (Watanabe et al., 2002)). En MTB estas reacciones serían catalizadas por las enzimas acil-ACP desaturasas codificadas por los ORFs *desA1* y *desA2* (Cole et al., 1998), pero se desconoce el orden en el que actuaría cada una sobre la cadena del ácido micólico en crecimiento. Esta vía de desaturación constituye un blanco atractivo para el diseño de nuevas drogas anti-tuberculosas dado que a partir de las observaciones realizadas por Sasseti et al., (2003) se postula que los genes *desA1* y *desA2* serían esenciales para el crecimiento de MTB. Para avanzar en el tema, se plantearon como objetivos la delección de los genes *MSMEG_5773* (homólogo de *desA1* con 80% de identidad aminoacídica) y *MSMEG_5248* (homólogo de *desA2* con 76% de identidad aminoacídica) de *M. smegmatis* encontrados por alineamientos de secuencia nucleotídica locales mediante el programa BlastX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). El procedimiento se llevó a cabo mediante la técnica de “Recombineering”, que en este caso se diseñó para lograr la interrupción de los genes *desA2* y *desA1* por medio de la introducción en su marco de lectura de un cassette de resistencia a Hyg (materiales y métodos).

4.4.2. RESULTADOS

4.4.2.1. Construcción de las cepas de *M. smegmatis* delecionales en *desA1* y *desA2*

Para la construcción de la cepa mutante Δ *desA1* el sustrato recombinogénico se construyó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. En resumen, los fragmentos de 500 pb corriente arriba y 500 pb corriente abajo del gen *MSMEG_5773*: *i*) se obtuvieron mediante PCR con los oligonucleótidos DA1 KO 5'Fw, DA1 KO 5'Rv, DA1 KO 3'Rv y DA1 KO 3' Fw; *ii*) se clonaron a ambos lados de un marcador de resistencia a higromicina en el vector soporte pLitmus28G (Ap^r) y *iii*) la construcción completa se digirió con enzimas de restricción, se separó el sustrato de recombinación por electroforesis en geles de agarosa y posteriormente se eluyó la banda de DNA correspondiente. El mismo procedimiento se realizó con el ORF *MSMEG_5248* que codifica para DesA2. En este caso,

las reacciones de PCR se realizaron con los oligonucleótidos específicos DA2 KO 5'Fw, DA2 KO 5'Rv, DA2 KO 3'Fw y DA2 KO 3'Rv y se utilizó como vector soporte al plásmido pBluescript (Ap^r).

Los dos sustratos recombinogénicos obtenidos se electroporaron en la cepa *M. smegmatis* mc²155 pJV53 (Km^r) y la selección de los clones transformantes se realizó en placas de 7H9 ADS-G Hyg a 37°C. En ambos casos hubo ausencia de transformantes tras sucesivos intentos de transformación. Sasseti et al., (2003), mediante estudios de TraSH (del inglés transposon site hybridization), identificaron a *desA1* y a *desA2* como genes esenciales para el crecimiento óptimo de MTB. Debido a los resultados negativos de los experimentos de recombineering, se planteó la posibilidad de que los dos genes también fueran esenciales en *M. smegmatis*. Por lo tanto, en este punto se decidió construir cepas merodiploides que sobre-expresaran a los genes *des* según se explica en la siguiente sección. Una vez obtenidas las cepas *M. smegmatis::desA1* y *M. smegmatis desA2*, se electroporaron con el plásmido pJV53 y se continuó con el protocolo de Recombineering. De cada una de las transformaciones con los sustratos recombinogénicos se obtuvieron clones transformantes con resistencia a Hyg que fueron chequeadas por PCR de colonia (materiales y métodos). En la figura 4.1 se muestran los resultados de dichas reacciones en un clon de *M. smegmatis::desA1 ΔdesA1* (A) y uno de *M. smegmatis::desA2 ΔdesA2* (B). Como muestra control negativo se utilizó DNA de colonia de *M. smegmatis* mc²155. En la reacciones de PCR de confirmación se usaron los oligonucleótidos DA1 KO 3'-Fw y DdesA2ExtCheck Fw que hibridan por fuera de *desA1* y *desA2*, respectivamente y Rv 1886-Hyg y Fw 1888-Hyg que hibridan dentro del casete de Hyg. En cada caso, se realizó como control una reacción de PCR con los oligonucleótidos Fw y Rv que hibridan externamente al gen a delecionar (para *desA1* se utilizaron DA1 KO 3'-Fw y DdesA1ExtCheck Rv y para *desA2* DdesA2ExtCheck Fw y DdesA2ExtCheck RV) y un tiempo de extensión que sólo permitió la formación de producto en la cepa silvestre (amplicón de 1,5 kb con un tiempo de extensión 1 minuto 30 segundos) y no en las mutantes (amplicón de aproximadamente 3,8 Kb con un tiempo de extensión 3 minutos 30 segundos). En las reacciones que utilizaron un cebador que hibrida en el casete de antibiótico, únicamente se observó la presencia de producto en las muestras de ADN de los clones mutantes y opuestamente a

esto, en la reacción de PCR control, sólo se observó presencia de producto en las muestras pertenecientes a la cepa silvestre.

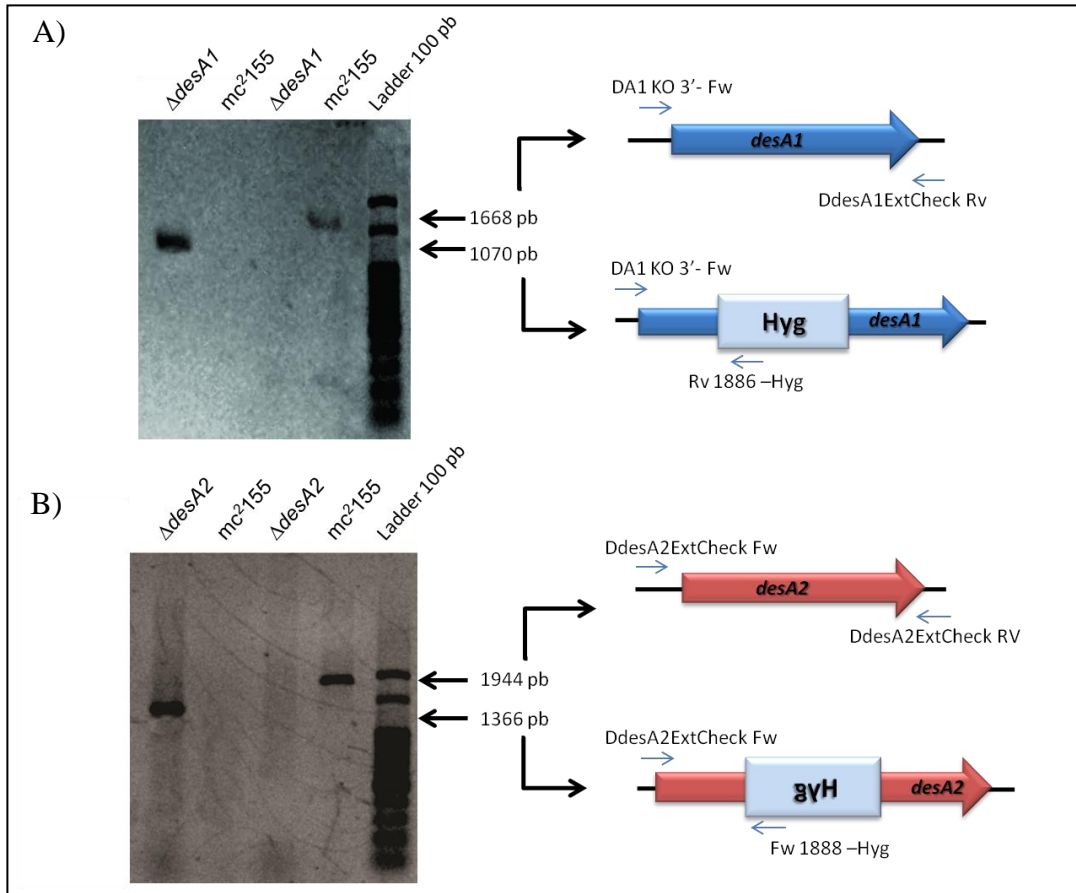


Figura 4.1. Confirmación, mediante PCR de colonia, de la delección de los genes A) *desA1* y B) *desA2* en un clon merodiploide de cada gen. A la izquierda de las figuras se muestran los productos de PCR realizadas con muestras de ADN de *M. smegmatis* mc²155 y *M. smegmatis::desA1* Δ *desA1* (Δ *desA1*) (A) o *M. smegmatis::desA2* Δ *desA2* (Δ *desA2*) (B). Las bandas de 1070 pb (A) y 1366 pb (B) confirman la presencia del casete de antibiótico interrumpiendo los genes *desA1* y *desA2*. Las bandas de 1668 pb (A) y de 1366 pb (B) corresponden a los controles de amplificación de los genes *desA1* y *desA2* en la cepa silvestre. se utilizó el marcador de PM comercial Ladder 100 pb.

