



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

TESIS DE DOCTORADO

“Caracterización molecular de los factores involucrados en la regulación de la biosíntesis de ácidos micólicos en *Mycobacterium tuberculosis*”

Presentada por Lic. María Julia Lara

Rosario, Santa Fe, Argentina
- 2017 -

Caracterización molecular de los factores involucrados en la regulación de la biosíntesis de ácidos micólicos en *Mycobacterium tuberculosis*

Licenciada en Ciencias Biológicas María Julia Lara –Universidad Nacional de Luján

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Fisiología y Genética de Actinomycetes del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), dependiente de CONICET y de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2013 y el 3 de febrero de 2017, bajo la dirección del Dr. Hugo Gramajo y codirección de la Dra. Gabriela Gago.

Director Dr. Hugo Gramajo

Codirector Dra. Gabriela Gago

Dra. Andrea E. Villarino

Dr. Andrés Binolfi

Dra. Natalia Gottig

Defendida

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral fueron dados a conocer en la siguiente publicación y presentaciones en reuniones científicas:

Publicación:

Cabruja M, Mondino S, Tsai YT, Lara J, Gramajo H, Gago G. (2017) "A conditional mutant of the fatty acid synthase unveils unexpected cross talks in mycobacterial lipid metabolism". *Open Biol.* **7**: 160277.

Reuniones científicas:

2012 - VIII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Cristalografía, (AACr). Santa Fe, Argentina. "Structural characterization of a transcriptional regulator of mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Lara, Julia; Salzman, Valentina; Diacovich, Lautaro; Gago, Gabriela, Gramajo, Hugo.

2012 - Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, (SAIB). Centro de Congresos y Exposiciones, Mendoza. Argentina. "Characterization of a transcriptional regulator of mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*". Lara, Julia; Tsai, Yi Ting; Diacovich, Lautaro, Gago, Gabriela, Gramajo, Hugo.

2013 - IX Congreso de Microbiología General, (SAMIGE). Rosario, Santa Fe, Argentina. "Structural characterization of MabR and FasR, the transcriptional regulators

of mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*". Lara, Julia; Diacovich, Lautaro; Gago, Gabriela, Gramajo, Hugo.

2013 - IX Reunión Anual de la Asociación Argentina de Cristalografía, (AACr). Córdoba, Argentina. "Structural study of the transcriptional regulators MabR and FasR from *Mycobacterium tuberculosis*: control of fatty acid biosynthesis and lipid homeostasis". Lara, Julia; Diacovich, Lautaro; Gago, Gabriela, Gramajo, Hugo.

2013 - 8th International conference on Lipid Binding Protein, (LBP). La Plata, Buenos Aires, Argentina. "Regulatory network in mycobacteria: key role of long chain acyl-CoAs". Lara, Julia; Tsai, Yi Ting; Mondino, Sonia; Salzman, Valentina; Gago, Gabriela; Gramajo, Hugo.

2014 - VII Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis, (SLAMTB). Canela, RS-Brasil. "Understanding fatty acid biosynthesis regulation at the molecular level". Julia Lara, Sonia Mondino, Lautaro Diacovich, Nicole Larrieux, Alejandro Buschiazzo, Gabriela Gago, Hugo Gramajo.

2014 - L Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular, (SAIB). Rosario, Santa Fe, Argentina. "Long chain Acyl-CoAs as effector molecules: understanding the transcriptional regulatory network in *Mycobacteria*". Julia Lara, Sonia Mondino, Lautaro Diacovich, Gabriela Gago, Hugo Gramajo.

2016 - XII Reunión Anual de la Asociación Argentina de Cristalografía, (AACr).

San Luis, Argentina. "Understanding the fatty acid biosynthesis regulation: structural characterization of FasR". Julia Lara, Sonia Mondino, Lautaro Diacovich, Nicole Larrieux, Alejandro Buschiazzo, Gabriela Gago, Hugo Gramajo.

2016 - VIII Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis, (SLAMTB). Rosario, Santa Fe, Argentina. "Caracterización estructural de FasR: el regulador transcripcional de la biosíntesis de ácidos grasos de *Mycobacterium tuberculosis*". Julia Lara, Sonia Mondino, Lautaro Diacovich, Nicole Larrieux, Alejandro Buschiazzo, Gabriela Gago, Hugo Gramajo.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, los doctores Hugo Gramajo y Gabriela Gago, por estar siempre ahí cuando los necesité, sin importar el día de la semana u horario que fuera. Gracias por el apoyo y la enseñanza. Gracias a ambos, por su confianza desde el principio, su ayuda y sus conocimientos, sin los cuales no hubiera sido posible llevar a cabo este trabajo de tesis. Gracias al Dr. Lautaro Diacovich, mi tercer director, que aunque extraoficial siempre estuvo dispuesto a brindarme sus conocimientos y consejos, autor de la frase “la estructura de FasR es una auténtica peluca Luis XV”. Gracias a Anita y a Tato por su siempre buena predisposición para ayudarme. Gracias a Alejandro Buschiazzo porque también me padeció, gracias por la claridad y calidad explicativa, por hacer que algo, sumamente difícil como es la resolución de una estructura cristalográfica, parezca “sencillo”.

Gracias a ustedes, amigos y confidentes del laboratorio, dadores de abrazos, cebadores expertos de mates lavados y fríos, proveedores de tortas, facturas y picadas. No solo fueron cinco años de compartir el trabajo diario en el laboratorio, sino también las risas, las salidas, los viajes de congreso, las tardes en el parque y las noches en las que es preferible dormir con miedo. Gracias a los que estuvieron desde el principio, Meli, Santi, Simón, Ber, Gasti, Cabru, Ale, gracias por los súper abrazos, el pelito (y la edición de esta tesis), la pesada, la cebollita, La Mostro. Gracias por ser mis amigos, por el día a día, por el ¿cómo estás hoy? Y el ¡cómo estás hoy! Y a los que vinieron después, pero que ya se convirtieron en personas muy importantes para mí, los que me sacan una sonrisa ni bien llego al laboratorio, los que me esperan siempre con sus brazos extendidos para demostrarme un cariño que realmente me hace muy feliz, Papa, Agos, Barbi, Tuty, Tomasito (aunque ya no te tengamos entre nosotros), Delfi, La Julia, Aye y Martu.

A mis viejos, gracias por todo; la fuerza, el empuje, el amor, las palabras, los abrazos, la enseñanza y la vida. Aunque no estén cerca, ellos siempre se las arreglan para que yo sienta que si lo están.

Finalmente, quiero agradecer a Walter por soportarme cada día, porque aunque se ponga más nervioso que yo cuando parece que no llego a las fechas de entrega, es el que me acompaña cada día y me hace feliz.

Gracias a todos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 MICOBACTERIAS	1
1.2 TUBERCULOSIS Y LA NECESIDAD DE NUEVAS DROGAS	2
1.3 <i>M. TUBERCULOSIS</i>: MORFOLOGIA, ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA ENVOLTURA CELULAR	5
1.3.1 NATURALEZA DE LA ENVOLTURA DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	5
1.3.1.1 Membrana plasmática	7
1.3.1.2 Pared celular	7
1.3.1.3 La cápsula	9
1.4 SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN MICOBACTERIAS	11
1.5 REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN BACTERIAS.....	15
1.6 ANTECEDENTES SOBRE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS SISTEMAS FAS I Y FAS II EN <i>M. TUBERCULOSIS</i>.	24
1.7 REGULADORES TRANSCRIPCIONALES COMO BLANCO PARA NUEVAS DROGAS.....	27
1.8 OBJETIVOS GENERALES.....	29
<u>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</u>	<u>31</u>
2.1 CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS.....	31
2.2 MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO.....	35
2.3 TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i>	37
2.4 MANIPULACIÓN DE ADN Y CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS.....	38
2.4.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	38
2.4.2 TRATAMIENTO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN	39
2.4.3 ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA	39
2.4.4 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.....	39
2.4.5 SECUENCIACIÓN DE NUCLEÓTIDOS Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS	40
2.4.6 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE <i>E. COLI</i>	40
2.4.7 CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS	40
2.4.8 ENSAYOS DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL.....	42

2.5 ENSAYO DE TRANSCRIPCIÓN <i>IN VITRO</i>	43
2.6 ANÁLISIS DE INTERACCIÓN MOLECULAR POR SPR	47
2.6.1 DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE AFINIDAD EMPLEANDO SPR.....	47
2.6.2 INMOVILIZACIÓN DE PROTEÍNA AL CHIP PARA ENSAYOS DE UNIÓN DIRECTA	51
2.6.3 CONDICIONES DE UNIÓN FASR _{MT} -ACIL-COAS.....	51
2.6.4 INMOVILIZACIÓN DEL ADN AL CHIP	52
2.6.5 CONDICIONES DE UNIÓN ADN-FASR _{MT}	53
2.7 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	53
2.7.1 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	53
2.7.2 DOSAJE DE PROTEÍNAS Y SDS-PAGE.....	55
2.7.3 CRIBADO DE CONDICIONES DE SOLUBILIDAD DE PROTEÍNAS	56
2.7.4 ANÁLISIS PREDICTIVO EN FUNCIÓN DE ESTRUCTURA LA PRIMARIA DE LAS PROTEÍNAS.....	57
2.8 CRISTALIZACIÓN DE PROTEÍNAS	58
2.8.1 ENSAYO DE PRE-CRISTALIZACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE PROTEÍNA.....	60
2.9 DIFRACCIÓN DE RAYOS X, RESOLUCIÓN DE ESTRUCTURAS Y REFINAMIENTO	61
2.9.1 COLECTA DE DATOS.....	62
2.9.2 PROCESAMIENTO DE DATOS.....	63
2.9.3 REDUCCIÓN DE LOS DATOS.....	64
2.9.4 RESOLUCIÓN DE LA ESTRUCTURA 3D	65
2.10 ANÁLISIS ESTRUCTURALES	65
<u>3. RESULTADOS</u>	<u>67</u>
3.1 CAPÍTULO I ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN FASR_{MT}-LIGANDO Y FASR_{MT}-ADN	68
3.1.1 INTRODUCCIÓN.....	69
3.1.1.1 FasR _{MT} y su modelo de regulación transcripcional.....	69
3.1.2 OBJETIVOS.....	73
3.1.3 RESULTADOS	73
3.1.3.1 Análisis cinético de la interacción Proteína-Ligando.....	73
3.1.3.2 Análisis cinético de la interacción Proteína-ADN	83
3.1.3.3 Influencia del Acil-CoA sobre la interacción ADN-FasR _{MT}	90

3.1.3.4 Caracterización in vitro del modelo de regulación de FasR _{MT}	92
3.1.4 DISCUSIÓN.....	95
3.2 CAPÍTULO II CARACTERIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE FasR_{MT}	100
3.2.1 INTRODUCCIÓN.....	101
3.2.1.1 Esquema para la producción y determinación estructural y funcional de proteínas.	102
3.2.1.2 FasR _{MT} es un activador transcripcional de la familia TetR	106
3.2.2 OBJETIVO	109
3.2.3 RESULTADOS	109
3.2.3.1 Características generales y análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de la proteína FasR _{MT}	109
3.2.3.2 Expresión, purificación y optimización de las condiciones de cristalogénesis de las diferentes formas de la proteína FasR _{MT}	113
3.2.3.3 Estudios estructurales y funcionales.....	124
3.2.3.3.1 Cristalización	124
3.2.3.3.2 Difracción, colecta y procesamiento de los datos	127
3.2.3.3.3 Resolución de estructuras y refinamiento	131
3.2.3.3.4 Análisis y validación de los datos.	134
3.2.3.3.4.1 Análisis global de las estructuras de FasR _{33MT} y FasR _{33MT} -C ₂₀ -CoA.	134
3.2.3.3.4.2 Diferencias entre las estructuras de FasR _{33MT} y FasR _{33MT} -C ₂₀ -CoA: interpretación de las consecuencias de la unión del ligando efector.	140
3.2.3.3.5 Validación funcional y estructural.....	144
3.2.4 DISCUSIÓN.....	147
<u>4. CONCLUSIONES.....</u>	<u>157</u>
<u>5. RESUMEN</u>	<u>161</u>
<u>6. BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>163</u>

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AG	Arabinogalactano
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
AM	Ácidos micólicos
Ap	Ampicilina
BLASTP	Basic Local Alignment Search Tool in Proteins
Cm	Cloranfenicol
CME	Crio-microscopía electrónica
CM5	Carboximetil-dextrán de cadena larga
CoA	Coenzima A
cpm	Cuentas por minuto
DAT	Diacil-trehalosa
DC	Dicroísmo circular
DE	Desvío estándar
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DO ₆₀₀	Densidad óptica (Abs a 600 nm)
DO	Densidad óptica
EDC/NHS	N-hidrosuccinimida
ETH	Etionamida
FAS	Ácido graso sintasa
GPL	Glicopeptidolípidos
Hyg	Higromicina
HTH	Hélice - Giro - Hélice (<i>Helix-Turn-Helix</i>)
INH	Isoniacida
Km	Kanamicina
IPMONT	Instituto Pasteur de Montevideo
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosido
K _d	Constante de disociación
LAM	Lipoarabinomanano

LB	Luria Bertani
LM	Lipomanano
LOS	Lipooligosacáridos
M & M	Materiales y Métodos
MDR-TB	Tuberculosis multiresistente
MPD	2-metil-2,4-pentanodiol
nt	Nucleótidos
PAT	Pentacil-trehalosa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDIM	Tiocerol dimicocerosato
PEG	Polietilenglicol
PEI	Poli(etil)enimida
<i>Pfas</i>	Promotor del operón <i>fas-acpS</i>
PG	Peptidoglicano
PIMs	Fosfatidilinositol manósidos
PGL	Fenolglicolípidos
p/v	Peso en volumen
R	Resistente
RU	Unidades de resonancia (<i>Resonance units</i>)
RI	Repeticiones invertidas
RMN	Resonancia magnética nuclear
SB	Super Broth
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SL	Sulfolípidos
SPR	Resonancia Plasmónica de Superficie
TAGs	Triacilglicéridos
TB	Terrific broth
TB	Tuberculosis
Tc	Tetraciclina

TDM	Dimicolato de trehalosa
TLM	Tiolactomicina
TMM	Monomicolato de trehalosa
Tris	N-tris-(hidroximetil) aminometano
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen en volumen
XDR-TB	Tuberculosis extremadamente resistente
2YT	2x Triptona extracto de Levadura
3D	Tres dimensiones

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Micobacterias

El género *Mycobacterium* contiene más de 120 especies reconocidas hasta el momento, muchas de ellas descritas en los últimos años, incluyendo principalmente organismos patógenos de humanos y animales [1]. Dentro del taxón *Actinomycetes*, la familia *Mycobacteriaceae* forma un grupo monofilético con las familias *Corynebacteriaceae* y *Nocardiaceae*, el cual contiene a todos los organismos productores de ácidos micólicos, siendo el género *Mycobacterium* el más extensamente estudiado por su implicancia médica [2]. Filogenéticamente, los miembros de este grupo pertenecen al dominio *Bacteria*, con alto contenido en G+C en su ADN, desde 53% para algunas especies de *Corynebacterium* hasta 70% para especies de *Nocardia*. Las micobacterias presentan un contenido de G+C cercano al 65%. Desde el punto de vista de los requerimientos atmosféricos algunas micobacterias son actinomicetes aerobios y otros microaerófilos, son ácido-alcohol resistente como consecuencia de su compleja pared celular rica en lípidos, que forman bacilos rectos o ligeramente curvos de 3 a 5 μm de longitud. La separación del género *Mycobacterium* en dos grupos principales en función de la velocidad de crecimiento de sus especies, constituye la base de la taxonomía micobacteriana. A pesar de no respetar exactamente esta división, la mayoría de las especies de crecimiento lento (tiempo de duplicación de ~ 24 h), como *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium bovis* están asociadas o son las causantes de enfermedades en humanos o animales. En consecuencia, la mayoría de las especies de crecimiento rápido (tiempo de duplicación de ~ 3 h), tal como *Mycobacterium smegmatis*, las cuales son comúnmente saprófitas de vida libre, son consideradas no patógenas. Sin embargo,

este escenario no debería conducir a una subestimación de la patogenicidad de estas micobacterias, especialmente en huéspedes inmunocomprometidos [3].

1.2 Tuberculosis y la necesidad de nuevas drogas

Las micobacterias son agentes de enfermedades infecciosas que han acompañado al hombre a lo largo de su historia. La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por especies del género *Mycobacterium*. El agente etiológico más representativo de esta enfermedad es *M. tuberculosis*, identificada por primera vez como una especie patógena por Robert Koch en 1882, de allí su denominación como bacilo de Koch [4]. Poco tiempo después que Robert Koch descubriera a *M. tuberculosis*, fueron identificadas otras micobacterias, constituyendo el grupo de las micobacterias atípicas. El hallazgo de estas últimas estuvo vinculado por años a la colonización transitoria o contaminación de muestras clínicas, pero es a partir de 1950 que se les ha asignado un rol en determinadas patologías; por ejemplo, *Mycobacterium avium complex*, agente causal de una enfermedad pulmonar muy diseminada en pacientes inmunocomprometidos.

Desde un punto de vista histórico evolutivo, existen evidencias de TB desde el neolítico, pero es a partir de la revolución industrial donde la enfermedad adquiere carácter endémico, debido a una mayor aglomeración de la población en las urbes, lo cual facilitó su diseminación. Desde 1945, con el descubrimiento de las drogas antituberculosas, la utilización del examen radiológico de tórax y la implementación de programas estrictos de control de diagnóstico y tratamiento, se logró una disminución de la incidencia de tuberculosis, lo que hizo pensar a principios de la década de 1980 en una posible erradicación de la enfermedad para el año 2010. Pero a partir de 1985, la TB

comienza a emerger en los países desarrollados en tasas que no se veían desde hacía 20 años [5]. Los factores postulados para explicar esta reemergencia de la enfermedad son varios:

- El compromiso del sistema inmune en los individuos infectados con el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), que permite tanto una reactivación de una antigua infección, como un aumento de la susceptibilidad a una nueva infección.
- Cambios sociales: aumento del índice de pobreza, hacinamiento.
- Falla en los sistemas de control de la salud pública.
- Emergencia de bacilos tuberculosos multirresistentes a las drogas.
- Escasa asignación de recursos para la investigación de nuevas drogas, nuevos métodos diagnósticos y vacunas.

M. tuberculosis forma un complejo junto con otras especies, caracterizado por la alta conservación de sus genomas [6]. El complejo *M. tuberculosis* comprende varias especies: *M. tuberculosis*, el agente causal de la mayoría de los casos de TB humana; *Mycobacterium africanum*, responsable de la TB humana en el África sub-Sahariana; *Mycobacterium microti*, el agente causal de la TB en el ratón de campo; *M. bovis*, capaz de infectar una amplia variedad de especies de mamíferos incluyendo humanos; y *Mycobacterium canettii*, una variante raramente encontrada pero capaz de infectar humanos [7]. Otras especies patógenas son *Mycobacterium leprae*, agente causal de lepra, una enfermedad granulomatosa crónica de la piel y nervios periféricos [8] y *Mycobacterium ulcerans*, que provoca la aparición de úlceras en la piel conocidas como úlceras de Buruli [9].

La TB es predominantemente una enfermedad pulmonar, representando el 70% de los casos; sin embargo *M. tuberculosis* puede diseminarse a otros órganos, incluyendo los

nódulos linfáticos, huesos y meninges, provocando una enfermedad extrapulmonar (tuberculosis miliar o extra pulmonar) en 10-42% de los pacientes, dependiendo de la edad, estado inmune y grupo étnico [10], [11]. El contagio ocurre por vía aérea cuando un individuo enfermo de tuberculosis pulmonar expulsa bacterias a través de la tos, el estornudo o la salivación. Si bien basta con que una persona inhale unos pocos bacilos para quedar infectada, en general, una baja proporción de los individuos infectados desarrollan la forma activa de la enfermedad. La mayoría de los individuos son asintomáticos y mantienen la infección en una forma latente. Los informes estadísticos estiman que entre el 5-10% de éstos desarrollará la forma activa de la TB durante el transcurso de su vida, fenómeno denominado reactivación o tuberculosis postprimaria. Este riesgo de reactivación es mucho mayor para las personas cuyo sistema inmune está deprimido, como ocurre en casos de personas infectadas con el VIH, desnutrición, diabetes mellitus o abuso de drogas, alcohol o tabaco [12]. El impacto de la TB a nivel mundial sigue siendo extremadamente elevado. En la República Argentina se notifican alrededor de 13.000 nuevos casos cada año. La pobreza, la marginalidad y el hacinamiento que experimenta gran parte de la población del país constituyen un obstáculo en la lucha contra esta enfermedad, al igual que la imposibilidad de implementar los llamados tratamientos directamente observados o DOTS, que garantizan el cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes. Por todo esto, y teniendo en cuenta la continua aparición de cepas multirresistentes (MDR-TB) y extremadamente resistentes (XDR-TB), es necesario el desarrollo de nuevas drogas que sean efectivas contra estas cepas y que puedan reducir los tiempos y la complejidad de las terapias actuales [13]. Para esto es necesario profundizar el conocimiento de aspectos claves del metabolismo necesarios tanto para la viabilidad como para la patogenicidad de *M. tuberculosis*.

1.3 *M. tuberculosis*: MORFOLOGIA, ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DE LA ENVOLTURA CELULAR

La morfología característica de esta bacteria suele ser bacilar y ligeramente curvada. Como todas las células procariotas, las micobacterias poseen un citoplasma, la membrana celular y un espacio periplásmico que lo separa de una gruesa y compleja pared celular. A continuación se describirán las particularidades de estas estructuras en *M. tuberculosis*, las cuales son útiles para diferenciarlo de otras bacterias.

1.3.1 Naturaleza de la envoltura de *M. tuberculosis*

La envoltura bacteriana provee protección y soporte a las bacterias y también posee mecanismos que permiten el intercambio de sustancias entre la bacteria y el medio ambiente. *M. tuberculosis* tiene un metabolismo complejo, siendo capaz de modularlo en respuesta a los diferentes cambios ambientales [14]. El éxito de este patógeno se debe en gran medida a su notable capacidad para sobrevivir en el huésped infectado, donde puede persistir durante varias décadas; siendo su inusual pared celular un factor clave en esta supervivencia [15]. Su compleja envoltura celular le confiere algunas ventajas, como ser la resistencia a la desecación y una gran impermeabilidad, lo que le proporciona una resistencia intrínseca a la mayoría de los antibióticos de uso general y a los agentes quimioterapéuticos. Numerosas drogas utilizadas actualmente en el tratamiento contra la TB están dirigidas a enzimas involucradas en la síntesis de componentes esenciales de la pared celular de *M. tuberculosis*, como isoniazida (INH), etionamida (ETH), tiolactomicina (TLM) y triclosán. Además, existe una contribución de la envoltura celular en el proceso infeccioso y en la persistencia de *M. tuberculosis*, que

proviene en gran medida de la capacidad de algunos complejos lipídicos asociados a la pared de actuar en la modulación de la respuesta inmune del huésped, generando mecanismos de inmunoevasión [16].

El contenido lipídico de la envoltura celular de las micobacterias representa hasta un 40% de su peso seco, siendo responsable de su crecimiento agrumado en medio líquido y de sus propiedades de tinción ácido-alcohol resistente. La envoltura celular micobacteriana (Figura 1), está compuesta por una membrana plasmática, similar a la presente en otras bacterias, rodeada por una compleja pared rica en carbohidratos y lípidos, la cual a su vez se encuentra rodeada por una estructura denominada cápsula, rica en polisacáridos y proteínas [17].

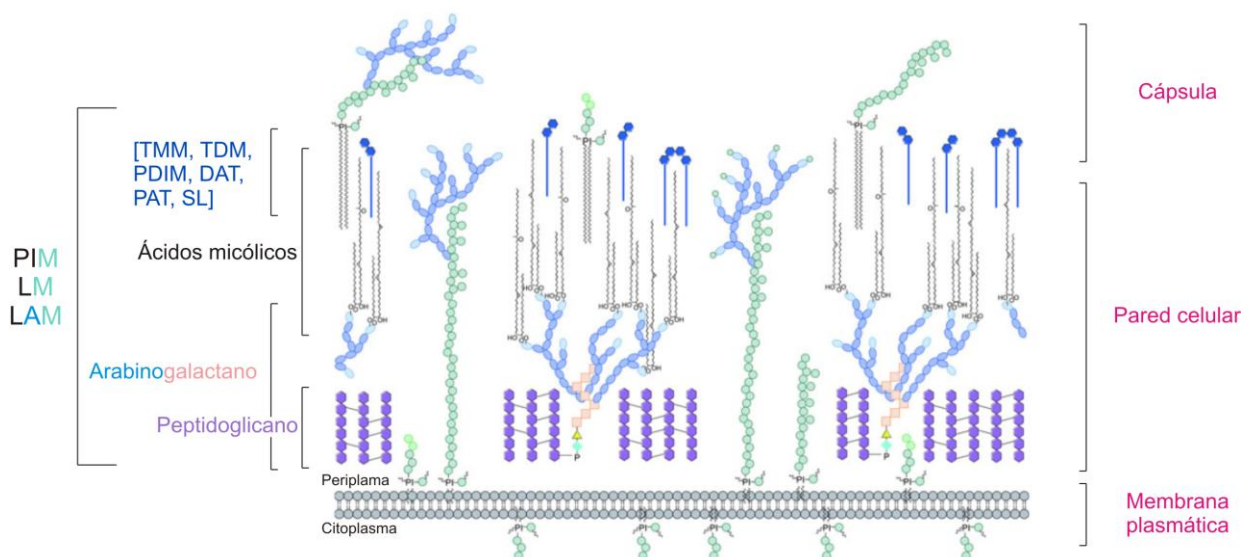


Figura 1. Representación esquemática de la compleja envoltura celular de *M. tuberculosis*. Se muestran los ácidos micólicos (AM, en negro) unidos covalentemente a la capa de arabinogalactano, a su vez unida al peptidoglicano (violeta) por una unión fosfodiéster. En la capa de arabinogalactano, los residuos de galactofuranosa se muestran en rosa y los restos de arabinofuranosil en azul. En los acilglicolípidos, que se muestran en color azul, los ácidos micólicos pueden estar unidos al arabinano, o a trehalosa para formar monomicolato de trehalosa (TMM), con un solo AM y trehalosa dimicolato (TDM), con dos AM. El lipoarabinomano (LAM, arabinofuranosil en azul y manopiranosil en verde) se encuentra

tanto en la membrana externa como en la membrana plasmática, al igual que el lipomanano (LM). Además se muestran los fosfolípidos derivados de ácido fosfatídico (PIM), tiocerol dimicocerosato (PDIM), trehalosas aciladas como diacil- y pentacil-trehalosas (DAT y PAT) y sulfolípidos (SL). Figura adaptada de Abrahams K. 2016 *et al* [18].

1.3.1.1 Membrana plasmática

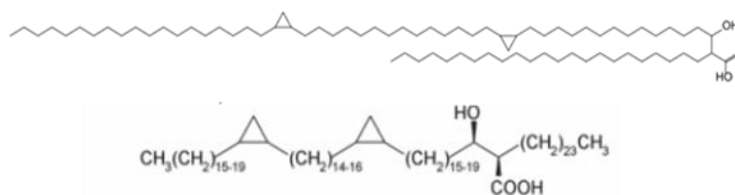
La membrana plasmática de las micobacterias aparece en cortes ultrafinos como una membrana biológica trilaminar clásica, es decir, dos capas electrodensas separadas por una capa transparente. Sin embargo, tiene como característica la presencia de fosfolípidos derivados del ácido fosfatídico, como por ejemplo fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol y sus manósidos (PIMs). Los PIMs son exclusivos de actinomicetes, siendo componentes principales de la membrana plasmática de las micobacterias y donde actúan como lípidos basales de anclaje para lipoarabinomanano (LAM) y lipomanano (LM). Forman así una bicapa asimétrica con los PIMs en la cara exterior, dándole a esta cara un grosor extra que se observa por microscopía electrónica [19], [20].

1.3.1.2 Pared celular

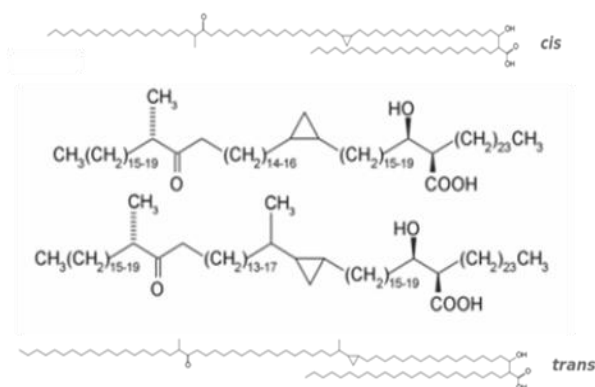
En los libros de texto de microbiología, las micobacterias se clasifican como bacterias Gram-positivas. Sin embargo, está bien documentado que las micobacterias, a diferencia de otras bacterias Gram-positivas, han desarrollado una pared celular muy compleja, lo que proporciona una barrera de permeabilidad extraordinariamente eficaz a los compuestos nocivos, haciendo que las micobacterias sean intrínsecamente resistentes a muchos fármacos [21]. Esta pared celular está compuesta por una capa interna de peptidoglicanos (PG) cuya estructura es similar a la de otras bacterias; una capa media,

más ancha que la anterior, compuesta por polisacáridos, el arabinogalactano (AG), cuyos extremos distales están esterificados con ácidos grasos de alto peso molecular, los ácidos micólicos (AM). Los AM son ácidos grasos α -alquil β -hidroxilados muy largos, formados por una cadena carbonada principal, conocida como ácido meromicólico, y una cadena lateral α . Las micobacterias presentan los ácidos micólicos (C₇₀-C₉₀) y las cadenas laterales α más largas (C₂₂-C₂₆) que se conocen en la naturaleza. Cada especie de micobacteria tiene una composición característica, y esta distinción se ha empleado para la identificación y clasificación de las distintas especies [22]. En la Figura 2 se muestran las distintas clases de AM que se encuentran en *M. tuberculosis*. Los AM son responsables de algunas de las características distintivas de las micobacterias, como la resistencia a daños químicos, resistencia a deshidratación, baja permeabilidad a antibióticos hidrofóbicos, virulencia [23]-[24], tinción ácido-alcohol resistente [25] y la habilidad de persistir en el hospedador [26].

α Micolatos



Cetomicolatos



Metoximicolatos

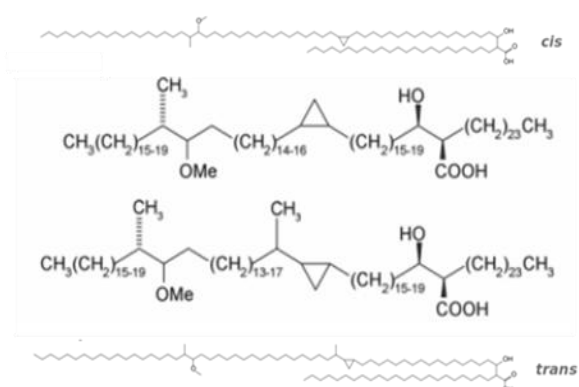


Figura 2. Estructuras químicas de ácidos micólicos de *M. tuberculosis*. Existen cinco formas de ácidos micólicos en *M. tuberculosis*. Ambos anillos de ciclopropano en α -Micolatos tienen la configuración *cis*. Los ácidos metoxi y ceto-micólicos pueden tener la configuración *cis* o *trans* en el anillo proximal de ciclopropano. Se muestran dos tipos de representación, se puede observar que tienen una cadena larga denominada meromicolato con sustituyentes y una cadena carbonada lateral α más corta.

1.3.1.3 La cápsula

En la cápsula de las micobacterias, existe una gran variedad de lípidos de estructuras inusuales en forma de lípidos libres; que no forman parte del polímero de PG-AG unidos covalentemente con AM, pero que están asociados a éste y que se han denominado lípidos extraíbles [15], [27]. Las principales clases, comprenden a los glicolípidos con trehalosas aciladas, los cuales se clasifican en: fenolglucolípidos (PGL), glicopeptidolípidos (GPL) y lipooligosacáridos (LOS) [28]. El PGL tiene una porción

sacarídica altamente inmunogénica y está presente en las cepas patógenas de micobacterias. Estas moléculas le proporcionan propiedades antigénicas en la cápsula de *M. tuberculosis* y se asocian con la patogénesis de la TB; por esa razón se utilizan en el serodiagnóstico de la enfermedad [29], [30].

Los GPL son antígenos muy abundantes en la cápsula, presentan diferencias antigénicas entre especies de micobacterias. Están compuestas por moléculas de fenol-tiocerol esterificado con dos ácidos grasos multimetilramificados (micocerósico o tioceránico) y, a diferencia de todos los anteriores, los residuos sacarídicos están O-metilados y asociados a la morfología lisa de algunas cepas de micobacterias. Tienen un papel importante en la supervivencia intracelular de las micobacterias. Se ha observado *in vivo* e *in vitro* que los GPL inhiben la proliferación de células mononucleadas estimuladas con mitógenos [30].

Los LOS son aquellos constituidos por ácidos grasos de cadena larga con un núcleo sacarídico de poliacil trehalosa y un alto contenido de manosa. La cantidad y tipo de residuos de carbohidratos dan lugar a una variedad de LOS capsular, siendo antigénicamente diferentes [28]. Estas diferencias en los residuos sacarídicos tienen valor taxonómico y diagnóstico.

Otros componentes abundantes e importantes en la cápsula son las ceras, como el tiocerol dimicocerosato (PDIM), trehalosas aciladas como diacil- y pentacil-trehalosas (DAT y PAT), la trehalosa dimicolato (TDM), y sulfolípidos (SL). Cada especie micobacteriana presenta clases y variantes características. La TDM representa el lípido extraíble más abundante, granulogénico y significativamente tóxico de la envoltura celular de *M. tuberculosis* [31],(Figura 3).

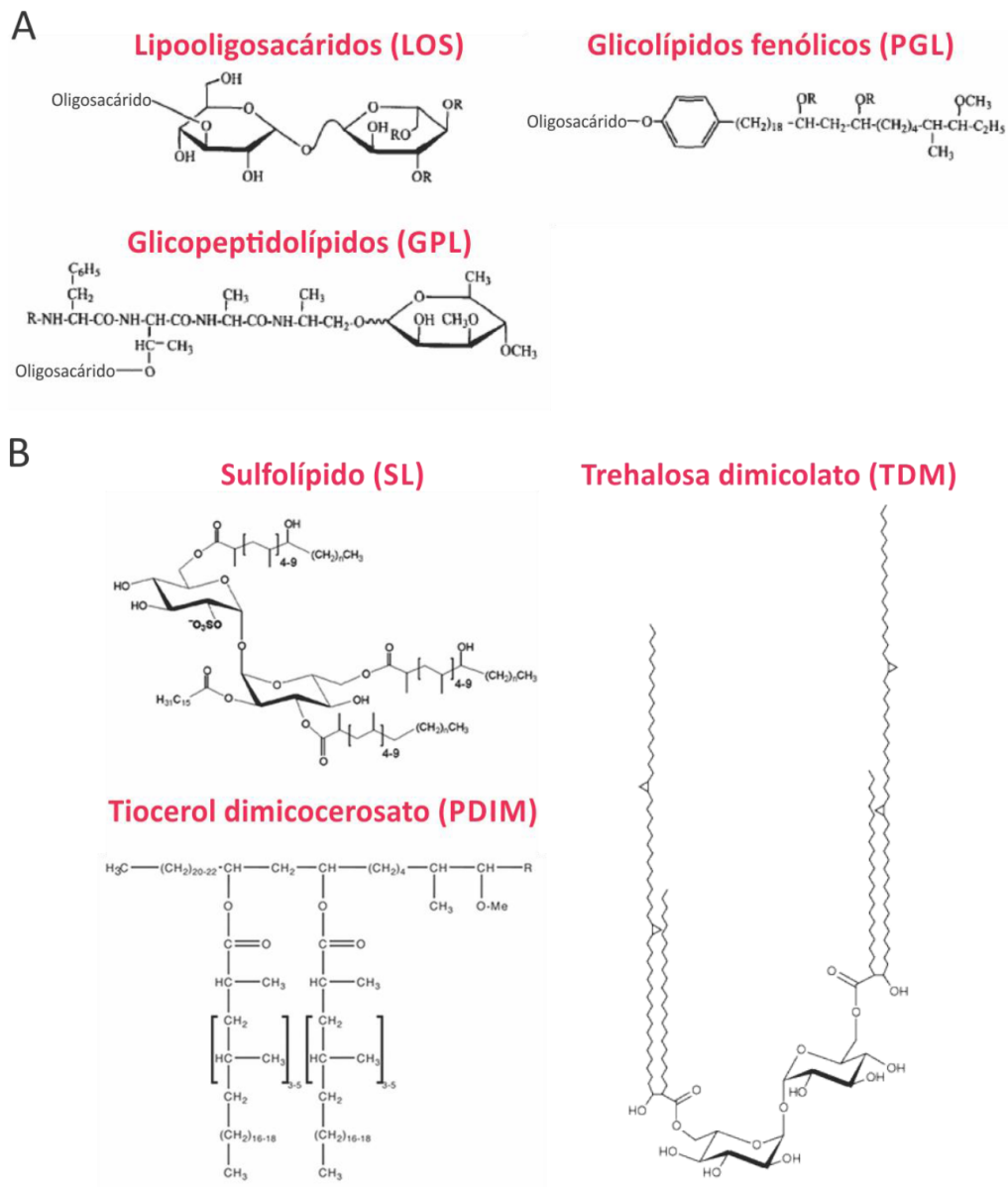


Figura 3. Lípidos extraíbles de micobacterias. A) Estructuras genéricas de las tres clases principales de glicolípidos extraíbles de la pared celular micobacteriana. B) Ejemplos de algunos lípidos extraíbles de *M. tuberculosis*.

1.4 Síntesis de ácidos grasos en micobacterias

A pesar de la extensa literatura disponible acerca de la biosíntesis, estructura y función biológica de los principales componentes de la pared celular de *M. tuberculosis*

[32], se sabe muy poco sobre los mecanismos que permiten a este microorganismo modular y adaptar la composición de su pared celular en respuesta a los cambios ambientales. Por lo tanto, el estudio de los procesos que regulan la biosíntesis y composición de su pared celular es un paso crucial hacia la comprensión de la fisiología y la fisiopatología de este patógeno, así como también de las interacciones entre las micobacterias y su entorno en general.

Los AM, que son los mayores constituyentes de esta cubierta protectora, continúan siendo el centro de numerosas investigaciones, fundamentalmente porque una de las enzimas involucradas en su síntesis, la enoil-ACP reductasa *InhA*, es el blanco de acción de la isoniacida (INH), una de las drogas más efectivas y específicas contra *M. tuberculosis* [33].

La biosíntesis de los AM en micobacterias involucra dos sintasas de ácidos grasos diferentes denominadas FAS I y FAS II [32]. Los genes que codifican para las enzimas del sistema FAS II se ubican en diferentes regiones del cromosoma, organizados en tres unidades independientes. La primera está formada por los genes *fabD-acpM-kasA-kasB-accD6*; la segunda tiene dos genes, *mabA-inhA*; y la tercera cuenta con tres genes, *hadA, hadB, hadC* [34], [35]. Pawelczyk y colaboradores [36] demostraron que los genes *fabD, acpM, kasA, kasB* y *accD6* forman un operón, al que denominamos operón *fasII* (Tabla 1). El gen *fas* que codifica para la sintasa FAS I, similar a la presente en eucariotas, también forma parte de un operón, el operón *fas-acpS*, siendo el gen *acpS* el que codifica para la enzima responsable de la modificación postraduccional (fosfopanteteinilación) necesaria para la activación de AcpM o del dominio ACP presente en FAS I.

Tabla 1. Genes y enzimas de los sistemas FAS de micobacterias.

Operón putativo	Proteína	Actividad enzimática
<i>Operón fasII</i> <i>fabD-acpM-kasA-kasB-accD6</i>	FabD	Malonil-CoA:ACP transacilasa
	AcpM	Proteína transportadora de acilos
	KasA	β -cetoacil-ACP sintasa
	KasB	β -cetoacil-ACP sintasa
	AccD6	Subunidad carboxiltransferasa de la ACCasa 6
<i>mabA-inhA</i>	MabA	β -hidroxiacil-ACP reductasa
	InhA	Enoil-ACP reductasa
<i>hadA-hadB-hadC</i>	HadA/B	Hidroxil-acil-deshidratasa
	HadB/C	Hidroxil-acil-deshidratasa
<i>Operón fas-acpS</i> <i>fas-acpS</i>	Fas	Sintasa de ácidos grasos
	AcpS	Fosfopanteteiniltransferasa

La sintasa de ácidos grasos multidominio FAS I, elonga grupos acetilo mediante la condensación de dos unidades de carbono, utilizando acetyl-CoA y malonil-CoA como sustratos para dar butiril-S-Enzima. Las elongaciones subsiguientes a partir de este compuesto C₄ llevan a la producción de C₁₆- y C₁₈-S-Enzima que luego son liberados como acil-CoAs y utilizados primariamente para la síntesis de fosfolípidos de membrana. Experimentos bioquímicos han demostrado que la síntesis de acil-CoAs mediada por FAS I tiene un comportamiento “bimodal” y en presencia de polisacáridos de membranas estas enzimas son estimuladas para producir acil-CoAs de cadena más larga [37]. *M. tuberculosis* por ejemplo, produciría más específicamente C₂₆-S-Enzima, que sería liberado también como éster de CoA y posteriormente activado mediante una carboxilasa específica para ser convertido finalmente en la cadena α -alquilo del AM. El sistema FAS I en micobacterias puede sintetizar acil-CoAs de cadena media y larga. En experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* se ha demostrado que FAS I produce un perfil

característico entre C₁₆ y C_{24/26} acil-CoAs (según la especie), siendo los más abundantes C₁₆, C₁₈ y C_{24/26}, seguido de C₂₀ y C₂₂. Esta “bimodalidad” de FAS I no sería solamente una propiedad intrínseca de la proteína, sino que además, estaría determinada también por factores externos que tendrían influencia en el proceso de elongación de estos ácidos grasos, como fue demostrado *in vivo* mediante el intercambio de FAS I de *M. smegmatis* que produce C₂₄-S-Enzima por FAS I de *M. tuberculosis* [38], [39]. Los sistemas FAS I y FAS II están conectados por una enzima clave: la β-cetoacil-ACP sintasa III o FabH. Esta enzima cataliza la condensación de malonil-ACP con los acil-CoA producidos por FAS I [16]. El producto de esta condensación, un cetoacil-ACP de cadena mediana, es el sustrato inicial del sistema FAS II. Luego de los pasos de reducción por la β-cetoacil-ACP reductasa MabA [40], deshidratación por el complejo HadABC [35], y reducción por la enoil-ACP reductasa InhA; KasA y KasB catalizan la condensación con unidades de malonil-ACP, en el ciclo de FAS II propiamente dicho [41], [42] El producto de FAS II, un ácido graso de cadena muy larga denominado meromicolato, es finalmente activado por una acil-AMP ligasa antes de ser condensado finalmente por la PKS 13 para dar el AM maduro [43], (Figura 4).

Como puede deducirse, la interacción entre los sistemas enzimáticos FAS I y FAS II, es fundamental para mantener un fino balance metabólico (homeostasis) entre la síntesis de los ácidos grasos de membrana y los AM de la envoltura celular. Es importante resaltar que estos microorganismos presentan un nivel adicional de complejidad que proviene de la capacidad de las micobacterias de utilizar también los acil-CoAs de cadena media generados por FAS I para la síntesis de triacilglicéridos (TAGs), compuestos de almacenamiento presentes en micobacterias y otros actinomicetes [44].