A la derecha de la figura, se esquematiza la hibridación de los oligonucleótidos utilizados en cada reacción de acuerdo con el producto obtenido. En flechas azules representan al gen *desA1* y las de color rosado a *desA2*. El cuadrado color celeste corresponde casete de Hyg (leyenda Hyg: inserción en dirección 5'-3'; leyenda Hyg rotada 180° cuando se encuentra en dirección 3'-5'). En flechas celestes delgadas se esquematizaron los distintos cebadores utilizados.

Como resultado de la realización de estos protocolos se obtuvieron las cepas: *M. smegmatis::desA1* Δ *desA1* y *M. smegmatis::desA2* Δ *desA2*. Ambas cepas deleciones sólo se pudieron obtener cuando el recombineering se realizó con cepas merodiploides en los genes blanco, lo cual permite suponer que tanto *desA1* como *desA2* serían esenciales. Sin

embargo, para poder confirmar definitivamente esta hipótesis sería necesaria la expresión condicional de estos genes. Las construcciones necesarias para el cumplimiento de este objetivo se están llevando a cabo actualmente, mediante la utilización del sistema descrito por Boldrin et al., (2010). En este caso se coloca el gen blanco bajo control de un promotor reprimible por pristamicina (*Pptr*), este compuesto es producido por el gen *pip* cuya transcripción es a su vez reprimida por la unión del regulador TetR a su región operadora. El *Pptr* se encuentra presente en el plásmido pFra42B (Str^r), corriente abajo de este promotor se clona un fragmento de aproximadamente un 50% del tamaño del gen blanco y con esta construcción se transforma la cepa micobacteriana a estudiar a fin de que se produzca la recombinación homóloga entre este fragmento y el gen blanco, quedando la transcripción de este último bajo control del *Pptr*. La regulación de este sistema se produce por el agregado de anhidrotetraciclina (Tc) al medio, este compuesto se une al regulador TetR y esta unión evita la inhibición de *pip*, por lo que hay producción de pristamicina (PIP) y el gen blanco no se transcribe. En ausencia de Tc se produce la unión de TetR a *pip*, no hay producción de PIP y por lo tanto el gen blanco se transcribe normalmente. El sistema *tetR-pip* se encuentra presente en el plásmido pFra50 (Hyg^r), que se incorpora en la célula luego de realizada la recombinación ya descrita. En el caso de *desA1* y *desA2* se obtuvieron las construcciones pFra42B::*desA1/desA2* a partir del sub-clonado de los fragmentos de 500 pb de cada gen ligados al plásmido pGEM[®]-T-Easy que se generaron por reacciones de PCR realizadas con los oligonucleótidos DesA1 TET PIP Fw/DesA1 TET PIP Rv y DesA2 TET PIP Fw/DesA2 TET PIP Rv. Sin embargo, cuando se electroporaron las construcciones en *M. smegmatis* mc² no se obtuvieron clones transformantes aún cuando este procedimiento se realizó repetidas veces. Por lo tanto continúa pendiente la expresión condicional de los genes *des* y la confirmación de su esencialidad.

4.4.2.2. Construcción de las cepas merodiploides *M. smegmatis*::*desA1* y *M. smegmatis*::*desA2*

Para la construcción de las cepas merodiploides en los genes *desA1* y *desA2*, en primer lugar, se amplificaron por PCR los ORFs *MSMEG_5773* y *MSMEG_5248* con los oligonucleótidos *MSMEG_5773* Up-*MSMEG_5773* Dn y *MSMEG_5248* Up-*MSMEG_5248* Dn, respectivamente (materiales y métodos). Posteriormente, los productos

de estas reacciones se clonaron corriente abajo del promotor *hsp60* presente en el vector pMV261 (Km^r) y luego, por medio de cortes con enzimas de restricción, se sub-clonaron los fragmentos *MSMEG_5773::hsp60* y *MSMEG_5248::hsp60* en el vector integrativo pML1342 (Hyg^r). La presencia del promotor *hsp60* fue chequeada por PCR con los oligonucleótidos específicos para la construcción: pMV261 Fw-*MSMEG_5773* Dn (*desA1*) y pMV261 Fw-*MSMEG_5248* Dn (*desA2*). El plásmido pML1342 fue construido en base al micobacteriófago L5, por lo tanto posee el gen que codifica para su integrasa (*int* L5) y su secuencia *attP*, homóloga al sitio de unión bacteriano *attB* que reside en el gen *MSMEG_4676* (*glyV*, ARNt de glicina) (Huff et al., 2010). En la figura 4.2 se presentan los resultados de las reacciones de PCR de colonia en las que se confirmaron dichas inserciones. Para este procedimiento se utilizó un oligonucleótido directo que hibrida en el gen *MSMEG_5348* o bien *MSMEG_5773* y uno reverso que hibrida en el gen *MSMEG_4676*. En los clones que poseen la inserción *hsp60::desA1* o *hsp60::desA2* dentro del gen *MSMEG_4676* se observó la presencia de una banda de 1400 pb o 1315 pb, respectivamente. En los clones que no poseen la inserción no se observó presencia de producto de amplificación. Como controles positivos, en ambos casos, se observa una banda de 400 pb correspondiente a la amplificación del gen *MSMEG_4676* y una banda de 1023 pb o 945 pb correspondientes al gen *desA1* o *desA2*, respectivamente. Estas amplificaciones se realizaron a partir de ADN extraído de colonias silvestres. De este modo se obtuvieron las cepas *M. smegmatis::desA1* y *M. smegmatis::desA2* (Hyg^r). Como se describió en el apartado anterior los sustratos de recombinación construidos comparten la resistencia a higromicina con estas cepas, por lo que para que pudieran ser utilizadas en el protocolo de recombinación se debieron transformar con el plásmido pCresacB (Km^r) que codifica a la enzima *cre* recombinasa que cataliza la escisión de los restos de esqueleto del pML1342, el gen *int* L5 y el gen de resistencia a antibiótico. De estas transformaciones se seleccionaron los clones capaces de crecer en presencia de Km e incapaces de hacerlo en Hyg, los cuales posteriormente, se sub-cultivaron de manera sucesiva en medio líquido 7H9 ADS-GT en ausencia de antibiótico para ser curadas del plásmido pCresacB. Como resultado de estos procedimientos se obtuvieron las cepas merodiploides en cada gen *des* sin resistencias a antibióticos.

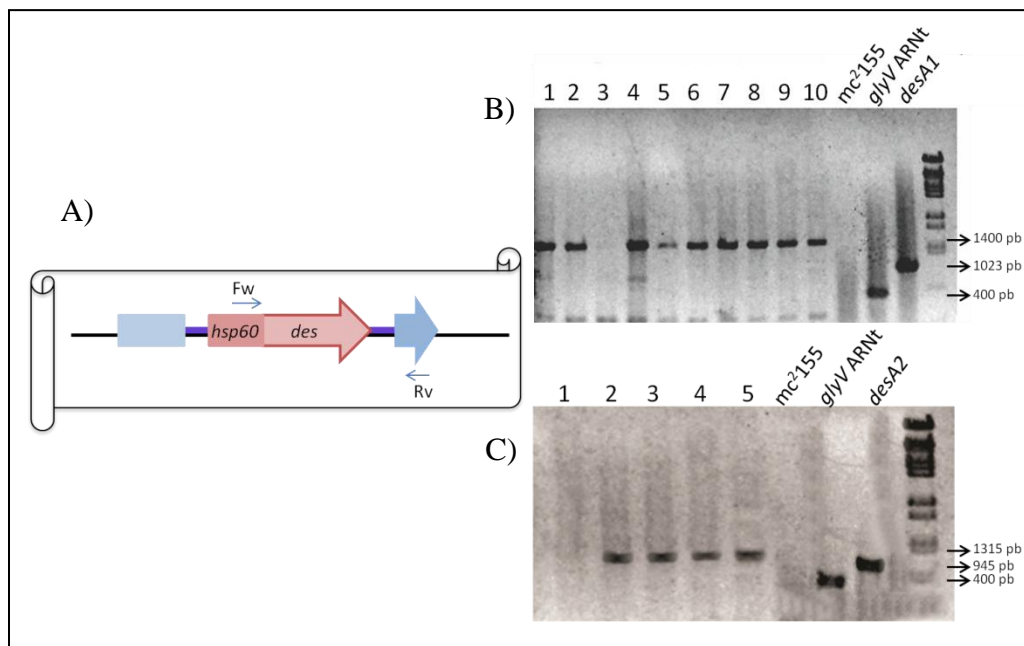


Figura 4.2. Confirmación de la inserción de la construcción (B) *hsp60::desA1* o (C) *hsp60::desA2* mediante PCR de colonia. En la figura se presenta A) un esquema de la inserción del plásmido pML1342 *hsp60::des* en el gen *glyV* ARNt (flecha de color celeste). El rectángulo rosa oscuro corresponde al promotor *hsp60* ubicado corriente arriba del gen *des* (flecha rosa claro) y en líneas color violeta se muestran las porciones del plásmido pML1342 que también forman parte del inserto. Las flechas celestes con las leyendas Fw y Rv representan a los oligonucleótidos directo y reverso utilizados para realizar las PCR de colonia cuyos productos se presentan en las calles numeradas de los geles de agarosa mostrados en B) y C). Las bandas de 1400 pb y 1315 pb corresponden a los productos de reacciones positivas para la inserción. Como control negativo se utilizó ADN de colonia de la cepa *M. smegmatis* mc²155 (mc²155) y como controles positivos se amplificaron los genes *glyV* ARNt y *desA1* o *desA2*. Se utilizó el marcador de PM comercial λ *Bsr*EII.

4.4.2.3. Análisis de los efectos fenotípicos producidos por la sobre-expresión de *desA1* y *desA2*

Como complementación del estudio de las acil-ACP desaturasas hipotéticas se analizó el patrón de crecimiento y biosíntesis de ácidos micólicos en cepas de *M. smegmatis* que sobre-expresan los genes *des* bajo control del promotor constitutivo *hsp60*. Estas cepas se generaron por la transformación de la cepa silvestre con los plásmidos pMV261::*desA1* y pMV261::*desA2* obtenidos en un paso intermedio de la construcción de las cepas merodiplíodes en los genes *des*. En el análisis de los patrones de crecimiento se determinó que las cepas no presentan diferencias en este aspecto con respecto a la cepa silvestre *M. smegmatis* mc²155 (datos nos mostrados). La síntesis de ácidos micólicos se estudió mediante experimentos de incorporación del precursor [1-¹⁴C] ácido acético y posterior extracción, trans-esterificación y análisis por TLC de MEAGs y MEAMs. En la TLC 1D en placa de silica gel presentada en la figura 4.3 no se observaron diferencias

apreciables en los perfiles de ácidos micólicos de las cepas analizadas con respecto a la cepa silvestre. Conjuntamente a estos experimentos, se realizaron extracciones de MEAGs de ambas cepas para su análisis mediante GC-MS. Como puede observarse en la figura 4.3, los perfiles de *M. smegmatis* pMV261::*desA1* y *M. smegmatis* pMV261::*desA2* varían de forma discreta con respecto a los de la cepa control. De acuerdo con estos resultados no se observan diferencias en la abundancia de ácidos grasos insaturados con la sobre-expresión de estas enzimas.

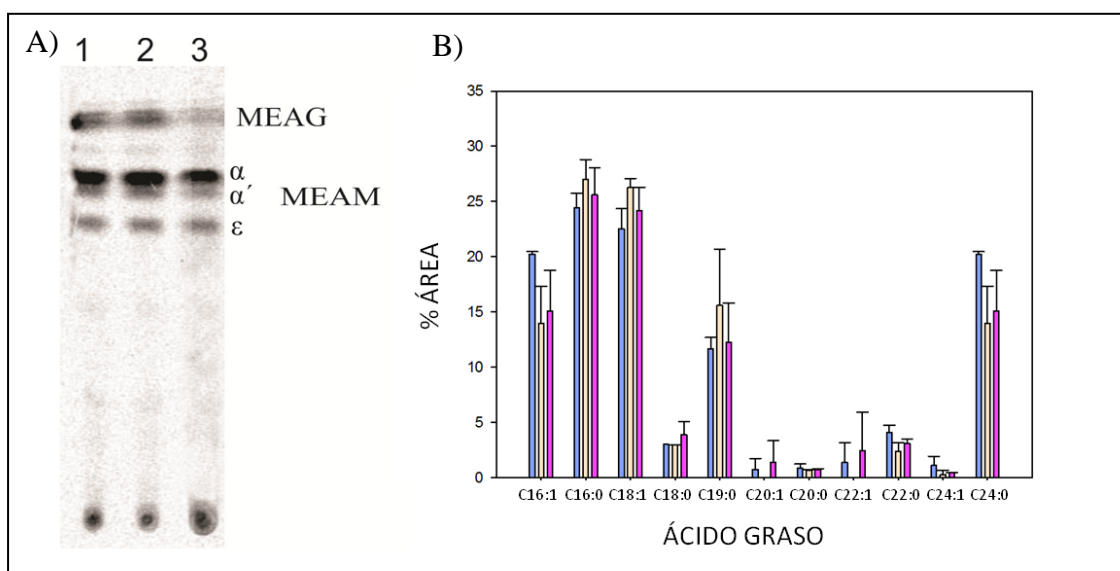


Figura 4.3. Análisis del efecto de la sobre-expresión de los genes *desA1* y *desA2* en los perfiles de ácidos grasos y ácidos micólicos de la cepa *M. smegmatis* mc²155. Se analizaron muestras de MEAGs y MEAMs de *M. smegmatis*: pMV261 (1) y (■); pMV261::*desA1* (2) y (■) y pMV261::*desA2* (3) y (■) mediante TLC 1D en placa de sílica gel (A) y GC-MS (B). La placa de TLC se sembró con 40000 cpm de cada muestra y se desarrolló 3 veces con éter de petróleo-éter etílico (85:15). Los porcentajes de ácidos grasos mayoritarios presentes en las muestras obtenidos por GC-MS se presentan en un grafico de barras. **MEAG:** metil-ésteres de ácidos grasos; **MEAM:** metil-ésteres de ácidos micólicos; α : ácidos α -micólicos; α' : ácidos α' -micólicos; ϵ : ácidos épxi-micólicos.

Por último, para completar el análisis de la sobre-expresión de *desA1* y *desA2* se decidió estudiar su efecto en la cepa *M. smegmatis* Δ *desA3* (Doprado Tesis doctoral, 2013), que por tener el gen *desA3* mutado tiene mas disponibilidad de ácidos grasos para ofrecer a otras vías. Para cumplir con el objetivo planteado, se electroporaron las construcciones pMV261::*desA1* y pMV261::*desA2* en la cepa mutante y se seleccionaron los clones con resistencia a Km. De este modo se obtuvieron las cepas *M. smegmatis* Δ *desA3* pMV261::*desA1* y *M. smegmatis* Δ *desA3* pMV261::*desA2* y posteriormente se analizaron

sus perfiles de ácidos grasos mediante GC-MS. Como control en estos experimentos se utilizó a la cepa *M. smegmatis* $\Delta desA3$ transformada con el plásmido vacío. Los resultados de estas determinaciones se encuentran en la figura 4.4. En ambas cepas se observó un aumento en la proporción de los ácidos grasos insaturados de cadena larga (C20:1, C22:1 y C24:1) de aproximadamente dos veces con respecto a la cepa mutante control. En el caso de los ácidos grasos insaturados de largo de cadena menor a C20 o los ácidos grasos saturados no se observaron variaciones significativas con respecto a la cepa control.