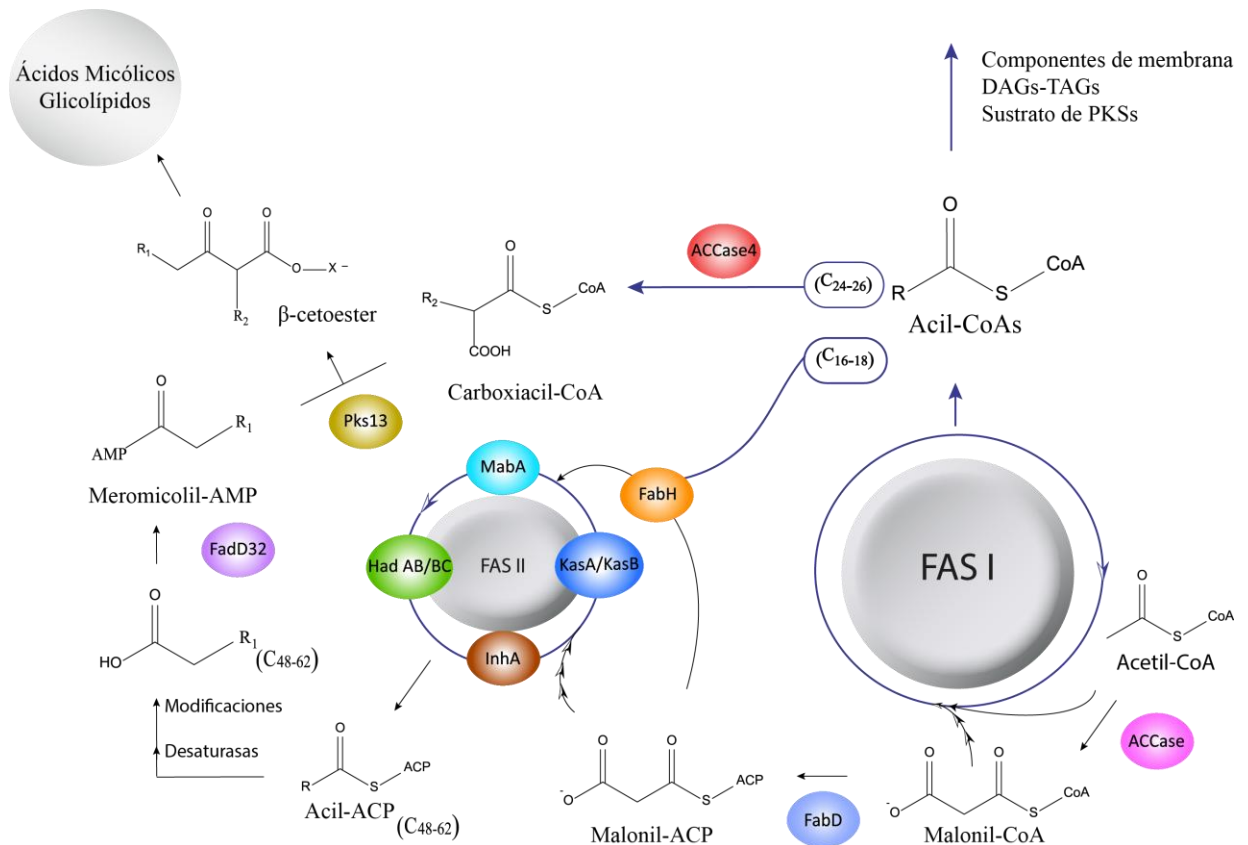


Figura 4. Representación esquemática de la vía de síntesis de los ácidos micólicos. La biosíntesis de los precursores de los ácidos micólicos requiere dos sintasas de ácidos grasos: FAS I y FAS II. Los pasos de la síntesis de ácidos micólicos se encuentran detallados en el texto.

1.5 Regulación transcripcional de la síntesis de ácidos grasos en bacterias.

La biosíntesis de ácidos grasos es esencial para el crecimiento bacteriano, siendo un componente fundamental de la red metabólica celular ya que proporciona los precursores esenciales (acil-CoAs) para la formación de la membrana y la pared celular. Dado que la biosíntesis de ácidos grasos es esencial y energéticamente costosa, los organismos han desarrollado mecanismos homeostáticos para mantener la

concentración de lípidos altamente regulada [45]. Aunque se ha avanzado mucho en los últimos años, la mayor parte de los modelos de regulación de la síntesis de ácidos grasos han sido propuestos para los organismos modelos *Escherichia coli* [46] y *Bacillus subtilis* [47], [48]. Estos mecanismos de regulación involucran tanto un control bioquímico de las enzimas claves (respuesta rápida) así como también la regulación de la transcripción de los genes involucrados. Han sido identificados cinco reguladores transcripcionales, tres de ellos, FadR y FabR de *E. coli* y DesT de *Pseudomonas aeruginosa*, que ajustan los niveles de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de la membrana, mientras que FapR de *B. subtilis* y FabT de *Streptococcus pneumoniae* son represores transcripcionales globales que controlan simultáneamente la expresión de genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos [45], [49], [50]. Sumados a estos, tres reguladores de actinomicetes han sido caracterizados en nuestro laboratorio: FasR de *Streptomyces coelicolor*, (por sus siglas en inglés, Fatty acid synthesis Regulator), aquí llamado FasR_{sc}, es un activador del operón *fab* involucrado en la síntesis de ácidos grasos destinados a fosfolípidos y triglicéridos [51], MabR de *M. tuberculosis*, involucrado en la regulación de genes de la vía de biosíntesis de ácidos micólicos [52], y por último, FasR de *M. tuberculosis* que regula la biosíntesis de ácidos grasos [53]. La actividad regulatoria de FasR se detallará más adelante, ya que es el regulador en el cual se basará este trabajo de tesis doctoral (Tabla 2).

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

Regulador	Familia	Organismos	Activación*	Represión*	Molécula señal
FadR	GntR	<i>E.coli</i>	<i>fabA-B</i>	Regulón <i>fad</i>	Acil-CoA (cadena larga)
FabR	TetR	<i>E. coli</i>	-	<i>fabA-B</i>	Acil-CoA (cadena larga)
FapR	DeorR	<i>B. subtilis</i>	-	<i>fabHI-F, fabH2, yhdO, fapR, fabI, fabD, FabG, plsX</i>	Malonil-CoA
FabT	MarR	<i>S. pneumoniae</i>	-	<i>fabT-H-acpP, fabK-D-G-accB-fabZ-accC-D-A</i>	Acil-ACP (cadena larga)
DesT	TetR	<i>P. eruginosa</i>	-	<i>desC-B, fabA-B</i>	Acil-CoA (cadena larga)
FasRsc	desconocido	<i>S. coelicolor</i>	<i>fabD-fabH-acpP-fabF</i>	-	-
MabR	desconocido	<i>M. tuberculosis</i>	<i>fabD-acpM-kasA-kasB</i>	-	-
FasR	TetR	<i>M. tuberculosis</i>	<i>fas-acpS</i>	-	Acil-CoA (cadena larga)

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

El factor de transcripción mejor caracterizado es FadR (por sus siglas en inglés, Fatty acid degradation Repressor) de *E. coli*. FadR fue identificado en principio como un represor de la transcripción de genes involucrados en el transporte, activación y β -oxidación de los ácidos grasos [46], [54]. Posteriormente se demostró que esta proteína regula también la biosíntesis de ácidos grasos insaturados (AGI), actuando como activador transcripcional de los genes *fabA* (β -hidroxidecanoil-ACP deshidratasa/isomerasa) y *fabB* (β -cetoacil-ACP sintasa I) [55], [56]. Sólo dos reacciones, catalizadas por FabA y FabB, son específicamente requeridas para producir

AGI durante el transcurso de la biosíntesis de ácidos grasos en *E. coli* [57]. De las dos hidroxilacil-ACP deshidratasas involucradas en esta ruta biosintética (FabA y FabZ), FabA se restringe a sustratos de diez átomos de carbono, y no sólo cataliza el paso de deshidratación del hidroxidecanoil-ACP, sino que también es capaz de isomerizar el doble enlace en el intermediario *trans*-2-decenoil-ACP a *cis*-3-decenoil-ACP, constituyendo el primer paso en la vía de síntesis de AGI. Posteriormente, FabB elonga el *cis*-3-decenoil-ACP producido y a través de sucesivos pasos de elongación resulta en la producción de AGI [58], (Figura 5 A).

La unión de FadR a su sitio operador en el ADN está regulada por la presencia de acil-CoAs de cadena larga (de 12 a 18 átomos de carbono) y las funciones como activador o represor pueden ser explicadas en función de la localización de su sitio operador en la zona promotora de los genes que regula. Cuando no hay ácidos grasos largos disponibles en el medio de cultivo, FadR permanece unido a sus sitios operadores reprimiendo la transcripción de los genes de la β -oxidación (regulón *fad*) y activando los genes de la biosíntesis de ácidos grasos (*fabA* y *fabB*). Por el contrario, cuando hay ácidos grasos exógenos de cadena larga disponibles en el medio, estos son captados por *E. coli* y convertidos en acil-CoAs. Ha sido demostrado que moléculas de acil-CoAs de cadena larga tanto saturadas como insaturadas se unen a FadR provocando un cambio conformacional que disocia al regulador de su sitio de unión en el ADN. En consecuencia, se desreprimen los genes del regulón *fad* y se inhibe la expresión de los genes biosintéticos *fabA* y *fabB*. La regulación mediada por FadR permite entonces optimizar el metabolismo de ácidos grasos en respuesta a la disponibilidad de estos compuestos en el medio ambiente [46], [54], [55].

FabR (por sus siglas en inglés, Fatty acid biosynthesis Repressor) es un represor que controla la expresión de los genes *fabA* y *fabB* de *E. coli*. La expresión de estos genes

debe estar estrictamente co-regulada para asegurar una correcta relación entre AGI y ácidos grasos saturados (AGS), lo cual determina la estabilidad y fluidez de la membrana [57]. Mientras que FadR tiene su mayor influencia sobre la expresión de *fabA*, FabR tiene un efecto más pronunciado sobre la expresión de *fabB* [59]. La regulación por FabR se encuentra modulada por la proporción de AGI y AGS exógenos de cadena larga, que ingresan a la célula y son convertidos a sus ésteres de CoA. Se postula que moléculas de AGI-CoA de cadena larga inducen un cambio conformacional que aumenta la afinidad de unión de FabR por la región promotora de *fabB*, y en menor medida de *fabA*, mientras que la unión a moléculas de AGS-CoA disminuyen la afinidad del regulador por sus sitios operadores [59], [60]. Mediante experimentos *in vitro* pudo observarse que este mismo efecto era provocado también por los derivados acil-ACPs de los AGI y AGS (AGI-ACP y AGS-ACP). Sin embargo, experimentos *in vivo* utilizando una cepa de *E. coli* Δ *fadR*, y un inhibidor específico de FabA, demuestran que los niveles de expresión de *fabB* y *fabA* no se ven afectados en esta cepa, a pesar del bloqueo de la síntesis de los AGI (en ausencia de AGI exógenos) y la continua síntesis de AGS-ACPs. Esto indicaría que FabR no censa la concentración de AGI-ACPs *in vivo*, sino que su principal función es la de reportar la presencia de AGI exógenos (como sus derivados AGI-CoAs) al promotor de *fabB*. En consecuencia, FadR y FabR actúan de manera concertada para balancear la producción de AGI y AGS en *E. coli* (Figura 5 B).

DesT es un regulador transcripcional de *P. aeruginosa* que controla la expresión de los operones *desCB* y *fabAB*, implicados en las vías aeróbicas y anaeróbicas de biosíntesis de AGI respectivamente. El operón *desCB* codifica para los componentes de una acil-CoA Δ 9 desaturasa dependiente de oxígeno, que introduce dobles enlaces en la posición 9 de los acil-CoAs que derivan de ácidos grasos exógenos. Mientras que la principal vía de síntesis de AGI en *P. aeruginosa* involucra a FabA, ésta se ve

suplementada por la acción de la desaturasa dependiente de oxígeno DesB [61]. *P. aeruginosa* capta ácidos grasos exógenos y una vez convertidos en sus respectivos tioésteres de CoA son incorporados a los fosfolípidos de membrana. Dado que la membrana de esta bacteria normalmente presenta una mayor proporción de AGI respecto a los AGS, niveles elevados de AGS extracelulares tienen el potencial de alterar la homeostasis de la membrana. De esta manera, DesT censa la composición de los ácidos grasos exógenos bajo la forma de sus derivados acil-CoAs, y ajusta la expresión de sus genes blanco para asegurar que la célula no se vea sobrecargada de AGS. DesT une AGI-CoAs y AGS-CoAs prácticamente con igual afinidad, y al igual que FabR, DesT es un represor bacteriano atípico que censa la relación AGI:AGS en lugar de la concentración de un ligando acil-CoA, como es el caso de FadR. En condiciones normales de crecimiento, DesT alterna entre su forma libre y unida al ADN, y existe un nivel de transcripción basal del operón. En presencia de AGS, los AGS-CoAs derivados interaccionan con DesT bloqueándolo en una conformación que impide su interacción con el ADN, desreprimiendo así la expresión de los genes *desCB* y *fabAB*. La acumulación de AGI-CoAs en la célula y su unión a DesT provoca un cambio conformacional que promueve la unión de este regulador a sus secuencias operadoras con mayor afinidad que en ausencia del ligando, reprimiendo la expresión de estos dos operones [61]–[63], (Figura 5 C).

FabT (por sus siglas en inglés, Fatty acid biosynthesis Transcriptional regulator) es un represor de los genes *fab/acc* de *Streptococcus pneumoniae* y otras bacterias Gram-positivas, perteneciente a la superfamilia de reguladores MarR. En este patógeno, los doce genes requeridos para la biosíntesis de ácidos grasos están ubicados en la misma región cromosómica, organizados en dos operones. El segundo gen de uno de los operones codifica para el regulador transcripcional FabT, el cual controla la composición

de los ácidos grasos de membrana mediante la regulación de la expresión de los genes *fab* (excepto *fabM*, que codifica para la isomerasa del sistema FAS II y está involucrada en la biosíntesis de AGI) [64]. La afinidad de FabT por sus sitios de unión en el ADN está regulada por acil-ACPs, productos del sistema FAS II. Si bien FabT une acil-ACPs de distinta longitud de cadena con aproximadamente la misma afinidad, sólo los acil-ACPs de cadena larga (>14 carbonos) inducen un cambio conformacional en FabT aumentando su afinidad por el ADN. El regulador censa de esta manera los niveles de acil-ACPs disponibles para la producción de fosfolípidos y en consecuencia regula la transcripción de los genes biosintéticos [65], (Figura 5 D).

FapR (por sus siglas en inglés, Fatty acid and phospholipid biosynthesis Regulator) es un represor transcripcional global de bacterias Gram-positivas como *B. subtilis* o *Staphylococcus aureus* que controla la expresión del regulón *fap*, formado por genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos (*fab*) y fosfolípidos (*pls*) [50]. La disminución de los niveles intracelulares de malonil-CoA, una molécula esencial para la elongación de los ácidos grasos, inhibe la expresión de los genes del regulón *fap*. Esto se debe a que la unión directa y específica de malonil-CoA al dímero FapR provoca un cambio conformacional que libera al represor de su sitio de unión en el ADN. De esta manera, la expresión de los genes de la ruta biosintética responde a los niveles de un sustrato de la vía, constituyendo un mecanismo diferente a la regulación por producto evidenciada para los reguladores anteriormente descritos [49], [66]. La observación de la inhibición de la acetil-CoA carboxilasa de *E. coli*, responsable de la síntesis de malonil-CoA, por acil-ACPs de cadena larga podría dar un indicio de cómo la regulación mediada por FapR estaría acoplada a la síntesis de acil-ACPs. En este sentido, la acumulación de los productos de la vía FAS II podrían llevar a una inhibición en la síntesis de malonil-CoA y la consecuente unión de FapR a sus secuencias operadoras. De esta manera, FapR

estaría censando el estado de la biosíntesis de ácidos grasos y ajustando consecuentemente la expresión de los genes de esta vía [67], [68], (Figura 5 E).

En nuestro laboratorio hemos realizado un análisis bioinformático exhaustivo sobre las diferentes bases de datos de genomas de actinomicetes y encontramos que estos microorganismos carecen de reguladores homólogos a los previamente caracterizados. Esto no nos resultó sorprendente ya que, si bien en la mayoría de las bacterias los ácidos grasos producidos se utilizan para la síntesis de los fosfolípidos de membrana, los actinomicetes pueden dirigirlos también hacia la síntesis de otros componentes celulares como lípidos estructurales complejos (por ejemplo, ácidos micólicos o PDIM) o lípidos de almacenamiento (TAGs), lo que añade un nivel más alto de sofisticación a la regulación de la homeostasis de lípidos en estos microorganismos.

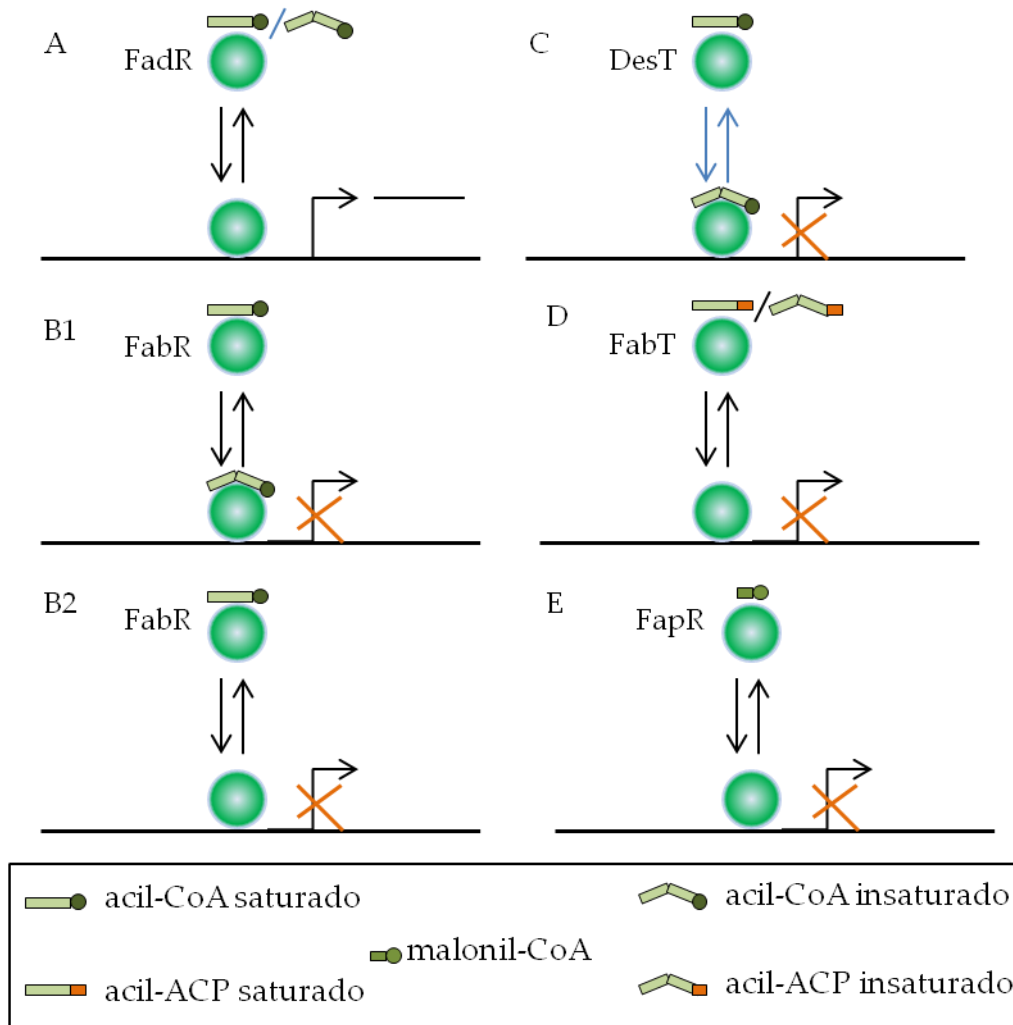


Figura 5. Regulación transcripcional de la biosíntesis de lípidos en bacterias. A) FadR activa los genes *fabA* y *fabB* de *E. coli* en ausencia de acil-CoA de cadena larga. **B)** FabR de *E. coli* reprime los genes *fabA* y *fabB* **B1)**, la unión a acil-CoAs insaturados de cadena larga aumenta su afinidad por el ADN **B2)**; acil-CoAs saturados disminuyen su afinidad por sus sitios de unión. **C)** DesT censa la composición de acil-CoAs de cadena larga intracelular en función de reprimir la transcripción de los operones *fabAB* y *desCB* de *P. aeruginosa*. **D)** FabT regula la transcripción de todos los genes *fab*, excepto *fabM* en *S. pneumoniae*, la unión a acil-ACP disminuye la afinidad por sus sitios de unión en el ADN. **E)** FapR reprime los genes que forman el regulón *fap* en *B. subtilis*, el aumento de malonil-CoA induce la expresión de los genes.

1.6 Antecedentes sobre la regulación transcripcional de los sistemas FAS I y FAS II en *M. tuberculosis*.

Las micobacterias son inusuales dentro de las bacterias, ya que contienen dos sistemas que participan en la biosíntesis de ácidos grasos [32]. El sistema FAS I es el responsable de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, mientras que el sistema FAS II, si bien es similar a otros sistemas bacterianos, posee una diferente especificidad en la cadena iniciadora, ya que sólo es capaz de elongar los acil-CoAs de cadena media-larga producidos por FAS I [32] para proveer las largas cadenas de meromicolatos presentes en los ácidos micólicos.

A pesar de la relevancia de la co-existencia de los dos sistemas en micobacterias, tanto por su rol en la síntesis de los ácidos grasos de membrana y de los ácidos micólicos, como por ser el blanco de poderosas drogas antituberculosas, es muy poco lo que se sabe acerca de cómo se regula el funcionamiento de estas dos rutas biosintéticas y cuáles serían las señales regulatorias que permiten la correcta interacción entre ambos sistemas metabólicos. **Hace ya algunos años, en nuestro laboratorio nos propusimos estudiar cómo se regulan a nivel transcripcional los sistemas de síntesis de ácidos grasos y ácido micólicos en micobacterias y caracterizar cuál es la señal a la cual responden.**

La transcripción de genes que codifican para componentes de rutas multienzimáticas es regulada frecuentemente en respuesta a la disponibilidad de cofactores, precursores, intermediarios o productos de la misma ruta metabólica. Es de esperar que compuestos, incluyendo drogas, que selectivamente inhiben una enzima de la ruta y causan la acumulación de precursores y la depleción de productos, induzcan selectivamente cambios en la transcripción de genes que codifican enzimas involucradas en la vía

metabólica afectada. La disponibilidad de la secuencia genómica completa de *M. tuberculosis* permitió analizar mediante el uso de microarreglos [69], [70] y de proteómica cuantitativa [71], cuáles eran los transcriptos o proteínas inducidas en cultivos, luego de tratar a este microorganismo con INH, un poderoso inhibidor de la síntesis de ácidos micólicos. Ambos estudios demostraron que la inhibición de la síntesis de ácidos micólicos induce marcadamente la transcripción del operón *fasII*, o la síntesis de las proteínas codificadas por este operón. Resultados similares se obtuvieron cuando se trataron los cultivos de *M. tuberculosis* con etionamida, otro inhibidor de InhA utilizado como antibiótico de segunda línea para el tratamiento de la tuberculosis. Este paralelismo en la respuesta transcripcional de *M. tuberculosis* como consecuencia al tratamiento con INH o etionamida, sugiere fuertemente que el mismo es una respuesta característica del proceso celular afectado, independientemente de la droga utilizada. Además de la inhibición de la síntesis de los ácidos micólicos, la INH origina también una acumulación de acil-ACPs (C₂₄ a C₂₆), que presumiblemente refleje el punto en el cual la síntesis de estos ácidos micólicos es interrumpida por el antibiótico. Se podría especular que estas moléculas serían la señal metabólica que dispararía la transcripción de los genes del complejo FAS II a través de su interacción con un regulador transcripcional. Más recientemente, mediante el uso de microarreglos, se informó que el tratamiento con INH también es capaz de inducir la transcripción del gen *fas* de *M. tuberculosis*, sugiriendo que podrían existir señales metabólicas comunes en la regulación de ambos sistemas de sintasas de ácidos grasos [72].

Una búsqueda bioinformática sobre el genoma de numerosas especies del género *Mycobacterium* nos llevó a identificar un regulador putativo, codificado por el gen *Rv2242* en *M. tuberculosis*, ubicado corriente arriba del operón *fasII*. En una publicación de nuestro laboratorio se ha reportado la identificación y caracterización bioquímica y

funcional de este nuevo regulador transcripcional de *M. tuberculosis*, denominado MabR (Mycolic acid biosynthesis Regulator), al que llamaremos MabR_{MT}. Los resultados obtenidos por nuestro grupo demostraron que el factor de transcripción MabR_{MT} regula la expresión del sistema FAS II mediante la unión a una repetición invertida de 21 pb presente en la región promotora del operón *fasII*, modulando de esta manera la biosíntesis de ácidos micólicos [52], (Figura 4). Además, alterando los niveles de expresión de MabR_{MT} observamos que no sólo se ve afectada la producción de ácidos micólicos sino que también se altera la expresión del gen *fas* (que codifica para el sistema FAS I) y por lo tanto la biosíntesis de ácidos grasos. Estos resultados proporcionaron la primera evidencia de la existencia de una regulación coordinada entre los dos sistemas de sintasas de ácidos grasos presentes en micobacterias.

Más recientemente, en nuestro laboratorio se ha caracterizado un factor transcripcional de *M. tuberculosis* denominado FasR (Fatty acid synthase Regulator), al que llamaremos FasR_{MT}. Este regulador es capaz de reconocer específicamente la región promotora del operón *fas-accS*. Se determinó que esta proteína dimérica es un activador transcripcional esencial de la síntesis de ácidos grasos en *M. smegmatis*, que regula la expresión de los genes del operón *fas-accS* mediante su unión a la región promotora de ese operón en dos regiones diferenciadas, localizadas a 169 pb y 320 pb corriente arriba del inicio de la transcripción del gen *fas* (Figura 6); modulando de esta manera su expresión y la consiguiente biosíntesis *de novo* de ácidos grasos cuyo destino final son los fosfolípidos de membrana y los triacilglicéridos, como así también los sustratos del sistema FAS II para producir los ácidos micólicos [53]. Además, a partir de una mutante de FasR_{MT} en *M. tuberculosis*, hemos demostrado que la disminución de FasR_{MT} genera una cepa notablemente afectada en su virulencia (estudios aún no publicados).

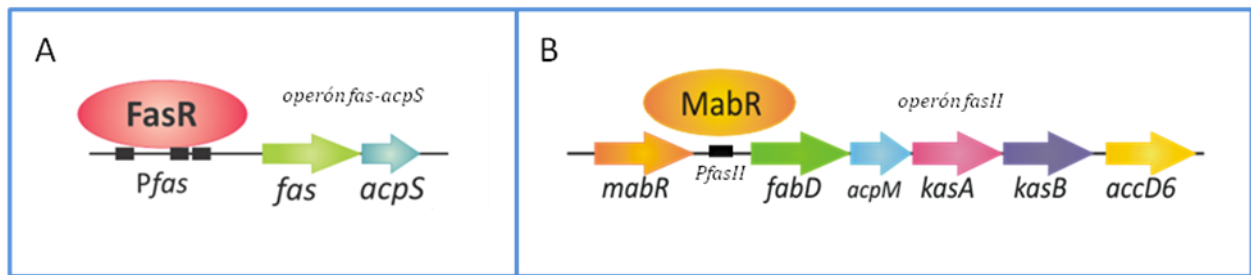


Figura 6. Esquema de regulación de la expresión de los genes de los operones *fas-acpS* y *fasII*.

A) FasR_{MT} se une a la región promotora de operón *fas-acpS* y **B)** MabR_{MT} se une a la región promotora del operón *fasII*, regulando los genes de cada operón, respectivamente.

Los resultados obtenidos con estos reguladores, llevaron a plantearnos la hipótesis de que **los sistemas FAS I y FAS II deben estar estrictamente co-regulados a nivel transcripcional con el fin de mantener la homeostasis en la síntesis de lípidos en micobacterias, y que la interrupción o perturbación de esta coordinación resultaría en un organismo severamente comprometido en su viabilidad y/o virulencia.** Por lo tanto, las proteínas reguladoras implicadas en dicha regulación podrían ser un nuevo blanco para el desarrollo de agentes antimicobacterianos con un novedoso mecanismo de acción.

1.7 Reguladores transcripcionales como blanco para nuevas drogas.

Como se mencionó en la primera parte de la introducción, el incumplimiento de los tratamientos con antibióticos, el escaso seguimiento de los pacientes bajo medicación, la epidemia de SIDA y la aparición de cepas resistentes a las drogas comúnmente utilizadas ha llevado a que la TB se convierta en una enfermedad infecciosa de emergencia a nivel mundial. El desarrollo de nuevas clases de antibióticos ha quedado muy por detrás de la creciente necesidad de tales fármacos. Un enfoque alternativo es dirigirse a funciones

esenciales para la viabilidad de la bacteria a nivel transcripcional y sobre mecanismos esenciales para la infección, tales como los factores de virulencia o reguladores transcripcionales implicados en la biosíntesis de compuestos esenciales para la viabilidad de la bacteria. Este enfoque tiene varias ventajas potenciales que incluyen expandir el repertorio de blancos bacterianos, preservar el microbioma endógeno del huésped y ejercer una presión menos selectiva, lo que puede resultar en una disminución de la resistencia [73], [74]. En consecuencia, numerosos grupos de investigación dedicados al estudio de las micobacterias centran sus estudios en el entendimiento del metabolismo de *M. tuberculosis* y el descubrimiento de genes esenciales para su viabilidad.

En este sentido, la caracterización de posibles nuevos blancos de acción de antibióticos resulta de importancia para la búsqueda de compuestos inhibidores y el desarrollo de drogas más eficientes para su tratamiento.

El uso de reguladores transcripcionales como blancos para el desarrollo de fármacos es algo novedoso y tiene como ventajas varios aspectos, entre ellos; la baja concentración que se necesita para afectar a los reguladores, ya que se encuentran en muy baja concentración dentro de las células, por otro lado algunos de estos reguladores solo se encontrarían en las bacterias por lo que el blanco se vuelve sumamente específico contra el microorganismo.

En *M. tuberculosis* ya existen algunos casos de reguladores transcripcionales que son blancos de drogas, por ejemplo el regulador EthR. La etionamida es uno de los fármacos de segunda línea más utilizados para el tratamiento de la TB multirresistente; sin embargo la etionamida en sí misma es inactiva y requiere la activación por la monooxigenasa EthA, para generar el compuesto activo que inhibe a InhA, la enoil-ACP reductasa involucrada en la biosíntesis ácidos micólicos. La expresión de *ethA* está

controlada por el represor transcripcional EthR, miembro de la familia TetR de los reguladores transcripcionales. La inactivación de EthR conduce a la sobreexpresión de EthA y consecuentemente a la hipersensibilidad de las micobacterias a la etionamida [75]. Así los inhibidores sintéticos de EthR aumentarían la transcripción de *ethA* para mejorar la bioactivación de la etionamida y la eficacia de esta droga [76].

Otro caso es el de DosRST, el sistema de regulación de dos componentes que promueve la supervivencia de *M. tuberculosis* durante la persistencia no replicativa. La inhibición química de DosRST puede inhibir la capacidad de *M. tuberculosis* para establecer la persistencia y así acortar los tratamientos. Actualmente se está trabajando en la búsqueda de inhibidores del regulón de DosRST, los cuales bajo condiciones de hipoxia, inhiben los procesos fisiológicos asociados a la persistencia de *M. tuberculosis*, incluyendo la síntesis de triacilglicerol, la supervivencia y la tolerancia a los antibióticos [77].

Considerando que MabR_{MT} y FasR_{MT} serían esenciales para mantener la homeostasis lipídica en micobacterias, su caracterización estructural podría aportar información importante para la búsqueda racional de nuevos compuestos antimicobacterianos. Además, la determinación de su estructura tridimensional, permitiría comenzar a comprender cómo estos reguladores transcripcionales interactúan con los metabolitos efectores para modular su actividad.

1.8 Objetivos generales

El objetivo general de este proyecto es estudiar, mediante métodos estructurales los mecanismos moleculares por los cuales la proteína FasR_{MT} regula la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos con el fin de mantener la homeostasis lipídica en

micobacterias. Además, considerando que este regulador podría ser esencial para la sobrevivencia de *Mycobacterium*, un objetivo a largo plazo será considerar a esta proteína como blanco para la búsqueda de inhibidores que actúen como nuevos agentes antimicobacterianos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α [78] para los clonados de rutina y su transformación se realizó según lo descrito por Sambrook y colaboradores [79]. Las transformantes se seleccionaron en medio sólido suplementado con los antibióticos apropiados. La cepa de *E. coli* BL21 (λ DE3) es una cepa de *E. coli* B lisogénica para el bacteriófago λ DE3, un profago que expresa la ARN polimerasa T7 a partir del promotor *lacUV5* inducible con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) [80]. La cepa BL21 (λ DE3) codón Plus (Novagene), expresa además ARNts para facilitar la expresión de genes que codifican codones no habituales en *E. coli*, esta cepa es resistente al antibiótico cloranfenicol. La cepa Origami (λ DE3), derivada de *E. coli* K-12, también está lisogenizada con λ DE3 y posee además dos mutaciones, una en la tioredoxina reductasa (*trxB*) y otra en la glutatión reductasa (*gor*), lo que permite la formación de enlaces disulfuro, que usualmente son reducidos en *E. coli*. Esta cepa es resistente a los antibióticos kanamicina y tetraciclina. La cepa Rosetta (λ DE3), derivada de BL21, está diseñada para mejorar la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones raramente usados en *E. coli*. Esta cepa suministra tRNAs para los codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA, en un plásmido compatible resistente a cloranfenicol. La cepa C41 también derivada de BL21 es una cepa específica para la expresión de proteínas tóxicas o proteínas de membrana.

Las cepas, los plásmidos, los fragmentos de ADN sintético y los oligonucleótidos utilizados en este trabajo de tesis se listan en las Tablas 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

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

Cepa	Descripción	Ref.
DH5 α	<i>E. coli</i> K12 F- Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) <i>endA1 recA1 hsdR17 deoR supE44 thi-1λ- gyrA96 relA1</i>	[81]
BL21	<i>E. coli</i> B F- <i>ompT r_B⁻ m_B⁻</i> (DE3)	Novagen
BL21 codón Plus	<i>E. coli</i> B F- <i>ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) dcm+ Tetr gal (DE3) endA Hte [argU ileY leuW Cm^R]</i>	Stratagen
Origami	<i>E. coli</i> F- <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522:: Tn10 trxB (Kan^R, Tet^R)</i>	Novagen
Rosetta	<i>E. coli</i> F- <i>ompT hsdSB (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pRARE (Cm^R)</i>	Novagen
C41	<i>E. coli</i> F- <i>ompT hsdS B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) (Cm^R)</i>	Lucigen
SM07	Cepa recombinante derivada de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 que contiene integrado el gen <i>rpoC</i> con fusión a cola de 6 histidinas. (Hyg ^R)	[82]

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

Plásmido	Descripción	Ref.
Topo PCR-Blunt	Vector para el clonado de productos de PCR (Km ^R)	Invitrogen
pET24a(+)	Fagémido para la expresión de proteínas recombinantes bajo control de señales de transcripción y traducción fuertes (Km ^R lacZ)	Stratagene
pET28a(+)	Vector fagémido (Km ^R lacZ') para expresión de proteínas recombinantes bajo el promotor T7 que permite la fusión a 6 residuos de histidina N-terminales	Novagen
pFR3	pET24a(+) con el gen <i>Rv3208</i> como fusión a una cola de seis histidinas (his6) N-terminal, bajo control del promotor T7, Km ^R	[83]
pFR4	pET24a(+) con el gen <i>MSMEG_1935</i> como fusión a una cola de seis histidinas (his6) N-terminal, bajo control del promotor T7, Km ^R	[83]
pTOPO_ML0815c	Topo PCR-Blunt con el gen <i>ML0815c</i>	[83]
pHis ₉ SigA	pET24a(+) con el gen <i>Rv2703</i> como fusión a una cola de nueve histidinas (his9) N-terminal, bajo control del promotor T7, Km ^R	[84]
pTH24-TEV _{SH}	pTH24 con el gen <i>TEVS219N</i> como fusión a una cola de seis histidinas (his6) C-terminal, bajo control del promotor T7, Ap ^R	[85]

pFRtev	pET28a(+) con el gen <i>Rv3208</i> como fusión a una cola de seis histidinas (his6) N-terminal seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV, bajo control del promotor T7, Km ^R	Esta tesis
pFR33MT	pET28a(+) con el gen sintético <i>FR33MT</i> como fusión a una cola de seis histidinas (his6) N-terminal seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV, bajo control del promotor T7, Km ^R	Esta tesis
pFR43MT	pET28a(+) con el gen sintético <i>FR43MT</i> como fusión a una cola de seis histidinas (his6) N-terminal seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV, bajo control del promotor T7, Km ^R	Esta tesis
pFR33MS	pET28a(+) con el gen <i>FR33MS</i> como fusión a una cola de seis histidinas (his6) N-terminal seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV, bajo control del promotor T7, Km ^R	Esta tesis
pFR43MS	pET28a(+) con el gen sintético <i>FR43MS</i> como fusión a una cola de seis histidinas (his6) N-terminal seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV, bajo control del promotor T7, Km ^R	Esta tesis
pFR33ML	pET28a(+) con el gen <i>FR33ML</i> como fusión a una cola de seis histidinas (his6) N-terminal seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV, bajo control del promotor T7, Km ^R	Esta tesis
pFRML	pET28a(+) con el gen sintético <i>FR43ML</i> como fusión a una cola de seis histidinas (his6) N-terminal seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV, bajo control del promotor T7, Km ^R	Esta tesis
pFR_MutL	pET28a(+) con el gen sintético <i>FRML</i> como fusión a una cola de seis histidinas (his6) N-terminal seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV, bajo control del promotor T7, Km ^R	Esta tesis
pFR_MutLVL	pET28a(+) con el gen sintético <i>FRMLVL</i> como fusión a una cola de seis histidinas (his6) N-terminal seguida de un sitio de corte para la proteasa TEV, bajo control del promotor T7, Km ^R	Esta tesis

Tabla 5. Plásmidos derivados de pUC57 conteniendo fragmentos de ADN sintético utilizados en esta tesis.

ADN Sintético	Descripción	Ref.
<i>FR33MT</i>	Gen diseñado a partir de <i>Rv3208</i> de <i>M. tuberculosis H37Rv</i> que codifica para la proteína truncada FasR33MT (sin aminoácidos 2 a 34)	Esta Tesis
<i>FR43MT</i>	Gen diseñado a partir de <i>Rv3208</i> de <i>M. tuberculosis H37Rv</i> que codifica para la proteína truncada FasR43MT (sin aminoácidos 2 a 44)	Esta Tesis
<i>FR43MS</i>	Gen diseñado a partir de <i>MSMEG_1935</i> de <i>M. smegmatis mc2 155</i> que codifica para la proteína truncada FasR33MS (sin aminoácidos 2 a 44)	Esta Tesis
<i>FR43ML</i>	Gen diseñado a partir de <i>ML0815c</i> de <i>M. leprae TN</i> que codifica para la proteína truncada FasR33ML (sin aminoácidos 2 a 44)	Esta Tesis
<i>FRML</i>	Gen diseñado a partir de <i>Rv3208</i> de <i>M. tuberculosis H37Rv</i> que codifica para la proteína mutada FasR _{MT} _MUT_L/F (mutación Leu72/Phe)	Esta Tesis
<i>FRMLVL</i>	Gen diseñado a partir de <i>Rv3208</i> de <i>M. tuberculosis H37Rv</i> que codifica para la proteína mutada FasR _{MT} _MUT_LVL/F (mutación Leu72 - Val129 - Leu151 / Phe)	Esta Tesis

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados durante este trabajo de tesis.

Oligonucleótido	Secuencia	Ref.
F-Rv3208TEV	CCCTCCATATGGAAAACCTGTACTTCCAGGGTATGAGCGATCTCG CCAAG	Esta tesis
R-Rv3208	GAATTCCTACGAGCGGGTAAGCG	Esta tesis
F-FasR33MS	CGGCCGCATATGGAAAACCTGTACTTCCAGGGTCTGCCCCGCGAT GAGC	Esta tesis
R-FasR33MS	AAGCTTCTAGAGCGGCACGTGTGACAG	Esta tesis
F-FasR33ML	GATATACATATGGAAAACCTGTACTTCCAGGGTTTATCCCGCGA CAAGCGT	Esta tesis
R-FasR33ML	AAGCTTCTAAAGCGGCACATGTGACAG	Esta tesis
F-Rv3208Psite	TAGCTACTCCACCGTAACCAC	Esta tesis
F-Rv3208Psite	ATCGGATACAGGCGAGTTCTA	Esta tesis

F-Rv3208Psite1	TAGCTACTCCACCGTAACCACCTGCAC	Esta tesis
R-Rv3208Psite1	GTGCAGGTGGTTACGGTGGAGTAGCTA	Esta tesis
F-Rv3208Psite2	CGACACGGTTACCCGTACGTAGAACTCGCCAGTAACCGATCT	Esta tesis
R-Rv3208Psite2	AGATCGGTTACTGGCGAGTTCTACGTACGGGTAACCGTGTCG	Esta tesis
N2fasIMTprom	CATAACGATTTGATAACAAAACCTGC	[53]
CfasIMTprom	CACCCGGTCGTGCTCGTGGATCGTC	[53]
CfasIMT100	GAATTCTCACCAGCCATGAGGCGATC	Esta tesis
CfasIMTprom BIOTIN	CACCCGGTCGTGCTCGTGGATCGTC	[83]
F- <i>Pgyr</i>	CATATGCGGCTACAGAATCGGTGCTGTCGC	Esta tesis
R- <i>Pgyr</i>	GAATTCGTGATGGAATCGGCGCCATACTCC	Esta tesis

2.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano

A continuación se describe la composición de los medios que se utilizaron para mantener y crecer las cepas utilizadas en esta tesis.

Luria bertani (LB)

Triptona 1 %

Extracto de Levadura 0,5 %

NaCl 0,5 %

Terrific Broth (TB)

Triptona 1,2 %

Extracto de levadura 2,4 %

K_2HPO_4 17 mM

KH_2PO_4 1,417 mM

Glicerol 0,4 %

Super Broth (SB)

Triptona 3,2 %

Extracto de Levadura 2 %

NaCl 0,5 %

2x Triptona extracto de Levadura (2YT)

Bactotriptona 1,6 %

Extracto de Levadura 1,0 %

NaCl 0,5 %

Middlebrook 7H9 Difco

4,7 g polvo (0,5 g Sulfato de Amonio, 0,5 g Ácido L-Glutámico, 0,1 g Citrato de Sodio, 1 mg Piridoxina, 0,5 mg Biotina, 2,5 g Fosfato Disódico, 1 g Fosfato Monopotásico, 0,04 g Citrato de Amonio Férrico, 0,05 g Sulfato de Magnesio, 0,5 mg Cloruro de Calcio, 1 mg Sulfato de Zinc, 1 mg Sulfato de Cobre), y 900 ml H₂O.

Middlebrook 7H10 Difco

19 g polvo (0,5 g Sulfato de Amonio, 1,5 g Fosfato Monopotásico, 1,5 g Fosfato Disódico, 0,4 g Citrato de Sodio, 25 mg Sulfato de Magnesio, 0,5 mg Cloruro de Calcio, 1 mg Sulfato de Zinc, 1 mg Sulfato de Cobre, 0,5 g Ácido L-Glutámico, 0,04 g Citrato de

Amonio Férrico, 1 mg Piridoxina, 0,5 mg Biotina, 250 µg verde de malaquita, 15 g agar) y 900 ml H₂O.

Para el crecimiento de *M. smegmatis* en cultivo líquido se utilizó medio Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado con 0,2% glicerol y 0,03% Tyloxapol. Para el crecimiento en medio sólido se utilizó Middlebrook 7H10 agar (Difco) suplementado con 0,5% glicerol. Para la propagación de *E. coli* en cultivo líquido se utilizó medio LB, ST, TB o 2YT. Para su crecimiento en cultivo sólido, el mismo medio se suplementó con 2% agar.