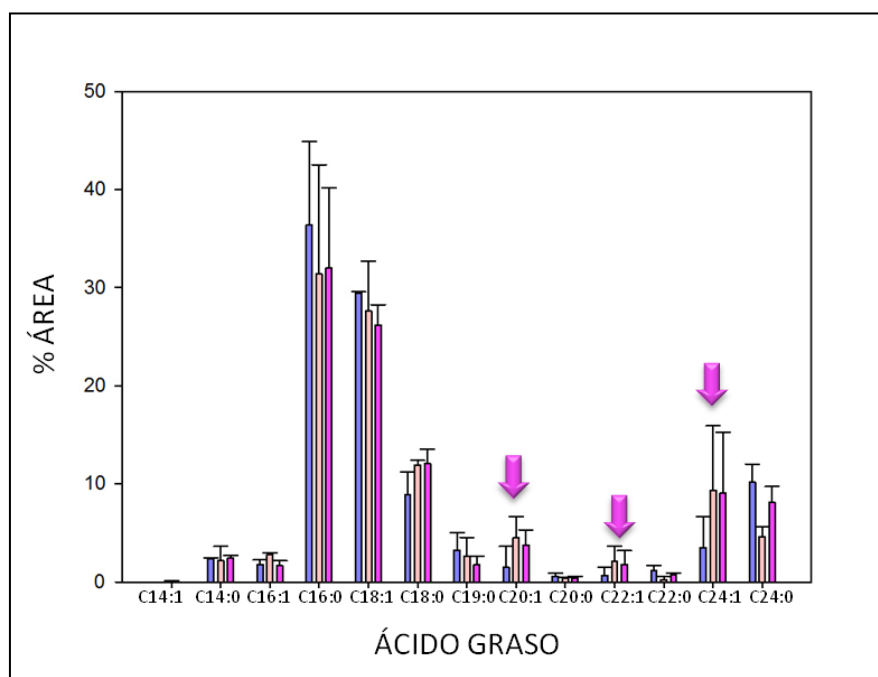


Figura 4.4. Análisis por GC-MS del efecto de la sobre-expresión de los genes *desA1* y *desA2* en los perfiles de MEAGs de la cepa *M. smegmatis* $\Delta desA3$. En el gráfico de barra se muestran los porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios sobre el total de ácidos grasos presentes en las muestras de MEAGs de las cepas *M. smegmatis* $\Delta desA3$: pMV261 (■), pMV261::*desA1* (■) y pMV261::*desA2* (■), crecidas en medio 7H9 ADS-GT a 37°C. Con flechas color rosado se señalan porcentajes de área los ácidos grasos insaturados de cadena larga C20:1, C22:1 y C24:1.

4.4.3. DISCUSIÓN

Los ácidos micólicos son los componentes mayoritarios de la envoltura celular micobacteriana y su presencia constituye una de las características distintivas de este género. Muchas de las propiedades únicas de estas bacterias se encuentran relacionadas con la estructura y composición lipídica de su envoltura celular.

Los ácidos micólicos se encuentran formados por una cadena α alquilo C24-C26 y una cadena meromicolato de más de C56. Esta cadena, presenta modificaciones químicas tales como ciclopropanaciones, grupos oxigenados o grupos metilo que se introducen de manera sitio específica a partir de dobles enlaces en posición *cis* (Dubnau et al., 2000; Yuan, 1996; Yuan et al., 1995). Sin embargo, aún se desconoce el momento de la biosíntesis del meromicolato en que los dobles enlaces y los diversos grupos son incorporados. Watanabe et al., (2002) determinaron por medio de espectrometría de masas por disociación inducida por colisión (CID MS) que las insaturaciones presentes en el meromicolato son *cis* Δ^5 24:1 y *cis* Δ^3 , *cis* Δ^{15} 34:2. Se ha propuesto que los ORFs de MTB *rv0824c* y *rv1094*, anotados como acil-ACP desaturasas hipotéticas *desA1* y *desA2* (Cole et al., 1998), serían las desaturasas de ácidos micólicos. Dyer et al., (2005) realizaron estudios bioinformáticos mediante los cuales se determinó en ambos ORFs la presencia de los residuos conservados propios de las acil-ACP desaturasas; en este trabajo se obtuvo el cristal de DesA2, a partir del cual se realizaron análisis del tipo estructura-función. Sin embargo, hasta este momento los roles de DesA1 y DesA2 no se han estudiado bioquímica o fisiológicamente. Por estos motivos, en este trabajo de tesis se planteó como objetivo principal el estudio del rol fisiológico de MSMEG_5773 y MSMEG_5248 de *M. smegmatis*. De acuerdo a los análisis bioinformáticos realizados, ambos genes poseen el dominio conservado de unión a Fe (centro di-hierro) presente en los sitios catalíticos de las acil-ACP desaturasas (Shanklin y Cahoon, 1998) y son los ORFs de *M. smegmatis* mc²155 con mayor homología de secuencia con respecto a DesA1 y DesA2. De acuerdo con los experimentos realizados, *desA1* y *desA2* de *M. smegmatis* mc²155 serían genes esenciales para el crecimiento de la bacteria, dado que solo pudieron ser deletados cuando en los protocolos se utilizaron cepas merodiploides en cada gen. Estas observaciones coinciden con lo publicado por Sasseti et al., (2003), quienes determinaron que *desA1* y *desA2* de MTB son esenciales para el crecimiento de la bacteria *in vitro*. Watanabe et al., (2002) observaron que los ácidos micólicos aún cuando inmaduros (sin la longitud de cadena completa) de varias especies de micobacterias, incluida MTB H37Rv, presentan dos dobles enlaces en conformación *cis* en la posición correcta. Estas observaciones concuerdan con las realizadas por Liu y Nikaido (1999) en mutantes temperatura sensibles que a 30°C son deficientes en la síntesis de ácidos micólicos pero acumulan precursores meromicolatos de

menor longitud con los dos dobles enlaces en conformación *cis* en la posición correcta. Se puede pensar entonces, que aún cuando el meromicolato no posee la longitud total, la presencia de los dobles enlaces marca el estadio biosintético en el que puede ser utilizado por el conjunto de enzimas modificadoras; lo cual le confiere sentido al hecho de que ambas desaturasas sean necesarias para la viabilidad de la bacteria. En contrapartida se presenta el caso de KasA y B, en el que sólo KasA es esencial para el crecimiento de MTB debido a que actúa en los primeros pasos biosintéticos del meromicolato (Bhatt et al., 2005), mientras que KasB actúa en los pasos de elongación por lo que en su ausencia la bacteria puede sobrevivir utilizando precursores meromicolatos más cortos (Bhatt et al., 2007). Para poder confirmar certeramente que *desA1* y *desA2* son genes esenciales se debe realizar la construcción de cepas con expresión condicional de estos genes, experimentos que se encuentran actualmente en proceso en el laboratorio.

Por otro lado, en este capítulo se presentó información referida a la sobre-expresión de las enzimas en estudio en la cepa *M. smegmatis* mc²155, no habiéndose observado cambios en los perfiles lipídicos analizados por TLC 1D o por GC-MS. En el primer caso sería lógico pensar en que si se sobre-produce un precursor meromicolato di-insaturado todo el conjunto de enzimas involucradas en su modificación aumentarían su actividad y por lo tanto el balance total sería un aumento de todas las familias de ácidos micólicos y no diferencias entre las proporciones de cada una. En este caso no se apreciaron diferencias entre las cepas sobre-expresantes y la silvestre, sin embargo no se puede llegar a una conclusión debido a la sensibilidad del método empleado para el revelado de la placa de TLC. Los perfiles ácidos grasos analizados por GC-MS tampoco mostraron diferencias entre las cepas sobre-expresantes y la silvestre. Se han publicado trabajos que proponen que los ácidos grasos C22-C24 serían desaturados por *cis* Δ^5 desaturasas para después ser elongados y que este sería el punto de entrada a Fas-II (Asselineu et al., 1970; Lacave et al., 1990). Sin embargo, en las observaciones realizadas por Doprado (Tesis doctoral, 2013) mediante GC-MS de MEAGs convertidos en aductos de DMDS se observa la presencia de un ácido graso C24:1 *cis* Δ^{15} (tiempo de retención en min. 31,89) que podría provenir de la elongación de C16:1 *cis* Δ^7 o bien C18:1 *cis* Δ^9 o bien ser sintetizado por una enzima específica, mientras que no se observa la presencia de un insaturado C24:1 *cis* Δ^5 . Estos perfiles coinciden con los presentados por las cepas sobre-expresantes de *M. smegmatis*. A

partir de estas observaciones se podría afirmar que en esta bacteria las desaturaciones *cis* Δ^5 , en caso de ser llevadas a cabo por *desA1* o por *desA2*, se realizarían cuando el meromicolato se encuentra siendo sintetizado por FAS-II y no previamente a su entrada a este sistema, posteriormente se efectuaría la desaturación *cis* Δ^3 ; estas observaciones coinciden con las características observadas en el sitio activo del cristal de DesA2, el cual muestra un desarreglo general en la ubicación de los aminoácidos conservados en acil-ACP desaturasas sugiriendo capacidades especiales en esta enzima. Sin embargo, para poder concluir estas observaciones sería necesario determinar la composición de los meromicolatos por técnicas más sofisticada de MS (previa pirólisis de la fracción MEAGs) y estas técnicas no se realizan en nuestro país.

Por otro lado, también se realizaron experimentos de sobre-expresión de *desA1* y *desA2* en la cepa *M. smegmatis* $\Delta desA3$ (Doprado Tesis doctoral, 2013); en este caso se observó un aumento de ácidos grasos insaturados de cadena larga (C20:1, C22:1 y C24:1) cuando se sobre-expresó cualquiera de los dos ORFs en estudio, MSMEG_5773 o MSMEG_5248. Estos resultados permiten asociar a ambos ORFs con el metabolismo de ácidos grasos, sin embargo debido a la ubicación de las insaturaciones en estos intermediarios nuevamente no se puede asociar este cambio al metabolismo de ácidos micólicos si no a una probable actividad desaturante *cis* Δ^{11} sobre cadenas C20 que posteriormente se elonguen y se acumulen debido a la falta de actividad desaturante por parte DesA3 y a un posible efecto compensatorio por DesA1 y DesA2.

4.4.4. CONCLUSIONES

Se construyeron las cepas deleciones en los ORFs MSMEG_5373 y MSMEG_5248 (genes *desA1* y *desA2*, respectivamente) de *M. smegmatis* mc²155. Estas deleciones solo pudieron ser logradas en cepas merodiploides de cada gen, por lo que puede inferirse esencialidad en las condiciones ensayadas. Además se analizó la sobre-expresión de ambos genes, pudiendo asociárseles una participación en el metabolismo de ácidos grasos de *M. smegmatis* mc²155, aunque no fue posible la asignación de una función acotada debido a que no se logró la construcción de las cepas de expresión regulable.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se abordó el estudio de las mutantes químicas con fenotipo TS/SAD: UNR21, UNR18 y UNR1, mediante diversas estrategias moleculares que fueron complementadas con estudios fisiológicos y bioinformáticos, asociados a una extensiva revisión bibliográfica. A partir de estos análisis, se generaron nuevas hipótesis de trabajo relacionadas con las vías afectadas en estas cepas que también fueron estudiadas, como el posible mecanismo de acción de TAC en *M. smegmatis* y la funcionalidad de las desaturasas de ácidos micólicos hipotéticas. Con el conjunto de resultados obtenidos se elaboraron las siguientes conclusiones, que para permitir una lectura organizada, se asociaron a cada mutante analizada.

A través de los estudios asociados a la cepa UNR21 y su relación con la síntesis de ácidos α' -micólicos en *M. smegmatis* se concluyó que:

- El ORF *MSMEG_1204* se encuentra anotado incorrectamente como β -cetoacil-ACP sintetasa ya que no presenta la tríada catalítica característica de este grupo de enzimas y su expresión no modificaría el perfil de ácidos grasos de *M. smegmatis*.
- La mutación asociada a la ausencia de ácidos α' -micólicos en la cepa UNR21 no se encuentra localizada en ninguno de los genes asociados, hasta el momento, a la biosíntesis de ácidos micólicos.

Por su parte, el análisis de la cepa UNR18 y los blancos de acción de TAC en *M. smegmatis* permitió determinar que:

- La mutación asociada a la deficiencia en la familia de ácidos α_1 -micólicos y a la sensibilidad a TAC de esta cepa, no se encuentra en ninguno de los ORFs de *M. smegmatis* homólogos a los que participan en el mecanismo de acción propuesto para TAC en MTB.
- *M. smegmatis* posee blancos de acción para TAC a pesar de ser naturalmente resistente a la droga. Sin embargo, el mecanismo de inhibición de la síntesis de ácidos micólicos en esta especie sería diferente al propuesto para MTB y no implicaría interrupción del crecimiento.
- El ORF *MSMEG_0902* codifica para una MtfSAM involucrada en la síntesis de ácidos micólicos dicitopropanados.

Con respecto a la mutante UNR1 y el estudio de la posible conexión entre la síntesis de ácidos grasos insaturados y ácidos ϵ -micólicos en *M. smegmatis*, se pudo concluir que:

- La técnica de Recombineering descrita en Van Kessel y Hatfull (2007) permite la construcción de cepas mutantes puntuales y mediante éste protocolo, se obtuvo la mutante *M. smegmatis* UNR1 Re (C1006T en *MSMEG_1886*).
- El fenotipo TS/SAD de la mutante UNR1 no se asocia directamente con la mutación C1006T en *MSMEG_1886*.
- La mutación C1006T en *MSMEG_1886* afecta la síntesis de ácidos grasos de cadena C16 y C18, por lo que en este trabajo se aportaron evidencias que sustentan la función propuesta para DesA3 por Doprado (Tesis Doctoral, 2013) como desaturasa con especificidad para cadenas carbonadas de esa longitud. En este sentido, a partir de los resultados obtenidos se puede proponer, además, que en esta vía participarían otras enzimas desaturasas y que la mutación C1006T en *MSMEG_1886* probablemente afecte la regioselectividad de DesA3.
- Debido a problemas técnicos, no se pudieron obtener conclusiones acerca de la conexión entre la vía de síntesis de ácidos ϵ -micólicos y la de ácidos grasos insaturados asociada con la deficiencia en ambos metabolismos que presenta la cepa UNR1. Sin embargo con la información disponible se puede proponer que este fenotipo se encuentra asociado a otra mutación cromosomal fuera del ORF *MSMEG_1886* en esta cepa.

Por último y en continuidad con los estudios de las vías de síntesis de ácidos micólicos y ácidos grasos insaturados en *M. smegmatis*, a partir del análisis de los genes *desA1* y *desA2* de esta bacteria:

- Se construyeron las cepas delecionales en los ORFs *MSMEG_5373* y *MSMEG_5248* (genes *desA1* y *desA2*, respectivamente) de *M. smegmatis* mc²155; y dado que estas deleciones solo pudieron ser logradas en cepas merodiploides de cada gen, puede inferirse su esencialidad en las condiciones ensayadas.

- Se puede suponer la participación de estas enzimas en el metabolismo de ácidos grasos de *M. smegmatis mc²155*, de acuerdo con los resultados obtenidos de su sobre-expresión.
- La asignación de una función acotada a las enzimas codificadas por los ORFs *MSMEG_5373* y *MSMEG_5248* no fue posible, debido a que no se logró la construcción de las cepas de expresión regulable.

6. RESUMEN

El género *Mycobacterium* incluye especies patógenas de alto impacto en salud pública, como *M. tuberculosis* (agente causal de la tuberculosis humana), y especies no patógenas como *M. smegmatis*. La tuberculosis es un problema de salud mundial que causa aproximadamente 1,4 millones de muertes anuales. En los últimos años con la emergencia de cepas de *M. tuberculosis* multi, extremada y totalmente resistentes a drogas, el estudio de los blancos moleculares de las drogas anti-tuberculosas ya conocidas así como el diseño de nuevas drogas, han sido planteados como necesidades urgentes. En este sentido, la ruta biosintética de los ácidos micólicos (ácidos grasos α - alquil, β - hidroxilados de cadena larga (hasta C86) comunes en todas las micobacterias) ofrece un gran potencial para el diseño de drogas debido a que su compleja síntesis requiere de múltiples genes.

En el laboratorio se aislaron, mediante mutagénesis química, mutantes de *M. smegmatis* mc²155 termosensibles (TS) y con sensibilidad aumentada a drogas (SAD) que presentaban deficiencias en diferentes tipos de ácidos grasos y micólicos. En este trabajo de tesis se planteó como objetivo principal la caracterización genética y bioquímica de los genes involucrados en los fenotipos observados en estas mutantes teniendo como metas finales la identificación de nuevos blancos para el diseño racional de drogas así como la obtención de nuevos datos acerca de los mecanismos de acción de drogas antimicobacterianas ya conocidas que actúan sobre esta vía. Para ello se utilizó una estrategia basada en la aplicación de técnicas moleculares que fueron complementadas con estudios fisiológicos, de lipidómica y análisis bioinformáticos, asociados a una extensiva revisión bibliográfica.

Los estudios realizados en la cepa mutante UNR21, deficiente en la síntesis de ácidos α' -micólicos, permitieron concluir que en la vía de síntesis de esta sub familia de ácidos micólicos existen genes cuya función aún no ha sido descrita y que no forman parte de la maquinaria descrita hasta el momento. Por otro lado, se identificó un error en la anotación genómica del ORF *MSMEG_1204* anotado como β -cetoacil-ACP hipotética.

Mediante el análisis de la cepa UNR18 se identificaron probables blancos de acción de TAC en *M. smegmatis* (bacteria naturalmente resistente a esta droga) en metriltransferasas asociadas a las vías de modificación de ácidos micólicos, diferenciando a este mecanismo del de inhibición de la ciclopropanación propuesto en *M. tuberculosis*. Así

mismo, se identificó al ORF *MSMEG_0902* como una MtfSAM involucrada, posiblemente, en la síntesis de ácidos micólicos diciticlopropanados.