Las cepas bacterianas se inocularon desde medio sólido en un volumen de medio de cultivo líquido que en ningún caso superó la quinta parte del recipiente. Cuando este inóculo inicial llegó a saturación (1 día para las células de *E. coli* y hasta 3-7 días para *M. smegmatis*), los cultivos fueron diluidos 1:100 en medio fresco o fueron recolectados por centrifugación. Cuando fue necesario, el medio fue suplementado con 5 µg/ml tetraciclina (Tc), 20 µg/ml cloranfenicol (Cm), 50 µg/ml kanamicina (Km), 100 µg/ml higromicina (Hyg) y 100 µg/ml ampicilina (Ap) para el mantenimiento de los plásmidos. Para el crecimiento se utilizaron baños termostatzados a 37 °C con agitación a 200 rpm.

2.3 Transformación de *E. coli*

La transformación de *E. coli* se realizó de acuerdo a Sambrook y colaboradores [79]. Las células correspondientes a 1 ml de cultivo crecido a 37 °C hasta fase logarítmica (DO₆₀₀ 0,5) se recolectaron por centrifugación (10 min, 2000 g, 4 °C) y se lavaron con 0,5 ml de Solución 1 de transformación estéril (10 mM MOPS pH 7 y 10 mM KCl). Posteriormente se resuspendieron en 0,5 ml de Solución 2 (100 mM MOPS pH 6,5, 50 mM CaCl₂, 10 mM KCl) y se incubaron 15 min a 4 °C, tras lo cual las células se

recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en 0,1 ml de Solución 2. Para la transformación se agregó 1-200 ng de ADN en un volumen menor a 10 μ l, y la mezcla se incubó 1 h a 4 °C. El choque térmico se realizó durante 1 min a 42 °C, con posterior incubación durante 2 min a 4 °C. Las células se recuperaron a 37 °C en 1 ml de medio LB durante 30 min y posteriormente se sembraron en medio LB agar con los antibióticos apropiados para la selección de las transformantes.

2.4 Manipulación de ADN y construcción de plásmidos

2.4.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l, utilizando 20 pmol de cada oligonucleótido cebador y aproximadamente 5 pmol de ADN molde. En el caso de PCR de colonia, se inoculó una colonia bacteriana en 10 μ l de agua y se incubó a 100 °C durante 5 min; 5-7 μ l del extracto resultante se utilizó como molde en la reacción de amplificación. Dependiendo de los distintos experimentos realizados, se emplearon las ADN polimerasas Taq, Pfu (PB-L, Productos Bio-Lógicos) o DeepVent (Promega), siguiendo las indicaciones del proveedor. La reacción consistió de una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min; 30 ciclos de desnaturalización (30-45 s, 94 °C), anillado (30-45 s a la temperatura apropiada según el par de cebadores empleados) y polimerización (el tiempo adecuado según el tamaño del fragmento a amplificar, 72 °C); y una extensión final de 10 min a 72 °C.

2.4.2 Tratamiento con enzimas de restricción y ligación de fragmentos de ADN.

El tratamiento del ADN con enzimas de restricción (Promega y NEB), fosfatasa alcalina y T4 ADN ligasa (Promega), se realizó según Sambrook y colaboradores [79] y siguiendo las recomendaciones de los proveedores.

2.4.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa se realizó según Sambrook y colaboradores [79]. Se utilizaron concentraciones de agarosa entre 0,7-2%, según el tamaño de los fragmentos a separar, y solución TAE (40 mM Tris-acetato pH 8, 1 mM EDTA) para la preparación y corrida de los mismos. Las muestras se mezclaron con solución de siembra (0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilenecianol y 30% glicerol) y la corrida electroforética se realizó a voltaje constante, 90 V. Los fragmentos de ADN fueron visualizados por tinción con GelGreen™ (Biotium) y visualización en un transiluminador con luz azul (excitación a 488 nm).

2.4.4 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN resultantes de las digestiones enzimáticas o de las reacciones de PCR fueron purificados con el kit GFX (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos de ADN de tamaño igual o menor a 200 pb se purificaron con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega).

2.4.5 Secuenciación de nucleótidos y análisis de secuencias

Para la determinación de la secuencia de fragmentos de ADN se utilizó el servicio de secuenciación de la Universidad de Maine (DNA Sequence Facility-UMaine, Maine, USA). El análisis de las secuencias se realizó utilizando los programas ClustalOmega [86].

2.4.6 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Los plásmidos utilizados se purificaron utilizando el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.4.7 Construcción de plásmidos

pFRtev. *fas*_{RMT} (*Rv3208*) se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv utilizando los oligonucleótidos F-Rv3208TEV que introduce un sitio *Nde*I y una secuencia (GAAAACCTGTACTTCCAGGGT) que codifica para el sitio de corte de la proteasa TEV antes del codón de inicio de la traducción del gen *fasR*, y R-Rv3208 que introduce un sitio *Eco*RI al final del marco abierto de lectura. El producto de PCR de 687 pb se clonó en el vector pCR BluntII TOPO (Invitrogen). Luego de determinar la secuencia del fragmento amplificado y para construir una fusión del gen TEV_*fas*_{RMT} a una cola de seis histidinas (*his6*) N-terminal, este se digirió con *Nde*I y *Eco*RI y se clonó dentro del plásmido de expresión pET28 (+) digerido con las mismas enzimas, dando lugar al vector pFRtev.

pFR33MT, pFR43MT, pFR43MS, pFR43ML. Los plásmidos para expresar las diferentes versiones truncadas de FasR fueron obtenidos a partir los genes sintéticos *FR33MT*, *FR43MT*, *FR43MS* y *FR43ML*. Estos fueron digeridos con las enzimas *Nde*I y

*Hind*III, y clonados en el vector de expresión pET28 (+), dando lugar a los vectores pFR33MT, pFR43MT, pFR43MS, pFR43ML. En todos los casos se introdujo la secuencia que codifica para el sitio de corte de la proteasa TEV antes del codón que codifica para el primer aminoácido de cada una de las proteínas mutantes que se deseaban expresar.

pFR33MS. Se amplificó parte del gen *MSMEG_1935* por PCR a partir del plásmido pFR4 utilizando los oligonucleótidos F-FasR33MS (5'-CGGCCGCATATGAAAACCTGTACTTC CAGGGTCTGCCCCGCGATGAGC-3') que introduce un sitio *Nde*I y una secuencia que codifica para el sitio de corte de la proteasa TEV antes del codón de inicio de la traducción del gen y R-FasR33MS (5'-AAGCTTCTAGAGCGGCACGTGTGACAG-3') que introduce un sitio *Hind*III al final del marco abierto de lectura. El producto de PCR de 576 pb se clonó en el vector pCR BluntII TOPO (Invitrogen). Una vez confirmada la secuencia del fragmento amplificado, el plásmido se digirió con *Nde*I y *Hind*III y el fragmento se clonó dentro del plásmido de expresión pET28 (+) cortado con *Nde*I y *Hind*III, dando lugar al vector pFR33MS.

pFR33ML. Se amplificó parte del gen *ML0815c* de *M. leprae* MT por PCR a partir del plásmido pTOPO_*ML0815c* utilizando los oligonucleótidos F-FasR33ML (5'-GATATACATATG GAAAACCTGTACTTCCAGGGTTTATCCCGCGACAAGCGT-3') que introduce un sitio *Nde*I y una secuencia que codifica para el sitio de corte de la proteasa TEV antes del codón de inicio de la traducción del gen, y R-FasR33ML (5'-AAGCTTCTAAAGCGGCACATGTGACAG-3') que introduce un sitio *Hind*III al final del marco abierto de lectura. El producto de PCR de 576 pb se clonó en el vector pCR BluntII TOPO (Invitrogen). Una vez confirmada la secuencia del fragmento amplificado, el

plásmido se digirió con *NdeI* y *HindIII* y el fragmento se clonó en el plásmido de expresión pET28 (+) cortado con *NdeI* y *HindIII*, dando lugar al vector pFR33ML.

pFR_MutL y pFR_MutLVL. Los plásmidos para expresar las 2 mutantes puntuales de FasR fueron obtenidos a partir los genes sintéticos *FRML* y *FRMLVL*. Estos fueron digeridos con las enzimas *NdeI* y *HindIII* y clonados en el vector de expresión pET28 (+), dando lugar a los vectores pFR_MutL y pFR_MutLVL. En todos los casos, se introdujo la secuencia que codifica para el sitio de corte de la proteasa TEV antes del codón que codifica para el primer aminoácido de cada una de las proteínas mutantes que se deseaban expresar.

2.4.8 Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en gel

Las proteínas recombinantes purificadas His₆-FasR_{MT}, FasR_{MT}, FasR_{MT}_MUT_L/F y FasR_{MT}_MUT_LVL/F, fueron utilizadas para determinar su capacidad de unión a la región promotora *Pfas* (398 y 120 pb). Los oligonucleótidos N2fasIMTprom y F-Rv3208Psite fueron marcados en su extremo 5' con [γ -³²P]-ATP (3000 Ci mmol⁻¹) usando la enzima T4 polinucleótido quinasa (Promega) y purificados usando las columnas de desalado Zeba™ Spin Desalting Columns (Pierce chemical). Los productos de PCR obtenidos empleando cada uno de estos oligonucleótidos marcados junto el oligonucleótido CfasIMTprom, fueron purificados a partir de geles de agarosa al 2% (p/v), y la actividad específica fue determinada utilizando un contador de centelleo. La sonda marcada (10.000-1.000 cpm) se incubó con diferentes concentraciones de proteína, según el caso, en un volumen final de 20 μ l en solución de unión, 25 mM Tris/HCl pH8, 5% (v/v) glicerol, 5mM MgCl₂, 150mM NaCl y 1 μ g de poly(dIdC), a temperatura ambiente durante 15 min. Cuando fue necesario, se adicionó acil-CoA a la solución de unión y se incubó con

la proteína durante 5 min a temperatura ambiente antes de la adición de la sonda marcada. Los complejos ADN-proteína se resolvieron por electroforesis en un gel no desnaturante al 6% (p/v) en 1xTBE, 5% (v/v) glicerol a 150 V a 4 °C, y se visualizaron y digitalizaron con un escáner Storm167 840 (Amersham) o Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare). Las soluciones stock de los acil-CoAs fueron preparadas a una concentración final de 10 mM utilizando ácido acético 10 mM para su disolución y fueron almacenadas a -20 °C. En el momento de su uso fueron disueltas a la concentración final deseada en solución de unión.

Para las sondas de 42 y 27 pb, pertenecientes a la región 1 y 2 de *Pfas*, primero se marcaron con γ^{32P} ATP los oligonucleótidos F-Rv3208Psite1 y F-Rv3208Psite2 como se indicó antes y una vez purificados fueron anillados con concentraciones equimolares (250 μ M) de los oligonucleótidos complementarios, R-Rv3208Psite1 y R-Rv3208Psite2, respectivamente. El anillado se realizó incubando la mezcla 5 min a 95 °C y luego bajando la temperatura muy lentamente (1 °C por minuto). Una vez que la temperatura alcanzó los 40°C, se incubó a temperatura ambiente por dos horas, luego la sonda se purificó en un gel de agarosa al 2% (p/v) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

2.5 Ensayo de transcripción *in vitro*

Para realizar el ensayo de transcripción *in vitro* se utilizó una ARN polimerasa purificada de *M. smegmatis*. El complejo holoenzimático de la ARN polimerasa, compuesto por cinco subunidades ($\alpha 2\beta\beta'\omega$), se purificó a partir de la cepa SM07 de *M. smegmatis* mc²155 que contiene el gen (RPOC) que codifica la subunidad β' de la ARN polimerasa fusionado a una cola de histidina [84]. Esto nos permitió co-purificar junto a esta subunidad las demás subunidades de la ARN polimerasa (holo-ARN polimerasa).

Para la purificación se partió de un cultivo inicial de 2 litros en fase exponencial, las células se recolectaron por centrifugación (5.000 rpm, 4 °C, 15 min), se resuspendieron en 40 ml de solución de lisis [50 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl, 10% (v/v) glicerol, 10 mM β -mercaptoetanol y 1 mM EDTA, 1 pastilla de inhibidor de proteasas (Roche)] y se lisaron por sonicación (7 pulsos, 15 s ON y 60 s OFF, 35 % de amplitud, 4 °C). Los restos celulares se clarificaron por centrifugación (15000 rpm, 4 °C, 60 min). La fracción soluble se llevó a 100 ml con solución TEGB [10 mM Tris-HCl pH 8, 0,5 mM EDTA, 10% (v/v) glicerol, 10 mM β -mercaptoetanol], seguido de una precipitación con 0,35 % de Polietilenimina (PEI). Luego de centrifugar 10 minutos a máxima velocidad y 4°C, la fracción insoluble se lavó con 20 ml de solución TEGB conteniendo 400 mM NaCl. La fracción proteica de interés se extrajo de la fracción insoluble a partir de 10 ml de solución TEGB con 1M de NaCl. Para eliminar la PEI de la fracción proteica se realizó una precipitación fraccionada con sulfato de amonio (40 % a 60 %). La fracción precipitada fue centrifugada y finalmente resuspendida con 5 ml de solución TEGB, 1 M NaCl. Tras un paso de precipitación con acetona para eliminar el sulfato de amonio de la muestra, la proteína fue purificada por cromatografía de afinidad, utilizando una columna de Ni²⁺-NTA agarosa (Qiagen), y siguiendo las instrucciones del fabricante. El extracto proteico se incubó 1 h a 4 °C con 1 ml de la resina de afinidad de Ni²⁺-NTA agarosa, equilibrada previamente con la solución B [TEGB con 600 mM NaCl y 2 mM de imidazol]. Tras el lavado de la columna con 25 volúmenes de la solución B, las proteínas se eluyeron con concentraciones crecientes de imidazol (20, 40, 60, 80, 100, y 250 mM). Cada una de las fracciones recolectadas se analizó por SDS-PAGE, donde se observó que la proteína eluyó en la fracción de 60 mM de imidazol. Aquellas fracciones que contenían la proteína pura se dializaron a 4 °C durante toda la noche, contra una solución de diálisis [20 mM

Tris-HCl pH 8, 0,5 mM EDTA, 0,1 mM DTT, 400 mM NaCl, 10% (v/v) glicerol]. Las proteínas obtenidas se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Además de la ARN polimerasa, se expresó y se purificó el factor sigma A de *M. smegmatis* mc²155 como una proteína recombinante. SigA es el factor sigma vegetativo y como tal uno es uno de los factores indispensables para la transcripción de genes esenciales por la ARN polimerasa [87]. El plásmido pHis₉SigA, cedido por el grupo del Dr. Cole (Global Health Institute, Suiza) se transformó en la cepa de *E. coli* C41 con el fin de realizar la expresión de la proteína SigA. Se partió de 500 ml de cultivo y la inducción de la expresión se realizó a DO₆₀₀ 0,8 con IPTG 0,15 mM, a 18 °C durante toda la noche. Las células se recolectaron por centrifugación, se resuspendieron en solución de lisis [50 mM Tris-HCl pH 8, 500 mM NaCl, 5% (v/v) glicerol, 10 mM β-mercaptoetanol, 0,1 mM EDTA, 5 mM imidazol y una pastilla de inhibidor de proteasas (Roche)] y la purificación se realizó siguiendo un protocolo similar al descrito para FasR_{MT}. El tampón de diálisis utilizado en este caso fue 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl y 10% (v/v) de glicerol.

Como molde para la reacción de transcripción *in vitro* se generó una sonda de 598 pb que incluye el sitio de unión de FasR_{MT} al ADN perteneciente a la región promotora del operón *fas-acpS* y 100 pb (*Pfas-fas*) corriente abajo del sitio inicio de la transcripción del gen *fas*, con el fin de poder monitorear la actividad de este regulador sobre la transcripción de este gen. Como control de la transcripción se realizó la construcción de una sonda que contiene una región promotora de 48 pb seguida de un fragmento del gen de 110 pb que codifica para una ADN girasa de *M. smegmatis* (*Pgyr-gyr*), la cual posee un promotor fuerte y es utilizada como control de la actividad de la ARN polimerasa [88]. Los fragmentos de ADN se obtuvieron mediante la amplificación por PCR a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv para *Pfas+100* (oligonucleótidos N2fasIMTprom y CfasIMT100) o de *M. smegmatis* mc²155 para *Pgyr+100*

(oligonucleótidos *F-Pgyr* y *R-Pgyr*). Los fragmentos obtenidos se purificaron empleando las técnicas descritas en 2.4.3 y 2.4.4.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l en la siguiente solución de reacción; 4 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM MgCl₂, 0,01 mM EDTA, 0,1 mM DTT y 0,5% (v/v) glicerol. Para la reacción, se preincubó por un lado la ARN Polimerasa 1,28 μ M y SigA 0,1 μ M en la solución de reacción y por otro lado FasR_{MT} (1 μ M) con o sin C₂₀-CoA (1 μ M), 5 min a 37°C. Se adicionaron los componentes en el siguiente orden: la ARN polimerasa-SigA, FasR_{MT} con o sin C₂₀-CoA, sonda de ADN molde (80nM) y por último se agregaron los cuatro rNTPs (1mM) conteniendo uno de ellos radiactivo (5 mCi [α -³²P] UTP (800 Ci/mmol)). La mezcla de reacción se incubó 10 min a 37°C. Luego se agregó UTP frío (62 μ M), se incubó 5 min más a 37°C y se cortó la reacción con 4 μ l de acetato de sodio 3M pH7.

Finalmente, el producto de reacción se sembró en un gel de poliacrilamida al 6% y 8M de Urea. El tamaño de los transcritos obtenidos se constató con un marcador de peso molecular de ARN (Thermo Scientific™). Luego de la corrida electroforética, el gel fue secado y la visualización del ARN marcado radiactivamente se realizó por revelado manual con placas de autoradiografía de alta sensibilidad (GE).

2.6 Análisis de interacción molecular por SPR

2.6.1 Determinación de constantes de afinidad empleando SPR

Las interacciones de FasR_{MT}-acil-CoA y FasR_{MT}-ADN, se determinaron empleando el biosensor Biacore T100 (General Electric, Piscataway, NJ, USA), en el Instituto IDEHU en Buenos Aires. Para los ensayos preliminares de interacción FasR_{MT}-acil-CoA realizados en París en la empresa Horiba Scientific, se utilizó el biosensor SPRI-PLEX II™.

Las superficies sobre las cuales se llevan a cabo las mediciones, conocidas como superficies resonantes, están asociadas a un sistema óptico que permite medir variaciones en el índice de refracción. Estas variaciones se miden en unidades de resonancia (RU) en el sistema Biacore (GE) o variación de la reflectividad (%) en función del tiempo en el sistema SPRI-PLEX (HORIBA), y se graficaron en un sensorgrama, donde los cambios en la concentración molecular en la superficie del sensor se registran en función del tiempo (RU o % vs Tempo). En BIACore, una RU = 1 pg/mm² [89].

Los ensayos realizados por SPR implicaron la preparación de la superficie del sensor, aquí llamado chip, mediante la unión del ligando y el establecimiento de condiciones de ensayo adecuadas para la interacción con el analito. La configuración experimental y la evaluación de los resultados se realizan por medio de programas computacionales, en nuestro caso se utilizó el programa Biacore T100 System Operation Kit (GE) y el OpenPlex suite (HORIBA).

La constante de disociación (K_D) se determinó a partir de los niveles de respuesta en el estado de equilibrio estacionario obtenidas mediante la inyección de diferentes concentraciones del analito. Para ello es necesario utilizar concentraciones que cubran un rango aproximado de 0,1-10 veces la concentración de la K_D esperada, y debe dar lugar a sensorgramas que se acerquen al nivel de saturación para las concentraciones

más altas. En estos casos la K_D se determina a partir de un ajuste no lineal a un modelo elegido, en nuestro caso siempre se eligió un modelo 1:1 (modelo de Langmuir) ya que no se tenían datos que avalen el ajuste a otro modelo, por lo que se elige el modelo más sencillo para evitar introducir errores en los cálculos.

El modelo de Langmuir es el modelo más utilizado para calcular la K_D . Este modelo se aplica a la simple situación de una interacción entre dos muestras (A, B). Se plantea la hipótesis de que tanto el analito como el ligando son homogéneos y que el analito es monovalente. Modelo Langmuir 1:1 ($A + B \leftrightarrow AB$).

De esta manera, al graficar en el ajuste no lineal la respuesta obtenida ($y=RU$) para cada concentración de analito utilizado ($x=Molar$), se puede calcular la K_D a partir de este ajuste al modelo 1:1, y de la respuesta máxima obtenida a la concentración de saturación para el analito (R_{max}) mediante la ecuación (1).

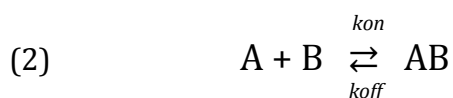
$$(1) \quad y = R_{max} \cdot x / (K_D + x) \quad \text{siendo } R_{max}: \text{unidades de respuesta máxima.}$$

En la práctica, cuando existen problemas que limitan la concentración del analito usado y no se pueden alcanzar concentraciones de saturación, como en nuestro caso con la interacción entre FasR_{MT} y C₁₆-CoA, la K_D todavía puede ser determinada si se ajustan los valores R_{max} . Este valor se puede estimar de forma teórica por la extrapolación de los datos obtenidos en el ajuste no lineal mediante el programa computacional de Biacore. De esta manera, la determinación de la afinidad en la que se aproximaron por extrapolación, los datos a saturación utilizando una serie de concentraciones seleccionadas y se estimó la afinidad mediante el ajuste a un modelo de estado estacionario, se conoce como **K_D Estimada (K_{DE})** [90].

Los ensayos de SPR también permitieron analizar parámetros cinéticos de las interacciones, los cuales se obtuvieron también a partir del sensorgrama (RU vs tiempo), en función a concentraciones crecientes del analito. Durante la fase de asociación, la unión del analito se refleja mediante un aumento en la respuesta (incremento de RU), una vez que finaliza la inyección del analito, el tampón comienza a pasar sobre el analito que se encuentra unido al ligando y comienza allí la fase de disociación (diminución de RU), luego de la cual la respuesta debe volver al nivel de la línea de base. En caso contrario, el ligando se regenera mediante la inyección de tampón de regeneración.

A partir de la fase de asociación, se calculó la tasa de asociación o k_{on} (M / s) entre el ligando y el analito, y a partir de la fase de disociación, se calculó la tasa de disociación o k_{off} (1 / s). A partir de estos valores se pudo calcular la constante de disociación, K_D como k_{off}/k_{on} . La constante de disociación es la inversa de la constante de asociación ($1/K_D$ o k_{on}/k_{off}), también llamada constante de afinidad, por lo que cuanto más pequeña sea la K_D obtenida en una reacción, mayor será la afinidad [90].

El programa del equipo de SPR, determina estos valores de la siguiente manera, tomando nuevamente un modelo de unión 1:1. La asociación de Ligando A con el analito B, genera la formación del complejo AB (2).



Cuando la respuesta (RU) alcanza el equilibrio, la velocidad de formación del producto [AB] en función del tiempo, que depende de las concentraciones de A, B y AB, se puede escribir de la siguiente manera: (3)

$$(3) \quad d [AB]/dt = k_{on} [A][B] - k_{off} [AB]$$

$$k_{off} / k_{on} = [A] [B] / [AB] = K_D \text{ constante de disociación, (M)}$$

En los sistemas Biacore, el analito A, fluye siempre sobre el ligando B, entonces luego de cierto tiempo t , la concentración del analito $[A] = [A]_0$, pero la concentración del ligando es $[B] = [B]_0 - [AB]$. Y reemplazando en la ecuación anterior (4)

$$(4) \quad d[AB] / dt = k_{on} [A] [B] - k_{off} [AB] = k_{on} [A]_0 ([B]_0 - [AB]) - k_{off} [AB].$$

Ahora al relacionar los parámetros en la Ecuación (4) a los parámetros SPR, la concentración del complejo AB ($[AB]$) es la respuesta R (RU), $[B]_0$ es la respuesta máxima R_{max} (RU), y la concentración del analito A $[A]_0$ es C. (5)

$$(5) \quad \begin{aligned} dR/dt &= k_{on} C (R_{max}-R) - k_{off} R \\ dR/dt &= k_{on} C R_{max} - (k_{on} C + k_{off}) R \\ &(k_{on} C + k_{off}) \text{ pseudo reacción} \end{aligned}$$

La tasa de cambio de R sigue una reacción de pseudo-primer orden. Aquí, el término $(k_{on} C + k_{off})$ se puede calcular como la pendiente de dR/dt (a partir del sensorgrama). Luego, el pseudo calculado $(k_{on} C + k_{off})$ depende de C; por lo tanto, el k_{on} se puede calcular como la pendiente trazando $(k_{on} C + k_{off})$ frente a la conocida C (concentración del analito), donde k_{off} será la ordenada al origen [91]. Mediante el uso del programa de evaluación suministrado por *GE Healthcare*, se puede realizar un ajuste no lineal del sensorgrama mediante un análisis de mínimos cuadrados no lineal. Para determinar la k_{on} y la k_{off} , en nuestro caso en el análisis cinético también se realizó un ajuste a un modelo 1:1, siendo el más sencillo (utilizando el dímero de FasR_{MT} para el cálculo), ya

que no contamos con información estequiométrica que nos permita hacer otro tipo de ajuste, por lo que si nuestro modelo no es 1:1, como pensamos en el caso de FasR_{MT}-ADN, la constante de disociación obtenida es una **constante global** de la reacción [90].

2.6.2 Inmovilización de Proteína al chip para ensayos de unión directa

En el sistema Biacore, las celdas de los sensores están recubiertas con carboximetil dextrán de cadena larga (CM5), que al activarse con N-hidrosuccinimida (EDC/NHS) permite el acoplamiento químico de la proteína a través de los grupos aminos libres. Este procedimiento de inmovilización del ligando no ocupa todos los sitios activados, es por ello que hay un último paso de bloqueo de grupos reactivos libres con etanolamina [92].

Se inmovilizaron 1200 RU de FasR_{MT} (pH 5,5) en la celda Fc2 del chip CM5. Luego, se bloquearon los sitios libres con etanolamina en las celdas Fc1 y Fc2. La celda Fc1 funcionó como control de unión inespecífica, la cual se descontó automáticamente en cada ensayo de unión realizado.

En el sistema Horiba, se inmovilizó la proteína FasR_{MT} al chip por el mismo principio y condiciones que en Biacore pero el procedimiento se llevó a cabo en un sistema de inmovilización automatizado por contacto. Se utilizó la proteína glutatión S-transferasa (GST), inmovilizada en el mismo chip, en la celda de referencia, como control negativo de la interacción con los ligandos utilizados.

2.6.3 Condiciones de unión FasR_{MT}-acil-CoAs

El ensayo de unión directa FasR_{MT}-acil CoA en el sistema Biacore, se realizó en Tris 10 mM pH 8 y 100 mM NaCl, el rango de concentraciones empleadas fue de 0,3 μ M a 5

μM tanto para $\text{C}_2\text{-CoA}$, como para $\text{C}_{16}\text{-CoA}$ y $0,3 \mu\text{M}$ a $10 \mu\text{M}$ para $\text{C}_{20}\text{-CoA}$. Se utilizó glicina a pH3 para la disociación de estos complejos.

La constante de disociación (K_D) para la unión $\text{FasR}_{\text{MT}}\text{-C}_{16}\text{CoA}$ se determinó en condiciones de equilibrio mediante ajuste no lineal, los valores para el cálculo se tomaron a los 20 segundos post-inyección del analito. Se utilizó el peso molecular del monómero para el ajuste 1:1.

El ensayo de unión directa $\text{FasR}_{\text{MT}}\text{-acil-CoA}$ en el sistema Horiba, se realizó en 25 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl y 5 mM MgCl_2 , el rango de concentraciones empleadas fue de $0,5 \mu\text{M}$ a $2 \mu\text{M}$ para $\text{C}_{12}\text{-CoA}$ y $1 \mu\text{M}$ a $2 \mu\text{M}$ para $\text{C}_{20}\text{-CoA}$. Se intentó regenerar el sistema con (1) 0,1M glicina-HCl pH 2, (2) 1 mM EDTA 25mM, Tris 75mM, NaCl pH 7,5 y (3) 10mM NaOH, sin éxito para la disociación del complejo $\text{FasR}_{\text{MT}}\text{-C}_{20}\text{-CoA}$.

2.6.4 Inmovilización del ADN al chip

La superficie del chip se activó con la mezcla en partes equimolares de los reactivos EDC-NHS. Se hizo fluir sobre la superficie activada una solución de estreptavidina 0,5 mg/ml a pH4. Se inmovilizaron 2100 RU en la celda Fc1 y Fc2 del chip CM5. Luego, se bloquearon los sitios libres con etanolamina en ambas celdas. La celda Fc1 funcionó como control de unión inespecífica, la cual se descontó automáticamente en cada ensayo de unión realizado.

La sonda biotinilada de 398 pb conteniendo la región promotora de operón *fas-acpS* (*Pfas* 398 biotinilada), se obtuvo mediante la amplificación por PCR a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv (oligonucleótidos N2fasIMTprom y CfasIMTprom BIOTIN). Los fragmentos obtenidos se purificaron empleando las técnicas descritas en 2.4.3 y 2.4.4.

La sonda biotinilada de ADN se empleó a una concentración de 5 μM en 10 mM de Tris pH 8. Sobre la celda Fc2 se inyectó la sonda con un flujo de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 300 segundos logrando una unión biotina-estreptavidina que no se disocia.

2.6.5 Condiciones de unión ADN-FasR_{MT}

FasR_{MT}, en concentraciones 0,06 μM a 2,5 μM , se hizo pasar a un flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ sobre las celdas Fc1 y Fc2. El ensayo se realizó en Tris 10 mM pH 8 y 100mM NaCl. La disociación se realizó con acetato de sodio 10 mM pH 5,5. Para la determinación de los parámetros cinéticos de la reacción se utilizó el peso molecular del dímero tanto para el ajuste 1:1, como para el ajuste 1:2.

Para los ensayos de preincubación FasR_{MT}-acil-CoA, la proteína FasR_{MT} a una concentración de 1,25 μM (concentración calculada para el monómero) se preincubó en una relación 1:1 con C₂-CoA o C₁₆-CoA, durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se procedió como en el caso anterior.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, a temperatura ambiente.

2.7 Análisis de proteínas

2.7.1 Expresión y purificación de proteínas

La expresión de las proteínas a partir de las cepas de *E. coli* BL21, BL21 codón plus, Rosetta u Origami transformadas con el vector específico en cada caso, se realizó mediante la inducción con IPTG 0,2 a 0,5 mM a DO₆₀₀ 0,5 y empleando diferentes temperaturas de expresión según la proteína: 18, 21 o 37 °C durante toda la noche. Las células se recolectaron por centrifugación, se resuspendieron en solución B [50 mM

Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10% (v/v) glicerol, 10 mM β -mercaptoetanol y 5 mM imidazol], y se lisaron por sonicación (5 pulsos, 15 s ON y 45 s OFF, 25-30% de amplitud, 4 °C). Los restos celulares se clarificaron por centrifugación (15000 rpm, 4 °C, 45 min) y las proteínas se purificaron a partir de la fracción soluble obtenida por cromatografía de afinidad, utilizando una columna de Ni²⁺-NTA agarosa (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El extracto proteico total libre de células se incubó 1 h a 4 °C con 1 ml de la resina de afinidad de Ni²⁺-NTA agarosa, equilibrada previamente con la solución B. Luego, se procedió al lavado de la columna con 25 volúmenes de la solución B. las proteínas se eluyeron con concentraciones crecientes de imidazol (20, 40, 60, 80, 100, y 250 mM). Cada una de las fracciones recolectadas se analizó por SDS-PAGE. Aquellas que contenían la proteína pura se dializaron a 4 °C durante toda la noche contra una solución de diálisis, la cual fue variando según las optimizaciones de purificación (ver capítulo II).

En el caso de las proteínas con sitio de corte para la proteasa TEV, luego de que el extracto libre de células fue incubado con la resina de afinidad de Ni²⁺-NTA agarosa, y realizado el primer lavado, se extrajo la resina de la columna con 10 ml de solución B y se colocó en un tubo falcon. Se le agregó 1 mM DTT y proteasa TEV (en una relación de masas 1:40 proteasa:proteína recombinante), y se incubó 3 hs a 23 °C con agitación (60 rpm) y 12 hs a 4°C sin agitación. Se montó nuevamente la resina en la columna y se eluyó la proteína sin cola de histidina con solución B, ya que como la proteasa TEV se expresa como fusión a cola de histidinas, ésta queda retenida en la columna. Al igual que para las proteínas sin sitio de corte, cada una de las fracciones recolectadas se analizó por SDS-PAGE. Aquellas que contenían la proteína pura se dializaron a 4 °C durante toda la noche. El plásmido pTH24-TEV_{SH} para la expresión y purificación de la proteasa TEV

fue cedido gentilmente por el Dr. Diacovich, y el protocolo de purificación se realizó según las condiciones reportadas, [85], [93].

Las proteínas obtenidas en el primer paso de purificación, fueron concentradas por ultrafiltración en dispositivos para centrífugas (Vivaspin corte 10kDa, Sartorius) y luego sembrada en una columna de exclusión por tamaño S200 o S75 (GE Healthcare), previamente equilibradas en la solución de diálisis de cada proteína. Luego, las fracciones con alto grado de pureza fueron analizadas mediante SDS-PAGE, concentradas por ultrafiltración y almacenadas en alícuotas de pequeño volumen a -80°C.

2.7.2 Dosaje de proteínas y SDS-PAGE

La concentración de proteínas fue determinada mediante los métodos descritos por Bradford [94], usando como patrón una solución de albúmina sérica bovina comercial (BSA- Promega) y también mediante la utilización del Kit Quant-iT™ Protein Assay junto al fluorómetro Qubit® (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Dado que la A_{280} en condiciones nativas o desnaturalizantes (6M cloruro de guanidinio) no presentaron diferencias para ningunas de las proteínas purificadas en este trabajo, se utilizó el ϵ_{280} teórico para calcular la concentración de proteínas una vez constatada su pureza [95], [96].

Los extractos proteicos y las proteínas purificadas se analizaron mediante SDS-PAGE, utilizando la celda Mini-gel PROTEAN IV (BioRad) y el sistema discontinuo de Laemmli [97]. El gel de concentración al 5% (p/v) del monómero de acrilamida se preparó en solución C [125 mM Tris-HCl pH 6,8, 1,8 mM EDTA y 0,1% (p/v) SDS], y el gel de separación al 12% (p/v), en solución B [375 mM Tris-HCl pH 8,8, 1,8 mM EDTA y 0,1%

(p/v) SDS]. Se utilizó una relación acrilamida:bisacrilamida 30:0,8. Las muestras a sembrar se calentaron a 100 °C durante 5 min, en solución de siembra [60 mM Tris-HCl pH 6,8, 25% (v/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 14,4 mM β -mercaptoetanol y 0,1% (p/v) azul de bromofenol], y se corrieron a una corriente constante de 30 mA a temperatura ambiente, en solución Laemmli [25 mM Tris base, 192 mM glicina pH 8,3, 1 mM EDTA y 0,1 % (p/v) SDS]. Como marcador de peso molecular se utilizó una mezcla de proteínas: lisozima (14,4 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), albúmina sérica bovina (BSA, 66,2 kDa) y fosforilasa B (97,4 kDa). Para detectar proteínas totales los geles se fijaron en una solución de ácido acético-H₂O (3:7) y se tiñeron con una solución de azul brillante de Coomassie (0,25% Azul brillante de Coomasie R250, 50% etanol y 10% ácido acético).

2.7.3 Cribado de condiciones de solubilidad de proteínas

Las proteínas purificadas fueron dializadas contra un conjunto de soluciones (Tabla 7) con el fin de encontrar un tampón que sea compatible con ensayos de cristalogénesis en el que la proteína pueda ser almacenada. El análisis se realiza mediante la determinación de la formación de agregados medidos por absorbancia a 340 nm [98].

Tabla 7. Compuestos usados en el cribado de solubilidad

Tampón (10 mM)	Sales	Estabilizantes	Detergentes	Aditivos
NaOAc pH 5,5	NaCl 500 mM	Glicerol 5% (v/v)	DDM 0,02%	DTT 1mM
MES pH 6	NaCl 1M	Glicerol 10% (v/v)	N-octyl glucosido 0,02-1%	EDTA 1mM
Na ₂ HPO ₄ pH 6,5	NaCl 2M			Arginina 25-50mM
MOPS pH 7				Glutamina 25-50mM
Tris pH 7,5				
HEPES pH 7,5				
Imidazol pH 8				
Tris pH 8,5				
Tris pH 9				

Se colocaron 300 μ l de proteína en un botón de microdiálisis recubierto de membrana de diálisis (Sigma corte 14.000 Da), y este se colocó en un tubo falcon de 50 ml con la solución tampón y se dializó durante 16 hs a 4°C. Luego se recuperó la proteína de cada uno de los botones de diálisis y se midió la absorbancia a 340 nm. La proteína se consideró como soluble a $DO_{340} < 0,05$ [98].

2.7.4 Análisis predictivo en función de estructura la primaria de las proteínas

Para los análisis predictivos de estructura secundaria, se utilizaron los programas ProtParam [99] y PSIPRED [100]. Para el análisis de las regiones desordenadas se emplearon los programas Disorderd2 y PredictProtein, dentro de la plataforma de análisis en línea XtalPred [101], que además permite determinar la probabilidad de cristalización de las proteínas a partir del análisis de su secuencia de aminoácidos.

2.8 Cristalización de proteínas

La búsqueda de condiciones para la cristalización de las proteínas se efectuó mediante los métodos de difusión de vapor al equilibrio en gota colgante o sentada, de acuerdo a si se realizaron en forma manual o robótica, respectivamente. El trabajo de cristalogenésis para algunas de las proteínas contó con la asistencia técnica de Nicole Larrieux (Unidad de Cristalografía de Proteínas, IPMONT) y Sebastián Klinke (Plataforma Argentina de Biología Estructural y Metabolómica PLABEM del Instituto Leloir).

Los primeros rastreos de condiciones se realizaron con procedimientos robóticos utilizando matrices dispersas de condiciones comerciales (480 soluciones comerciales de QIAGEN y Hampton Research) por el método de gota sentada. El robot de cristalización Honeybee963® (Digilab) del IPMONT y el robot de cristalización Gryphon del IBR nos permitieron utilizar placas de 96 pocillos tipo Greiner. Se agregaron 90-100 μL de las soluciones comerciales en cada pocillo y las gotas fueron preparadas con 0,25-0,3 μl de proteína y 0,25-0,3 μl del reservorio.

Las placas fueron selladas e incubadas a 20 °C durante varios días. Una vez identificadas las condiciones con presencia de posibles cristales de proteína, se procedió al escalado y optimización. Estos ensayos se realizaron manualmente por el método de gota colgante en placas de 24 pocillos tipo Linbro (VDX, Hampton Research). En la parte inferior del pocillo se colocó 0,5-1 ml de la condición de cristalización (preparada manualmente o comercial) y, en general, la mezcla de 2 μL de esta condición y 2 μL de la proteína se ubicó sobre vidrios siliconados. El pocillo fue aislado utilizando grasa y se dejó equilibrar por al menos 48-72 hs, hasta su primera observación. Todos los ensayos

de cristalogénesis se realizaron a 20 °C, en un cuarto termostatzado a temperatura constante.

Las soluciones empleadas en optimizaciones y escalado fueron preparadas manualmente. En los ensayos de co-cristalización de las proteínas en presencia de C₁₆-CoA o C₂₀-CoA, se realizaron preincubaciones de 30 minutos en concentraciones equimolares y 1:2 (Proteína-Acil-CoA). En la Tabla 8 se muestran las condiciones de optimización donde se obtuvieron los cristales que luego fueron difractados y a partir de los cuales se lograron resolver las estructuras tridimensionales de las proteínas FasR_{33MT} y FasR_{33MT}-C₂₀-CoA.

Tabla 8. Condiciones de optimización de cristales

	Condición inicial			Condiciones optimización
	Composición	Kit	N° condiciones usadas en optimización	
FasR_{33MT}	0,1M MES monohidratado pH 6,0 22% v/v PEG 400	PEGRx1	48	0,1M MES monohidratado pH 5,8 24% v/v PEG 400
				0,1M MES monohidratado pH 5,8 27% v/v PEG 400
				0,1M MES monohidratado pH 5,8 28% v/v PEG 400
FasR_{33MT}-C₂₀-CoA	2 M NaCl 0,1 M NaAc pH 4,6	PEGRx2	24	2,1 M NaCl, 0,1 M NaAc pH 4,5
				2,2 M NaCl, 0,1 M NaAc pH 4,5
				2,4 M NaCl, 0,1 M NaAc pH 4,5

La criopreservación de los cristales fue realizada por incubación de 60 segundos en la condición de cristalización suplementada con glicerol (25% para FasR_{33MT}-C₂₀-CoA y 35% para FasR_{33MT}) con el fin de evitar la formación de hielo a bajas temperaturas. Los

cristales tratados con la solución de criopreservación fueron congelados en N₂ líquido rápidamente y almacenados hasta la colección de los datos [102], [103].

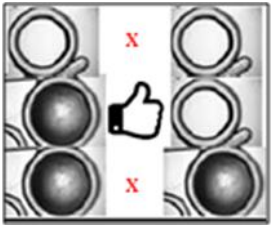
2.8.1 Ensayo de Pre-cristalización para la determinación de la concentración óptima de proteína

La mayoría de las proteínas que cristalizan, tienen como concentraciones óptimas entre 5 y 20 mg/ml. Complejos grandes, virus y proteínas con solubilidad limitada, cristalizan a menor concentración, 2-5 mg/ml. Los péptidos y proteínas pequeñas tienden a cristalizar en concentraciones mayores, 20 a 50 mg/ml. Pero existen casos de concentraciones de cristalización tan bajo como 1 mg/ml y tan alto como 300 mg/ml [104].

Para determinar la concentración de proteína apropiada para los ensayos de cristalización, se puede utilizar una prueba de pre-cristalización. Para este análisis se utilizan algunos componentes que se presentan con frecuencia en los kit de cristalización (Tabla 9), el ensayo se realiza de a pares, utilizándose dos concentraciones, la mayor y la menor concentración que podemos encontrar en los kit. La idea del ensayo es utilizar varias concentraciones de la proteína para evaluar a partir de que concentración se obtienen los mejores resultados. El pre ensayo se realiza a partir de cristalizaciones en gota colgante en placas de 24 pocillos tipo Linbro, tal como se describió anteriormente (2.8), y se evalúa dentro de las 2 o 3 hs el aspecto de las gotas. Se considera como óptima la concentración a la cual más del 60% de las condiciones presentan precipitado, o signos de actividad (cambio de fase, microcristales) en la condición con mayor concentración de precipitante y gotas claras para la menor concentración. Si la mayoría de las gotas presentan precipitados, probablemente la proteína se encuentra por encima de la concentración de

sobresaturación y si la mayoría son gotas claras, sin actividad, probablemente la proteína se encuentra muy por debajo de la concentración óptima [105], [106].

Tabla 9. Condiciones para el ensayo de pre-cristalización.

	Sales		Compuestos Orgánicos		Polímeros	
	1	2	3	4	5	6
A	4,3 M NaCl	1,5 M NaCl	30 % glicerol 2M AmSO ₄	15 % glicerol 2M AmSO ₄	30 % PEG 400	12 % PEG 400
B	3,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	1,1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	40 % 2- propanol	15 % 2- propanol	30 % PEG 4000	12 % PEG 4000
C	3 M Fosfato Na/K	1M Fosfato Na/K	63 % MPD	23 % MPD	30 % PEG 8000	12 % PEG 8000
D	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1 M acetato pH 4,6	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,1 M Tris pH 8,5	50% MPD acetato pH 4,6	50% MPD 0,1 M Tris pH 8,5	20% PEG 4000 acetat o pH 4,6	20% PEG 4000 0,1 M Tris pH 8,5

2.9 Difracción de rayos X, resolución de estructuras y refinamiento

Las colecciones de datos fueron realizadas en el Sincrotrón Nacional francés SOLEIL y en el Laboratorio de Microbiología Molecular del IPMONT. En el sincrotrón SOLEIL, se utilizó un detector de área de conteo de fotones con píxeles híbridos (Pilatus 6M®, Dectris), en la línea Proxima 1. En IPMONT, se utilizó en cambio otra tecnología de detección de área, donde se implementó una placa de imagen (Mar345dtb®, Mar Research). En ambos casos los cristales se mantuvieron siempre a temperaturas

criogénicas durante las colectas, utilizando tecnología de criocristalografía acoplada al goniómetro del detector.