Por otro lado, a partir de las características encontradas en la cepa UNR1 se estudió el efecto de la mutación puntual encontrada en el ORF *MSMEG_1886* (codifica para una enzima homóloga a DesA3 de *M. tuberculosis*) en la vía de síntesis de ácidos grasos insaturados. En este trabajo, se presentaron evidencias de que la mutación C1006T en el ORF *MSMEG_1886* probablemente afecta la regioselectividad de DesA3 y además se aportaron resultados que sustentan la función propuesta para esta enzima como desaturasa con especificidad para cadenas carbonadas de longitud C16-C18. Estos estudios se complementaron con un análisis de la desaturación de ácidos micólicos, mediante los cuales se pudo inferir una posible esencialidad de los ORFs *MSMEG_5773* y *MSMEG_5773* (anotados como desaturasas de ácidos micólicos hipotéticas) así como su asociación al metabolismo de ácidos grasos en *M. smegmatis*.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alahari, A.; Trivelli, X.; Guérardel, Y.; Dover, L.G.; Besra, G.S.; Sacchetti, G.C.; Reynolds, R.C.; Coxon, G.D.; Kremer, L. (2007) Thiacetazone, an antitubercular drug that Inhibits cyclopropanation of cell wall mycolic acids in Mycobacteria. Plos one 2(12): e1343.

Alahari, A.; Alibaud, L.; Trivelli, X.; Gupta, R.; Lamichhane, G.; Reynolds, R.C.; Bishai, W.R.; Guerardel, Y.; Kremer, L. (2009) Mycolic acid methyltransferase, MmaA4, is necessary for thiacetazone susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 71:1263-1277

Alibaud, L.; Alahari, A.; Trivelli, X.; Ojha, A.K.; Hatfull, G.F.; Guerardel, Y.; Kremer, L. (2010) Temperature-dependent Regulation of Mycolic Acid Cyclopropanation in Saprophytic Mycobacteria *ROLE OF THE MYCOBACTERIUM SMEGMATIS 1351 GENE (MSMEG_1351) IN CIS-CYCLOPROPANATION OF α -MYCOLATES*. The J of Biol Chem. 285(28): 21698-21707

Asselineau, C.; Lacave, C.S.; Montrozier, H.L.; Promé, J.C. (1970) Relations structurales entre les acides mycoliques insaturés et les acides inférieurs insaturés synthétisés par *Mycobacterium phlei*. Eur J Biochem. 14: 406-410.

Asselineau, J.; Lanéelle, G. (1998) Mycobacterial lipids: a historical perspective. Frontiers in Biosci. 3:164-174.

Asselineau, C.; Asselineau, J.; Laneelle, G.; Laneelle, M.A. (2002) The biosynthesis of mycolic acids by Mycobacteria: current and alternative hypotheses. Prog Lipid Res. 41: 501-523.

Av-Gay, Y.; Everett, M. (2000) The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. Trends Microbiol. 8: 238-244

Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K.S.; Wilson, T.; Collins, D.; de Lisle, G.; Jacobs, W.R. Jr. (1994) *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 263(5144):227-230.

Barkan, D.; Rao, V.; Sukenick, G.D.; Glickman, M.S. (2010) Redundant function of *cmaA2* and *mmaA2* in *Mycobacterium tuberculosis* cis cyclopropanation of oxygenated mycolates. *J Bacteriol.* 192:3661-3668

Barry, 3rd C.E.; Lee, R.E.; Mdluli, K.; Sampson, A. E.; Schroeder, B.G.; Slayden, R.A.; Yuan, Y. (1998) Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog Lipid Res.* 37:143-179.

Baulard, A.R.; Betts, J.C.; Engohang-Ndong, J.; Quan, S.; McAdam, R.A.; Brennan, P.J.; Locht, C.; Besra, G.S. (2000) Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J Biol Chem.* 275(36):28326-28331.

Belardinelli, J.M. (2007) Tesina de grado de la Licenciatura en biotecnología. Universidad Nacional de Rosario.

Belardinelli, J.M.; Morbidoni, H.R. (2012) Mutations in the essential FAS II β -hydroxyacyl ACP dehydratase complex confer resistance to thiacetazone in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium kansasii*. *Mol Microbiol.* 86(3):568-579.

Bhatt, A.; Kremer, L.; Dai, A.Z.; Sacchettini, J.C.; Jacobs, W.R. Jr. (2005) Conditional depletion of *KasA*, a key enzyme of mycolic acid biosynthesis, leads to mycobacterial cell lysis. *J of bacteriol.* 7596-7606

Bhatt, A., Molle, V.; Besra G.S., Jacobs, W.R. Jr.; 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(6): 1442-1454.

Blondelet-Rouault, M.H., J. Weiser, A. Lebrihi, P. Branny, and J.L. Pernodet. (1997) Antibiotic resistance gene cassettes derived from the omega interposon for use in *E. coli* and *Streptomyces*. *Gene* 190:315-317.

Bloom, B.R. (1994) *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control.* ASM Press. Washington, D.C.

Boldrin, F.; Casonato, S.; Dainese, E.; Sala, C.; Dhar, N.; Palù, G.; Riccardi, G.; Cole, S.T.; Manganeli, R. (2010) Development of a repressible mycobacterial promoter system based on two transcriptional repressors. *Nucleic Acids Res.* 38(12):e134

Brennan, P.; Nikaido, H. (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 64:29-63.

Cantaloube, S.; Veyron-Churlet, R.; Haddache, N.; Daffe, 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.

Carignano, H. (2009) Tesina de grado de la Licenciatura en biotecnología. Universidad Nacional de Rosario.

Chang, Y.; Fox, B.G. (2006) Identification of Rv3230c as the NADPH oxidoreductase of a two-protein DesA3 acyl-CoA desaturase in Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Biochem.* 45(45):13476-13486.

Chatterjee, D.; Hunter, S.W.; McNeil, M.; Brennan, P.J. (1992) Lipoarabinomannan multiglycolylated form of the mycobacterial mannosylphosphatidylinositols. *J of biol chem.* 267(9):6228-6233.

Choi, K-H.; Kremer, L.; Besra, G.S.; Rock, O.C. (2000) Identification and Substrate Specificity of b-Ketoacyl (Acyl Carrier Protein) Synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J of biol chem.* 275(36): 28201-28207.

Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, 3rd C. E.; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M.A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S. Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead S.; Barrell, B. G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544

- Daffé, M., Brennan, P.J.; McNeil, M.R.** (1990) Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through the characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas-chromatography and by ¹H and ¹³CNMR analyses. *J of Biol Chem.* 265: 6734-6743.
- Daffé, M.; Draper, P.** (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microbial Phys.* 39:131-203
- Daffé, M.; Etienne, G.** (1999) The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for Pathogenicity. *Tubercle and Lung Disease.* 79(3): 153-169
- Davidson, P.T.; Le, H.Q.** (1992) Drug treatment of tuberculosis-1992. *Drugs* 43: 651-673.
- Doprado, M.** (2013) Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Rosario.
- Dover, L.G.; Alahari, A.; Gratraud, P.; Gomes, J.M.; Bhowruth, V.; Reynolds, R.C.; Besra, G.S.; Kremer, L.** (2007) EthA, a common activator of thiocarbamide-containing drugs acting on different mycobacterial targets. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(3):1055-1063.
- Dubnau, E.; Marrakchi, H.; Smith, I.; Daffe, M.; Quemard, A..** (1998) Mutations in the *cmaB* gene are responsible for the absence of methoxymycolic acid in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. *Mol. Microbiol.* 29:1526-1528.
- Dubnau, E.; Chan, J.; Raynaud, C.; Mohan, V.P.; Laneelle, M.A.; Yu, K.; Quemard, A.; Smith, I.; Daffe, M.** (2000) Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol Microbiol.* 36: 630-637.
- Dyer, D.H.; Lyle, K.S.; Rayment, I.; Fox, B.G.** (2005) X-ray structure of putative acyl-ACP desaturase DesA2 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Protein Sci.* 14:1508-1517
- Funabashi, H.; Kawaguchi, A.; Tomoda, H.; Omura, S.; Okuda, S.; Iwasaki, S.** (1989) Binding site of cerulenin in fatty acid synthetase. *J Biochem.* 105(5):751-755.

Gao, L.-Y.; Laval, F.; Lawson, E.H.; Groger, R.K.; Woodruff, A.; Morisaki, J.H.; Cox, J.S.; Daffe, M.; Brown, E.J. (2003) Requirement for *kasB* In *Mycobacterium* mycolic acid biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Mol Microbiol.* 49(6): 1547-1563.