Para realizar los ensayos de difracción de rayos X, los cristales fueron primero transferidos desde las gotas de cristalización a reservorios conteniendo soluciones de crioprotección, como se describió anteriormente. Luego, los cristales fueron montados en lazos de nylon preparados para cristalografía (*Hampton Research*) y congelados en nitrógeno líquido por inmersión. El transporte siempre aseguró la cadena de frío, así como la maniobra de montaje en la estación experimental para medir, con los cristales bañados directamente por una corriente de nitrógeno seco a 100 °K que fluye sobre el cristal en la cabeza goniométrica de la cámara.

2.9.1 Colecta de Datos

Cuando el patrón de difracción de prueba resultaba satisfactorio, se tomaba un número pequeño de imágenes sucesivas en uno o dos segmentos del cristal y se indexaba con el fin de definir el grupo puntual de simetría. La indexación permite asignar cada punto de difracción con un set único de tres índices de Miller (la ubicación precisa de cada punto de difracción en el espacio recíproco), como así también la determinación de los parámetros de la celda unidad y el grupo puntual tentativo del cristal en estudio. Para ello, se utilizó el algoritmo implementado en la rutina “estrategia” de MOSFLM [107], para determinar los valores óptimos de rotación del cristal que permitiesen coleccionar juegos de datos completos en el menor tiempo posible. Como no se tenía información previa de la simetría cristalina, se eligió como posible grupo espacial para diseñar la estrategia de colección aquel de menor simetría dentro del conjunto propuesto por el programa, garantizando la mayor cobertura posible del

espacio recíproco. Cuando el tiempo de la línea seguía disponible, y los cristales no mostraban signos de daño por radiación, se procuraron realizar colectas de la más alta redundancia posible.

2.9.2 Procesamiento de datos

Una vez procesados los datos se integraron, etapa que corresponde a la cuantificación del número de cuentas de cada punto de difracción (o intensidad) y estimación de su correspondiente desviación estándar. Para la integración se utilizaron los programas MOSFLM, o bien XDS [108]. Se tomó el archivo de salida del programa de integración, y se calcularon factores de escala y consolidación (“*merging*”) de reflexiones únicas con el programa AIMLESS [109]. El archivo de salida es una tabla ordenada de reflexiones únicas (índices de Miller) con los valores de intensidad promedio y desviación estándar para cada una, seguida de varias tablas que resumen los valores estadísticos resultado del proceso de consolidación: cuán bien se ajustan entre sí las intensidades idénticas (si estos valores son muy malos es un indicativo de error en la asignación del grupo de simetría puntual o espacial durante la indexación e integración). Se calcularon los estadísticos como el “*R_{merge}*” y valores derivados, que indican la diferencia porcentual entre las diferentes mediciones de intensidades idénticas (medidas más de una vez o idénticas por simetría).

Antes de utilizar este único archivo, (del escalado con AIMLESS) como fuente de datos observados para proceder a refinar un modelo atómico 3D, se marcan un número estadísticamente significativo de reflexiones (se ha determinado experimentalmente que ese número se sitúa aproximadamente en 1000 reflexiones, o bien no más de un 10% de los datos completos si el juego tuviera menos de 10000 reflexiones únicas) para

fines de validación cruzada [110], proceso fundamental para verificar el correcto refinamiento de los modelos. Dicho subconjunto de reflexiones se marca como juego “libre” (“*free set*”), las que no se usan por los programas de ajuste para mejorar el modelo de modo de minimizar las diferencias entre reflexiones calculadas a partir del modelo y las observadas en el experimento de difracción. Si el modelo mejora realmente, las diferencias calculado-observado deberían disminuir también en el juego libre, incluso si no ha sido utilizado explícitamente.

El programa AIMLESS, confirmó que las celdas unidad de ambos cristales son primitivas, y compatibles con grupos puntuales tetragonal ($P4$) en FasR_{33MT}-C₂₀-CoA, y ortorrómbico ($P222$) en FasR_{33MT}, pronosticado previamente por la indexación.

2.9.3 Reducción de los datos

Los datos de salida de AIMLESS corresponden a intensidades I (con sus correspondientes desviaciones estándar) para cada reflexión de índices hkl . Sin embargo, para poder continuar con los pasos siguientes del proceso cristalográfico, hay que pasar de intensidades a su equivalente en términos de amplitud (correspondiente a la amplitud de la onda sinusoidal del factor de estructura en cuestión, cada índice de Miller representa una onda sinusoidal simple con amplitud, frecuencia y fase, la frecuencia tridimensional directamente relacionada a los tres números del índice). Dicha equivalencia es conocida como “reducción” de los datos, y la amplitud en representación vectorial de cada factor de estructura equivale a la magnitud del vector o su módulo $|F|$ en una escala absoluta (número de electrones, pues son los electrones de cada átomo los que dispersan significativamente los rayos X). Aparte de una constante de

proporcionalidad, se sabe que $|F|^2 = I$. Para reducir los datos se utilizó la opción *CTruncate* dentro de AIMLESS o el programa TRUNCATE [111].

Como dato adicional, el pasaje de intensidades a módulos de factores de estructura permite obtener también un factor térmico global B a través del llamado “gráfico de Wilson” [112]. Este valor sirve para tener una idea orientativa acerca de la movilidad general de la(s) molécula(s).

2.9.4 Resolución de la estructura 3D

Para resolver la estructura de FasR_{33MT}-C₂₀-CoA, se utilizó el programa ARCIMBOLDO [113], el cual utiliza fundamentalmente dos programas de base: PHASER [114], como máquina de reemplazo molecular automatizada para colocar elementos de estructura secundaria como hélices α , repitiendo ciclos de modificación de densidad en el espacio real, y SHELXE [115] para el trazado automático de cadenas. La estructura de FasR_{MT33} fue resuelta por reemplazo molecular con el programa PHASER [114], y usó el modelo refinado de FasR_{MT33}-C₂₀-CoA como sonda de búsqueda. En ambos casos se utilizó luego el programa BUSTER [116] para refinar los modelos atómicos en forma iterativa, y el programa COOT [117], [118] para reconstruir el modelo en función de la visualización de mapas de densidad electrónica. Los modelos fueron validados con MolProbity [119] y con las herramientas de validación implementadas en COOT.

2.10 Análisis estructurales

La comparación entre modelos se realizó mediante alineaciones estructurales utilizando el servidor Dali [120]. Este programa también permite la búsqueda de

modelos similares en la PDB, que también determina matrices de distancia entre los C α para asignar residuos equivalentes. El programa PISA permitió evaluar la importancia de las interfaces macromoleculares, mediante este programa se determinaron propiedades estructurales y químicas de superficies e interfaces macromoleculares, como superficie accesible y enterrada, así como energía libre de disociación, [121]. Las figuras del análisis estructural fueron preparadas con PyMOL (<http://pymol.org/>), [122-123] y Chimera [124].

3. RESULTADOS

3.1 CAPÍTULO I

Análisis de la interacción

FasR_{MT}-ligando y FasR_{MT}-ADN

3.1.1 Introducción

3.1.1.1 FasR_{MT} y su modelo de regulación transcripcional

Si bien son pocos los reguladores transcripcionales de la biosíntesis de ácidos grasos descritos hasta el momento, se sabe que todos responden a los niveles intracelulares de diferentes intermediarios de esta vía de síntesis. Por lo tanto, en numerosos sistemas bacterianos los productos finales de estas rutas biosintéticas (en general acil-CoAs de cadena larga) actúan como efectores comunes de los correspondientes reguladores transcripcionales, como sucede para FadR y FabR (*E. coli*), FabT (*S. pneumoniae*) y DesT (*P. aeruginosa*) [56], [60], [61], [64]. En el caso de FapR de *B. subtilis*, su regulación ocurre por un mecanismo de prealimentación por malonil-CoA [50]. Este metabolito es utilizado como sustrato elongante, luego de ser transferido a la proteína transportadora de acilos (ACP), en todas las reacciones de condensación o elongación en la ruta de biosíntesis de ácidos grasos. Asimismo, la concentración del malonil-CoA se encuentra a su vez determinada por la actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa [49]. En función de estos antecedentes y teniendo en cuenta lo reportado para los reguladores de la biosíntesis de ácidos grasos, era probable que ciertos intermediarios de la síntesis de ácidos grasos y/o micólicos fuesen los efectores del regulador FasR en micobacterias. A partir de un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se llevó a cabo una caracterización preliminar de las posibles moléculas efectoras que modularían la afinidad de FasR_{MT} por la secuencia operadora que reconoce en el promotor del operón *fas-acpS*, a la que denominaremos *Pfas* [53]. Teniendo en cuenta que FasR_{MT} está involucrado en la regulación de la síntesis de ácidos grasos, a través de la activación de la expresión de los genes del operón *fas-acpS*, estas moléculas podrían ser: malonil-CoA (metabolito precursor empleado por FAS I y FAS II en cada paso de condensación), acil-

CoAs de cadena media-larga (productos derivados de FAS I) o acil-ACPs de cadena larga (intermediarios y productos del sistema FAS II), entre otros. La interacción entre el activador transcripcional FasR_{MT} y su sitio de unión al ADN ocurre *in vitro* en ausencia de un efector, a partir de allí, se decidió evaluar si alguna de estas moléculas podría afectar la formación del complejo FasR_{MT}-*Pfas*. En consecuencia, los ensayos de retardo en gel realizados en presencia de acil-CoAs de distinta longitud de cadena (Figura 7A) dieron indicios de que los ésteres de ácidos grasos de cadena carbonada $\geq C_{16}$ serían los ligandos que de algún modo interaccionarían con FasR_{MT} para desestabilizar la unión del regulador a *Pfas*, modulando de esta manera su función activadora. El efecto más relevante observado en estos ensayos se evidenció en presencia de C₂₀-CoA; sin embargo, resulta difícil definir con esta técnica si existe una interacción directa FasR_{MT}-acil-CoAs, y poder determinar cuantitativamente la afinidad del ligando por la proteína y/o definir de qué manera se produce esta interacción molecular. De manera contraria a lo ocurrido con los acil-CoAs de cadena larga, la presencia de ácidos grasos libres o de un acil-ACP de cadena larga, como es el C₂₄-ACP, no disminuyó la capacidad de unión de FasR_{MT} a *Pfas* (Figura 7 B-C).

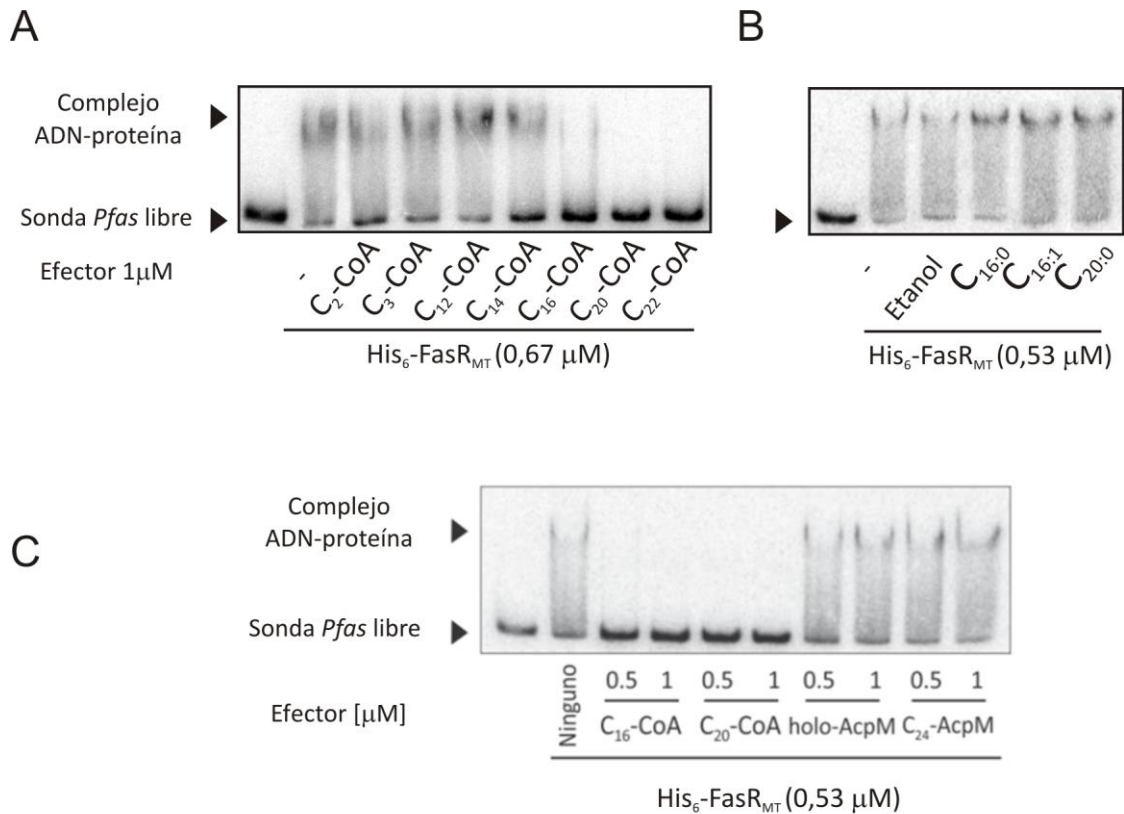


Figura 7. La unión de FasR_{MT} a la región Pfas es inhibida en presencia de acil-CoAs de cadena larga. Los ensayos de retardo en gel se realizaron incubando una sonda de 398 pb que contiene a Pfas_{MT} marcada radiactivamente con His₆-FasR_{MT} en presencia de **A.** acil-CoAs de distinta longitud de cadena (C₂-CoA a C₂₂-CoA) **B.** ácidos grasos (C_{16:0}, C_{16:1}, C_{20:0}) y **C.** acil-AcpM (C₂₄-AcpM), se utilizó holo-AcpM como control [53].

Los resultados obtenidos nos permitieron postular un modelo de regulación de la biosíntesis de ácidos grasos mediado por FasR_{MT}, donde FasR_{MT} activa la expresión del operón *fas-acpS* durante el crecimiento exponencial de las micobacterias por unión a su secuencia consenso en la región *Pfas*. Cuando la cantidad de acil-CoAs de cadena larga sintetizados por FAS I excede los requerimientos metabólicos de la célula, estos interaccionarían con FasR_{MT} produciendo la liberación del regulador de la región promotora; posiblemente como consecuencia de un cambio conformacional de la proteína tras la unión del efector. Como resultado, los niveles de expresión del operón

fas-acpS disminuirían y se restablecería así el equilibrio en la biosíntesis de ácidos grasos (Figura 8).

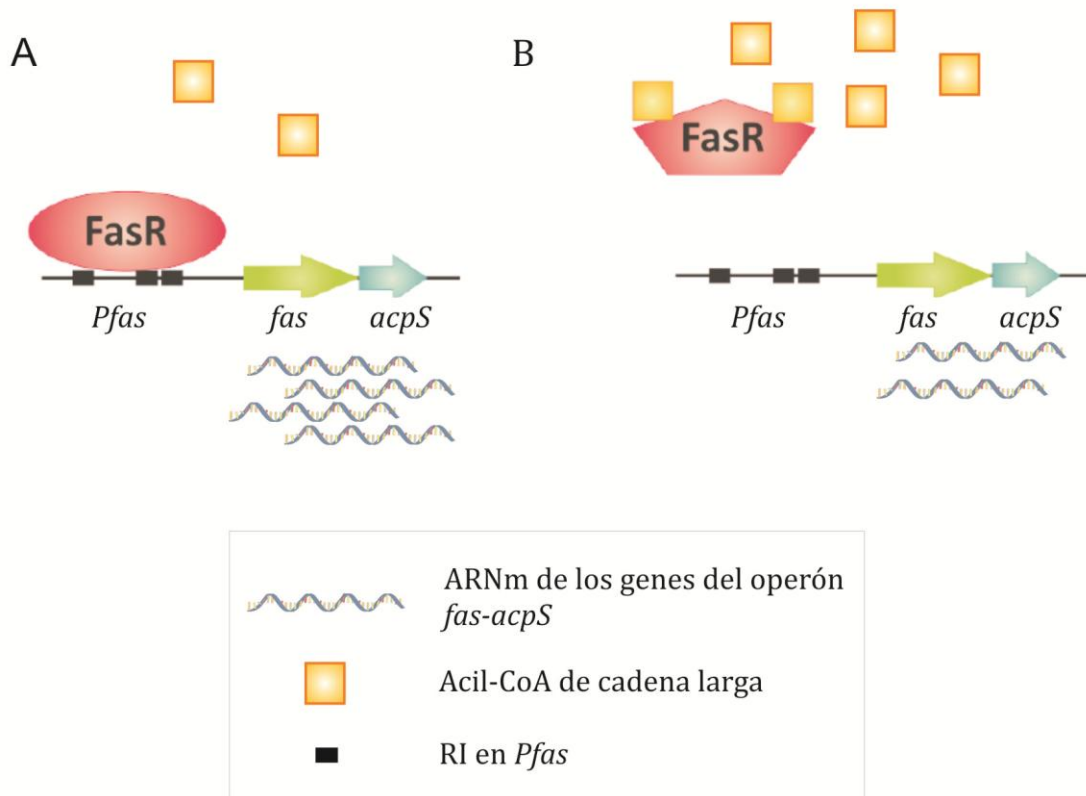


Figura 8. Modelo de regulación de la expresión del operón *fas-acpS* por FasR_{MT}. **A)** Durante el crecimiento exponencial de las micobacterias, FasR_{MT} activa la expresión del operón *fas-acpS* por unión a las RIs (Repeticiones Invertidas) ubicadas corriente arriba del inicio de la transcripción de ese operón, sobre la región *Pfes*. **B)** Cuando la cantidad de acil-CoAs de cadena larga sintetizados por FAS I excede los requerimientos metabólicos de la célula, estos interactúan con FasR_{MT} conduciendo a la liberación del regulador de la región promotora *Pfes*, posiblemente como consecuencia de un cambio conformacional de la proteína tras la unión del efector. Como resultado, disminuye la expresión de los genes del operón *fas-acpS* y se restablece el equilibrio en la biosíntesis de ácidos grasos.

En base a este modelo nos propusimos en esta parte del trabajo de tesis analizar mediante experimentos biofísicos y moleculares como es la interacción de estas

moléculas ligando con FasR_{MT} y validar el modelo propuesto mediante un análisis *in vitro*.

3.1.2 Objetivos

- Analizar la interacción de FasR_{MT}-ligando y FasR_{MT}-ADN mediante métodos biofísicos, a fin de obtener parámetros cuantitativos de dichas interacciones.
- Validar el modelo de activación propuesto para FasR_{MT} mediante análisis de transcripción *in vitro*.

3.1.3 Resultados

3.1.3.1 Análisis cinético de la interacción Proteína-Ligando

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de retardo en gel de poliacrilamida, se decidió realizar estudios que nos permitieran obtener constantes de afinidad y parámetros cinéticos de la interacción del regulador transcripcional FasR_{MT} por sus sitios de unión al ADN y a las moléculas señal propuestas mediante ensayos de Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR, de las siglas en inglés *Surface Plasmon Resonance*) [125]. Esta técnica permite la visualización en tiempo real de la interacción entre biomoléculas. El sistema utiliza un biosensor basado en la resonancia del plasmón de superficie de un metal noble, como es el oro presente en la superficie de un chip. El equipo monitorea de forma precisa y en tiempo real la interacción entre una especie unida a la superficie del chip (ligando), y otra que circula en solución (analito).

Todos los pasos en la preparación y análisis de los cambios que se producen en la superficie del chip se monitorean mediante un sensorgrama, donde los cambios en la concentración molecular en la superficie del chip se registran en función del tiempo, ya

sea como, señal de resonancia (RU) en función del tiempo en el sistema Biacore (GE) o variación de la reflectividad (%) en función del tiempo en el sistema SPRI-PLEX (HORIBA).

La configuración experimental y la evaluación de los resultados se realizan por medio de programas computacionales, en nuestro caso se utilizó el programa Biacore T100 System Operation Kit (GE) y el OpenPlex suite (HORIBA).

La respuesta de unión (RU o %) es directamente proporcional a la concentración de biomoléculas en la superficie del chip. Los sensorgramas muestran la formación y disociación de complejos a lo largo de todo el curso de una interacción. A partir de la información que proporcionan los sensorgramas, se pueden determinar parámetros de la cinética de unión y afinidad de las interacciones que estamos estudiando [126].

La constante de disociación (K_D) se puede determinar a partir de los niveles de respuesta en el estado de equilibrio estacionario obtenidas mediante la inyección de diferentes concentraciones del analito. Para ello es necesario utilizar concentraciones que cubran un rango aproximado de 0,1-10 veces la concentración de la K_D esperada, y debe dar lugar a sensorgramas que se acerquen al nivel de saturación para las concentraciones más altas (ver M&M). Además, las mediciones en tiempo real dan acceso a la evaluación de los parámetros cinéticos de la interacción biomolecular, a partir de los cuales se pueden determinar las tasas de asociación (k_{on}), disociación (k_{off}) y constante de disociación (K_D). Estos parámetros cinéticos de reacción se obtienen nuevamente a partir del sensorgrama (RU vs tiempo), en función a concentraciones crecientes del analito. Durante la fase de asociación, la unión del analito se refleja mediante un aumento en la respuesta (incremento de RU), una vez que finaliza la inyección del analito, el tampón comienza a pasar sobre el analito que se encuentra unido al ligando y comienza allí la fase de disociación (disminución de RU), luego de la

cual la respuesta debe volver al nivel de la línea de base. Si la fase de disociación no se produce, el ligando se regenera mediante la inyección de un tampón de regeneración.

A partir de la fase de asociación, se puede calcular la tasa de asociación o k_{on} (M/s) entre el ligando y el analito, y a partir de la fase de disociación, se calcula la tasa de disociación o k_{off} (1/s). A partir de estos valores se puede calcular la constante de disociación, K_D como k_{off}/k_{on} , la constante de disociación es la inversa de la constante de asociación ($1/K_D$ o k_{on}/k_{off}) o constante de afinidad, por lo que, cuanto más pequeña sea la K_D obtenida en una reacción, mayor será la afinidad del analito por el ligando [90]. Para más detalle de la determinación de los parámetros cinéticos y constante de disociación ver M&M (2.6) [126], [127].

Para la determinación de la K_D y los parámetros cinéticos de la reacción, los valores experimentales deben ajustarse a un modelo de interacción. Si se tienen datos que permitan ajustar los valores obtenidos en el sensorgrama a un modelo determinado, es decir, si se conoce el número de sitios de unión para la reacción, los valores se ajustan a ese modelo definido, en caso contrario, cuando no se cuenta con datos que avalen el ajuste un modelo determinado, se elige el modelo más sencillo para evitar introducir errores en los cálculos, esto permite un ajuste de la interacción global [128]. En nuestro caso siempre se eligió el modelo de Langmuir 1:1, ya que si bien podemos inferir sobre cuales o cuantos son los sitios de unión para las interacciones FasR_{MT}-acil-CoA y FasR_{MT}-ADN, no tenemos ensayos estequiométricos que nos aseguren inequívocamente la elección de un modelo, por lo que se optó por el modelo más sencillo. El modelo de Langmuir es el modelo más utilizado para calcular la K_D . Este modelo se aplica a la simple situación de una interacción entre dos muestras (A, B). Se plantea la hipótesis de que tanto el analito como el ligando son homogéneos, y que el analito es monovalente. Modelo Langmuir 1:1 ($A + B \leftrightarrow AB$), (ver más en M&M).

La empresa *Horiba Scientific* en París, nos brindó la posibilidad de realizar ensayos preliminares con un equipo de última generación (SPRi-plex). De este modo se llevaron a cabo ensayos de unión directa por unión covalente de FasR_{MT} a la superficie de un chip, y se analizó la interacción de FasR_{MT} con analitos constituidos por acil-CoAs de distinta longitud de cadena, más precisamente C₁₂-CoA y C₂₀-CoA (Figura 9).

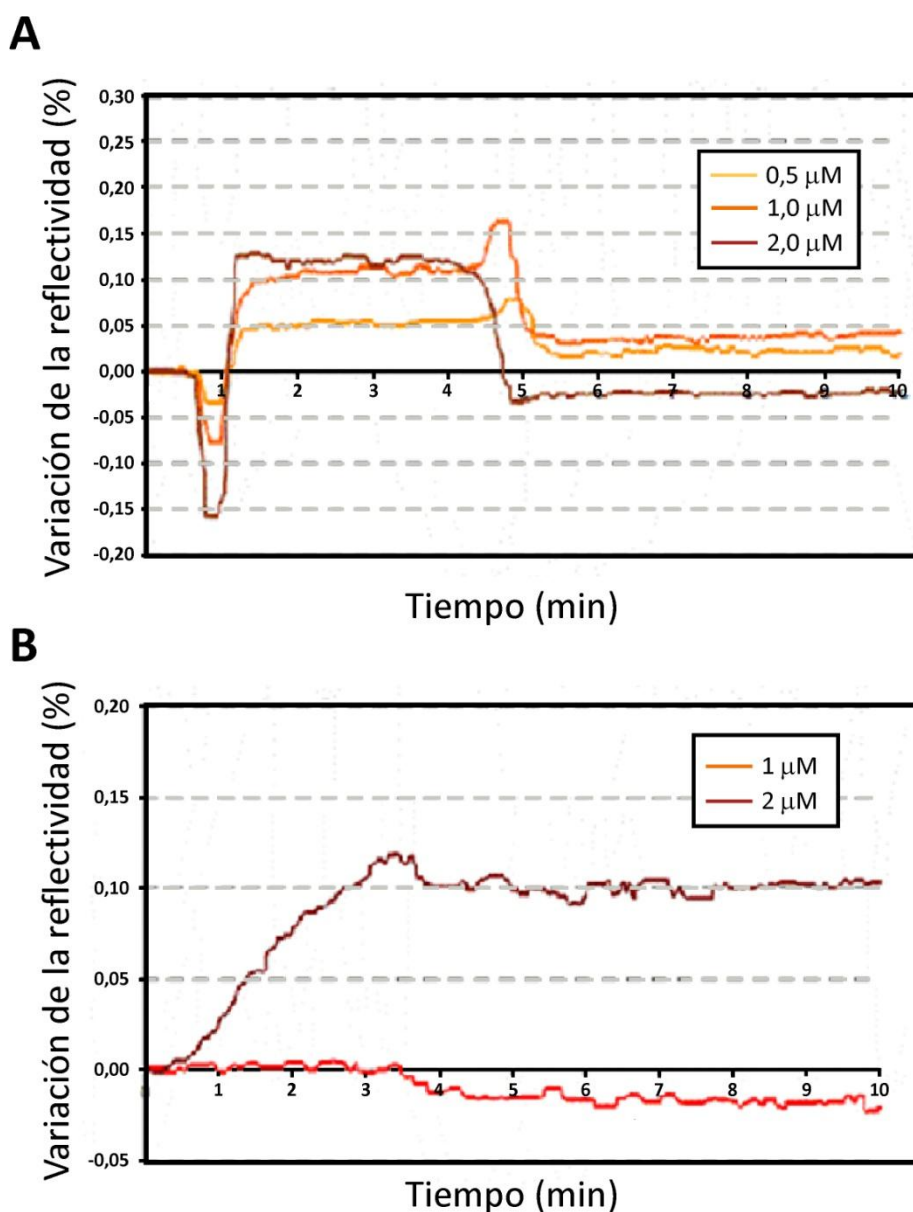


Figura 9. Sensorgramas de la interacción FasR_{MT}-acil-CoA mediante SPR. FasR_{MT} se unió a la superficie de un chip mediante química de aminas. Los gráficos o sensorgramas muestran los procesos de

asociación, estabilidad o equilibrio y disociación entre FasR_{MT} y **A)** C₁₂-CoA o **B)** C₂₀-CoA. Se utilizó la proteína glutathion S-transferasa (GST), inmovilizada en el mismo chip, como control negativo de la interacción con los ligandos utilizados. Se muestran las curvas promedio con las sustracciones de la variación en la Reflectividad de la celda del chip que contenía el control negativo.

Se puede observar que al inicio de la inyección de C₁₂-CoA las curvas del sensorgrama muestran un perfil de estado de equilibrio a las tres concentraciones ensayadas, por otro lado, en la última etapa de la inyección las curvas vuelven a la línea de base, sin la necesidad de una etapa de regeneración. Este tipo de curva indicaría una disociación, que en este caso se produce solamente por agregados de la solución tampón de corrida (25mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl y 5mM MgCl₂), y que depende del tiempo de vida media del complejo formado y de la astringencia de la condiciones utilizadas. En este caso el complejo mostraría una mayor labilidad que en el ensayo en el que se utilizó C₂₀-CoA como analito (Figura 9B), debido a que con C₁₂-CoA ocurre una disociación sin una etapa de regeneración previa. En los sensorgramas obtenidos para la interacción de C₂₀-CoA y FasR_{MT} no se observa disociación luego de las inyecciones. En este experimento se inyectaron en el sistema diferentes soluciones de regeneración para lograr una fase de disociación, incluyendo las típicamente usadas 0,1 M de glicina-HCl a pH 2, 0,1 mM de EDTA con 75 mM de NaCl y 25 mM Tris pH 7,5 y finalmente 10 mM NaOH, (esta última causó la precipitación de la proteína unida al chip); sin embargo, en ningún caso se logró disociar el complejo de interacción. La ausencia de disociación y regeneración del sistema imposibilitó la obtención de las constantes cinéticas para las reacciones analizadas. La dificultad para regenerar el sistema podría ser explicado por una fuerte afinidad de FasR_{MT} por el C₂₀-CoA, sin embargo los parámetros que rigen esta interacción no pudieron ser determinados a partir de los resultados obtenidos.

Si bien estos experimentos no nos permitieron obtener constantes cinéticas de interacción para estas biomoléculas, los mismos dieron lugar al primer indicio de la existencia de una interacción directa y probablemente con alta afinidad entre FasR_{MT} y C₂₀-CoA. Más aún, estos resultados son concordantes con los resultados obtenidos en los experimentos de retardo en gel.

Con el objetivo de profundizar el estudio de la interacción de FasR_{MT} con sus moléculas efectoras, iniciamos una colaboración con el Instituto IDEHU en Buenos Aires a fin de realizar nuevos experimentos de SPR empleando el equipo Biacore T100 (General Electric, Piscataway, NJ, USA). Al igual que en los experimentos realizados anteriormente y presentados en la Figura 9, la proteína FasR_{MT} fue inmovilizada de modo automatizado y estandarizando por unión covalente a la superficie de un chip, por el método de química de aminas utilizando los grupo amino libres de la proteína. En este caso, la respuesta de unión para la inmovilización fue de 1200 RU. Una vez preparado el chip con la proteína FasR_{MT} unida de forma covalente, se realizaron ensayos de tipo unión directa para determinar los parámetros de la interacción FasR_{MT}-acil-CoA, haciendo pasar en solución los analitos C₂-CoA, C₁₆-CoA y C₂₀-CoA en concentraciones crecientes, con el fin de obtener un sensorgrama de respuesta en función del tiempo para cada concentración de analito.

Al pasar C₂-CoA en solución, los sensorgramas no mostraron un cambio en la señal de resonancia, sugiriendo la ausencia de interacción con FasR_{MT}, lo cual coincide con los resultados obtenidos anteriormente en los ensayos de retardo en gel (Figura 7).

El sensorgrama obtenido con C₁₆-CoA muestra una unión estable dentro de los primeros 20 segundos de contacto que luego comienza a decaer (Figura 10A). El rango de concentraciones que se empleó en este experimento fue de 0,3 a 5 μ M. En este caso, la disociación del sistema se alcanzó utilizando glicina a pH3, como solución de

regeneración. El análisis de la interacción de C_{16} -CoA con FasR_{MT} indicó que se trata de una unión específica y nos permitió calcular una constante de disociación estimada para esta interacción (Figura 10B).

Del sensorgrama de respuesta en función del tiempo se obtiene la K_D , la cual se determina a partir de los niveles de respuesta (RU) en el estado de equilibrio estacionario, obtenidos para cada concentración de analito. En nuestro caso se tomaron para el cálculo los valores de RU a los 20 segundos post-inyección de C_{16} -CoA, pero además, como se mencionó al principio de este capítulo, es necesario utilizar concentraciones de analito que den lugar a sensorgramas que se acerquen al nivel de saturación. En estos experimentos no se alcanzaron esos valores de saturación ya que al utilizar concentraciones más altas de C_{16} -CoA, se dificultaba regenerar la línea de base, alterando así la calidad de las mediciones. Esto podría deberse a las propiedades físicas de los acil-CoAs largos, a su acción detergente y a su concentración micelar crítica [129].

Si no es posible llegar a la respuesta máxima, este valor se puede estimar de forma teórica por la extrapolación de los datos obtenidos en el ajuste no lineal, mediante el programa computacional de Biacore. De esta manera, se determinó para este ensayo la **K_D Estimada (K_{DE})** de la reacción, por extrapolación de los datos a la concentración de saturación [90].

A partir de este ajuste no lineal a un modelo 1:1, se obtuvo una K_{DE} de $4,7 \times 10^{-6}$ M, presentando un Desvío Estándar (DE) de $0,9 \times 10^{-6}$ M. El DE cercano al orden de magnitud de la K_{DE} , indica que estos ensayos son preliminares y deberán optimizarse, buscando la forma de utilizar concentraciones mayores de analito, a fin de alcanzar concentraciones de saturación de C_{16} -CoA, sin tener que estimar los valores de respuesta máxima a esa concentración.

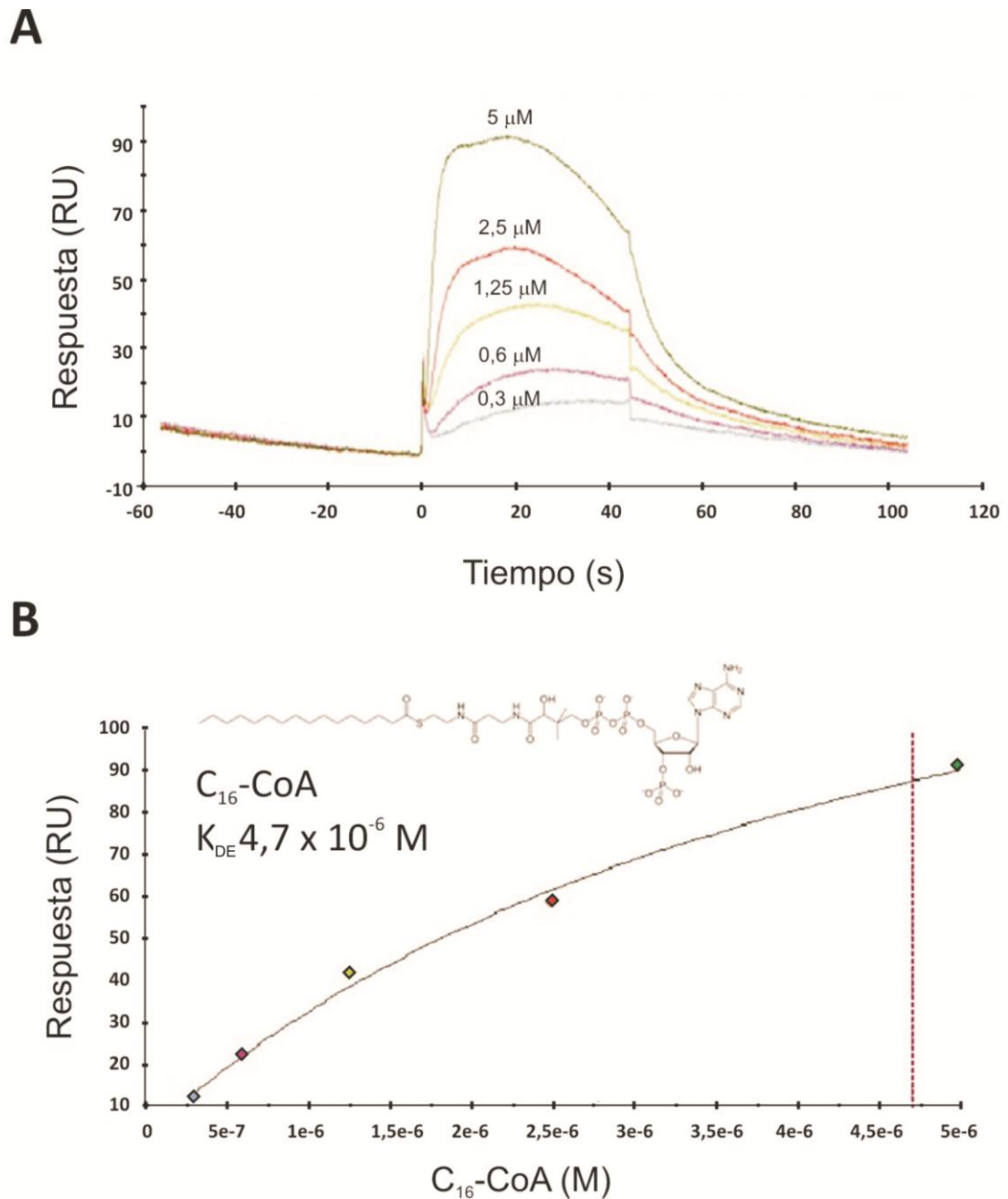


Figura 10. Ensayo de unión directa, FasR_{MT}-C₁₆CoA. **A)** Sensorgrama, donde se inyectaron concentraciones crecientes de C₁₆-CoA en un rango de entre 0,3 y 5 μM. **B)** Curva de ajuste no lineal, donde se determina la constante de disociación para FasR_{MT}-C₁₆-CoA, $K_{DE} = 4,7 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Se realizó el análisis para la determinación de los parámetros cinéticos de la interacción FasR_{MT}-C₁₆-CoA, a partir del sensorgrama de respuesta obtenido de la inyección con concentraciones crecientes de C₁₆-CoA (0,3 a 5 μM). Nuevamente se

realizó un ajuste al modelo de unión 1:1 y se determinaron los parámetros cinéticos a partir de la fase de asociación y disociación de la reacción en el sensorgrama de ajuste (Figura 11).

Se obtuvieron para esta reacción; una k_{on} de $5,99 \times 10^4$ 1/Ms con un DE de $1,3 \times 10^3$, una k_{off} de 0,05 1/s con un DE de $7,4 \times 10^{-4}$ y una K_D de $9,18 \times 10^{-7}$ M. Si bien los valores de k_{on} y k_{off} obtenidos muestran valores de DE aceptables (un orden de magnitud menor), se obtuvo una K_D ligeramente menor a la K_{DE} obtenida por ajuste no lineal en el estado de equilibrio estacionario ($0,9 \mu\text{M}$ frente a $4,7 \mu\text{M}$). Esta diferencia, que en términos de constantes no es tan significativa, podría deberse a varios factores: por un lado a la estimación por extrapolación que se usó para determinar la K_{DE} en el ajuste no lineal, y por otro lado, al realizar el análisis cinético, este mostró un mejor ajuste en la zona de asociación que en la de disociación en el sensorgrama de ajuste (Figura 11), lo que podría haber impactado en el cálculo final de la K_D . Todos los cálculos para la interacción de FasR_{MT}-C₁₆-CoA se realizaron teniendo en cuenta la concentración monomérica de FasR_{MT}.

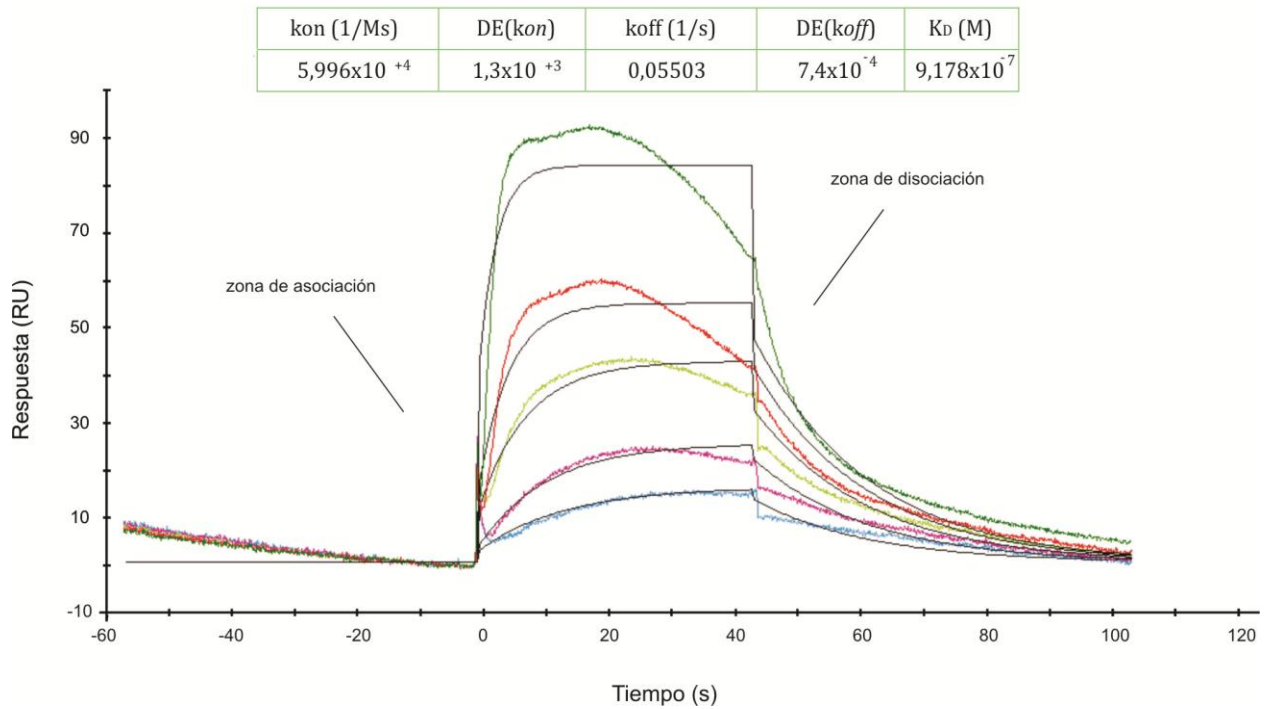


Figura 11. Análisis cinético de interacción FasR_{MT}-C₁₆CoA. Sensorgrama de respuesta obtenido por inyección con concentraciones crecientes de C₁₆-CoA, (0,3 a 5 μM); se muestran los parámetros cinéticos de la interacción FasR_{MT}-C₁₆-CoA por el ajuste del sensorgrama a un modelo de unión 1:1. Se determinó la *kon* (tasa de asociación), *koff* (tasa de disociación) y la K_D (constante de disociación). El ajuste generado por el programa computacional de Biacore se muestra en línea negra. Se puede observar que la respuesta obtenida en función del tiempo para cada concentración de C₁₆-CoA se ajusta mejor en la zona de asociación (aumento de RU), que en la zona de disociación (disminución de RU).

Finalmente, se realizaron ensayos de SPR para analizar la interacción de FasR_{MT} con C₂₀-CoA (Figura 12). Al igual que para el experimento anterior, se inyectaron en solución concentraciones crecientes de C₂₀-CoA (0,3 a 10 μM). A diferencia de lo obtenido para la interacción con C₁₆-CoA, en el ajuste no lineal se puede observar una curva con apariencia sigmoidea, indicando una posible unión cooperativa de C₂₀-CoA con FasR_{MT}. En este caso no se pudo calcular la K_D , o los parámetros cinéticos de la interacción, debido a que no se obtuvo una fase de disociación. Es decir que, en el sensorgrama de

respuesta en función del tiempo se observa un aumento en la RU, hasta una condición donde la respuesta se estabiliza y luego no se observa una fase de disociación, incluso inyectando soluciones para regenerar el sistema (datos no mostrados).

La forma sigmoidea de la curva mostrada en la Figura 12 podría sugerir un proceso cooperativo en la interacción entre FasR_{MT} y C₂₀-CoA, la cual es específica y sugiere una mayor estabilidad de la interacción regulador-ligando.

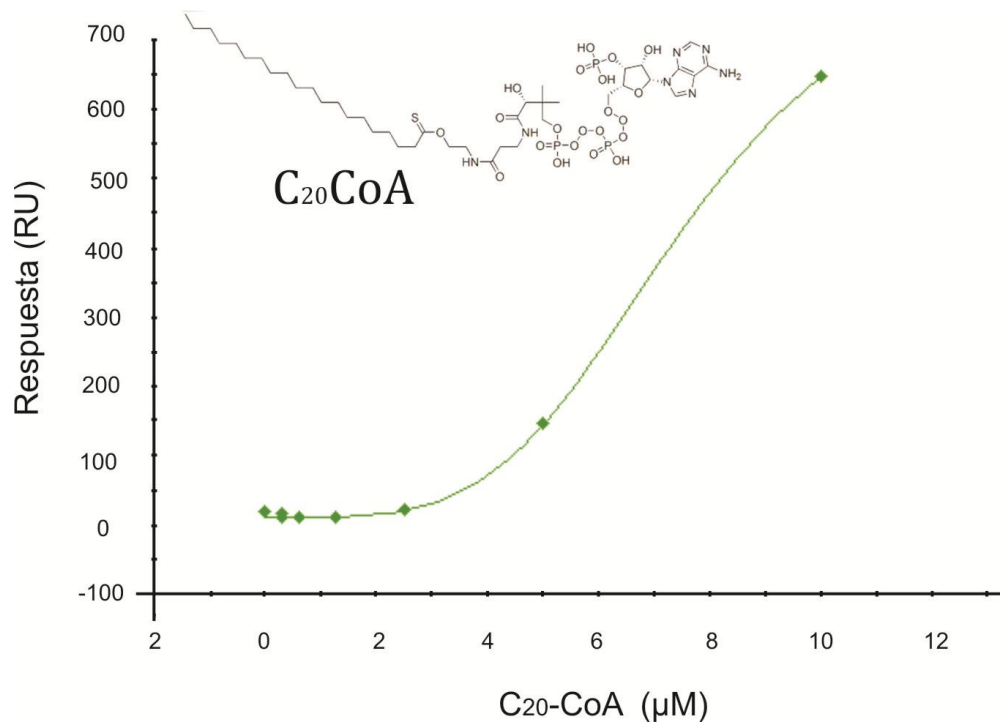


Figura 12. Ensayo de unión directa, FasR_{MT}-C₂₀-CoA. Se puede observar una curva de ajuste con características sigmoidea, se inyectaron en solución concentraciones de C₂₀-CoA en un rango de entre 0,3 y 10 μM.

3.1.3.2 Análisis cinético de la interacción Proteína-ADN

A fin de caracterizar la interacción entre FasR_{MT} y su sitio de unión al ADN, se llevaron a cabo ensayos de SPR, en los cuales se utilizó una sonda biotinilada de 398 pb correspondiente a la región *Pfas* (*Pfas* 398). Este fragmento contiene los sitios de unión

de FasR_{MT} a la región promotora del operón *fas-acpS* (Figura 13), los cuales fueron determinados previamente mediante ensayos de protección a la DNasa-I [53], y donde se determinó que FasR_{MT} se une a dos regiones: la región 1 formada por dos repeticiones invertidas, se encuentra a -196 pb del sitio de inicio de la transcripción (el cual se encuentra a 5 pb del sitio de inicio de la traducción), mientras que la región 2 se localiza a -320 pb y está formada por una sola repetición invertida. El análisis de las putativas secuencias promotoras de los operones *fas-acpS* de distintas especies de micobacterias utilizando la herramienta MEME de análisis de secuencias en base a motivos llevó a la identificación de un motivo altamente conservado en este grupo de bacterias (Figura 13 B), donde las tres secuencias pseudopalindrómica a las que se une FasR_{MT} se encuentran altamente conservadas [53].

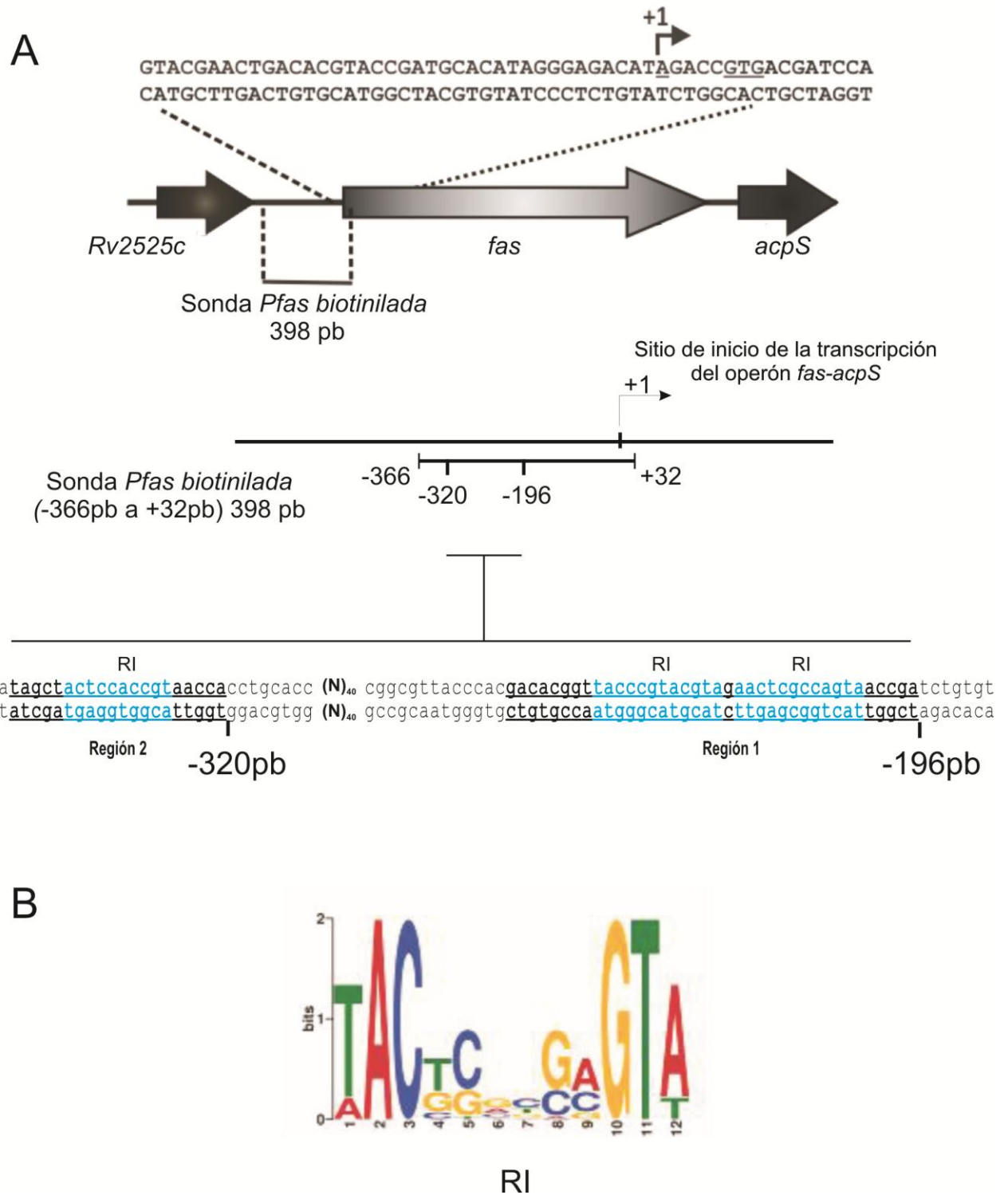


Figura 13. Sitio de unión de FasR_{Mt} en la región *Pfas*. A) Sonda biotilada utilizada para los ensayos de SPR, la región 1 formada por dos repeticiones invertidas, se encuentra a -196 pb del sitio de inicio de la transcripción, mientras que la región 2 se localiza a -320 pb y está formada por una sola repetición invertida. Las regiones protegidas en cada hebra están subrayadas e indicadas como región 1 y región 2.

Las repeticiones invertidas **(RI)** conservadas están resaltadas en celeste. **B)** Motivo altamente conservado en *Mycobacterium*.

Para llevar a cabo los estudios de interacción entre FasR_{MT} y su sitio de unión al ADN mediante la técnica de SPR, fue necesario en primer lugar optimizar la unión de la sonda *Pfas* 398 (previamente marcada con biotina) al chip recubierto con estreptavidina.

La superficie del chip se activó con los reactivos EDC-NHS. Se hace fluir sobre la superficie activada una solución de estreptavidina a pH4, se inmovilizaron 2100 RU al chip y luego se bloquearon los sitios libres con etanolamina. La sonda biotinilada de ADN se concentró a 5 μ M en 10 mM de Tris pH 8. Sobre la celda del chip se inyectó la sonda con un flujo de 20 μ l/min durante 300 segundos logrando una unión biotina-estreptavidina que no se disocia. La respuesta de unión estable (750 RU) de la sonda al chip se muestra en la Figura 14.

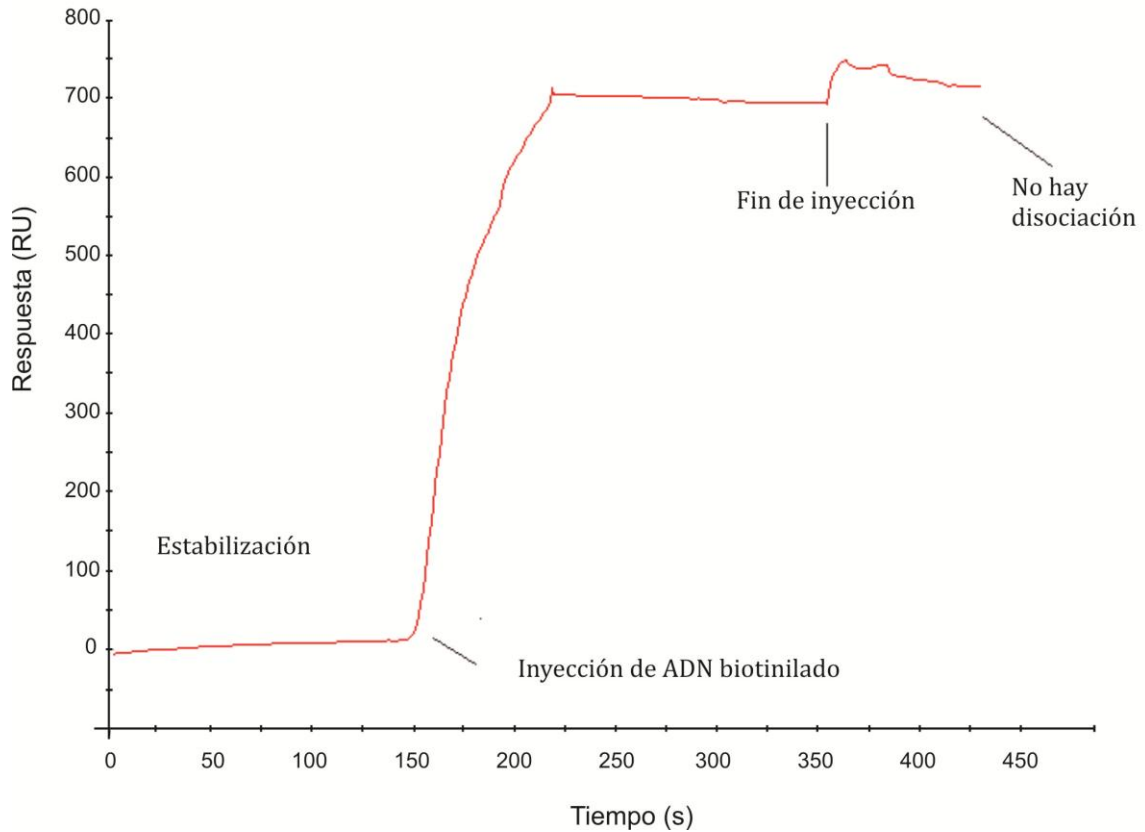


Figura 14. Respuesta de resonancia de unión de la sonda biotinizada al chip CM5. La sonda se inyectó con un flujo de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 300 segundos, logrando una unión biotina-estreptavidina que no se disocia, obteniéndose una inmovilización de la sonda al chip con una respuesta de 750 RU.

Se realizó el análisis para la determinación de los parámetros cinéticos de la interacción FasR_{MT} y *Pfas* 398, a partir del sensorgrama de respuesta obtenido tras la inyección con concentraciones crecientes de FasR_{MT} (0,075 a 2,5 μM) utilizando un flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ sobre las celdas del chip conteniendo la sonda *Pfas* 398. En el sensorgrama de respuesta obtenida en función del tiempo (Figura 15), se puede observar que las curvas correspondientes a las menores concentraciones de FasR_{MT} (0,075 y 0,15 μM) presentan una cinética diferente a las curvas obtenidas con mayores concentraciones del regulador (las pendientes en el equilibrio de saturación del analito son diferentes). Por esta razón no se tomaron en cuenta estas concentraciones en la determinación de los

parámetros cinéticos. Nuevamente, se realizó un ajuste al modelo de unión 1:1 y se determinaron los parámetros cinéticos a partir de la fase de asociación y disociación de la reacción en el sensorgrama de ajuste (Figura 16). Los cálculos para las concentraciones se realizaron teniendo en cuenta el estado dimérico de FasR_{MT}.

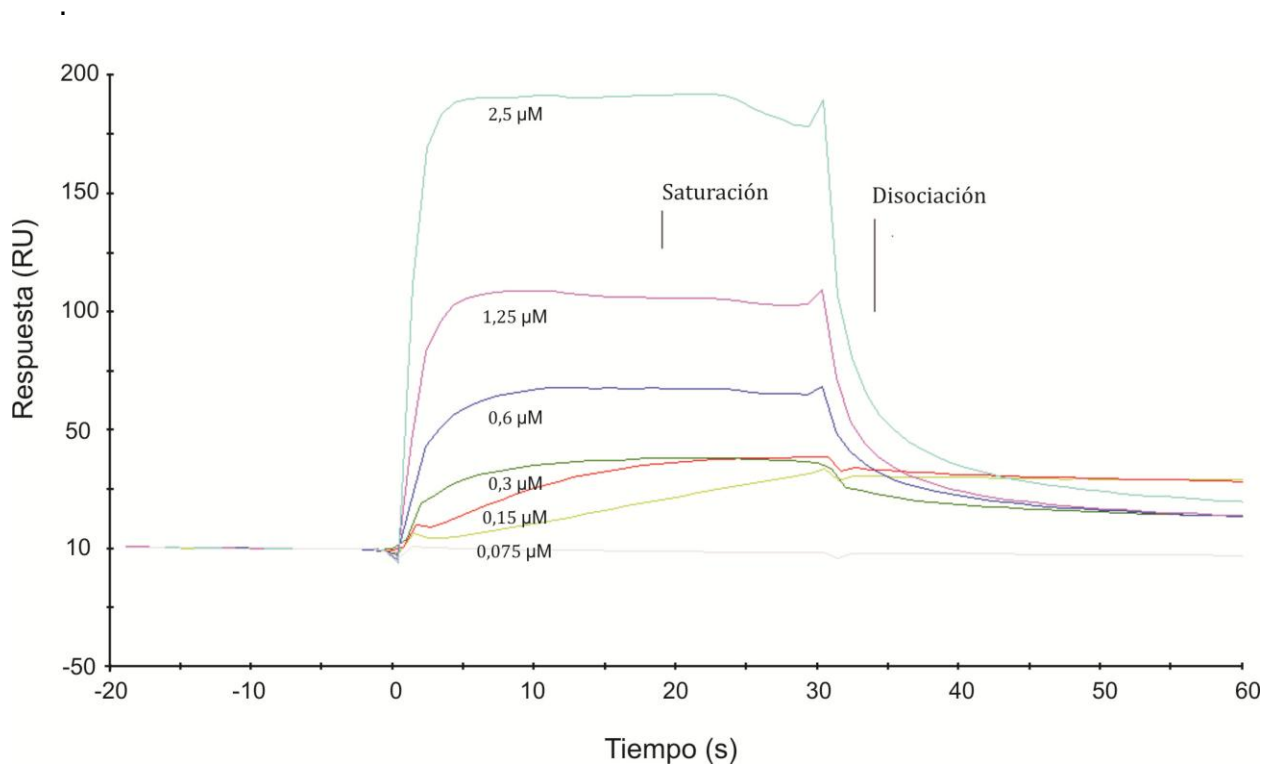


Figura 15. Sensorgrama de la unión FasR_{MT}-ADN. Curva de respuesta obtenida en función del tiempo para diferentes concentraciones de FasR_{MT}. Se observan pendientes a saturación diferentes para las concentraciones más bajas (0,075 y 0,15 μM).

Se obtuvieron para esta reacción; una k_{on} de $1,35 \times 10^5$ 1/Ms con un DE de $1,5 \times 10^4$, una k_{off} de $5,34 \times 10^{-2}$ 1/s con un DE de $2,8 \times 10^{-3}$ y una K_D de $3,94 \times 10^{-7}$ M. Los valores de k_{on} y k_{off} obtenidos muestran valores de DE aceptables (un orden de magnitud menor).

Si bien, el ajuste realizado no se correlaciona completamente con los datos empíricos obtenidos, el control de calidad de los datos en base al desvío estándar y a su variación a lo largo del tiempo de corrida (Figura 16 B), determinado a partir del gráfico de

residuales para el ajuste 1:1, el cual es una representación gráfica de la precisión del ajuste, indica el cálculo unívoco de las constantes con rangos que se encuentran dentro de los parámetros de precisión del equipo. Tanto la cinética de interacción mostrada a bajas concentraciones de proteína como un ajuste que no es perfecto para el modelo de unión 1:1, nos da herramientas para sospechar que justamente FasR_{MT} posee un comportamiento que no responde al típico ajuste de unión 1:1.

En este experimento la sonda de ADN utilizada posee 3 RI, a las cuales se puede unir la proteína FasR_{MT}, al menos por lo determinado en los ensayos de protección de la sonda a la DNasa-I. Además, los experimentos de exclusión molecular confirman que FasR_{MT} conforma un dímero en solución. Por lo tanto, la estequiometría de la unión entre el par ADN-FasR_{MT} podría ser compleja. Actualmente no contamos con evidencia adicional que nos permita esclarecer la estequiometría de esta unión. En este contexto, se utilizó un modelo donde la relación ADN-proteína se consideró como 1:1 para ajustar los datos empíricos a las ecuaciones y de esta manera nos permitió calcular constantes cinéticas globales, que definen ésta unión. Asimismo, se ensayó un segundo ajuste en el cual se utilizó un modelo 1:2 en la relación ADN-proteína, considerando la condición dimérica de FasR_{MT} en solución. Este ajuste bivalente, nos brindó valores de constantes que no difieren significativamente de aquellas obtenidas con el modelo 1:1, propuesto inicialmente (datos no mostrados).

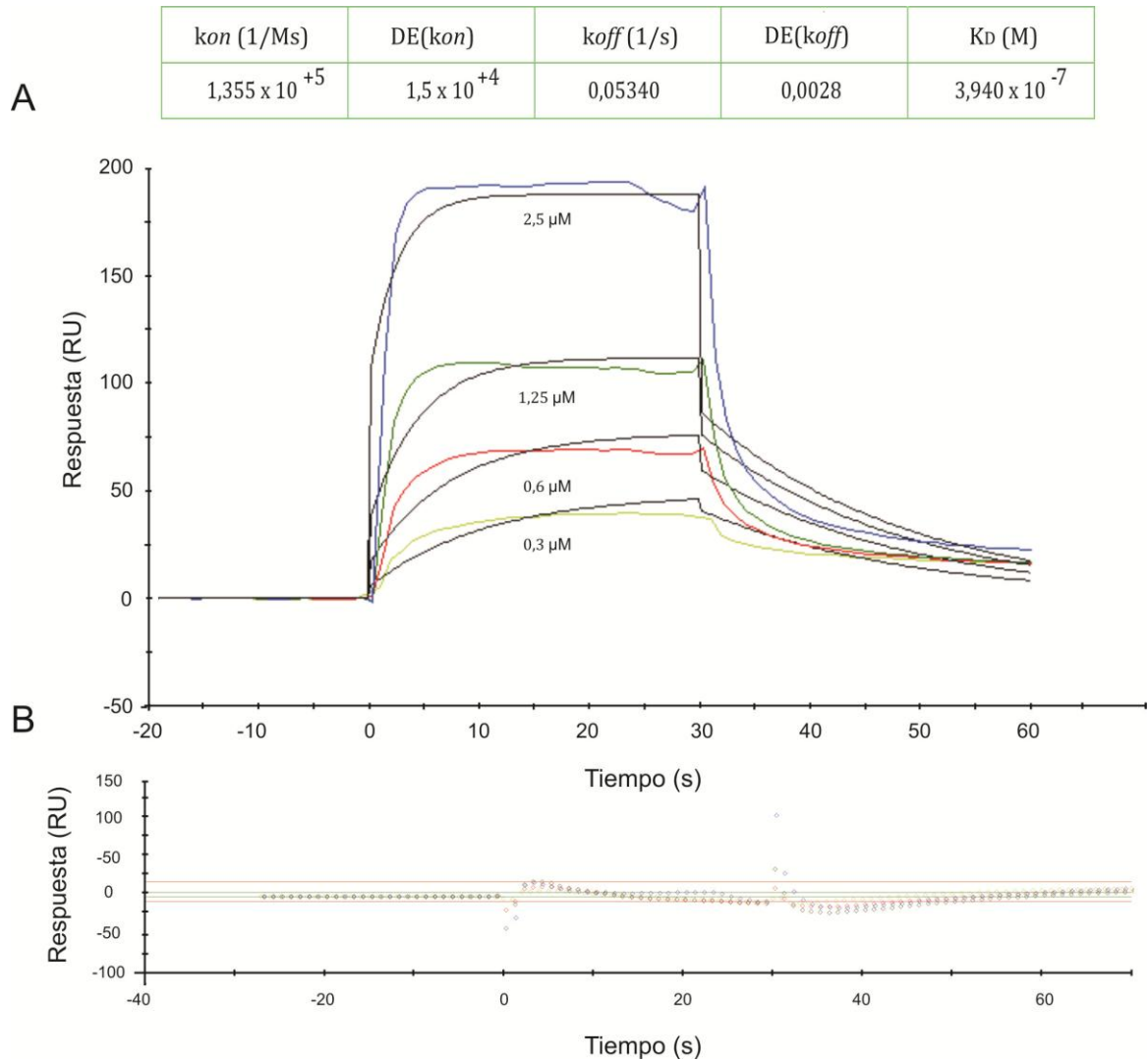


Figura 16. Curva de respuesta obtenida en función del tiempo para diferentes concentraciones de FasR_{MT}. **A)** Sensorgrama de ajuste generado por el programa Biacore T100 System Operation Kit (GE), a partir del cual se obtuvieron los valores de k_{on} , k_{off} y K_D global para la interacción FasR_{MT}-ADN. (DE): Desvío estándar. **B)** Variación del desvío estándar calculado en función del tiempo de corrida. En estos experimentos se utilizó un rango de concentraciones de FasR_{MT} entre 0,3 μ M y 2,5 μ M.

3.1.3.3 Influencia del Acil-CoA sobre la interacción ADN-FasR_{MT}

Considerando los resultados obtenidos en los experimentos previos, nos preguntamos entonces qué efecto podría tener preincubar la proteína con acil-CoAs de distinta longitud de cadena carbonada sobre la interacción ADN-FasR_{MT}. Para ello se preincubó a FasR_{MT} en concentraciones equimolares (1,25 μ M) con C₂-CoA y C₁₆-CoA, y

luego las mezclas fueron inyectadas sobre las celdas del chip, donde la sonda de ADN se encontraba unida (Figura 17).

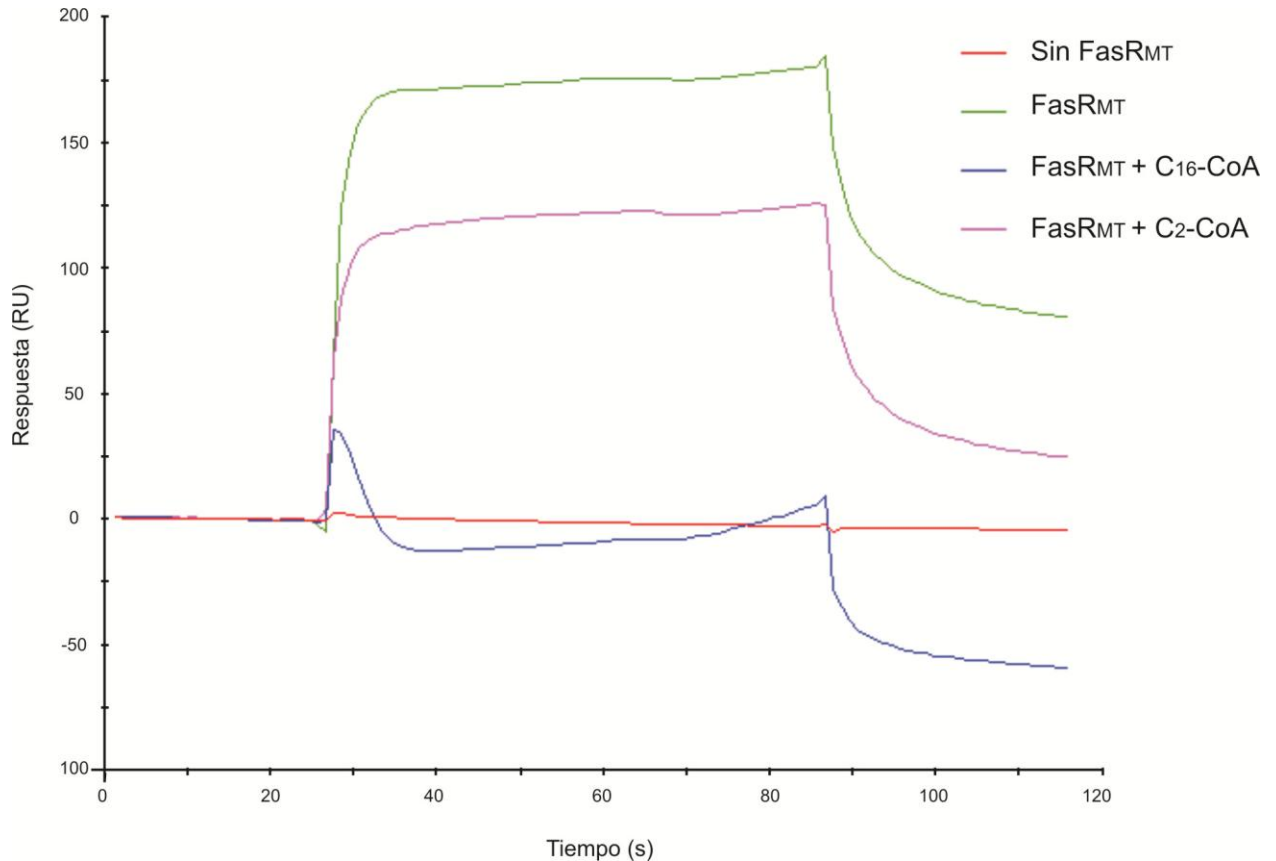


Figura 17. La unión de FasR_{MT} al ADN es inhibida por C₁₆-CoA. Sensorgrama de respuesta en función del tiempo de la interacción ADN-FasR_{MT}, tras la incubación en concentración equimolares (se tomó el monómero de FasR_{MT} para el cálculo) de la proteína con C₂-CoA y C₁₆-CoA.

Como esperábamos en base a resultados anteriores, la preincubación de FasR_{MT} con C₂-CoA no tuvo un efecto significativo sobre la unión de la proteína con el ADN (Figura 17). Si bien la respuesta observada en presencia de C₂-CoA fue ligeramente menor a la curva obtenida en ausencia de acil-CoA, las pendientes de asociación y disociación de ambos sensorgramas resultaron similares; lo cual sugiere que no hay un efecto sobre la

interacción de la proteína con el ADN blanco. Sin embargo, la unión de FasR_{MT} al ADN se vio significativamente inhibida por la preincubación de FasR_{MT} con C₁₆-CoA; esto se puede observar claramente ya que no se obtuvo señal de respuesta en función del tiempo, producto de la falta de unión de la proteína al ADN. Estos experimentos coinciden con los resultados obtenidos previamente mediante ensayos de retardo en gel (Figura 7A) [53].

3.1.3.4 Caracterización *in vitro* del modelo de regulación de FasR_{MT}

A fin de validar el modelo de regulación propuesto para FasR_{MT} y estudiar cómo actúa sobre la transcripción de los genes que regula, y evaluar cuál es el efecto de las moléculas señal descritas en los puntos anteriores, se implementó un sistema de transcripción *in vitro* utilizando la ARN polimerasa purificada de *M. smegmatis* [84]. El complejo holoenzimático de la ARN polimerasa, compuesto por cinco subunidades ($\alpha 2\beta\beta'\omega$), se purificó a partir de la cepa SM07 de *M. smegmatis* que contiene el gen *rpoC*, que codifica para la subunidad β' de la ARN polimerasa fusionado a una cola de histidina. Esto nos permitió co-purificar junto a esta subunidad las demás subunidades de la ARN polimerasa (holo-ARN polimerasa). Además, se expresó y se purificó como una proteína recombinante a partir de extractos de *E. coli* el factor sigma A de *M. smegmatis* (codificado por el gen *sigA*), el cual es el factor sigma vegetativo, y como tal, uno de los factores indispensables para la transcripción de genes esenciales por la ARN polimerasa [87]. Como molde para la reacción se generó una sonda de 498 pb que incluye el sitio de unión de FasR_{MT} al ADN perteneciente a la región promotora del operón *fas-acs*, similar a la utilizada en los ensayos de SPR (Figura 18). Esta sonda contiene además 100 pb corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción del gen *fas*, con el fin de poder monitorear la actividad de este regulador sobre la transcripción de este gen. Como

control de la transcripción se realizó la construcción de una sonda que contiene una región promotora seguida de un fragmento del gen (110 pb) que codifica para una ADN girasa de *M. smegmatis*, la cual posee un promotor fuerte y es utilizada como control de la actividad de la ARN polimerasa [88] y en este caso, también como control de especificidad de la actividad de FasR_{MT} sobre la transcripción.

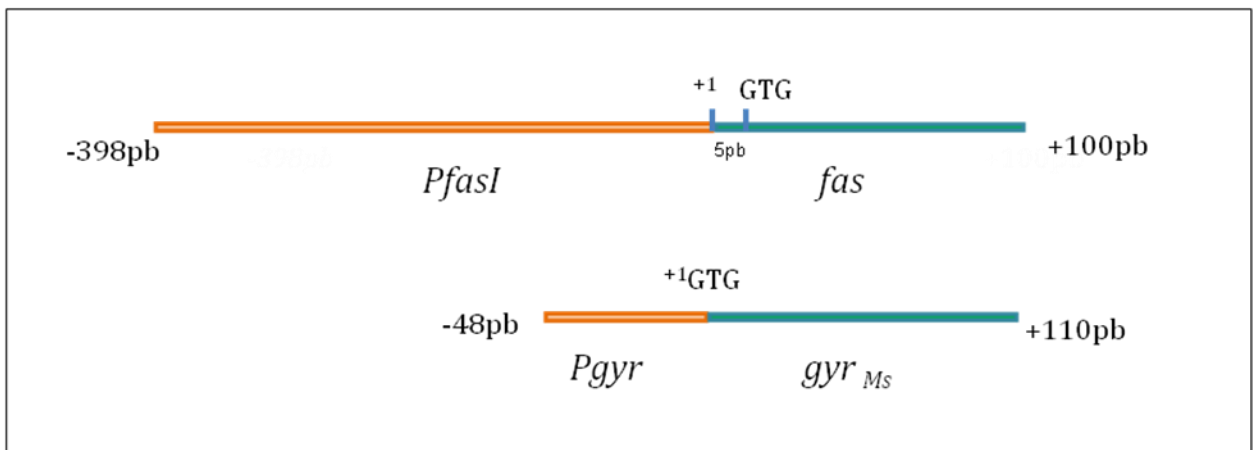


Figura 18. Sondas utilizadas en el ensayo de transcripción *in vitro*. En los dos casos las sondas contienen la región promotora y una región que permite monitorear la transcripción; los primeros 100 pb del gen *fas* y los primeros 110 pb del gen *gyr*. Estas regiones son las que se transcribirían en la reacción y por lo tanto se espera un producto de 100 nt y 110 nt. Para el gen *fas* el sitio de inicio de la traducción se encuentra 5 pb debajo de sitio de inicio de la transcripción, para el gen *gyr* ambos sitios coinciden.

Utilizando este sistema se realizaron ensayos de transcripción aumentando la concentración del regulador y manteniendo una concentración fija de las sondas *Pfas-fas* y *Pgyr-gyr*, en presencia o ausencia de C₂₀-CoA (Figura 19). Se observó que al aumentar la concentración de FasR_{MT} se incrementa la cantidad de transcripto en presencia de la sonda *Pfas-fas*, lo cual confirma a FasR_{MT} como un activador transcripcional. Además, en presencia de C₂₀-CoA se observa un efecto específico donde el transcripto disminuye a

los niveles basales que se observan en ausencia de FasR_{MT}. Al utilizar la sonda *Pgyr-gyr* se observó el producto de transcripción esperado, lo cual confirma la actividad de la ARN polimerasa, y no se obtuvo ningún efecto al incubar la sonda con FasR_{MT} o C₂₀-CoA (Figura 19 B), confirmando la especificidad del efecto de FasR_{MT} y C₂₀-CoA sobre la transcripción del gen *fas*. Estos resultados confirman a C₂₀-CoA como el ligando que modula la unión del regulador al ADN, efecto ya observado previamente mediante ensayos de retardo en gel y SPR. De esta manera, C₂₀-CoA actuaría como la (o una de las) señal(es) metabólica que regulan los niveles de expresión del operón *fas-acpS*, y por lo tanto de la síntesis *de novo* de ácidos grasos por el sistema FAS I.

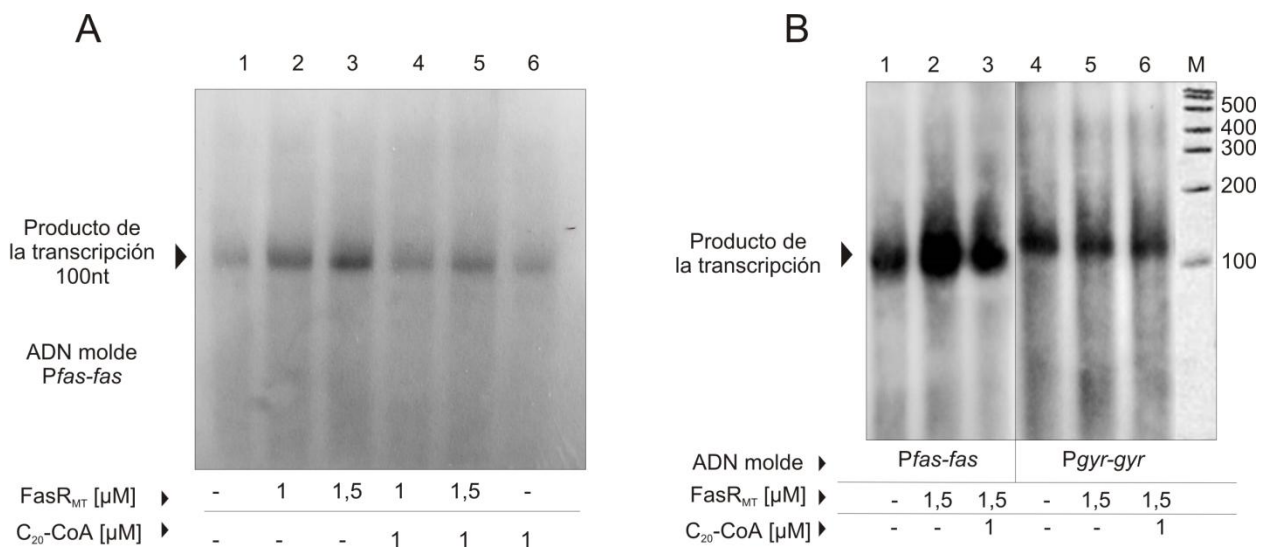


Figura 19. Efecto del regulador FasR_{MT} sobre la transcripción *in vitro* del gen *fas*. **A)** El ensayo se realizó en presencia de una sonda de 498 pb conteniendo la región *Pfas* y una región de 100 pb corriente abajo del inicio de la transcripción (*Pfas-fas*). De esta manera se esperaba un producto transcrito de 100nt (calle 1-6). **B)** En este ensayo la reacción se llevó a cabo usando la sonda *Pfas-fas* (calle1-3) y la sonda *Pgyr-gyr* (calle 4-6). En los dos casos, la reacción se llevó a cabo incubando la ARN Polimerasa, SigA, la sonda de ADN molde, los cuatro rNTPs conteniendo uno de ellos radiactivo (α UTP ³²P) en la solución de reacción, en presencia o ausencia de FasR_{MT} y C₂₀-CoA. El producto de reacción se sembró en un gel de

poliacrilamida al 6% y 8M de Urea. El tamaño de la sonda se constató con un marcador de peso molecular de ARN (M).

3.1.4 Discusión

Los resultados obtenidos a partir del análisis cinético de la interacción de los acil-CoAs de distinta longitud de cadena carbonada como moléculas ligando de FasR_{MT} coinciden con los ensayos de retardo en gel realizados previamente en el laboratorio [53]. Por un lado, pudimos comprobar que los acil-CoAs con cadenas aciladas $\geq C_{16}$ interaccionan de manera directa con FasR_{MT}, mientras que el acetil-CoA, con solo dos átomos de carbono en su cadena no lo hace. Por otro lado, los resultados obtenidos por SPR, no solo sugieren que C₁₆-CoA y C₂₀-CoA realmente interactúan con FasR_{MT} de forma directa, sino que también lo hacen de diferente manera. En los dos experimentos realizados para el análisis de la interacción FasR_{MT}-C₂₀-CoA se obtuvieron resultados similares, la respuesta obtenida por la interacción se estabiliza y luego no se observa una fase de disociación, incluso inyectando soluciones que regeneran el sistema. Este comportamiento podría ser el resultado de una unión más estable del regulador con C₂₀-CoA que con C₂-CoA, C₁₂-CoA o C₁₆-CoA. Si se confirma un proceso cooperativo en la interacción entre FasR_{MT} y C₂₀-CoA, esto podría explicar una mayor estabilidad de la interacción del regulador para este ligando específico.

A pesar de que en bacterias existen un extenso número de reguladores transcripcionales, el número de reguladores caracterizados es muy limitado, siendo aún menos los casos en que se conoce su molécula ligando. Por lo tanto, se cuenta con muy pocos ejemplos donde se ha logrado determinar la afinidad o los mecanismos por los cuales se produce la unión de estos reguladores a sus moléculas ligando, lo cual, permite comprender la modulación de la expresión de genes, operones o regulones.

De los complejos proteína-ligando que han sido caracterizados, se sabe que muchos de los ligandos producen una modulación alostérica sobre las proteínas durante la interacción, sin embargo, no existen demasiados casos de cooperativismo en reguladores transcripcionales bacterianos [130], [131]. Probablemente, la falta de estudios o la forma de abordar estos análisis sea la razón de la falta de ejemplos. Dentro de las excepciones, el represor transcripcional más caracterizado ha sido TetR de *E. coli*, el cual es capaz de detectar la concentración intracelular del antibiótico tetraciclina. La unión de este antibiótico al represor TetR, conduce a una disminución en la afinidad de la proteína respecto del ADN que permite la transcripción del gen que codifica para TetA, una proteína de membrana que exporta la tetraciclina de la célula bacteriana [132]. Este represor es un homodímero en el que cada monómero está compuesto de un dominio de unión a tetraciclina y dominio de unión al ADN; en este caso, la unión de un ligando en un sitio de la proteína altera la función de un sitio distante. Los estudios de plegamiento de proteínas de Reichheld *et. al.* [133] determinaron que la unión del antibiótico conduce al plegamiento cooperativo de toda la proteína en una conformación que reduce la afinidad por el ADN, mediante el bloqueo de los dominios de unión al ADN. Si bien sería necesario realizar experimentos adicionales para confirmar nuestra hipótesis, una interacción de tipo cooperativa entre el C₂₀-CoA con FasR_{MT} podría explicar el efecto observado en los ensayos de retardo en gel, donde la presencia de C₂₀-CoA impide de forma eficaz la unión del regulador con el ADN, mediante una unión FasR_{MT}-C₂₀-CoA altamente estabilizada.

El análisis cinético de la interacción proteína-ADN nos permitió obtener una K_D global de la interacción de 394 nM, un valor en el orden esperado en lo que respecta a lo reportado en bibliografía para otros reguladores transcripcionales de la familia TetR como por ejemplo, CprB de *S. coelicolor* (K_D = 400 nM) [134], EthR de *M. tuberculosis* (K_D

= 146 nM) [135], FasR de *Corynebacterium glutamicum* ($K_D = 101$ nM)[136] y otros reguladores transcripcionales de unión al ADN, como los reguladores de la familia MarR [137]–[139].

En bacterias no son tan comunes los ejemplos en los que las regiones operadoras que reconocen los reguladores transcripcionales sean extensas [140] y en los casos en que lo son, por lo general, los reguladores forman complejos oligoméricos donde las proteínas tetramerizan, o incluso octamerizan, como es el caso de el regulador transcripcional EthR de *M. tuberculosis*. Este regulador es un represor implicado en la resistencia a etionamida que reconoce una región de 55 pb; en este caso la unión al ADN se produce por octamerización cooperativa del regulador [135]. Otro ejemplo, es QacR de *S. aureus*, que reprime el gen que codifica para un transportador de multidrogas, *qacA*; este regulador reconoce una región protegida de 28 pb. Esta longitud, que es casi el doble que la de otros operadores caracterizados de los miembros de la familia TetR/CamR, es el resultado de la unión cooperativa de tetrámeros de QacR al ADN [141], [142].

En nuestro caso, los ensayos previos de protección a la DNasa-I, han demostrado que existen al menos dos regiones protegidas en *Pfas* en presencia de FasR_{MT}, denominadas 1, de 39 pb, y 2, de 20 pb (Figura 13A). Además, se determinó que FasR_{MT} se une a tres secuencias pseudopalindrómicas altamente conservadas en micobacterias [53]. Se estudió también, mediante ensayos de retardo en gel, como se veía afectada la unión a las secuencias reconocidas por FasR_{MT} cuando se realizaban mutaciones en nucleótidos específicos de las cajas de unión. En este análisis se observó la alta especificidad de la unión de FasR_{MT} sobre todo para la región 1 de *Pfas*, la cual contiene dos de las tres repeticiones invertidas.

Considerando los ejemplos mencionados y la longitud de la región operadora a la que se une FasR_{MT} se esperaría en este caso que la unión proteína-ADN resulte en un modelo

similar, donde se requiere la oligomerización del regulador para lograr la unión al ADN. Sin embargo, por el momento no contamos con datos definitivos que nos permitan determinar cuál es la estequiometría de la interacción FasR_{MT}-ADN. Por esta razón, en los ensayos cinéticos realizados mediante la técnica de SPR, la falta de evidencia para un ajuste a un modelo específico para esta unión, solo nos permite realizar un ajuste al modelo más sencillo de tipo 1:1 (siempre realizando los cálculos con respecto al dímero de FasR_{MT}). En este caso se obtiene un ajuste que no se amolda completamente a los datos experimentales y solo nos permite determinar una K_D global de la interacción. Los ajustes a otros modelos de unión, como el de analito bivalente 1:2, es decir un modelo en que la proteína tiene dos sitios de unión al ADN, considerando la característica dimérica de FasR_{MT} en solución, generan valores de constantes que no difieren de aquellos obtenidos utilizando el ajuste al modelo de unión 1:1; lo mismo ocurrió con el ajuste a otros modelos más complejos. Por lo tanto, la forma de no introducir errores en los cálculos es optar por el ajuste más sencillo de tipo unión 1:1, con las limitaciones que muestra este modelo. A futuro nos proponemos realizar ensayos adicionales que nos permitan obtener información sobre la estequiometría de esta unión, como ser, ensayos de exclusión molecular comparando el volumen de elusión de la proteína sola y unida al ADN o ensayos de calorimetría isotérmica de titulación (ITC de sus siglas en inglés, Isothermal Titration Calorimetry).