Gavalda, S.; Leger, M.; Van der Rest, B.; Stella, A; Bardou, F; Montrozier, H; Chalut, C; Burlet-Schiltz, O; Marrakchi, H; Daffe, M; Quemard, A. (2009) The Pks13/FadD32 crosstalk for the biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 284:19255-19264.

Glickman, M.S.; Cox, J.S., Jacobs, W.R. Jr. (2000) A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell* 5:717-27

Glickman, M.S., Cahill, S.M.; Jacobs, W.R. Jr. (2001) The *Mycobacterium tuberculosis* *cmaA2* gene encodes a mycolic acid trans-cyclopropane synthetase. *J Biol Chem.* 276:2228-2233.

Glickman, M.S. (2003) The *mmaA2* gene of *Mycobacterium tuberculosis* encodes the distal cyclopropane synthase of the alpha-mycolic acid. *J Biol Chem.* 278:7844-7849.

Goren, M.B. (1972) Mycobacterial lipids: selected topics. *Bacteriol Rev.* 36(1):33-64.

Grzegorzewicz, A.E.; Korduláková, J.; Jones, V.; Born, S.E.; Belardinelli, J.M.; Vaquié, A.; Gundi, V.A.; Madacki, J.; Slama, N.; Laval, F.; Vaubourgeix, J.; Crew, R.M.; Gicquel, B.; Daffé, M.; Morbidoni, H.R.; Brennan, P.J.; Quéward, A.; McNeil, M.R.; Jackson, M. (2012) A common mechanism of inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid biosynthetic pathway by isoxyl and thiacetazone. *J Biol Chem.* 287(46):38434-38441.

Heym, B.; Alzari, P.M.; Honoré, N.; Cole, S.T. (1995) Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 15(2):235-245.

- Huang, C.C.; Smith, C.; Glickman, M.S.; Jacobs, W.R. Jr.; Sacchettini, J.C.** (2002) Crystal structures of mycolic acid cyclopropane synthases from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 277: 11559–11569.
- Huff, J.; Czyz, A.; Landick, R.; Niederweis, M.** (2010) Taking phage integration to the next level as a genetic tool for mycobacteria. *Gene* 468: 8–19
- Hung, J.G.; Walker, R.W.** (1970) Unsaturated fatty acids of Mycobacteria. *Lipids* 5:720-722.
- Jacobs, W.R. Jr.; Hatfull, G.F.** (2000) *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press. Washington, D.C.
- Jackson, M.; Portnoi, D.; Catheline, D.; Dumail, L.; Rauzier, J.; Legrand, P.; Gicquel, B.** (1997) *Mycobacterium tuberculosis* Des protein: an immunodominant target for the humoral response of tuberculous patients. *Infect Immun.* 65(7):2883-2889.
- Kauppinen, S.; Siggaard-Andersen, M.; von Wettstein-Knowles, P.** (1988) β -Ketoacyl-ACP synthase I of *Escherichia coli*: nucleotide sequence of the *fabB* gene and identification of the cerulenin binding residue. *Carlsberg Res Commun.* 53(6):357-370.
- Korduláková, J.; Janin, Y.L.; Liav, A.; Barilone, N.; Dos Vultos, T.; Rauzier, J.; Brennan, P.J.; Gicquel, B.; Jackson, M.** (2007) Isoxyl activation is required for bacteriostatic activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(11):3824-3829.
- Kremer, L.; Baulard, A.; Besra, G.S.** (2000a) Genetics of Mycolic Acid Biosynthesis. In: Hatfull G, Jacobs WR Jr, eds. *Mol Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, Washington, D.C.: 173-190.
- Kremer, L.; Douglas, J.D.; Baulard, A.R.; Morehouse, C.; Guy, M.R.; Alland, D.; Dover, L.G.; Lakey, J.H.; Jacobs, W.R. Jr.; Brennan, P.J.; Minnikin, D.E.; Besra, G.S.** (2000b) Thiolactomycin and related analogues as novel anti-mycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 275:16857-16864.

Kremer, L.; Dover, L.G.; Carrère, S.; Nampoothiri, K.M.; Lesjean, S.; Brown, A.K.; Brennan, P.J.; Minnikin, D.E.; Locht, C.; Besra, G.S. (2002) Mycolic acid biosynthesis and enzymic characterization of the β -ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J.* 364: 423-430.

Krieg, N.R. (1984-1989) *Bergeys Manual of systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Co. Baltimore. 4 Volúmenes.

Lacave, C.; Quémard, A.; Lanéelle, G. (1990) Ethylenic mycolic acid biosynthesis: extension of the biosynthetic model using cell-free extracts of *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium smegmatis*. *Biochim Biophys Acta* 1045: 58-68.

Laval, F.; Haites, R.; Movahedzadeh, F.; Lemassu, A.; Wong, C.Y.; Stoker, N.; Billman-Jacobe, H.; Daffé, M. (2008) Investigating the function of the putative mycolic acid methyltransferase UmaA: divergence between the *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *J Biol Chem.* 283(3):1419-1427.

Lawn, S.D.; Zumla, A.I. (2011) Tuberculosis. *Lancet* 378: 57-72.

Lederer, E. (1969) Some problems concerning biological c-alkylation reaction and phytosterol biosynthesis. *Q Rev Chem Soc Lond.* 23: 453-481.

Lederer, E. (1975) Cell walls of mycobacteria and related organisms; chemistry and immunostimulant properties. *Mol Cell Biochem.* 7: 87-104.

Leger, M.; Gavalda, S.; Guillet, V.; Van der Rest, B.; Slama, N.; Montrozier, H.; Mourey, L.; Quemard, A.; Daffe, M.; Marrakchi, H. (2009) The dual function of the *Mycobacterium tuberculosis* FadD32 required for mycolic acid biosynthesis. *Chem Biol.* 16:510-519.

Lengeler, J.W.; Drews, G.; Schlegel, H.G. (1999) *Biology of the prokaryotes*. Blackwell Science. Stuttgart.

Lim, E.M.; Rauzier, J.; Timm, J.; Torrea, G.; Murray, A.; Gicquel, B.; Portnoi, D. (1995) Identification of mycobacterium tuberculosis DNA sequences encoding exported proteins by using *phoA* gene fusions. *J Bacteriol.* 177(1):59-65.

- Lindqvist, Y., Huang, W.J., Schneider, G., Shanklin, J.** (1996) Crystal structure of a Δ^9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other diiron proteins. *EMBO J.* 15:4081-4092.
- Liu, J.; Nikaido, H.** (1999) A mutant of *Mycobacterium smegmatis* defective in the biosynthesis of mycolic acids accumulates meromycolates. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4011-4016.
- Los, D.A.; Murata, N.** (1998) Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim et Biophys Acta* 1394:3-15.
- McNeil, M.R; Brennan, P.J.** (1991) Structure, function, and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis, and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information. *Research Microbiol.* 142: 451-463.
- Misaki, A.; Yukawa, S.** (1966) Studies on cell walls of mycobacteria. II. Constitution of polysaccharides from BCG cell walls. *J Biochem.* 59: 511-520.
- Molle, V.; Brown, A.K.; Besra, G.S.; Cozzone, A.J.; 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.
- Molle, V.; Gulten, G.; Vilchèze, C.; Veyron-Churlet, R.; Zanella-Cléon, I.; Sacchetti, J.C.; Jacobs, W.R. Jr; Kremer, L.** (2010) Phosphorylation of InhA inhibits mycolic acid biosynthesis and growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 78(6):1591-1605.
- Morbidoni, H.R.; Vilcheze, C.; Kremer, L.; Bittman, R.; Sacchetti, J.C.; Jacobs, W.R. Jr.** (2006) Dual inhibition of mycobacterial fatty acid biosynthesis and degradation by 2-alkynoic acids. *Chem Biol.* 13:297-307.
- Narayan, A.; Sachdeva, P.; Sharma, K.; Saini, A.K.; Tyagi, A.K.; Singh, Y.** (2007) Serine threonine protein kinases of mycobacterial genus: phylogeny to function. *Physiol Genomics* 29:66-75.

- Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G.** (2001) Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol.* 166(12):7477-7485.
- Nishida, C.R.; Ortiz de Montellano, P.R.** (2011) Bioactivation of antituberculosis thioamide and thiourea prodrugs by bacterial and mammalian flavin monooxygenases. *Chem Biol Interact.* 192(1-2):21-25.
- Ojha, A.; Anand, M.; Bhatt, A.; Kremer, L.; Jacobs, W.R. Jr.; Hatfull, G.F.** (2005) GroEL1: a dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell* 123: 861-873.
- Okuyama, H.; Kankura, T.; Nojima, S.** (1967) Positional distribution of fatty acids in phospholipids from Mycobacteria. *J Biochem.* 61:732-737.
- Ortalo-Magné, A.; Dupont, M-A.; Lemassu, A.; Andersen, A.B.; Gounon, P.; Daffé, M.** (1995) Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiol.* 141: 1609-1620
- Paul, T.R.; Beveridge, T.J.** (1992) Reevaluation of envelope profiles and cytoplasmic ultrastructure of mycobacteria processed by conventional embedding and freeze substitution protocols. *J Bacteriol.* 174: 6508-6517.
- Paul, T.R.; Beveridge, T.J.** (1994) Preservation of surface lipids and determination of ultrastructure of *Mycobacterium kansasii* by freeze-substitution. *Infect Immun.* 62: 1542-1550.
- Petit, J.F.; Lederer, E.** (1984) The structure of the mycobacterial cell wall. In: *The Mycobacteria: a Source Book.* Eds. Kubica G P, Wayne LG. Marcel Dekker, New York, N.Y.: 301-322.
- Phetsuksiri, B.; Jackson, M.; Scherman, H.; McNeil, M.; Besra, G.S., Baulard, A.R.; Slayden, R.A.; DeBarber A.E.; Barry, 3rd C.E; Baird, M.S.; Crick, D.C.; Brennan, P.J.** (2003) Unique mechanism of action of the thiourea drug isoxyl on *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 278:53123-30.

Portevin, D.; de Sousa-D'Auria, C.; Houssin, C.; Grimaldi, C.; Chami, M.; Daffé, 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 USA* 101(1): 314-319

Rastogi, N.; Fdhel, C.; David, H.L. (1986) Triple-layered structure of mycobacterial cell wall: evidence for the existence of a polysaccharide-rich outer layer in 18 mycobacterial species. *Curr Micmbiol.* 13: 237-242.

Sacco, E.; Covarrubias, A.S.; O'Hare, H.M.; Carroll, P.; Eynard, N.; Jones, T.A.; Parish, T.; Daffe, M.; Backbro, K.; Quemard, A. (2007) The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:14628-14633.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, NY.

Sambrook, J.; Russel, D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd Edition* Cold Spring Harbor, NY.

Sassetti, C.M.; Boyd, D.H.; Rubin, E.J. (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Micro.* 48(1): 77-84

Sassetti, C.M.; Rubin, E.J. (2003) Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:12989-12994.

Schaeffer, M.L.; Agnihotri, G.; Volker, C.; Kallender, H.; Brennan P.J.; Lonsdale, J.T. (2001) Purification and biochemical characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* β -Ketoacyl-acyl Carrier Protein Synthases KasA and KasB. *J Biol Chem.* 276:47029-47037.

Shanklin, J.; Cahoon, E.B. (1998) Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 49: 611-641.

Shinnick, T.M.; Good, R.C. (1994) Mycobacterial Taxonomy. *Eur J Clin Microbiol. Infect Dis.* 13(11): 884-901

- Schneider, G.; Lindqvist, Y.; Shanklin, J; Somerville, C.** (1992) Preliminary crystallographic data for stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed. *J Mol Biol.* 225:561-64
- Slayden, R.A.; Barry, 3rd C.E.** (2002) The role of KasA and KasB in the biosynthesis of meromycolic acids and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 82(4/5):149-160.
- Slayden, R.A.; Lee, R.E.; Armour, J.W.; Cooper, A.M.; Orme, I.M.; Brennan, P.J.; Besra, G.S.** (1996) Antimycobacterial action of thiolactomycin: an inhibitor of fatty acid and mycolic acid synthesis. *Antimicrob Agents Chemo.* 40: 2813-2819.
- Snapper, S.B.; Melton, R.E.; Mustafa, S.; Klesser, T.; Jacobs, W.R. Jr.** (1990) Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 4:1911-1919.
- Sridharan, S.; Wang, L.; Brown, A.; Dover, L.G.; Kremer, L.; Besra, G.S.; Sacchettini, J.C.** (2007) X-ray structure of *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl Acyl Carrier Protein Synthase II (*mtKasB*). *J Mol Biol.* 366 (2): 469-480.
- Stover, C.K.; de la Cruz, V.F.; Fuerst, T.R.; Burlein, J.E.; Benson, L.A.; Bennett, L.T.; Bansal, G.P.; Young, J.F.; Lee, M.H.; Hatfull, G.F.** (1991) New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 351(6326):456-460.
- Takayama, K.; Wang, C.; Besra, G.S.** (2005) Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 18(1): 81-101.
- Udwadia, Z.F.; Amale, R.A.; Ajbani, K.K.; Rodrigues, C.** (2011) Totally Drug-Resistant Tuberculosis in India *Clinical Infect Dis Advance Access CID* 2011:0.
- Van Kessel, J.C.; Hatfull, G.F.** (2007) Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature methods* 4(2): 147-152.
- Van Kessel, J.C.; Hatfull, G.F.** (2008) Efficient point mutagenesis in mycobacteria using single-stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets. *Mol Microbiol.* 67(5):1094-1107.

- Van Kessel, J.C.; Hatfull, G.F.** (2008) Mycobacterial recombineering. *Methods Mol Biol.* 435:203-15.
- Vannelli, T.A.; Dykman, A.; Ortiz de Montellano, P.R.** (2002) The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. *J Biol Chem.* 277(15):12824-12829.
- Velayati, A.A.; Reza Masjedi, M.; Farnia, P.; Tabarsi, P.; Ghanavi, J.; ZiaZarifi, A.H.; Hoffner, S.E.** (2009) Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant Tuberculosis Bacilli Super Extensively Drug-Resistant Tuberculosis or Totally Drug-Resistant Strains in Iran. *CHEST* 136:420-425.
- Veyron-Churlet, R.; Guerrini, O.; Mourey, L.; Daffe, M.; Zerbib, D.** (2004) Protein-protein interactions within the Fatty Acid Synthase-II system of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for mycobacterial viability. *Mol Microbiol.* 54:1161-1172.
- Veyron-Churlet, R.; Molle, V.; Taylor, R.C.; Brown, A.K.; Besra, G.S.; Zanella-Cléon, I.; Fütterer, K.; Kremer, L.** (2009) The *Mycobacterium tuberculosis* β -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III Activity Is Inhibited by Phosphorylation on a Single Threonine Residue. *J of Biol Chem.* 284(10): 6414-6424.
- 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(17):12714-12725.
- Vincent Lévy-Frébault, V.; Portaels, F.** (1992) Proposed Minimal Standards for the Genus *Mycobacterium* and for Description of New Slowly Growing *Mycobacterium* Species. *Internat J of Systemat Bacteriol.* 42(2):315-323.
- Walker, R. W.; Barakat, H.; Hung J.G.C.** (1970) The positional distribution of fatty acids in the phospholipids and triglycerides of *Mycobacterium smegmatis* and *M. bovis* BCG. *Lipids* 5: 684-691.

Watanabe, M.; Aoyagi, Y.; Mitome, H.; Fujita, T.; Naoki, H.; Ridell, M.; Minnikin, D.E. (2002) Location of functional groups in mycobacterial meromycolate chains; the recognition of new structural principles in mycolic acids. *Microbiol.* 148: 1881-1902.

Watkins, W.M.; Mungai, M.; Muhia, D.K.; Mberu, E.K.; Gathua, S. (1996) Cutaneous hypersensitivity reactions to thiacetazone, HIV infection and thiacetazone concentrations in plasma. *Br J Clin Pharmacol* 41: 160-162.

Winder, F.G.; Collins, P.B.; Whelan, D. (1971) Effects of ethionamide and isoxyl on mycolic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* BCG. *J. Gen Microbiol.* 66: 379-380.

Johlik, D.P.; Wolfgang, K. (1994) *Zinsser Microbiología* 20a edición. Editorial médica panamericana, Buenos Aires.

World health organization (WHO). (2012) Global tuberculosis report Factsheet. <http://www.who.int/tb>.

World health organization (WHO). (2013) HIV-Associated TB Facts. http://www.who.int/hiv/topics/tb/tbhiv_facts_2013/en/.

Yuan, Y.; Lee, R.E.; Besra, G.S.; Belisle, J.T.; Barry, 3rd C.E. (1995) Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 92: 6630-6634.

Yuan, Y.; Barry, 3rd C.E. (1996) A common mechanism for the biosynthesis of methoxy and cyclopropyl mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 12828-12833.

Zhang, Y.; Heym, B.; Allen, B.; Young, D.; Cole, S. (1992) The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 358:591-593.