Tanto los ensayos donde se preincuba FasR_{MT} con C₂-CoA y C₁₆-CoA, y se analiza su interacción con el ADN, como los ensayos de transcripción *in vitro*, confirman el modelo de acción de este regulador. Teniendo en cuenta que el mayor efecto se siempre se evidenció con la unión de C₂₀-CoA, sería interesante analizar qué sucede en presencia de acil-CoAs de mayor longitud de cadena, como por ejemplo C₂₄-CoA o C₂₆-CoA, ambos productos del sistema FAS I de micobacterias.

Se ha determinado entonces que FasR_{MT} interacciona de forma directa con acil-CoAs de cadena larga, donde el mecanismo de modulación de la actividad de FasR_{MT} sería un clásico ejemplo de regulación por producto, dado que los ésteres de CoA de cadena larga, productos del sistema FAS I, serían los responsables de controlar la actividad de este regulador.

Como perspectivas para esta parte del trabajo, se planea profundizar y expandir los análisis de interacción obtenidos hasta el momento por SPR, tanto para FasR_{MT}-acil-CoA, como para FasR_{MT}-ADN. También se realizarán ensayos que permitan analizar la interacción de FasR_{MT} con sondas de *Pfas* conteniendo las distintas regiones del ADN protegidas por el regulador (región 1 y 2) o bien mutaciones puntuales en las diferentes RI.

3.2 CAPÍTULO II

Caracterización de la estructura molecular de FasR_{MT}

3.2.1 Introducción

El conocimiento detallado de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de una proteína es fundamental para el estudio de sus propiedades. Los métodos biofísicos actuales tales como dicroísmo circular, dispersión estática, dinámica de luz, fluorescencia y espectrometría de masa, si bien ofrecen una aproximación a la estructura molecular de una proteína, ninguno provee la información detallada de la ubicación de cada átomo en la macromolécula. Para ello es importante disponer de la resolución atómica de la estructura de la proteína, lo cual ayuda a comprender su relación estructura-función y su posible rol en el interior celular. Asimismo, estos datos son una herramienta muy importante para el diseño racional de fármacos. Actualmente, existen tres técnicas que brindan información a nivel atómico: la cristalografía de rayos X, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la crio-microscopía electrónica (CME), que pueden ser empleadas de manera complementaria [143]. La cristalografía de rayos X posee la ventaja principal de no presentar limitación respecto al tamaño de la macromolécula en estudio, pudiéndose resolver estructuras de PM superior a 1 MDa sin mayores inconvenientes. Contrariamente, las otras metodologías presentan limitaciones en el tamaño de la macromolécula en estudio; RMN es de gran utilidad para la resolución de estructuras de proteínas de bajo PM (<35 kDa), y la crio-microscopía electrónica se aplica principalmente para complejos macromoleculares a resoluciones relativamente bajas. Sin embargo, esta última técnica se ha desarrollado ampliamente durante los últimos años y brinda importante información sobre todo en la estructura de macrocomplejos [144]–[146]. Por otro lado, la principal desventaja en el método de cristalografía de rayos X es la dificultad para la obtención de cristales de alta calidad, que brinden mediante ensayos de difracción, la información requerida para resolver las estructuras moleculares. Los estudios de RMN se llevan a cabo en solución y por lo tanto

no requieren la generación de cristales, produciendo modelos finales que permiten estudiar la movilidad molecular. Finalmente, los análisis mediante CME tampoco utilizan cristales, siendo muy apropiados para el estudio de proteínas de membranas celulares [147].

La base de datos “Protein Data Bank” (PDB) es el mayor repositorio mundial de libre acceso de estructuras tridimensionales de macromoléculas [148]. En enero de 2017, la base PDB comprendía unos 116.900 modelos de estructuras proteicas, de las cuales, el 89% fue resuelta mediante cristalografía de rayos X. Si bien existen numerosas proteínas cuya información estructural se desconoce, recientemente se lograron avances de relevancia en la automatización de las distintas etapas relacionadas a la resolución de estructuras tridimensionales. Asimismo, la calidad de los detectores para la difracción de rayos X se ha optimizado, permitiendo la obtención de datos de alta calidad para la resolución de estructuras. Todo esto ha tenido un fuerte impacto en la cantidad de nuevas estructuras resueltas e incorporadas en los últimos años en el PDB.

3.2.1.1 Esquema para la producción y determinación estructural y funcional de proteínas.

Existen cuatro pasos claves para el análisis estructural y funcional de proteínas (Figura 20), siendo este proceso marcadamente multidisciplinario. Los resultados presentados en este capítulo se abordarán siguiendo el siguiente esquema.

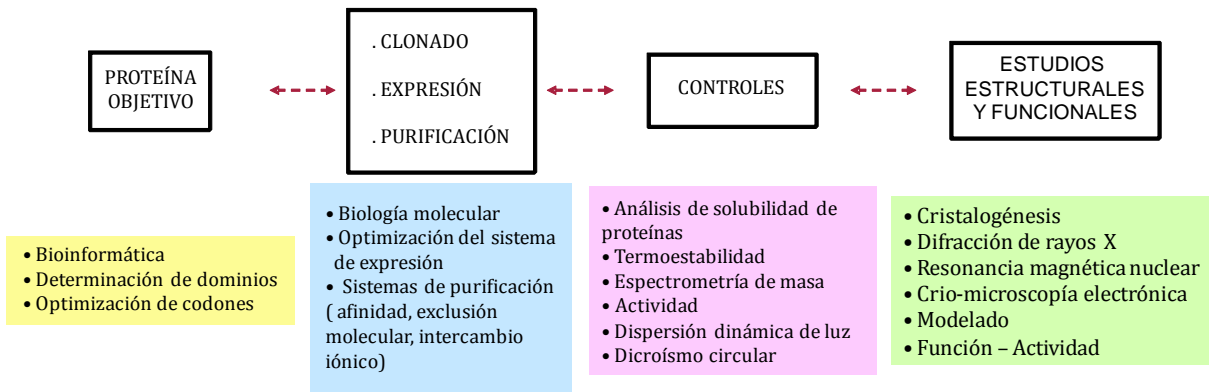


Figura 20. Diagrama de flujo para la producción y caracterización estructural y funcional de proteínas.

En este proceso, los tres primeros pasos poseen gran relevancia para la obtención de la proteína, incluyendo el análisis bioinformático de la proteína objetivo, el clonado, expresión y purificación de la proteína. Durante estas etapas iniciales, el objetivo principal se centra en la obtención de muestras homogéneas, minimizando la presencia de impurezas. Debido a que las impurezas pueden afectar la reproducibilidad de la cristalización, se busca en general que la proteína en estudio posea una pureza igual o superior al 95%. La cantidad de proteína requerida puede ser variable y depende de cada proteína en particular. Sin embargo, en general, 10 mg de proteína permiten explorar un número suficiente de condiciones de cristalización y obtener, si el proceso resulta exitoso, cristales de calidad que permitan la resolución de las estructuras. No obstante, la solubilidad de la proteína posee un rol relevante en este aspecto, ya que se requieren concentraciones adecuadas que favorezcan el efecto de nucleación que induce la formación de cristales, los cuales son la herramienta fundamental cuando la obtención de estructuras cristalográficas se realiza por medio de la difracción de rayos X.

Otro aspecto relevante es el control y verificación de la calidad y estabilidad de la muestra en estudio mediante ensayos de agregación, las cuales se realizan por medidas

de absorbancia a 340nm ($< 0,05$), dispersión de luz, dicroísmo circular, termoestabilidad y/o fluorescencia. Estos estudios nos permiten confirmar el estado oligomérico de la proteína, y nos brindan información acerca de su plegamiento. Asimismo, los análisis de actividad son fundamentales para evaluar la funcionalidad de la proteína purificada, previamente a los ensayos de cristalogénesis.

Los procedimientos que se llevan a cabo para cristalizar una proteína son por lo general notoriamente diferentes a los aplicados en sustancias inorgánicas o compuestos orgánicos de bajo peso molecular. En estos últimos, el agregado de solventes volátiles o la evaporación por calentamiento de las soluciones son en muchas ocasiones suficientes para la obtención de cristales. Sin embargo, en el caso particular de las proteínas, estas operaciones resultan en su desnaturalización.

Existe una gran variedad de técnicas que permiten lograr la cristalización de proteínas, sin embargo, la difusión de vapor sigue siendo el método más utilizado. Esta técnica es compatible tanto con procedimientos manuales como automatizados, y es la que se ha utilizado en este trabajo de tesis (se detallan los procedimientos técnicos en M&M).

La difracción de rayos X es un fenómeno físico que implica la dispersión de un haz de rayos X, producido por un solo átomo o una sola molécula, siendo el mismo de una magnitud muy baja. Los compuestos orgánicos en general están constituidos por átomos livianos como C, N, H y O, y dado que la dispersión de rayos X es directamente proporcional al número de electrones del centro de dispersión, para ser capaces de medir este fenómeno, es necesaria la dispersión proveniente de una enorme cantidad de moléculas perfectamente ordenadas en las tres dimensiones (3D). Por consiguiente, los cristales son herramientas esenciales de amplificación de la señal, distribuyendo a su vez la gran energía asociada a la radiación de alta frecuencia en trillones de moléculas

individuales que de otro modo se dañarían muy rápidamente. La difracción se produce por distorsión de una onda por un obstáculo y la longitud de onda del haz incidente es proporcional a las dimensiones del obstáculo. Esto se conoce como el experimento de difracción de Fraunhofer, donde el obstáculo es una rendija [149]. En este caso, la rendija es la distancia entre los átomos de las moléculas que componen la proteína, y la distancia de enlace se encuentra en el orden de los Angstrom (\AA), magnitud que concuerda con la longitud de onda de los rayos X. El término “rayos X” designa a un tipo de radiación electromagnética descubierta por Wilhelm Röntgen en 1895, que posee una longitud de onda situada entre 0,1 y 100 \AA . Los rayos X implicados en el campo de la cristalografía poseen una longitud de onda próxima a 1 \AA , que corresponden a una frecuencia aproximada de 3 millones de THz y a una energía de 12,4 keV [150]. Estos rayos X pueden producirse en laboratorios de cristalografía o en las grandes instalaciones denominadas sincrotrones.

El resultado experimental final de la cristalografía por difracción de rayos X es la obtención de un mapa de densidad electrónica en 3D, que luego es interpretado por medio de un modelo atómico del cristal. Desde el punto de vista estructural, las proteínas pueden considerarse como complejos soportes que organizan en el espacio, y de forma muy precisa, ciertos grupos químicos funcionales, definiendo de esta manera los sitios activos de las enzimas o las superficies de interacción con otras macromoléculas. Asimismo, las estructuras también codifican la potencialidad dinámica de las proteínas, permitiendo y definiendo los movimientos moleculares críticos que permiten ejecutar sus funciones biológicas. La periodicidad esencial de la materia cristalina determina que la aproximación cristalográfica aplicada al estudio de proteínas, genere información sobre estados conformacionales homogéneos (único estado, o al menos netamente mayoritario), para cada forma cristalina o tipo de empaquetamiento

espacial. Los modelos atómicos derivados, además de las coordenadas atómicas en 3D, incluyen también factores de desplazamiento atómico (factores B o de temperatura) que permiten apreciar las vibraciones atómicas y/o el desorden estático presente en los cristales, describiendo la flexibilidad de las distintas regiones de la macromolécula.

Los modelos estructurales obtenidos requieren ser validados. El proceso de validación tiene por objetivo detectar errores durante la resolución y el refinamiento, como así también determinar la calidad del modelo final en base a un conjunto de factores estadísticos y gráficos adecuados (ver M&M). Para ello se comparan los resultados obtenidos en los modelos experimentales contra los esperados, a partir de una base de datos de estructuras a alta resolución, siendo el paso final para el análisis estructural la validación biológica y funcional del modelo obtenido.

3.2.1.2 FasR_{MT} es un activador transcripcional de la familia TetR

FasR es un regulador transcripcional perteneciente a la familia TetR que, como se mencionó anteriormente, se une específicamente a la región promotora del operón *fas-*acpS**, la cual se encuentra altamente conservada en actinomicetales productores de ácidos micólicos [53].

Los reguladores transcripcionales de la familia TetR, son en general sistemas de transducción de señales que involucran un solo componente. Las proteínas pertenecientes a esta familia de reguladores contienen un motivo hélice-giro-hélice (HTH, del inglés *Helix-Turn-Helix*) conservado en el extremo N-terminal de unión a ADN, y un bolsillo de unión a ligando en el extremo C-terminal. Estos reguladores son a menudo represores y se unen al ADN evitando la transcripción en ausencia de un ligando [140]. La unión de una molécula efectora en el bolsillo C-terminal provoca cambios estructurales en la proteína que resultan en la liberación del regulador sobre la

molécula de ADN. A diferencia de la mayoría de los reguladores de esta familia que actúan como represores, FasR_{MT} es un activador de la transcripción [53], [151].

Las proteínas de tipo TetR están presentes en un gran número de genomas bacterianos [140], encontrándose disponibles en bases de datos públicas las secuencias aminoacídicas de más de 200000 reguladores TetR. Asimismo, se han resuelto al menos 200 estructuras de proteínas TetR. La proteína modelo de esta familia de reguladores, y de la cual recibe el nombre, es TetR del transposón *Tn10* de *E. coli*; como se mencionó en el capítulo I, este represor controla la transcripción de una bomba de flujo que transporta el antibiótico tetraciclina fuera de la célula [152]. Este antibiótico se une al bolsillo del dominio C-terminal de TetR de *E. coli*, provocando la disociación del complejo ADN-represor y permitiendo la expresión de la proteína de resistencia TetA, que es responsable del eflujo activo de tetraciclina [153].

A pesar que el control del eflujo de fármacos tiene un rol muy documentado en esta familia de proteínas, a medida que se caracterizan más reguladores, queda en evidencia que esta es sólo una de las diversas funciones controladas por este grupo de proteínas. La gama de funciones moduladas por los TetR incluye: metabolismo del carbono, del nitrógeno y de cofactores, señalización célula-célula y división celular [140]. Si bien la mayoría de las regulaciones mediadas por estos factores transcripcionales son por represión de la expresión, existen varias subfamilias de TetR que no se ajustan a este paradigma. Hay algunos casos en los que, al igual que FasR_{MT}, actúan como activadores transcripcionales [154], [155], como ser AtrA de *Streptomyces griseus* que activa la expresión de un regulador de la biosíntesis de streptomicina [156], y en muy pocos casos se observó que estas proteínas cumplen un rol como reguladores globales [157]. Expandiendo aún más la diversidad funcional de este tipo de reguladores, se demostró que los mismos pueden interactuar con ligandos peptídicos [158] o incluso llevar a cabo

una regulación dual, tanto a nivel transcripcional como post-traducciona [159]. Estas evidencias sugieren roles muy diversos para este tipo de reguladores y abren una serie de interrogantes acerca de los mecanismos moleculares involucrados en los distintos tipos de regulación.

FasR_{MT} tiene una masa molecular calculada de 25.166,3 Da con 228 aminoácidos, consistente con lo observado para la mayoría de los reguladores de la familia TetR, cuyas masas moleculares se ubican en el rango de 21 a 25 kDa. Como se mencionó anteriormente, una característica distintiva entre los miembros de esta familia es la presencia de un motivo HTH en la región N-terminal de unión a ADN [140]. En FasR_{MT}, este dominio se encuentra en la región comprendida entre los aminoácidos 44-89, el cual varía en unos pocos aminoácidos según la fuente de búsqueda (*Pfam*, *Prosite*, *Prints*). Además, este análisis de secuencia de FasR_{MT}, también revela un dominio efector de tipo TetR en el extremo C-terminal entre los aminoácidos 210 y 222 (*Interpro - EMBL*), [160].

En muchas especies de micobacterias, incluyendo *M. tuberculosis*, los reguladores TetR corresponden a la familia más abundante de reguladores transcripcionales, donde la mayoría parece estar involucrados en la regulación de la transcripción de proteínas implicadas en conferir la enorme plasticidad metabólica que tiene las micobacterias. Hasta la fecha, sólo 5 de al menos 52 TetR de *M. tuberculosis*, han sido caracterizados de forma estructural [161]. La pregunta más importante en torno a la biología de los reguladores TetR es la naturaleza y diversidad de sus ligandos y cómo estos se relacionan con los procesos bioquímicos bajo su control.

El análisis de la estructura cristalográfica de FasR_{MT} permitirá avanzar sobre el conocimiento hacia los cambios que se producen en función de su unión con los ligandos que modulan su actividad regulatoria. Considerando que FasR_{MT} es esencial para

mantener la homeostasis lipídica en micobacterias, su caracterización estructural podría aportar información importante para la búsqueda racional de nuevos compuestos antimicobacterianos.

3.2.2 Objetivo

El objetivo general de esta parte del trabajo de tesis consiste en obtener la estructura tridimensional del activador transcripcional de la síntesis de ácidos grasos, FasR_{MT}.

Los objetivos particulares son:

- Expresión, purificación y determinación de la forma molecular activa del regulador.
- Determinación de la estructura cristalográfica de FasR_{MT} y de sus complejos moleculares.
- Análisis de las estructuras cristalográficas de FasR_{MT} y FasR_{MT}-ligando con el fin de interpretar los cambios que se producen y que modulan su actividad regulatoria.

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Características generales y análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de la proteína FasR_{MT}.

La secuencia de FasR_{MT} fue empleada para realizar una búsqueda de proteínas homólogas mediante el uso del programa BLASTP [162]. Este análisis reveló la existencia de proteínas hipotéticas que poseen más del 40% de identidad con FasR_{MT}, todas ellas presentes exclusivamente en actinomicetes; incluyendo miembros del género

Rhodococcus, *Nocardia*, *Gordonia*, *Frankia* y *Streptomyces*. Los mayores porcentajes de identidad (> 51%) fueron observados en las proteínas presentes en los actinomicetes productores de ácidos micólicos, llegando a porcentajes de identidad mayores al 80% en las proteínas ortólogas presentes en las diferentes especies de micobacterias (Figura 21). En este caso, la mayor divergencia fue observada en el extremo N-terminal, que incluye a los primeros 28 aminoácidos.

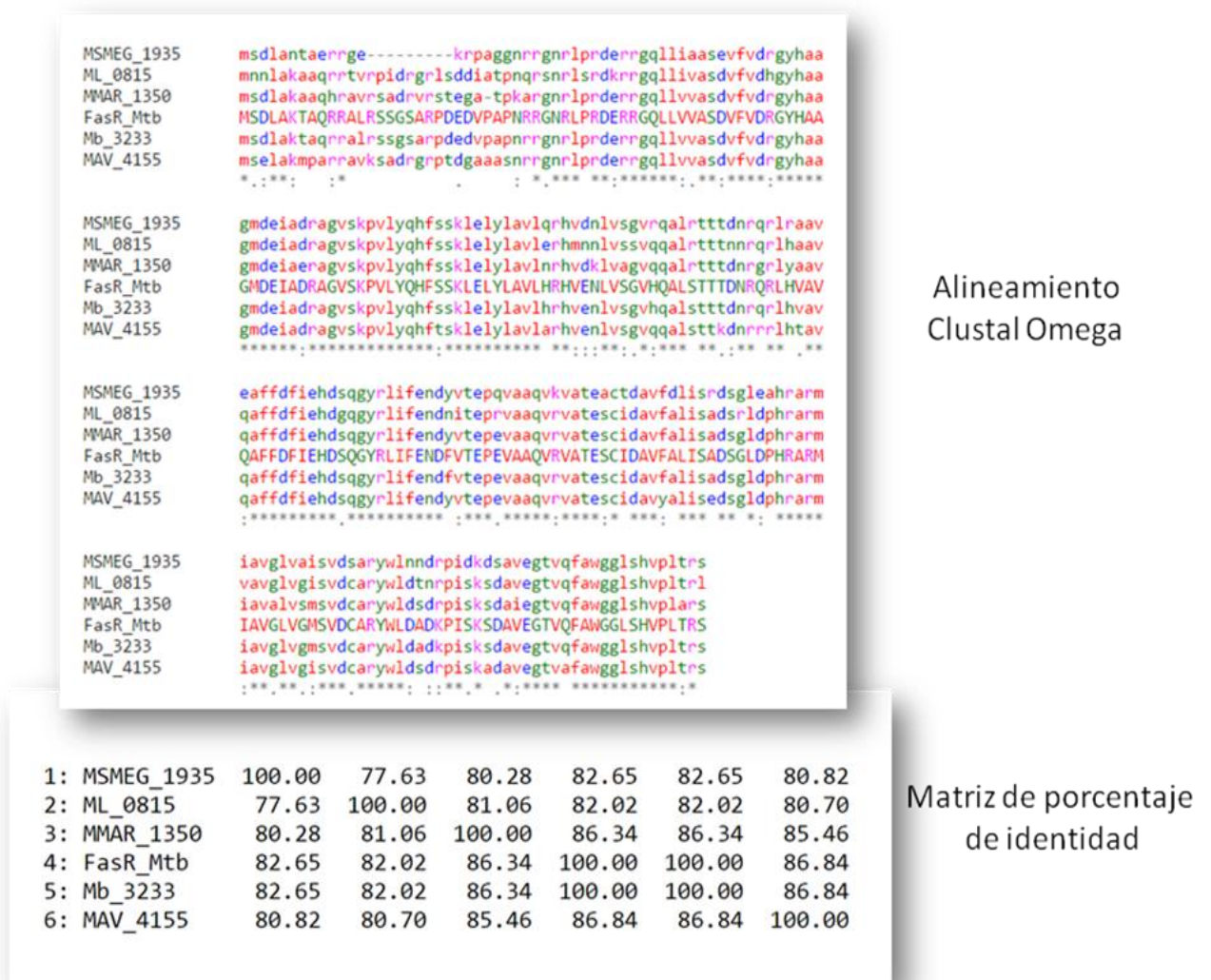


Figura 21. Alineamiento y homología de la secuencia aminoacídica de proteínas ortólogas a FasR_{MT}. 1 *M. smegmatis* (MSMEG_1935), 2 *M. leprae* (ML_0815), 3 *M. marinum* (MMAR_1350), 4 *M. tuberculosis* (FasR_Mtb), 5 *M. bovis* (Mb_3233), 6 *M. avium* (MAV_4155).

Considerando que el objetivo del trabajo era obtener la estructura tridimensional de esta proteína reguladora, el primer paso consistió en el análisis de sus características físico-químicas y la búsqueda de estructuras de proteínas semejantes ya caracterizadas. Esta información facilitaría tanto la optimización de la purificación como la obtención de un modelo base, que permitiese resolver las estructuras cristalinas en las últimas instancias del trabajo. Sin embargo, hasta el momento no se conoce la estructura de ningún ortólogo de FasR_{MT}. La proteína que presenta mayor identidad de secuencia y cuya estructura ha sido depositada en la base de datos de PDB, es una proteína perteneciente a la familia TetR de *Rhodococcus sp. RHA1* (PDB id. 3F1B), la cual posee sólo un 28% de identidad.

La Tabla 10 muestra un resumen de algunas características físicas y químicas de la proteína FasR_{MT} y las predicciones de su estructura secundaria, obtenidas mediante los programas ProtParam [99] y PSIPRED [100].

Tabla 10. Características generales de FasR_{MT}

Características FasR_{MT}	
Número de aminoácidos	228
Peso Molecular (Da)	25169
Punto isoeléctrico	6.13
Índice de inestabilidad	36,25
Épsilon 280	18450
Predicciones de estructura secundaria	
Hélices transmembrana	No
Péptido señal	No
Regiones desordenadas (N° de aminoácidos)	44
Regiones extensas con baja complejidad aminoacídica	0
Estructuras coil-coil	0
Predicción de hélices (N° de aminoácidos)	63
Aminoácidos Hidrofóbicos (ALIVMWPF)	101

El análisis de las características físicas y químicas generales de FasR_{MT} permite obtener datos importantes para llevar a cabo la expresión, purificación y cristalización de proteínas. Como se mencionó en la introducción, FasR_{MT} tiene un peso molecular característico de los miembros de la familia TetR, así como una estructura secundaria formada exclusivamente por hélices α (Figura 22), otra característica compartida por los miembros de esa familia [140]. El punto isoeléctrico es un valor significativo en la purificación de proteínas, ya que representa el pH en el que la solubilidad es típicamente mínima, por lo que nos proporcionó un rango de pH en el cual trabajar durante el proceso de purificación.

El índice de inestabilidad proporciona una estimación de la estabilidad de una proteína en solución, se basa en un análisis estadístico de proteínas inestables y estables donde, la frecuencia de ciertos dipéptidos específicos difiere significativamente entre estos dos grupos de proteínas. Los autores de este método han asignado un valor de inestabilidad a cada uno de los 400 dipéptidos diferentes. Estas predicciones indican que una proteína con un índice de inestabilidad menor a 40 es estable, mientras que una proteína con índice mayor a 40, no lo es [163]. En nuestro caso, para FasR_{MT} el valor obtenido predice una proteína estable en solución.

La proteína FasR_{MT}, presenta una región desordenada de 44 aminoácidos en su extremo N-terminal, y es la región que presenta mayor divergencia de secuencia entre las proteínas ortólogas presentes en las diferentes especies de micobacterias, discutiremos sobre esto más adelante.

dímero con un peso molecular aparente de ~52 kDa [53]. La funcionalidad de His₆-FasR_{MT} también había sido demostrada previamente por su capacidad de unión al promotor del operón *fas-acs* mediante ensayos de retardo en gel (Figura 7).

En estos primeros ensayos no se había puesto énfasis en la cantidad o concentración final de la proteína purificada. Sin embargo, debido a que para la realización de ensayos cristalográficos se requiere en general una concentración elevada y un alto grado de pureza de la proteína en estudio, en esta etapa se decidió optimizar la expresión y purificación de His₆-FasR_{MT}. Para ello se realizaron ensayos en cuatro cepas de *E. coli* (BL21, BL21 codón Plus, Rosetta y Origami, Tabla 3 M&M), se combinaron 4 medios de cultivo (LB, SB, TB, 2YT), y 3 temperaturas de crecimiento (37, 23, 17 ° C), a fin de encontrar la condición de expresión más propicia. El regulador se expresó como proteína recombinante con fusión a una cola N-terminal de 6 histidinas a partir del plásmido pFR3, el cual fue obtenido mediante el clonado del gen *Rv3208* de *M. tuberculosis*, en el plásmido pET24a (+), (Figura 23). De las condiciones evaluadas, aquella donde se utilizó la cepa BL21 codón Plus, el medio LB y la temperatura de inducción de 23°C, resultó ser la más adecuada para la óptima expresión de la proteína His₆-FasR_{MT}. Luego de optimizada su expresión, His₆-FasR_{MT} se purificó a través de cromatografía de afinidad por columnas de Ni²⁺-NTA agarosa, seguida por una cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Superdex S200 GL (GE Healthcare), (Figura 23 B y C).

Implementando este procedimiento la proteína alcanzó una alta pureza (Figura 23 C) y alta concentración luego de ser concentrada con microconcentradores (~35 mg/ml), aunque la misma se encontraba en un tampón en presencia de 20% de glicerol. Si bien la presencia de glicerol (10 a 50% v/v) es útil para incrementar la estabilidad de las proteínas, sobre todo para ser congeladas durante su almacenamiento, en

cristalogénesis se recomienda evitar su uso, ya que no solo puede resultar difícil eliminar el glicerol por diálisis o filtración, sino que la presencia de este alcohol es una variable más que se introduce en el evento de cristalización. El glicerol puede comportarse como un precipitante, un aditivo, o como crioprotector y por lo tanto pueden influir en el resultado de un experimento de cristalización.

Con el fin de sustituir el glicerol presente en el tampón de almacenamiento, se llevó a cabo un estudio de solubilidad mediante microdiálisis, utilizando pequeños recipientes para contener la proteína (botones de 100 μ l) y diferentes tampones sin glicerol (o menor concentración), con distintas condiciones de salinidad y pH. Se evaluaron 45 condiciones totales y como criterio para detectar la formación de agregados se midió la absorbancia a 340 nm, tal como se describió en M&M. El ensayo en microdiálisis se realizó partiendo de una concentración de 1 mg/ml de His₆-FasR_{MT}. Una vez realizada la microdiálisis, una condición con absorbancia a 340 nm \leq 0,05 se consideraba satisfactoria en cuanto a la solubilidad de la proteína y se continuaba concentrando en la misma condición y analizando la solubilidad de la misma mediante la medida de absorbancia a 340 nm. La mejor condición encontrada en el ensayo descrito anteriormente fue 10 mM Tris pH 9 y 500 mM NaCl. Utilizando esta condición, se probó el mantenimiento de la solubilidad de His₆-FasR_{MT} luego de un paso de congelado/descongelado a -70°C, resultando satisfactoria. De esta manera, esta solución fue utilizada como condición final de diálisis y almacenamiento.

La concentración de His₆-FasR_{MT} obtenida originalmente, o sea cuando se expresaba en una cepa de BL21 codón Plus a 37°C, se purificaba, y luego se dializaba y almacenaba en un tampón que contenía 20 mM Tris pH 8, 150 mM de NaCl y 20 % de glicerol era de 4 mg/ml (luego de ser concentrada utilizando microconcentradores), mientras que,

luego de optimizar las condiciones de expresión, purificación y solubilidad fue de 45 mg/ml.

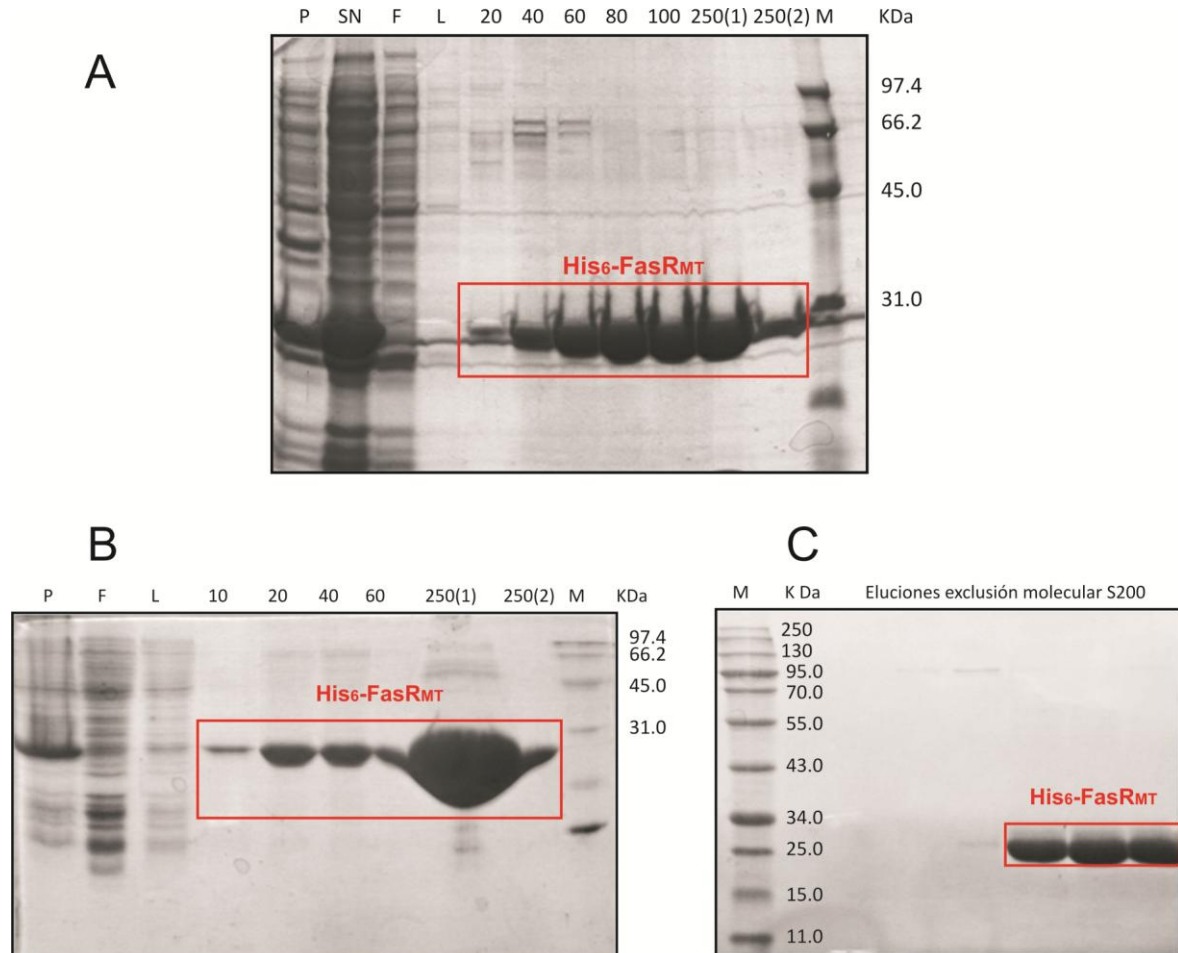


Figura 23. Optimización de la expresión y purificación de His₆-FasR_{MT}. La proteína se purificó utilizando una columna de afinidad Ni²⁺-NTA agarosa y las fracciones eluidas se analizaron por SDS-PAGE. **A)** resultado obtenido antes de la optimización de las condiciones de expresión. **B)** resultado obtenido luego de la optimización de la expresión. **C)** SDS-PAGE de las eluciones obtenidas en el ensayo de exclusión molecular de la proteína His₆-FasR_{MT}. P, fracción insoluble; SN, fracción soluble; F, fracción no unida a la columna; L, lavado 5 mM imidazol; 10-250, fracciones eluidas con 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM y 250 mM imidazol, (1) y (2) primera y segunda elución, respectivamente; M, marcador de peso molecular.

Una vez optimizadas las condiciones de purificación y la concentración de FasR_{MT}, se realizaron ensayos de cristalización en el Instituto Pasteur de Montevideo (IPMONT), empleando diversos kits comerciales (AmSO4 Suite, ClassicsL Suite, PEGs Suite y pHClear Suite -Qiagen) y mediante el método de difusión de vapor en gota sentada. Se ensayaron distintas concentraciones de proteínas (20, 25 y 45 mg/ml) no obteniéndose cristales en ninguna de ellas. Estos resultados negativos y la observación de que, en la mayoría de las gotas no se encontraban precipitados de proteína o señales de actividad, nos llevaron a hipotetizar que la alta solubilidad de FasR_{MT} podría ser un factor negativo para lograr núcleos de cristalización iniciales. A partir de estos resultados se realizaron algunas pruebas para determinar si estábamos utilizando una concentración de proteína que se encontraba muy por debajo de la concentración recomendada para estos ensayos. En estas pruebas, se utilizaron concentraciones límites (mayores y menores) de precipitantes y pH, presentes en muchas de las condiciones que forman parte de los kits de cristalogénesis (ver M&M). Utilizando una concentración inicial de His₆-FasR_{MT} de 45 mg/ml y elevadas concentraciones de los agentes precipitantes, tampoco se logró observar núcleos de precipitación. Nuevos ensayos de concentración de la proteína demostraron que la misma podía alcanzar concentraciones cercanas a los 80 mg/ml manteniéndose aún soluble ($Abs_{340} < 0,05$); esto resultó ser un gran inconveniente, ya que para realizar ensayos de cristalogénesis (400-500 μ l), se necesitaba una gran cantidad de proteína, la cual era muy difícil de obtener. Si bien se logró completar un rastreo robótico de 200 condiciones de cristalización a 75 mg/ml tampoco se obtuvieron cristales a esa elevada concentración.

Posteriormente, se realizaron algunos experimentos de cristalogénesis con distintos kits (Hampton Research, M&M) en el Instituto Leloir de Buenos Aires y en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR). En el IBR los cribados fueron realizados a

mano por el método de difusión de vapor en gota colgante y se utilizaron otros tampones de almacenamiento para His₆-FasR_{MT}, donde la proteína mostraba menor solubilidad; sin embargo, en ninguno de los casos se lograron obtener cristales de His₆-FasR_{MT}.

Ensayo 2: FasR_{MT} nativa

En base a los resultados del Ensayo 1 se decidió realizar nuevas construcciones de FasR_{MT}, a fin de modificar sus propiedades fisicoquímicas y de esta manera intentar mejorar las propiedades para alcanzar la cristalización. Existen evidencias que indican que, para muchas proteínas la cola de histidinas podría ser un factor que interfiere con la cristalización debido a un aumento de la movilidad de la proteína en solución [164]; por lo consiguiente decidimos quitar la cola de histidinas ubicada en el extremo N-terminal de His₆-FasR_{MT} mediante tratamiento con la cistein-proteasa TEV (*Tobacco etch virus*). Con éste fin, se amplificó el gen *Rv3208*, que codifica para FasR_{MT}, con oligonucleótidos que contenían la secuencia que codifica para el sitio de corte de la proteasa TEV y luego de secuenciar se clonó dicho gen en el vector pET28a (+), para dar lugar al plásmido pFRtev. Finalmente se transformó la cepa BL21 codón Plus (descrito en M&M) para la expresión de la nueva proteína recombinante. La proteína FasR_{MT} nativa fue obtenida mediante un primer paso de purificación, utilizando una columna de Ni²⁺-NTA agarosa, y un corte de la cola de histidinas en la misma columna con la proteasa TEV. La proteína eluída fue sometida a una nueva etapa de purificación mediante el uso de una columna de exclusión molecular Sephadex S-200 (GE).

La versión de la proteína nativa presentó características de solubilidad satisfactorias para los ensayos de cristalogénesis, alcanzando concentraciones finales cercanas a los 20 mg/ml.

Con esta proteína se realizaron ensayos funcionales de retardo en gel en presencia de una sonda marcada con ^{32}P que contenía las regiones de unión al ADN. En este caso se utilizó una sonda de 120 pb (*Pfas120*) que contenía las regiones protegidas 1 y 2 determinadas por ensayos de protección a la DNasa-I descritas en el capítulo I (Figura 13). Mediante este experimento se pudo confirmar que la forma proteica nativa era activa por su capacidad de unirse al ADN (Figura 24). Además, se realizó el mismo experimento utilizando sondas más cortas en vista del posible uso de las mismas en ensayos de cristalogénesis. Para ello se utilizaron las regiones de unión denominadas 1 y 2 por separado. Como se comentó en el capítulo I, la región 1 está formada por dos repeticiones invertidas, por lo que se generó una sonda marcada con ^{32}P de 42 pb que contenía dichas secuencias, mientras que para la región 2 se generó una sonda de 27 pb, la cual contiene solamente una repetición invertida. En ninguno de los dos casos se logró obtener un retardo en gel producto de la unión del regulador a estas sondas, esto también se analizó utilizando la proteína His₆-FasR_{MT}, donde se obtuvo el mismo resultado (dato no mostrado).

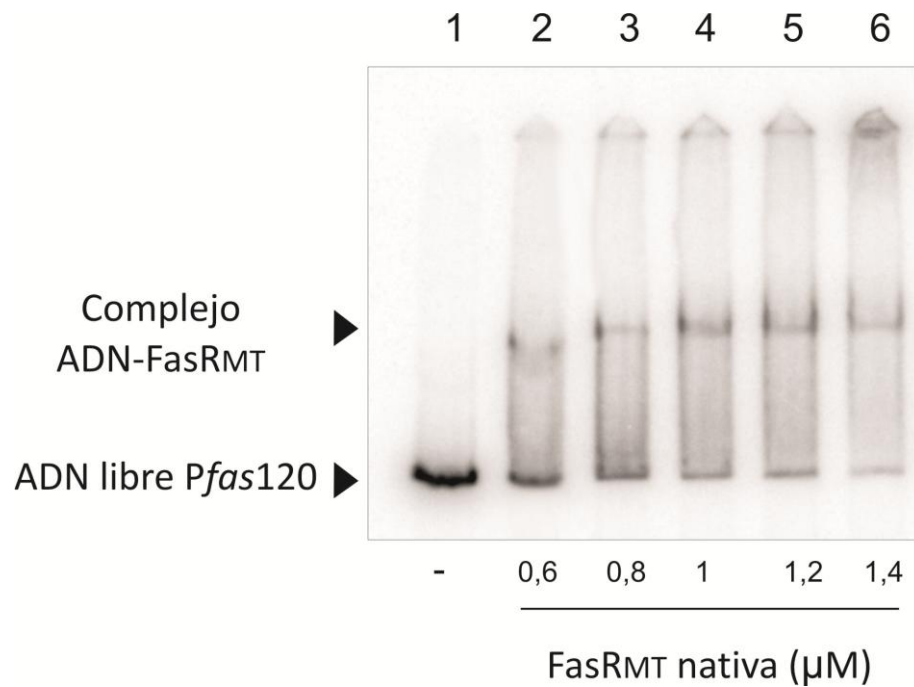


Figura 24. Análisis de la capacidad de la proteína FasR_{MT} nativa de unirse a *Pfas120*. El ensayo de retardo en gel se realizó mediante una sonda marcada con ³²P. La sonda *Pfas120* contiene las tres repeticiones invertidas previamente identificadas en la región promotora del operón *fas-acpS*. Para este ensayo, se utilizaron concentraciones crecientes de FasR_{MT} nativa, donde se puede observar un retardo en la movilidad electroforética de la sonda marcada producto de la unión del regulador a dicha sonda. Calle 1- sonda libre, 2-6 concentraciones crecientes de FasR_{MT} nativa (0,6 -1,4 μM).

El perfil de FasR_{MT} nativa utilizando Dicroísmo Circular (DC) nos permitió determinar que la proteína se encontraría correctamente plegada. FasR_{MT} nativa muestra una señal dicroica con mínimos a 208 y 222 nm, característicos de proteínas con alto contenido α -hélice (Figura 25). Esto resultados coinciden con las predicciones de una estructura secundaria compuesta por hélices α obtenida con los programas bioinformáticos utilizados.

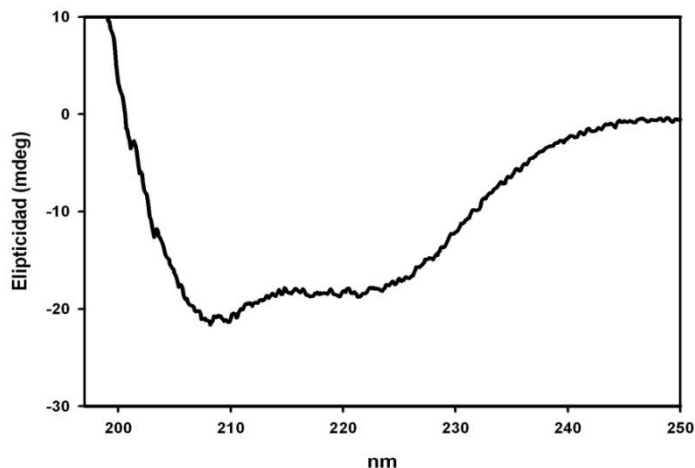


Figura 25. Dicroísmo circular de FasR_{MT} nativa. FasR_{MT} nativa muestra una señal dicróica con mínimos a 208 y 222nm característicos de proteínas con alto contenido α -hélice, esto indicaría que la proteína se encuentra plegada.

Luego de confirmar la integridad y funcionalidad *in vitro* de la proteína FasR_{MT} nativa, y habiendo purificado la misma con un alto grado de pureza a una concentración promedio de 20 mg/ml, utilizando 10 mM de Tris pH 7,5 y 250 mM de NaCl como tampón de diálisis, (el cual posee condiciones óptimas para ensayos de cristalogénesis), se procedió a realizar un nuevo cribado de condiciones de cristalización como se realizó para el caso de His₆-FasR_{MT} en IPMONT. Sin embargo, a partir de ensayos de cristalogénesis por el método de difusión en gota sentada y gota colgante, solo se establecieron condiciones en las cuales se lograron obtener pequeños cristales con hábito de agujas de la proteína nativa FasR_{MT} en presencia de C₂₀-CoA, que no lograron ser reproducidos. Por lo que no se pudieron obtener datos de difracción que permitieran resolver su estructura.

Teniendo en cuenta la importancia de la caracterización a nivel estructural de esta proteína decidimos analizar más en detalle a FasR_{MT} mediante nuevos estudios bioinformáticos.

Ensayo 3: FasR_{33MT}

Existen programas computacionales que ofrecen diferentes herramientas para el análisis de proteínas a partir de su secuencia, incluso algunos permiten estimar cual es la probabilidad que tiene nuestra proteína objetivo de cristalizar [165], [166]. El análisis bioinformático mediante el programa *XtalPred* [101] indicó una muy baja probabilidad de cristalización para FasR_{MT}, debido principalmente a una región altamente desordenada en el extremo N-terminal de la misma (Figura 26). Esta región se encuentra también presente en varios ortólogos de FasR_{MT} (Figura 21). En muchos casos, las regiones desordenadas generan una gran movilidad para las proteínas en solución [167], pudiendo ser esta la causa de la imposibilidad de obtener cristales con las proteínas His₆-FasR_{MT} y FasR_{MT} nativa, utilizadas previamente para los ensayos de cristalogénesis (Ensayos 1 y 2). Por esta razón nos propusimos realizar construcciones que nos permitieran expresar la proteína de forma truncada, sacando parte de esta región desordenada de FasR_{MT} comprendida entre los aminoácidos 1 al 44 (Figura 26).



Figura 26. Predicción de estructura secundaria de FasR_{MT}. Se pueden observar las predicciones de estructuras secundarias de FasR_{MT} por diferentes programas bioinformáticos (*XtalPred*, *Disorder2*, *PredictProtein*) a partir del análisis de su secuencia. Se observa una estructura secundaria formada íntegramente por hélices α (aminoácidos en rojo) y una gran región desordenada en el extremo N-terminal de la proteína (aminoácidos subrayados).

A partir de FasR_{MT} (*Rv3208*) se construyeron dos mutantes conteniendo deleciones de los primeros 33 o 43 aminoácidos, FasR_{33MT} y FasR_{43MT}, respectivamente. Además, se realizaron construcciones de la proteína truncada a partir de dos ortólogos de FasR_{MT}; dos correspondientes a la proteína de *M. smegmatis* (*MSMEG_1935*), FasR_{33MS} y FasR_{43MS} y otras dos correspondientes al ortólogo en *M. leprae* (*ML0815c*), FasR_{33ML} y FasR_{43ML} (Tabla 4).

Las construcciones para obtener las proteínas truncadas FasR_{33MT}, FasR_{43MT}, FasR_{43MS} y FasR_{43ML} fueron obtenidas a partir de genes sintéticos (*GenScript*), mientras que para FasR_{33MS} y FasR_{33ML} y fueron amplificadas con oligonucleótidos específicos por PCR a partir de los genes *MSMEG_1935* y *ML0815c*, respectivamente (M&M). Todos los genes incluían en su construcción la secuencia que codifica para el sitio de corte de la proteasa TEV (ENLYFQ/G) en el extremo N-Terminal y fueron subclonados en el plásmido de expresión pET28a (+). Como se realizó con las construcciones anteriores, en este caso también se optimizaron las condiciones de expresión para todas las proteínas mutadas. Para ello, se utilizaron como cepas de expresión a BL21 y BL21 codón Plus. Se evaluaron los niveles de expresión de las distintas construcciones a diferentes temperaturas de inducción (15, 23 y 30°C) e induciendo con diferentes concentraciones finales de IPTG (0,1, 0,25 y 0,5 mM). La Tabla 11 resume las condiciones finales en las que se obtuvieron las mejores condiciones de concentración y pureza para cada proteína.

Tabla 11. Condiciones de expresión para las seis proteínas FasR truncadas.

Organismo	Nombre de la construcción	Aminoácidos truncados	Condición Final			Concentración
			Temperatura de inducción	IPTG (mM)	Tampón de diálisis	
<i>M. tuberculosis</i>	FasR _{33MT}	2-34	30-23°C	0,25-0,5	10 mM Tris pH 8 -250mM NaCl	10 mg/ml
	FasR _{43MT}	2-44	23°C	0,25	10 mM Tris pH 8 - 250mM NaCl-5% Glicerol	2 mg/ml
<i>M. smegmatis</i>	FasR _{33MS}	2-34	23°C	0,25	10 mM Tris pH 7,5 - 250mM NaCl -5% Glicerol	5 mg/ml
	FasR _{43MS}	2-44	23°C	0,25	10 mM Tris pH7,5 - 250mM NaCl -5% Glicerol	1 mg/ml
<i>M. leprae</i>	FasR _{33ML}	2-34	23°C	0,25	10 mM Tris pH7,5 - 500mM NaCl -5% Glicerol	5 mg/ml
	FasR _{43ML}	2-44	23°C	0,25	10 mM Tris pH7,5 - 500mM NaCl -10% Glicerol	-

En las tres construcciones que carecían de los primeros 43 aminoácidos, las proteínas aparecían casi en su totalidad en la fracción no soluble, y lo poco que lograba ser purificado sufría luego graves problemas de agregación. En cambio las proteínas sin los primeros 33 aminoácidos, pudieron ser purificadas satisfactoriamente y en condiciones adecuadas para los ensayos de cristalogénesis.

3.2.3.3 Estudios estructurales y funcionales

3.2.3.3.1 Cristalización

A partir de las tres construcciones que presentaban mejores condiciones de pureza y concentración, FasR_{33MT}, FasR_{33MS} y FasR_{33ML}, se realizaron los ensayos de

cristalogénesis por medio de un cribado robótico en placas de 96 pocillos, basado en el método de difusión de vapor en gota sentada en un ambiente con temperatura controlada (20 °C). Estos ensayos se realizaron en el IBR con el nuevo robot de cristalización Gryphon (M&M).

Al igual que en los ensayos de cristalogénesis anteriores, debido a que no se contaba con información previa relativa a la cristalogénesis de estas proteínas, se iniciaron los ensayos de cristalización con los kits comerciales de Hampton Research (288 condiciones diferentes). Para todas las proteínas se iniciaron los ensayos de cristalogénesis con 5 mg/ml de proteína. Si bien FasR_{33MT} llegaba a concentraciones mayores, esta fue la concentración óptima según los ensayos de concentración para cristalogénesis, realizados a partir de las concentraciones máximas y mínimas de los precipitantes más frecuentes en los kits. Solo para la proteína FasR_{33MT} se realizaron ensayos de cristalogénesis preincubando esta proteína con C₁₆-CoA y C₂₀-CoA, juntos y por separado.

Se logró obtener cristales para dos condiciones; la Tabla 12 presenta las condiciones de cristalización donde se obtuvieron cristales de FasR_{33MT} (construcción que carece de 33 aminoácidos de la proteína nativa) y FasR_{33MT} en presencia de C₂₀-CoA. En el caso de la co-cristalización del complejo FasR_{33MT}-C₂₀-CoA, se agregó el ligando en cantidad estequiométrica 1:2 proteína: ligando (102,5 μM).

En el rastreo robótico de condiciones de cristalización en placas de 96 pocillos, los cristales crecen en gotas de 0,5 μl por lo que son muy pequeños. Por consiguiente, es necesario reproducir estas condiciones manualmente y en gotas más grandes (4μl), partiendo de la condición inicial, a fin de obtener cristales de mejor tamaño y de calidad suficiente para generar datos de difracción que permitan la resolución de las estructuras 3D. Esta optimización se realizó mediante el método de difusión de vapor en gota

colgante en placas de cristalización de 24 pocillos. Para ello, se variaron convenientemente diversos parámetros, incluyendo la concentración del precipitante, el pH y la naturaleza del tampón. La optimización de las condiciones iniciales de cristalización permitió obtener mejores resultados del tamaño de los cristales (Figura 27), además, se lograron mejorar los cristales con apariencia de maclas (agrupación simétrica de cristales idénticos) o policristales que crecían en las gotas de 4 μ l en las condiciones iniciales de cristalización (Figura 27 B) y cuya difracción puede presentar problemas a la hora del procesamiento de los datos y la resolución de estructuras correspondientes. Los cristales crecieron en una gran variedad de tamaños y en distintas condiciones las cuales se detallan en la Tabla 9 de M&M.

Tabla 12. Condiciones de cristalización de las proteínas FasR_{33MT} y FasR_{33MT}-C₂₀-CoA, en el cribado robótico.

	FasR _{33MT}	FasR _{33MT} -C ₂₀ CoA
Precipitante	22% v/v Polietilenglicol 400	2,2 M Cloruro de Sodio
Tampón	0,1 M MES monohidratado pH 6	0,1 M Acetato de Sodio pH 4,7
Aditivos	-	-
Concentración de proteína	5 mg/ml	5 mg/ml
Volumen proteína (μ l)	0,25	0,25
Volumen solución madre (μ l)	0,25	0,25
Volumen solución proteína/ligando (μ l)	-	0,25 (relación 1:2)
Tiempo de aparición	72 hs	96 hs
Estructura resuelta / refinada	Si	Si

En esta tabla se presentan únicamente los datos correspondientes a aquellas proteínas que dieron origen a cristales que difractaron correctamente y que permitieron la resolución de la estructuras.

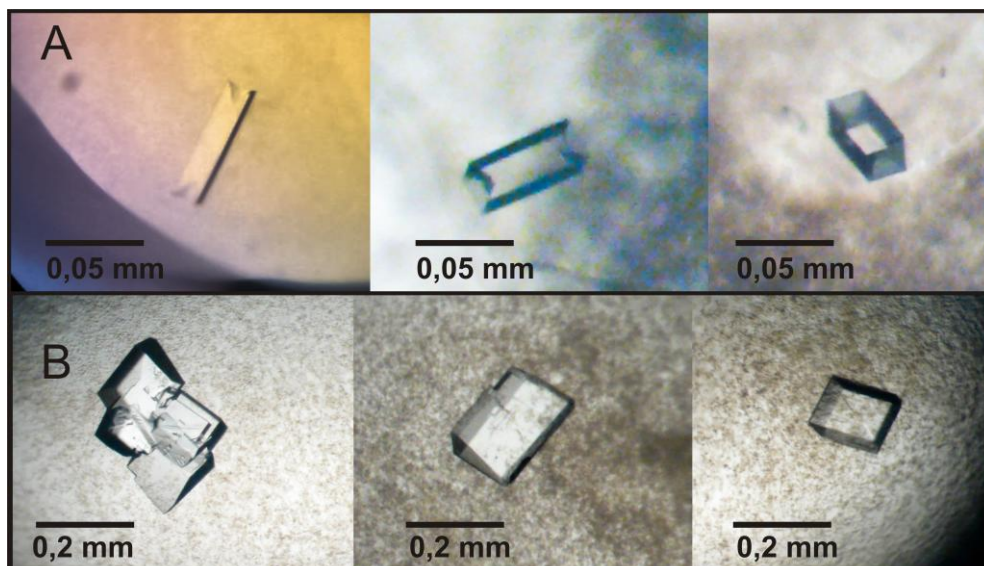


Figura 27. Cristales obtenidos luego de la optimización de las condiciones de cristalogénesis.

A) FasR_{33TB} en presencia de C₂₀-CoA, estos cristales crecieron en 72 hs en una gran variedad de tamaños (0,025 - 0,2mm), se muestran tres cristales en forma de barra correspondientes a las condiciones ya optimizadas. **B)** FasR_{33TB}, los cristales con forma de placas alcanzaron su máximo crecimiento luego de 7 días, en muchos casos, como en la primera imagen crecieron de forma superpuesta.

3.2.3.3.2 Difracción, colecta y procesamiento de los datos

Los mejores cristales obtenidos a partir de la optimización de las condiciones de cristalogénesis fueron analizados por difracción de rayos X. Se eligieron los cristales de mejor calidad que difractaban a una mayor resolución. Finalmente, se obtuvieron juegos de datos completos de difracción para FasR_{33TB} y FasR_{33TB} en presencia de C₂₀-CoA.

Las colecciones de datos fueron realizadas en el Sincrotrón Nacional francés SOLEIL y en el Laboratorio de Microbiología Molecular del IPMONT. En el sincrotrón SOLEIL, se utilizó un detector de área de conteo de fotones con píxeles híbridos (Pilatus 6M®, Dectris), en la línea Proxima 1. En IPMONT, se utilizó en cambio otra tecnología de detección de área, donde se implementó una placa de imagen (Mar345dtb®, Mar

Research). En ambos casos los cristales se mantuvieron siempre a temperaturas criogénicas durante las colectas, utilizando tecnología de criocristalografía acoplada al goniómetro del detector.

Las colecciones de datos comenzaron en todos los casos con la toma de dos imágenes de difracción de prueba, rotadas 90° una de otra, para controlar la calidad de las muestras. Las muestras se descartaron inmediatamente si no había difracción detectable, si la resolución era muy pobre ($> 4 \text{ \AA}$), o si existían signos de patología severa en el cristal, por ejemplo, maclas o policristales, cristales rotos, anisotropía extremadamente severa en una o más direcciones. Si el patrón de difracción de prueba resultaba satisfactorio (ver un ejemplo en la Figura 28), el proceso se continuaba tomando un número pequeño de imágenes sucesivas en uno o dos segmentos, para comprobar la calidad de los datos y diseñar la estrategia que permita tomar un juego completo de imágenes de difracción con mayor completitud, en el menor tiempo posible (dependiendo de los tiempos de la línea de difracción).

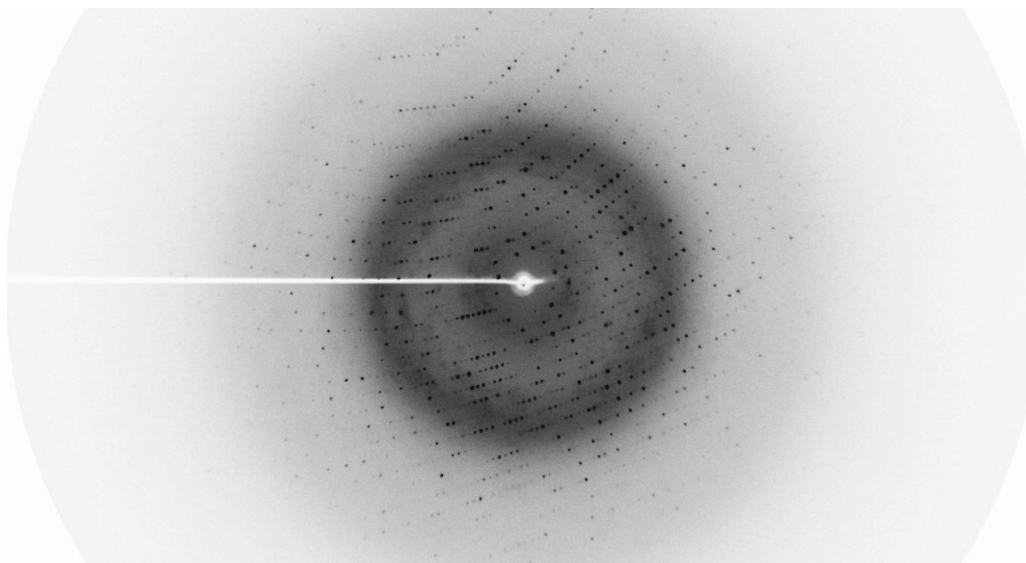


Figura 28. Patrón de difracción correspondiente a un cristal de Fas_{33MT}. Los datos se extienden hasta la resolución de 1,6 Å. El detector utilizado en este caso fue una placa de imagen (Mar345). Se pueden distinguir puntos de difracción bien definidos, originados por el arreglo periódico bien ordenado de las moléculas proteicas en el cristal. La marca que se observa en el centro de la imagen, que se extendida como una línea hacia la izquierda, corresponde al soporte de plomo ubicado entre el cristal y el detector para evitar la incidencia directa de rayos X que dañarían al detector.

Una vez colectado un conjunto de imágenes de difracción correspondientes a un juego completo de datos, se procesaron con el programa autoPROC [168]. También se usó el programa MOSFLM [107] perteneciente al paquete de programas de CCP4 para cristalografía de proteínas [169], dado que éste cuenta con una ventana de visualización de las imágenes que se van procesando, lo cual fue útil para comparar resultados y como forma de aprendizaje. La Tabla 13 resume las estadísticas de procesamiento de datos correspondientes a las estructuras cristalográficas que se reportan en esta tesis.

Tabla 13. Estadísticas correspondientes al procesamiento de los datos de difracción obtenidos.

Colecta de Datos	FasR _{33MT}	FasR _{33MT} -C ₂₀ -CoA
Fuente de rayos X	Anodo rotatorio (Cu) - Inst Pasteur de Montevideo	Sincrotrón Soleil línea Proxima 1
Longitud de onda (Å)	1,5418	0,97857
Temperatura (°K)	110	100
Detector	placa de imagen Mar345	detector de área Pilatus 6M
Distancia cristal-a-detector (mm)	100	283,4
Rango de rotación por imagen (°)	0,2	0,2
Rango de rotación total (°)	90	200
Tiempo de exposición por imagen (s)	60	0,2
Mosaicidad promedio refinada (°)	0,47	0,27
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2
Celda		
<i>a, b, c</i> (Å)	86.1 100.2 38.5	107.8 107.8 43.7
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Resolución (Å)	28,78 - 1,63 (1,66 - 1,63)*	48,2 - 1,7 (1,8 - 1,7)
Reflexiones únicas	41.807 (1.999)	28.970 (4.563)
<i>R</i> _{merge}	0,04 (0,47)	0,06 (1,47)
<i>R</i> _{meas}	0,05 (0,54)	0,07 (1, 52)
CC _{1/2}	0,99 (0,80)	1,00 (0,71)
<i>I</i> / Σi	11,3 (1,8)	22,6 (1,6)
Compleitud (%)	98,6 (96,4)	99,8 (98,8)
Multiplicidad	3,5 (3,5)	14,2 (13,9)
Factor B global, estimado con el gráfico de Wilson (Å ²)	21,8	38,3

* Los valores entre paréntesis corresponden a la capa de máxima resolución.

Una vez procesados los datos se procedió a integrar, etapa que corresponde a la cuantificación del número de cuentas de cada punto de difracción (o intensidad) y estimación de su correspondiente desviación estándar. Para la integración se utilizaron los programas MOSFLM, o bien XDS [108].

Los datos obtenidos mediante el programa AIMLESS [109], permitieron confirmar que las celdas unidad de ambos cristales son primitivas, y compatibles con grupos puntuales tetragonal, ($P4$) en FasR_{33MT}-C₂₀CoA y ortorrómbico ($P222$) en FasR_{33MT}. Los archivos de salida de este programa permitieron determinar la calidad global de los juegos de datos mediante un grupo de estadísticos claves ilustrados en la Tabla 13.

Además del R_{merge} , que indican la diferencia porcentual entre las mediciones de intensidades idénticas (medidas más de una vez o idénticas por simetría, ver M&M), se reportan en la Tabla 13, la multiplicidad o redundancia (número de veces que se midió en promedio cada punto de difracción, mientras más grande mejor), la relación I/σ (señal/ruido, se busca que sea siempre mayor a 2) y la completitud (porcentaje de reflexiones colectados respecto de los teóricamente posibles de coleccionar, se procura que sea mayor al 90%). Es importante destacar que estos estadísticos se evalúan tanto para la colección global como para la capa de máxima resolución, donde sus valores son menos satisfactorios en general. Al igual que con el R_{merge} (en muchos casos se descartan datos con $R_{\text{merge}} > 0,3$), todos ellos pueden utilizarse como criterio de corte para definir la resolución máxima de un juego de datos.

3.2.3.3.3 Resolución de estructuras y refinamiento

Los datos de difracción de rayos X de FasR_{33MT} y FasR_{33MT}-C₂₀-CoA permitieron resolver sus respectivas estructuras cristalográficas. Una estructura puede resolverse por el método de reemplazo molecular con los datos de difracción de los cristales nativos, aunque para ello es necesario contar con un modelo molecular previamente resuelto. Para que este método resulte exitoso, el modelo de partida debe ser

relativamente parecido a la estructura problema, requiriéndose en general un 30 a 40% de identidad de secuencia como mínimo, y aún así no siempre funciona.

En el caso de FasR_{MT}, no contábamos con modelos estructurales previamente resueltos a fin de llevar a cabo la resolución de su estructura por reemplazo molecular. Por lo tanto decidimos utilizar el programa ARCIMBOLDO [170], el cual lleva al límite computacional el uso del reemplazo molecular en forma muy automatizada, partiendo de fragmentos muy pequeños de elementos de estructura secundaria genéricos, como sola sonda de búsqueda inicial. Esto hace que operativamente se transforme en un método *ab initio*, esto significa que no necesita de ningún modelo estructural de proteínas similares para iniciar el proceso, sólo se requieren los datos medidos y una estimación de número y largo de elementos de estructura secundaria. Para funcionar ARCIMBOLDO utiliza fundamentalmente dos programas de base: PHASER [114], como máquina de reemplazo molecular automatizada para colocar elementos de estructura secundaria como hélices α , repitiendo ciclos de modificación de densidad en el espacio real, y SHELXE [115] para el trazado automático de cadenas. Dos características importantes de FasR_{33MT} son las que probablemente facilitaron la utilización exitosa de este programa: 1) una estructura secundaria formada íntegramente por hélices α , lo que se ha visto facilita la solución con este programa [113] y 2) la resolución de la difracción de rayos X menor a 2 Å.

FasR_{MT33-C₂₀-CoA} fue la primer estructura que logramos resolver usando ARCIMBOLDO, esto fue logrado después de múltiples intentos de resolver su estructura por reemplazo molecular usando los programas MOLREP [171] y PHASER. Para esos intentos de resolver la estructura del regulador por reemplazo molecular convencional, habíamos identificado una serie de estructuras en la PDB con homología de secuencia con FasR_{MT}, tales como el regulador transcripcional tipo TetR de *Rhodococcus* (pdb id

3F1B), que como se mencionó anteriormente tiene un 28% de identidad con FasR_{MT}. Sin embargo, no se logró dar con soluciones satisfactorias. Tampoco el uso de programas de reemplazo molecular automatizados, como los implementados en el paquete MrBUMP [172] para buscar estructuras semejantes en la PDB y llevar adelante en paralelo cálculos de reemplazo molecular con distintos algoritmos, fueron exitosos.

Una vez que la estructura molecular de FasR_{MT33}-C₂₀CoA estuvo disponible, la estructura ortorrómbica de FasR_{MT33} fue resuelta fácilmente por reemplazo molecular con el programa PHASER, y usando el modelo refinado de FasR_{MT33}-C₂₀-CoA como sonda de búsqueda (sin el ligando, y utilizando los dominios separados en forma sucesiva).

En ambos casos se utilizó luego el programa BUSTER [116] para refinar los modelos atómicos en forma iterativa, y el programa COOT [117], [118] para reconstruir el modelo en función de la visualización de mapas de densidad electrónica. Los modelos fueron validados con MolProbity [119] y con las herramientas de validación implementadas en COOT.

El correcto proceso de refinamiento se verificó por medio del descenso conjunto de los estadísticos R y R_{free} en todos los casos. La Tabla 14 muestra las estadísticas del refinamiento realizado. Una vez finalizado el primer ciclo de modelado manual en COOT, se refinó nuevamente extendiendo el límite de resolución máxima en los casos donde era posible. Se obtuvieron así nuevos mapas y coordenadas refinadas, las cuales fueron sometidas nuevamente a modelado manual. Las dos estructuras reportadas en esta tesis superaron satisfactoriamente los requerimientos de calidad esperados, y serán depositadas en la PDB para su próxima publicación.

Tabla 14. Estadísticas del refinamiento de las estructuras cristalinas de FasR_{33MT} y FasR_{33MT}-C₂₀-CoA.

Refinamiento	FasR_{33MT}	FasR_{33MT}:C₂₀CoA
Resolución (Å)	28,78 - 1,63	21,19 - 1,70
Número de reflexiones usadas (reflexiones del subset <i>free</i>)	41.762 (1.692)	28.908 (1.439)
R _{work} / R _{free}	0,243/0,257	0,224/0,238
Número de átomos (no H)		
de proteína	2.859	1.479
de ligandos	32 (MYR)	29 (5F9)*
de solvente	78	84
Residuos de proteína en la unidad simétrica	374 (dos cadenas)	191 (una cadena)
Factor B promedio (Å ²)	33,9	35,7
R.m.s.d. de dist. de enlace (Å)	0,01	0,01
R.m.s.d. de ang. de enlace (°)	0,92	0,89
Gráfico de Ramachandran		
Más favorables (%)	98,1	99,5
Adicionalmente permitidos (%)	1,9	0,5
No permitidos (%)	0	0

*5F9= identificación de tres letras para el ligando C₂₀-CoA en la PDB

3.2.3.3.4 Análisis y validación de los datos.

3.2.3.3.4.1 Análisis global de las estructuras de FasR_{33MT} y FasR_{33MT}-C₂₀-CoA.

En FasR_{33MT}-C₂₀-CoA hay una sola cadena polipeptídica en la unidad asimétrica, mientras que en FasR_{33MT} hay dos, formando un dímero. Sin embargo, analizando el empaquetamiento cristalino, el mismo dímero está presente en FasR_{33MT}-C₂₀-CoA (Figuras 29 y 30), simplemente que es completamente simétrico, con lo que un protómero está relacionado con el otro a través del único eje de simetría cristalográfica de orden 2. Además, el hecho que en dos empaquetamientos cristalinos completamente diferentes (como lo son las estructuras ortorrómbica y tetragonal que reportamos aquí), la misma especie dimérica esté presente, es una evidencia muy fuerte de que dicha

especie es biológicamente relevante. Esta estructura dimérica es consistente con los datos en solución obtenidos por cromatografía de exclusión molecular, así como con otros miembros de la familia TetR reportados en la literatura [153].

Ambas estructuras son muy similares y queda demostrado que FasR_{33MT} sólo contiene α hélices en su estructura, lo cual es coherente con las predicciones presentadas en el análisis de secuencia y los espectros de dicroísmo circular (Figuras 22 y 25). FasR_{33MT} está compuesta por nueve hélices α ($\alpha 1$ - $\alpha 9$ y $\alpha 1'$ - $\alpha 9'$), (Figura 30). Las tres primeras hélices de cada monómero ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) forman el dominio más pequeño de unión a ADN que contienen el motivo HTH, mientras que las seis hélices siguientes están plegadas formando un dominio independiente de mayor tamaño, correspondiente al dominio de unión al ligando o “dominio efector”, en el extremo C-terminal de la proteína.

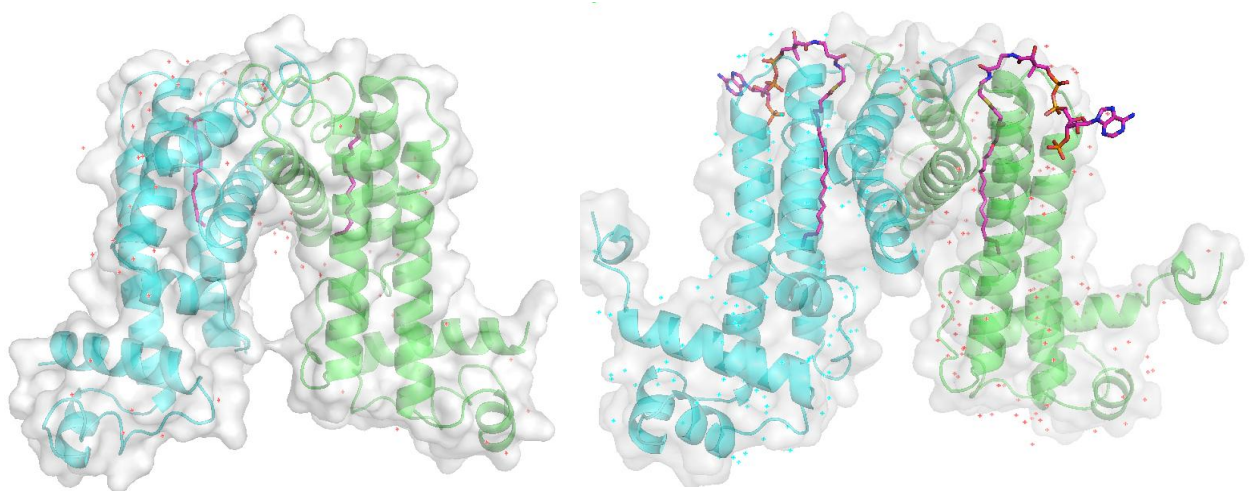


Figura 29. Estructura tridimensional de FasR_{33MT} (izquierda) y FasR_{33MT}-C₂₀-CoA (derecha). Se observa una proteína compuesta íntegramente por hélices α . Las proteínas se representan con el trazado de cadena principal en caricatura, distinguiendo con colores cada cadena polipeptídica. Superpuesta se muestra en gris semitransparente la superficie expuesta al solvente de la molécula. Notar la presencia de ligandos acilos, representados en líneas gruesas y coloreados por átomo (C, magenta; N, azul; O, rojo; S, amarillo; P, anaranjado). Las cruces rojas alrededor de las proteínas corresponden a las posiciones observadas de moléculas de agua unidas a la proteína en la primera esfera de hidratación (aguas ordenadas cristalinas).

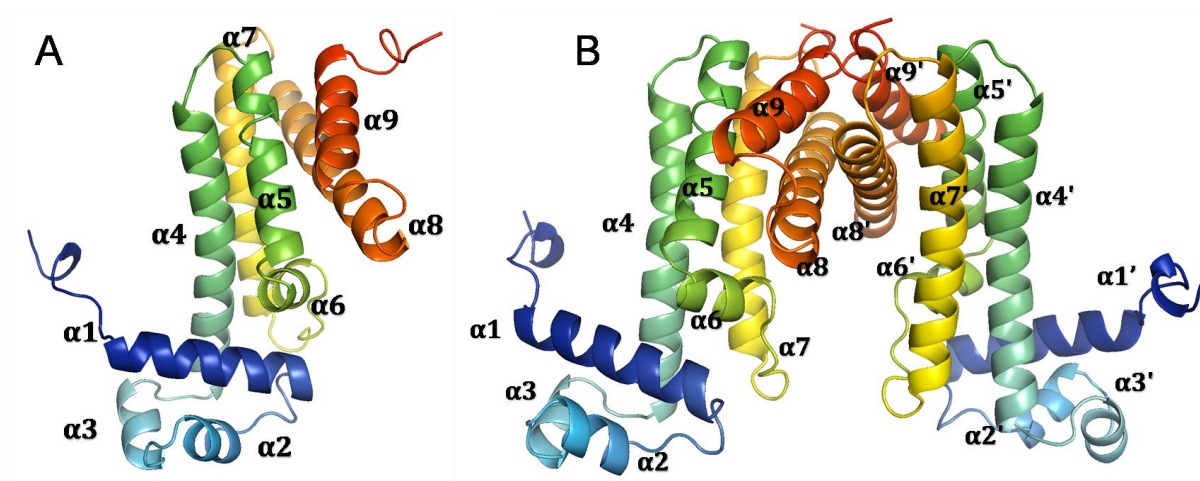


Figura 30. Estructura de FasR_{33MT}-C₂₀-CoA. **A)** Composición de la unidad asimétrica, con sólo un protómero formado por nueve hélices α como se indica. La cadena se coloreó con una rampa de colores (arcoíris) para marcar el recorrido de la estructura primaria desde el N-terminal (en azul) hasta el extremo C-terminal (rojo). **B)** El dímero de FasR_{33MT}-C₂₀-CoA se genera como resultado de la aplicación del único eje 2 de simetría cristalográfica.

La interfaz de dimerización es una característica estructural conservada entre los miembros de la familia TetR [75], formada principalmente por las hélices $\alpha 8$ y $\alpha 9$ (Figura 31). Tomando al dímero de FasR_{33MT} (el análisis del dímero cristalográfico de FasR_{33MT}-C₂₀-CoA es muy semejante en este sentido), la superficie de interacción entre ambos protómeros es importante, aproximadamente 1600 Å² de superficie, que equivale a una energía de asociación de 37 kcal/mol (determinado con PISA), [121]. Dicha energía se computa como la suma de la energía de solvatación más la contribución de puentes de hidrógeno, salinos y disulfuro. En este caso la mayor parte se debe a la energía de solvatación (estimada a 34,1 kcal/mol), pues no hay interacciones electrostáticas ni puentes disulfuro entre los protómeros. Los puentes de hidrógeno inter-protómeros no son abundantes (seis en total), con lo que podemos reconocer que la interfaz es fundamentalmente de carácter hidrofóbico, con contactos cercanos (< 4,2

Å). Entre una cantidad grande de residuos, sobresalen de cada uno de los dos protómeros (por la fracción de superficie enterrada a la que contribuyen, >0,5 kcal/mol cada uno) los siguientes aminoácidos: en la hélice α_8 , Met 180, Ile 181, Val 183, Gly 184, Met 188, Cys 192 y Tyr 195; Ile 203 en el bucle entre hélices α_8 - α_9 ; en la hélice α_9 el residuo Phe 215; y los residuos Leu 220, Ser 221, Val 223, en el lazo final que forma un bucle. Contactos adicionales son proporcionados por seis puentes de hidrógeno entre los residuos, His 176_B[N δ 1]:Tyr 195_A[OH], Arg 177_B[NH₂]:Asp 207_A[O], Leu 220_B[N]:Ala 216_A[O], Tyr195_B[OH]:His176_A[N δ 1], Gln214_B[O ϵ 1]:Arg177_A[NH₂] y Ala216_B[O]:Leu220_A[N].

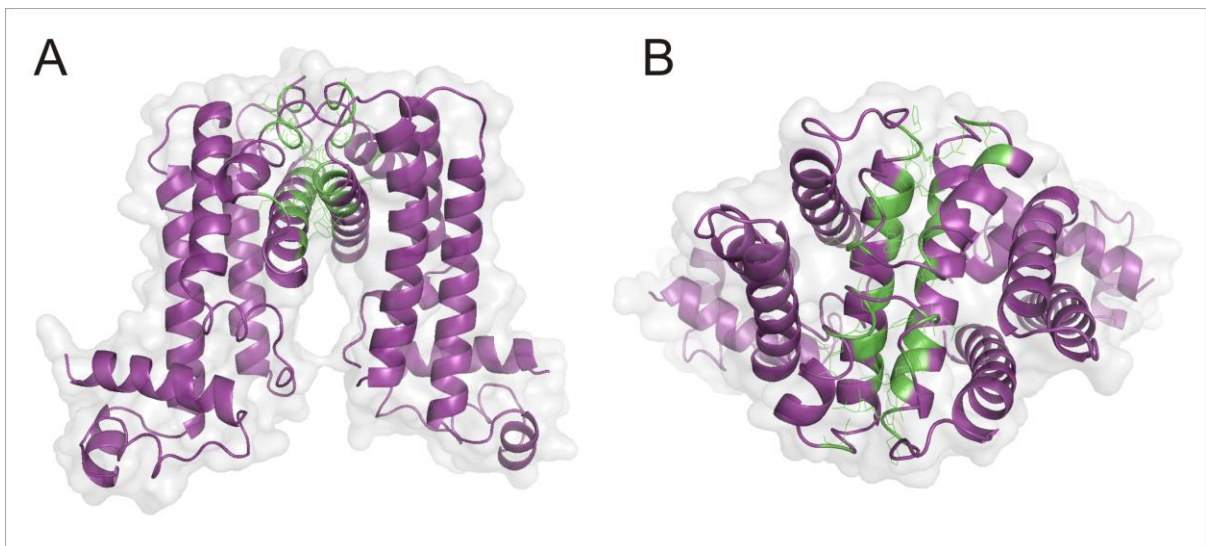


Figura 31. Interfaz de dimerización de FasR_{33MT}. Diagrama de cinta del dímero de FasR_{33MT} donde se muestran en color verde los aminoácidos hidrofóbicos implicados en la interfaz de dimerización.

Una de las características más llamativa de la presente estructura es una cavidad de tipo túnel, delimitada esencialmente por las hélices α_4 , α_5 , α_7 y α_8 (Figura 32), esta última atraviesa literalmente la molécula de lado a lado. El túnel presenta una abertura a la que llamaremos, externa, dirigida hacia el solvente, y otra a la que llamaremos, interna, dirigida hacia la cavidad de solvente entre los dos protómeros. La unión con la

molécula de C₂₀-CoA se produce dentro de este túnel que se extiende a lo largo del dominio efector en la región C-terminal de FasR_{33MT}, en el mismo sentido que el eje mayor del elipsoide que define al dominio.

Las hélices α_4 , α_5 y α_7 están dispuestas en un haz antiparalelo, con la hélice α_8 cruzando diagonalmente. Una parte de la hélice α_6 , que cruza casi perpendicular al haz α_4 - α_5 - α_7 , que también contribuye directamente con la pared del túnel próximo a la abertura interna. El túnel se extiende aproximadamente 25 Å a lo largo, con un diámetro de 7,5-8 Å (si se consideran los radios de Van der Waals de los átomos conformando las paredes, queda una cavidad libre de 4,1-4,6 Å). Este túnel está definido hacia su interior por medio de una serie de residuos, la gran mayoría hidrofóbicos, que dirigen sus cadenas laterales hacia la luz de la cavidad. Leu 98, Val 102, y Leu 106 en la hélice α_4 ; Asn 112, Arg 115, Ala 119, Phe 123, en la hélice α_5 ; Phe 138 en la hélice α_6 ; Thr 156, Cys 159, Val 164, Leu 166, Ile 167, en la hélice α_7 ; y Leu 185, Val 186, Ser 189, Val 190, en la hélice α_8 (Figura 32 y 33).

La entrada externa del túnel también muestra algunos aminoácidos del otro protómero correspondiente al bucle final C-terminal (hélice α_9'), contribuyendo a formar la abertura externa, como por ejemplo los aminoácidos Leu 220', Val 223' y Pro 224', junto al Trp 217 de la hélice α_9 del propio protómero (Figura 34).

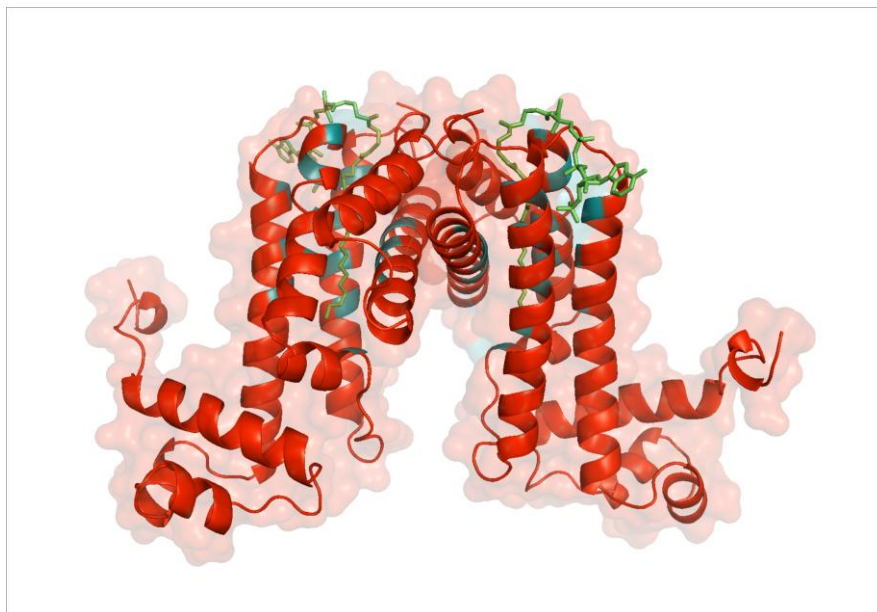


Figura 32. Diagrama de cinta del dímero de FasR_{33MT}-C₂₀-CoA. Se muestran en color turquesa los aminoácidos hidrofóbicos implicados en la formación del túnel de unión al ligando, en verde el C₂₀-CoA.

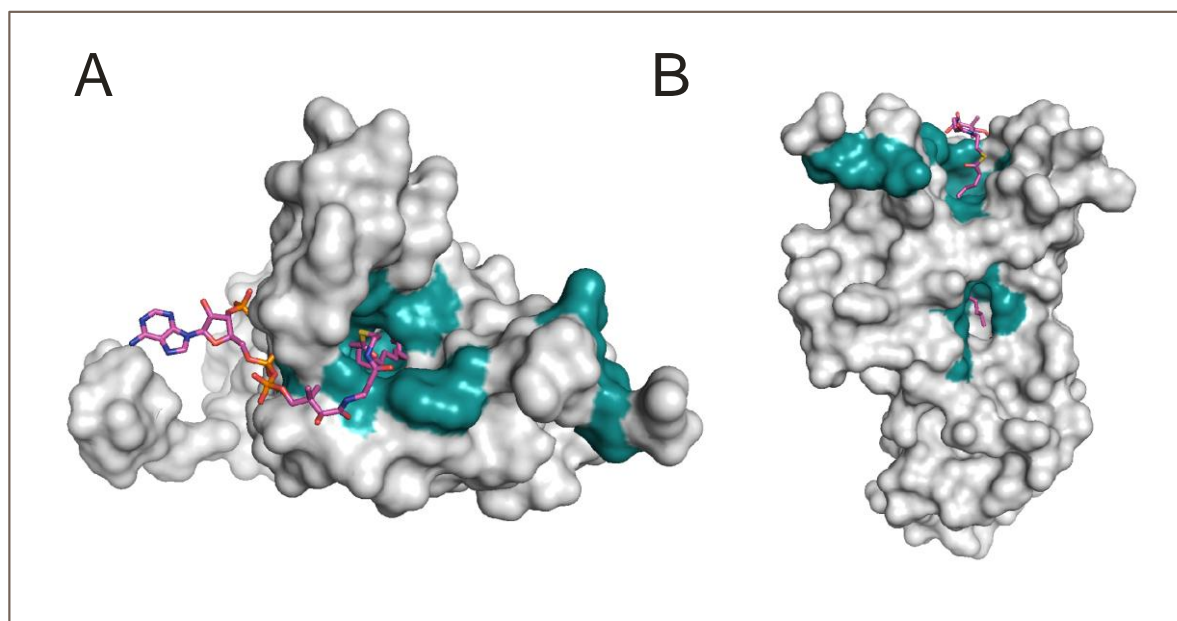


Figura 33. Diagrama de superficie del protómero de FasR_{33MT}-C₂₀-CoA. **A)** vista superior, donde se observa la apertura externa del túnel dirigida hacia el solvente. **B)** vista lateral, donde se puede ver que el túnel se encuentra abierto hacia la cavidad de solvente entre los dos protómeros. En turquesa se muestran los aminoácidos hidrofóbicos del dominio efector. La molécula de C₂₀-CoA, se muestra representada en líneas gruesas y coloreados por átomo (C, rosa; N, azul; O, rojo; S, amarillo; P, naranja).

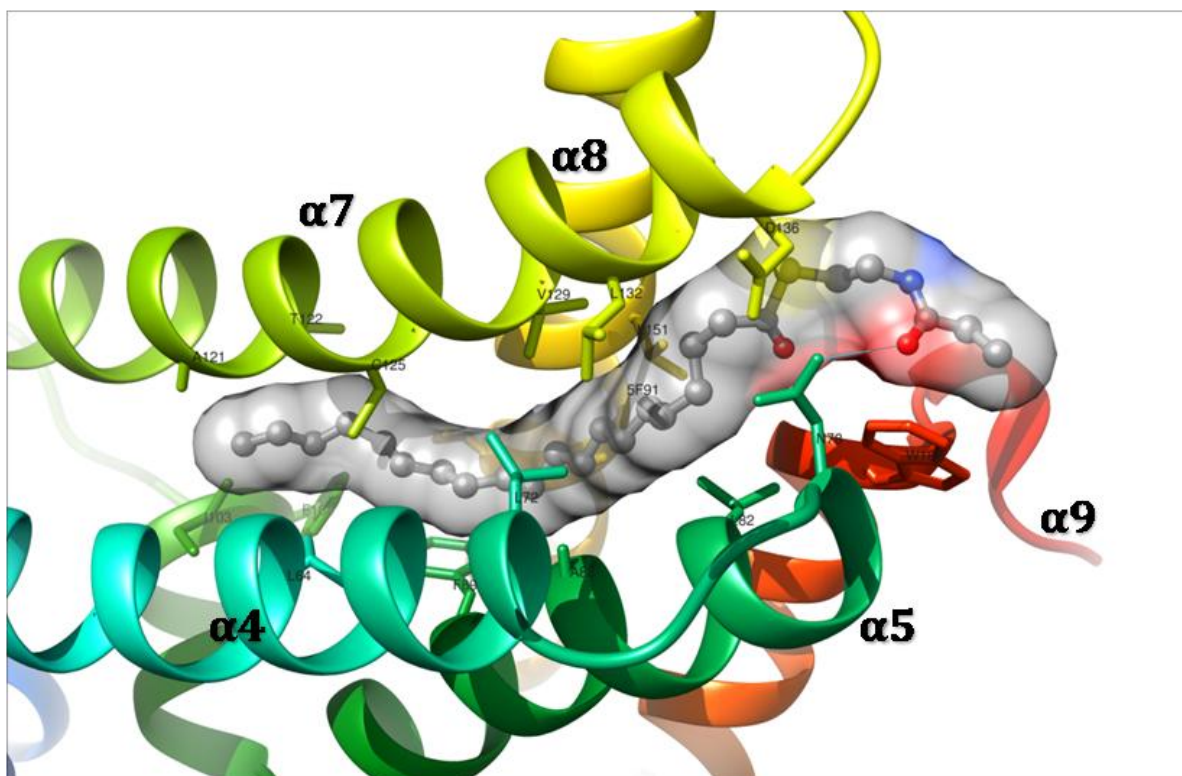


Figura 34. Molécula de C_{20} -CoA en el túnel del dominio efector de $FasR_{33MT}$. Se muestran los aminoácidos de las hélices $\alpha 4$ a $\alpha 9$ que forman el túnel hidrofóbico. Se puede ver una molécula de C_{20} -CoA en el túnel, coloreada por átomo (C, gris; N, azul; O, rojo; S, amarillo). En este esquema de $FasR_{33MT}$ - C_{20} -CoA, el aminoácido 1 corresponde al aminoácido 34 de $FasR_{MT}$. Se utilizó el programa Chimera para esta figura [124].

3.2.3.3.4.2 Diferencias entre las estructuras de $FasR_{33MT}$ y $FasR_{33MT}$ - C_{20} -CoA: interpretación de las consecuencias de la unión del ligando efector.

La primera de las dos estructuras resueltas fue la de $FasR_{33MT}$ - C_{20} -CoA, revelando que sólo un protómero está presente en la unidad asimétrica, aunque el dímero está presente por acción de un eje de simetría cristalográfico. Esto indica que, el homodímero en presencia del efector, es estrictamente simétrico. Es así que los dominios HTH de unión al ADN que se encuentran en el extremo N-terminal de cada una de las cadenas polipeptídicas, siguen una geometría rígida que no rompe la simetría perfecta entre ambos protómeros. En contraste con este escenario, la estructura de $FasR_{33MT}$ en

ausencia del C₂₀-CoA muestra dos protómeros en la unidad asimétrica que forman esencialmente el mismo dímero, pero ahora no respetando una simetría de orden 2 estricta. El eje cuasi-2 que relaciona un protómero con el otro es ahora no cristalográfico y se encuentra lejos de ser perfecto.

A la asimetría en el homodímero de FasR_{33MT} en ausencia de C₂₀-CoA, se agregan signos claros de mayor flexibilidad de la proteína: (i) uno de los dominios HTH presenta un significativo aumento de los parámetros de desplazamiento atómico (factores B de cada átomo, visualizados con COOT), en especial en las hélices α_2 , α_3 y la vuelta entre ellas, no observado en el otro HTH; (ii) factores B elevados así como señal débil de densidad electrónica en el bucle que conecta α_6 con α_7 (en uno de los protómeros no se pudo trazar la cadena principal de forma continua, los residuos 143 y 144 no se pudieron incluir en el modelo en la cadena B, por falta de densidad electrónica clara), así como factores B sustancialmente elevados en la primera mitad de la hélice α_7 (incluyendo residuos Pro 146 hasta Cys 159 inclusive).

En conclusión, la comparación entre ambas estructuras sugiere que la presencia del ligando efector unido al túnel hidrofóbico, rigidiza al homodímero, introduciendo así una geometría fija (lo que implica una distancia fija entre los dos HTH), la cual se flexibiliza cuando el efector C₂₀-CoA no está unido, permitiendo una mayor movilidad entre los dominios de unión al ADN.

La resolución de la estructura de FasR_{33MT} sin C₂₀-CoA, experimento que se había diseñado para observar la forma “apo” de la proteína, muestra sin embargo, con absoluta claridad en la densidad electrónica, una molécula ocupando el túnel de cada protómero. Dicha molécula fue modelizada como un ácido mirístico (C₁₄) en función de la compatibilidad con la densidad electrónica. Dado que este ácido graso no fue incluido en ninguno de los pasos de purificación ni en el ensayo de cristalización, parecería provenir

de *E. coli*, donde la proteína fue expresada. Sin embargo, todavía no conocemos con certeza su identidad, ya que habría que determinarla por métodos directos como por ejemplo, espectrometría de masas RMN o cromatografía gaseosa.

Aún continuamos los esfuerzos por obtener la estructura de FasR_{MT} sin ningún ligando unido, pero con los datos disponibles se puede hipotetizar que una molécula más corta como sería un ácido mirístico (C₁₄), o eventualmente la ausencia de ligando, no llegaría a interactuar hacia el final del túnel, región donde se encuentra la abertura interna, lo que corresponde al extremo más próximo al dominio HTH. En este sentido, hemos visto por ensayos de retardo en gel que moléculas de acil-CoA con cadena acilada menor a 16 átomos de carbono no desacoplan la unión de FasR_{MT} al ADN. Una molécula C₂₀ (o más larga) en cambio, alcanza este sitio clave y permitiría simetrizar a la proteína, posicionando a los ahora rígidos HTH en una geometría incompatible para la unión al ADN. Moléculas de acil-CoA con cadenas más cortas (como C₁₄) permitirían mayor movilidad a los dominios HTH, que podrían así adoptar una geometría compatible con las distancias impuestas por el ADN en su caja de unión. En ensayos de retardo en gel, los ácidos grasos con cadenas aciladas \geq a 16 átomos de carbono tampoco desacoplan la unión de FasR_{MT} al ADN, lo que nos lleva a pensar que tal vez no solo sea la longitud de la cadena, sino también la posición clave que adquiere esta molécula acilada \geq a 16 átomos de carbono guiada por el CoA, (el cual se posiciona justo por encima de la abertura externa del túnel) lo que determina el efecto de modulación que genera la unión de acil-CoAs de cadena larga en la interacción FasR_{MT}-ADN.

Como se dijo anteriormente, la interfaz de dimerización es una característica estructural conservada entre los reguladores de la familia TetR, una característica robusta que asegura la estructura cuaternaria de la proteína, e involucra exclusivamente a las hélices α 8 y α 9 de cada monómero, generando un paquete de cuatro hélices

centrales en el dímero. Al superponer los dímeros de las dos estructuras que tenemos, de modo que las cuatro hélices correspondientes a cada estructura dimérica se ajusten lo mejor posible, se puede observar con mucha claridad las diferencias entre ambas estructuras (Figura 35).

En la estructura de FasR_{33MT} unida a C₂₀-CoA, ambos protómeros se alejan respecto de la estructura del regulador sin ese ligando; al medir la distancia usando el centro de la hélice $\alpha 3$ pasamos de 52 Å para FasR_{33MT} a 60 Å para FasR_{33MT} unida a C₂₀-CoA.

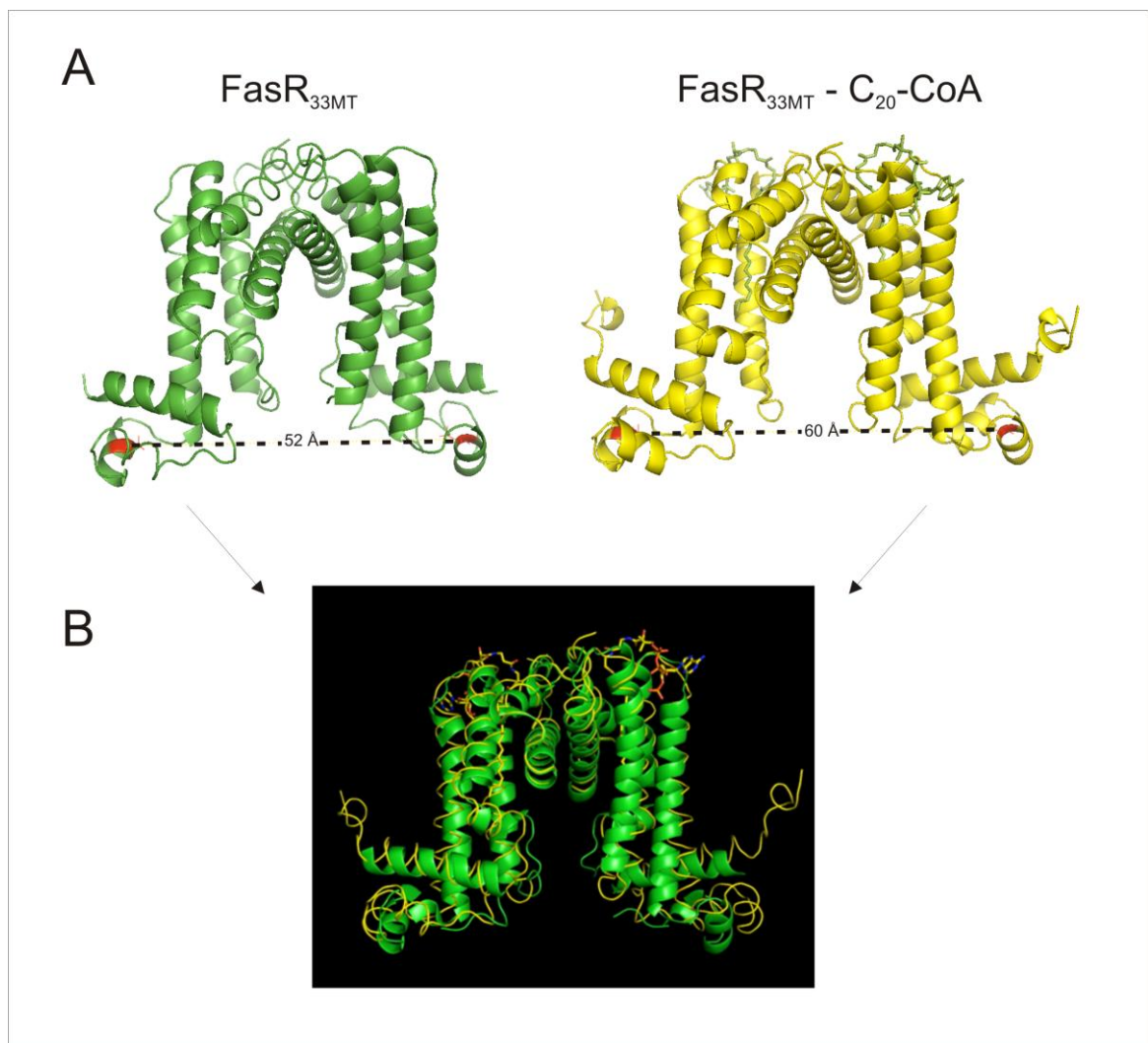


Figura 35. Superposición de las estructuras de FasR_{33MT} y FasR_{33MT}-C₂₀-CoA por ajuste de las hélices $\alpha 8$ y $\alpha 9$. A) Se puede observar cómo se reduce la distancia entre las hélices del dominio HTH de cada protómero en FasR_{33MT} (esquema en caricatura de cintas, color verde) respecto de FasR_{33MT}-C₂₀CoA

(esquema de caricatura de cintas, color amarillo), en la figura se indica la distancia entre la Leu 76 (rojo) de cada protómero (zona media de la hélice $\alpha 3$). **B)** Diagrama de superposición de FasR_{33MT} (esquema en caricatura de cintas, color verde) respecto de FasR_{33MT}-C₂₀CoA (esquema de caricatura en cilindro fino, color amarillo).

3.2.3.3.5 Validación funcional y estructural

El proceso de validación de los modelos estructurales detecta errores que se pueden introducir durante el refinamiento, generando índices cuantitativos que hablan de la calidad del modelo final. Pero además, es necesario validar las estructuras obtenidas mediante datos experimentales adicionales. A partir del análisis de la estructura de FasR_{33MT} y FasR_{33MT}-C₂₀-CoA, se logró identificar un túnel de carácter hidrofóbico dentro del dominio efector que funciona como sitio de unión para el ligando, y donde se determinaron también los aminoácidos implicados en dicha interacción.

A partir de los propios análisis estructurales y del modelo mecanístico de regulación, surgieron los diseños experimentales para esta validación estructural, en particular teniendo en cuenta que los acil-CoAs de cadena larga (C₁₆-CoA a C₂₂-CoA) impiden la formación del complejo ADN-proteína (Figura 7 y 17, capítulo I). Por lo tanto hipotetizamos que, al mutar aminoácidos implicados en la formación del túnel hidrofóbico, de manera tal de impedir la interacción del ligando, sin modificar el plegamiento de la proteína o la movilidad del dominio de unión al ADN, deberíamos obtener una proteína que se une a su región operadora, pero que ya no responde funcionalmente a la presencia de ligando. Es decir, en presencia de acil-CoAs de cadena larga, no debería haber disrupción de la unión proteína-ADN. De ésta manera, para bloquear la entrada del ligando al túnel, se construyeron dos mutantes aminoácido específicas guiadas por el análisis estructural: (i) una mutante simple

(FasR_{MT}_MUT_L/F), donde se reemplazó la leucina en la posición 106 por una fenilalanina, y (ii) una triple mutante (FasR_{MT}_MUT_LVL/F), donde se reemplazaron la leucina 106, valina 163 y leucina 185, por tres fenilalaninas (Figura 36).

Como el túnel es ancho (~ 8 Å), pronosticamos que incluso una triple mutante con tres fenilalaninas (un aminoácido voluminoso), no generaría interferencias estructurales de plegamiento. Los genes sintéticos codificantes para las dos proteínas mutadas fueron diseñados a partir de *Rv3208* de *M. tuberculosis* H37Rv, y clonados en el vector pET28a (+) para dar origen a los plásmidos pFR_MutL y pFR_MutLVL (Tabla 4 y 5, M&M). Las proteínas mutadas se expresaron en *E. coli* BL21 como proteínas recombinantes de fusión a una cola de 6 histidinas con sitio de corte para la proteasa TEV. Estas proteínas se purificaron con métodos idénticos a los utilizados para la especie nativa de FasR_{MT}. Ambas mutantes presentaron espectros de absorbancia característicos de proteínas bien plegadas, peso molecular esperado y un espectro de exclusión molecular que coincide con el de la proteína dimérica FasR_{MT}.

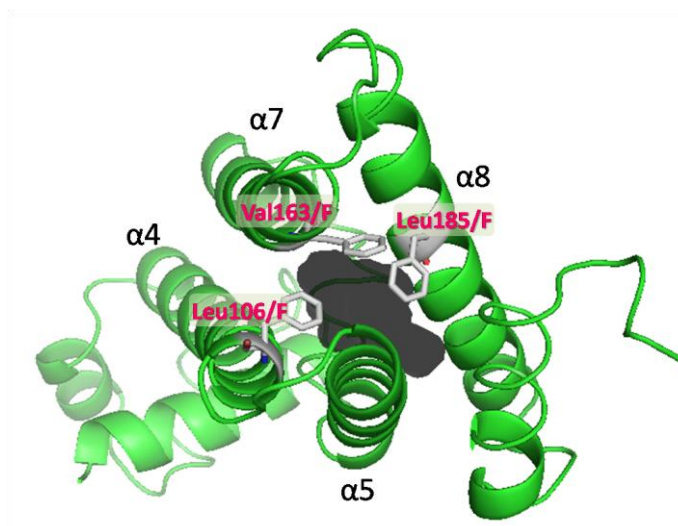


Figura 36. Esquema de la oclusión del túnel para FasR_{MT}_MUT_LVL/F. En el esquema se pueden ver las tres cadenas laterales de los residuos mutados por fenilalanina (en gris), una mutación en cada hélice $\alpha 4$, $\alpha 7$ y $\alpha 8$, respectivamente.

Las concentraciones obtenidas y el grado de pureza de estas proteínas resultaron satisfactorias para realizar ensayos funcionales mediante experimentos de retardo en gel (Figura 37). Se analizó el efecto de acil-CoAs de cadena larga sobre la unión de las dos proteínas mutantes a la sonda *Pfas* 398 descrita en el capítulo I (Figura 13). La sonda contiene la región promotora del operón *fas-acpS* que incluye el sitio completo de unión al ADN de FasR_{MT} determinado por ensayos previos [53]. El ensayo de retardo en gel fue realizado pre-incubando las proteínas FasR_{MT}, FasR_{MT}_MUT_L/F y FasR_{MT}_MUT_LVL/F con C₁₆-CoA y C₂₀-CoA, incubando luego la mezcla con la sonda *Pfas* 398 marcada con ³²P. Como se había observado tanto en el capítulo I de la presente tesis como en experimentos previos, los acil-CoAs de cadena larga disminuyen la afinidad de la interacción FasR_{MT}-ADN, especialmente en el caso de C₂₀-CoA. Sin embargo, la misma concentración de molécula ligando no tiene ningún efecto sobre la unión de las proteínas mutantes a *Pfas* 398 (Figura 37). Este resultado permite confirmar, en parte, la estructura propuesta en relación a la funcionalidad del dominio efector y la repercusión que se produce sobre la unión FasR_{MT}-ADN.

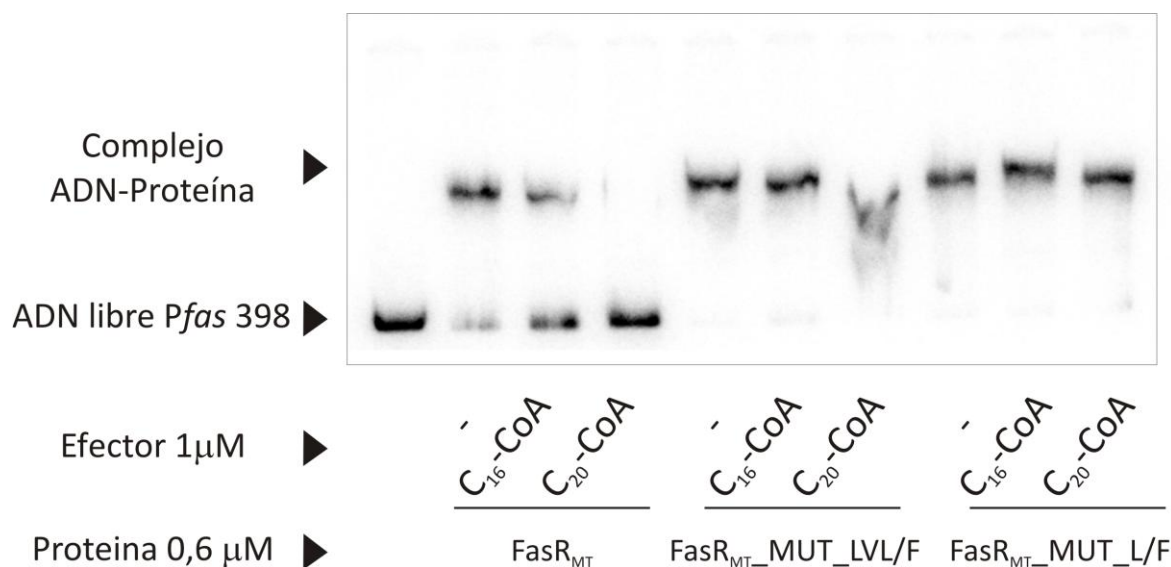


Figura 37. La unión de FasR_{MT}_MUT_L/F y FasR_{MT}_MUT_LVL/F a la región promotora *Pfas* 398 no es inhibida en presencia de acil-CoAs de cadena larga. El ensayo de retardo en gel se realizó incubando la sonda *Pfas* 398 marcada radiactivamente con una concentración 0,6 μM de FasR_{MT}, FasR_{MT}_MUT_L/F y FasR_{MT}_MUT_LVL/F en presencia de C₁₆-CoA y C₂₀-CoA a una concentración final de 1 μM.

3.2.4 Discusión

FasR_{MT} muestra un alto porcentaje de identidad de secuencia con un gran número de proteínas presentes en micobacterias, sin embargo no se conoce la estructura molecular de ninguna de ellas. El grupo de proteínas con estructura 3D conocida y que muestran ser homólogas estructurales a FasR_{MT}, son los miembros de la familia TetR, aun cuando la identidad de secuencia no es alta. Existen al menos 200 miembros de esta familia cuya estructura ha sido resuelta [140], y ahora que conocemos la estructura de FasR_{MT}, podemos confirmar que comparten una clara similitud topológica (Figura 38), (Tabla 15).

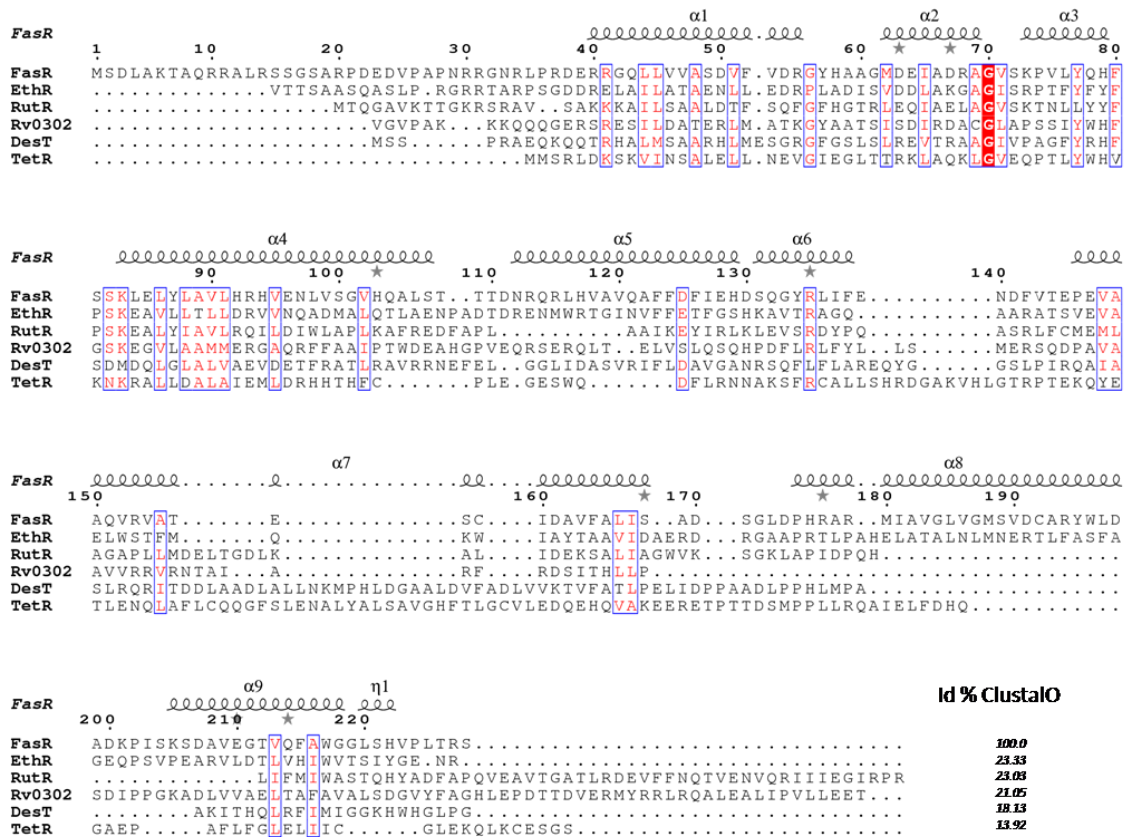


Figura 38. Alineamiento de la secuencia de FasR_{MT} con proteínas de la familia TetR. Los residuos conservados se muestran en rojo. Se observa un mayor número de residuos conservados en la región perteneciente al dominio de unión al ADN de la familia TetR, aminoácidos 44 a 90 (pfam). El porcentaje de identidad de cada regulador con FasR_{MT} se indica a la derecha de la parte inferior de la figura. Se utilizó el programa ESPript 2.2 para esta figura.

Tabla 15. Reguladores transcripcionales de la familia TetR utilizados en el alineamiento de secuencia.

TetRs	Microorganismo y actividad como efector transcripcional	Descripción	Ligando/s
TetR	<i>E. coli</i> Represor	Regulador transcripcional implicado en la resistencia a tetraciclina.	Tetraciclina
DesT	<i>P. aeruginosa</i> Represor	Regula la expresión de <i>desCB</i> y <i>fabAB</i> , implicados en las vías aeróbicas y anaeróbicas de biosíntesis de AGI respectivamente.	C ₁₆ CoA C _{18:1} CoA
EthR	<i>M. tuberculosis</i> Represor	Regulador de <i>ethA</i> que codifica para una monooxigenasa requerida para la activación de la etionamida.	Hexadecil-octanoato
RutR	<i>E. coli</i> Activador	Regula la síntesis de pirimidinas.	Uracilo
Rv0302	<i>M. tuberculosis</i> Activador	Regula la expresión de MmpL _s , proteínas de membrana transportadoras de lípidos.	-

La comparación de las estructuras de FasR_{33MT} con las de los reguladores TetR de la Figura 39, pone en evidencia una similitud en la disposición de interacciones hidrofóbicas complementadas por contactos polares, tanto en las regiones de dimerización como en la formación de sitios de unión al ligando. Sin embargo, cualquier alineación de a pares es difícil ya que las seis hélices, siete en el caso de TetR de *E. coli*, difieren tanto en longitud como en orientación relativa.

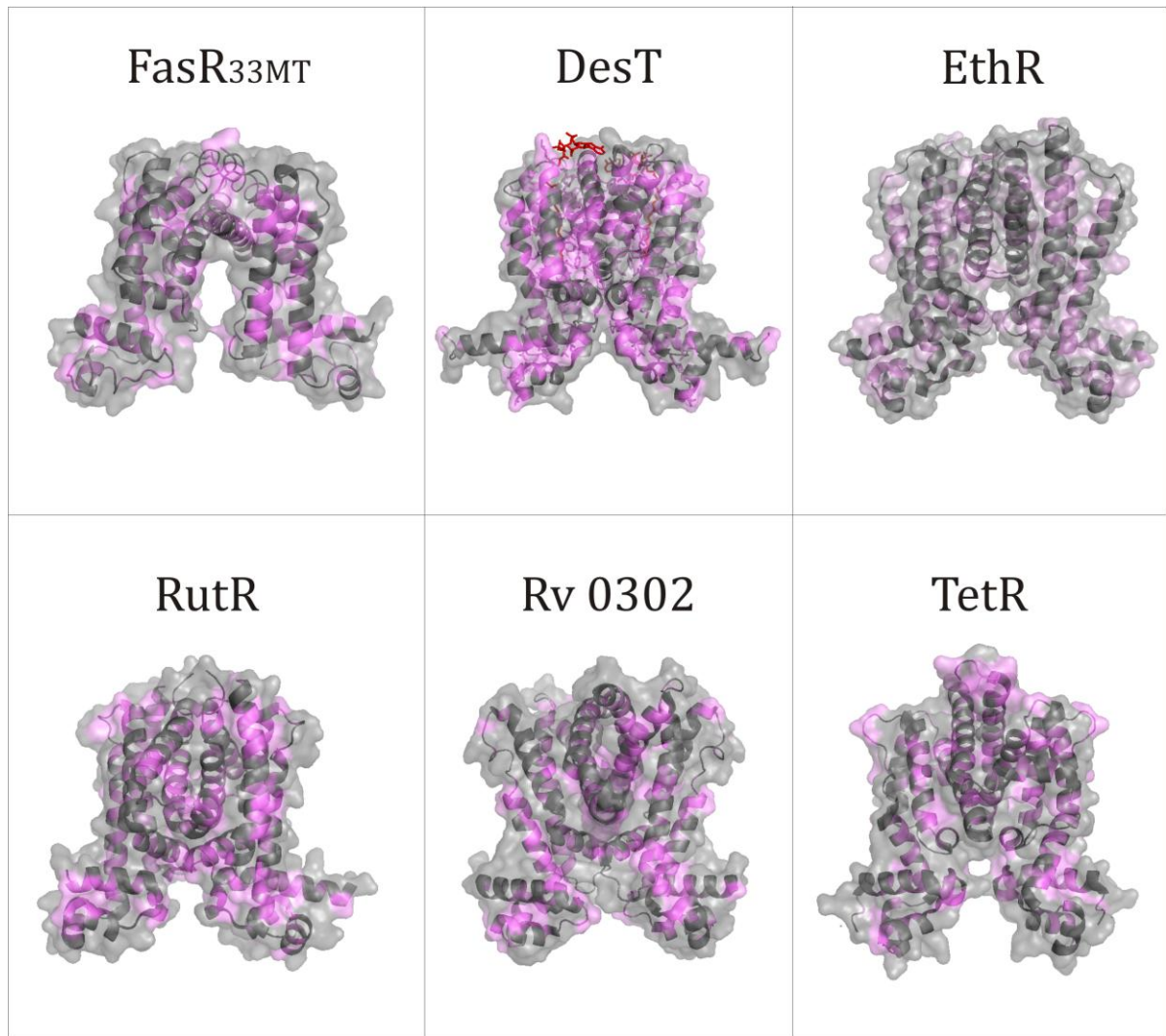


Figura 39. Comparación de estructura tridimensional de FasR_{33MT} con proteínas pertenecientes a la familia TetR. Se ilustraron todas las estructuras con una perspectiva de observación semejante. El análisis estructural detallado muestra diferencias sustantivas, sin embargo, se observa fácilmente una similitud general compartida entre los miembros de esta familia. Los aminoácidos hidrofóbicos están en violeta.

Una de las diferencias que presenta FasR_{MT} y que llama la atención con respecto a otros reguladores TetR, es la disposición de la cavidad a la que denominamos túnel. En otros TetRs es muy común la presencia de bolsillos en el dominio efector, que si bien son cavidades grandes, no se encuentran abiertas por ambos lados como en el caso de FasR_{33MT}. Una idea que surge inmediatamente a partir de esta particularidad, es que esta

disposición permitiría acomodar cadenas aciladas particularmente largas, incluso mayores a 20 carbonos, con los átomos de carbono adicionales emergiendo de la abertura interna del túnel, y hacia la cavidad intra-dímero que también tiene mayor volumen disponible que las otras proteínas TetR. Cadenas extremadamente largas como las que estamos proponiendo existen efectivamente en *M. tuberculosis*, productos de biosíntesis del sistema FAS I, como C₂₆-CoA, o bien intermediarios de la biosíntesis de los ácidos micólicos de longitud aun mayor como los ácidos meromicólicos [173].

Entre los reguladores de tipo TetR, es particularmente interesante el caso de DesT de *P. aeruginosa*, este regulador no sólo tiene una gran similitud topológica con FasR_{MT} sino que comparte un mismo tipo de ligando. Como se mencionó en la introducción general, DesT es un represor transcripcional que regula la expresión de los genes que controlan la proporción de ácidos grasos insaturados:saturados disponibles para la síntesis de lípidos de membrana. DesT unido a un C_{18:1}-CoA (insaturado) tiene una alta afinidad por su sitio de unión al ADN, mientras que DesT unido a un C₁₆-CoA (saturado) no se une a la región operadora que reconoce en el ADN [174]. En este caso, las características de la cadena acilada influyen directamente en el empaquetamiento de los residuos del núcleo hidrofóbico dentro del dominio de unión al ligando, y estos cambios se propagan a los dominios de unión al ADN a través de cambios conformacionales para modular dicha unión.

En el caso de FasR_{MT}, aún no podemos precisar en detalle cuáles son los cambios que se producen y como se propagan a partir de la unión al ligando para modular su afinidad por el ADN específico; pero, sí se observan características asociadas a la unión del ligando que, junto a los resultados reportados en el capítulo I, apoyan un modelo mecanístico de acuerdo al cual la unión de moléculas de acil-CoA de cadena larga en el túnel, desestabilizan la unión de FasR_{MT} al ADN.

Por el momento no contamos con la estructura de la proteína unida al ADN, ni con la estructura de FasR_{MT} sin ningún ligando en el dominio efector C-terminal. Estas estructuras serían valiosas para completar el modelo de estados funcionalmente relevantes, que contribuirían a confirmar la hipótesis de trabajo que proponemos. Por otro lado, las construcciones utilizadas para producir la proteína recombinante soluble y lograr su cristalización, corresponden a una forma truncada en los primeros 33 residuos N-terminales, debido a la dificultad para obtener cristales a partir de la proteína nativa. Esta dificultad podría deberse a una flexibilidad intrínseca de dicho extremo N-terminal. Recientemente hemos determinado que FasR_{33MT} no se une al ADN en ensayos de retardo en gel y en condiciones comparables en los que la proteína de largo completo sí lo hace, con lo que el segmento N-terminal putativamente flexible parece ser clave para permitir la unión de FasR_{MT} al ADN. Existen numerosos reportes de proteínas con regiones desordenadas jugando funciones variadas [175], y dado que nuestros modelos estructurales actuales no contienen este segmento, es prematuro concluir acerca del mecanismo exacto de unión FasR_{MT}-ADN.

Utilizando la aproximación de retardo en gel para analizar la unión proteína-ADN, se observó también que versiones de FasR_{MT} mutadas en su sitio de unión al ligando efector, revelan mayor afinidad aparente por la región operadora que reconoce (datos no mostrados). Estos datos sostienen nuestra hipótesis de trabajo, pues la mutantes fueron diseñadas para bloquear la entrada del ligando al túnel. Probablemente así hemos logrado variantes de FasR_{MT} realmente libres de cualquier interacción en este dominio, lo que resultaría en una libertad máxima en el arreglo geométrico de los dominios HTH de unión al ADN y por ende máxima eficiencia de asociación al mismo. De confirmarse estos resultados, el uso de estas mutantes podría lograr complejos proteína-ADN más estable, lo que permitiría su cristalización.

En relación a la cristalización de complejos FasR_{MT}-ADN, hasta el momento hemos avanzado en identificar condiciones que permiten obtener cristales de FasR_{MT} que crecieron en presencia de ADN (potencialmente en complejo), aunque aún no difractan los rayos X hasta una resolución suficiente para poder avanzar en los estudios cristalográficos propiamente dichos. Estos cristales se obtuvieron con oligonucleótidos anillados que abarcan la región formada por las dos repeticiones invertidas del sitio mayor de unión al ADN (Figura 13) de 25pb. Como perspectivas para esta aproximación, se intentará la optimización de la co-cristalización Proteína-ADN modificando el largo de los oligonucleótidos utilizados, ya que se han visto buenos resultados empleando esa técnica [176], [177].

Integrando todos nuestros datos experimentales, y considerando también los resultados obtenidos con otros reguladores de tipo TetR, podemos decir que la distancia entre los dos dominios HTH del dímero de FasR_{MT} debería ser próxima a 33-34 Å, esto permitiría que ambos dominios se unan al surco mayor por el mismo lado de la doble hélice de ADN a través de sendas secuencias palindrómicas consecutivas (considerando solamente la región 1). Dicha medida (una vuelta de hélice de B-ADN), en la proteína corresponde típicamente a la distancia que separa el centro de las hélices $\alpha 3$ de cada protómero, $\alpha 3$ es una hélice crítica que interviene directamente en la asociación al ADN en la mayoría de los reguladores de tipo TetR.

Para TetR de *E. coli* la distancia entre los HTH en la conformación de unión al ADN es de 35 Å [153]. Si bien hay reportes de TetRs sin ligando no unidos al ADN, donde la distancia inter-HTH es sustancialmente mayor a 34 Å, por ejemplo 44 Å en una mutante de RutR de *E. coli* incapacitada para unir el efector [178], en todos estos ejemplos se propone efectivamente que el mecanismo en juego es el del incremento en la distancia entre HTHs como consecuencia de la unión al ligando efector, resultando en una

proteína incapaz de unirse a la región del ADN que reconocen [151]. Una confirmación importante de que este mecanismo es relevante, puede hallarse en el análisis de todas las estructuras de proteínas de tipo TetR unidas al ADN [178]. Catorce estructuras depositadas en la PDB, pertenecientes a 11 reguladores diferentes, revelan que la asociación al ADN requiere de una conformación cerrada del regulador, correspondiente a una distancia entre hélices $\alpha 3$ de entre 34,5 Å (ms654 PDB id. 4JL3) hasta 39,5 Å (SlmA PDB id. 4GCK), con un promedio de 36,9 Å [179].

La rigidificación de los dominios HTH en la forma unida al ligando efector en la estructura de FasR_{33MT}-C₂₀-CoA, resulta en una distancia de ~60 Å entre los protómeros medida desde el centro de la hélice $\alpha 3$. Dicha distancia estabiliza una conformación en la que los dominios HTH indudablemente no se pueden acomodar para unirse al ADN. En la estructura de FasR_{33MT} sin C₂₀-CoA unido, si bien la distancia entre los dominios HTH no resulta compatible con la unión al ADN, quizás por la presencia de una molécula en el dominio efector, provee de indicios importantes sobre el mecanismo de acción, con una distancia entre HTHs reducida (~52 Å) y flexibilidad aumentada tanto en los dominios HTH como en una región del dominio efector espacialmente cercana a los HTH (bucle entre la hélices $\alpha 6$ - $\alpha 7$ y la mitad N-terminal de la hélice $\alpha 7$).

Como perspectivas de éste trabajo de tesis se planea completar la validación estructural con experimentos funcionales. Las mutantes analizadas hasta el momento permiten hacer parte de esa validación para la estructura propuesta en relación a la funcionalidad del dominio efector y la repercusión sobre el dominio de unión al ADN. Sin embargo, aunque sería importante resolver la estructura de las mismas, también sería necesario el análisis de mutantes que nos permitan obtener información sobre aminoácidos relevantes para desacoplar la unión de FasR_{MT} al ADN.

La estrategia para este análisis sería mutar residuos voluminosos por residuos menos voluminosos (alaninas) en regiones de contactos cercanos al extremo distal del acilo, donde se encuentra la abertura del túnel hacia la zona intra-dímero; la hipótesis es que un residuo menos voluminoso podría desacoplar el mecanismo que permite la movilidad del dominio HTH, que probablemente se transmite a través de la hélice $\alpha 4$. Del análisis estructural de FasR_{33MT} surge una evidencia para validar la efectividad de esta estrategia, una característica observada en muchos otros reguladores de tipo TetR. La misma trata de una torsión diferencial de la larga hélice $\alpha 4$ cuando se comparan las estructuras de estos reguladores en presencia o ausencia de un ligando efectivo. Esta región parece ser un elemento estructural importante, más aún si se nota que dicha hélice está directamente precedida de la hélice $\alpha 3$, crítica para la unión al ADN.

De esta manera, poniendo alaninas pequeñas en lugar de los residuos naturalmente voluminosos que contactan al acilo en la abertura intra-dímero del túnel, se debería desacoplar el mecanismo de torsión de la hélice $\alpha 4$, la que a su vez se transmite a la hélice $\alpha 3$. A partir de esta hipótesis se proponen tres mutaciones basados en el análisis estructural de FasR_{33MT} y FasR_{33MT}-C₂₀-CoA.

1. Leu 98 por Ala, en la hélice $\alpha 4$, este residuo se encuentra en un punto crítico de la torsión diferencial de esta hélice entre la estructura de la proteína con y sin C₂₀-CoA.

2. Phe 138 por Ala, al final de la hélice $\alpha 6$; esta hélice interactúa con hélice $\alpha 4$. Este residuo se posiciona en punto crítico hacia el extremo distal del acilo, con lo que se encuentra perfectamente posicionada para ver la influencia que tiene el largo de la cadena acilada, y disparar el cambio solo cuando el largo sea suficiente, este residuo se mueve mucho entre ambas estructuras resueltas.

3. Phe 123 por Ala, en la hélice $\alpha 5$, este residuo también se encuentra formando parte de la región hidrofóbica hacia el extremo distal del acilo junto a la Phe138, también se observa una gran diferencia en su posición entre ambas estructuras.

El análisis de las mutantes propuestas para desacoplar la unión al ADN, nos permitiría ahondar en el mecanismo que conlleva a la modulación de la unión FasR_{MT}-ADN. Eso sería de gran utilidad tanto para completar el modelo estructural de la regulación como para el diseño racional en la búsqueda de inhibidores que actúen como nuevos agentes antimicobacterianos, tarea que será abordada en un trabajo de investigación postdoctoral.

4. CONCLUSIONES

- Mediante estudios de interacción realizados por SPR, se comprobó que los acil-CoA de cadena larga C₁₆-CoA y C₂₀-CoA interaccionan de manera directa y específica con FasR_{MT}, mientras que los acil-CoA de cadena corta, como el C₂-CoA, no lo hacen.
- Se determinaron los parámetros cinéticos y constantes de afinidad de la interacción de FasR_{MT} con C₁₆-CoA, los cuales dieron una K_D de 0,9 μM, por determinación cinética de la reacción. Sin bien los ensayos de SPR realizados para el análisis de la interacción FasR_{MT}-C₂₀-CoA no permitieron determinar constantes de afinidad o cinética de interacción, los mismos sugirieron una posible interacción de tipo cooperativa altamente estabilizada entre FasR_{MT}-C₂₀-CoA, la cual deberá ser confirmada en futuros ensayos.
- El análisis cinético de la interacción FasR_{MT}-ADN nos permitió obtener una K_D global de la interacción de 394 nM, un valor que se encuentra en el orden de lo reportado en la bibliografía para otros reguladores transcripcionales de la familia TetR.
- El ensayo de transcripción *in vitro*, utilizando *Pfas* como sonda, confirmó la actividad previamente descrita para FasR_{MT} como activador transcripcional.
- Los ensayos de interacción de *Pfas* con FasR_{MT} en presencia de C₂-CoA y C₁₆-CoA, utilizando la técnica de SPR, y los ensayos de transcripción *in vitro*, nos permitieron confirmar el modelo de activación transcripcional propuesto para FasR_{MT}. El mismo consiste en un clásico ejemplo de regulación por producto donde FasR_{MT} se une a *Pfas*

para activar la transcripción de los genes del operón *fas-acpS* y dicha activación es modulada mediante ésteres de CoA de cadena larga, productos del sistema FAS I, los cuales al unirse a FasR_{MT} inhiben la unión de la proteína al ADN blanco, modulando de esta manera la transcripción de dicho operón.

➤ Se optimizó la expresión y purificación de His₆-FasR_{MT} y FasR_{MT} nativa para realizar ensayos de cristalogénesis, y se confirmó que la forma proteica nativa purificada era activa por su capacidad de unirse al ADN. Si bien no se lograron obtener cristales que permitieran la difracción de rayos X para estas proteínas, la negativa sobre esta búsqueda y el análisis bioinformático de la estructura primaria de FasR_{MT}, permitieron la identificación de una región desordenada que llevó a la construcción de proteínas truncadas, las cuales fueron exitosamente cristalizadas.

➤ Se expresaron y purificaron dos versiones truncadas (sin los primeros 33 o 43 aminoácidos) de la proteína FasR de *M. tuberculosis*, dos versiones a partir de su ortólogo en *M. smegmatis* y dos versiones de su ortólogo en *M. leprae*. Solo las versiones en las que se truncaron los primeros 33 aminoácidos de cada proteína proporcionaron proteínas a concentración y pureza satisfactorias para ensayos de cristalogénesis. Se obtuvieron cristales de FasR_{33MT} los cuales difractaron a una resolución de 1,63 Å y cristales de FasR_{33MT} en presencia de C₂₀-CoA, los cuales difractaron a una resolución de 1,7 Å. A partir de los datos de difracción, se resolvió la estructura tridimensional de FasR_{33MT} y de FasR_{33MT}-C₂₀-CoA. Las dos estructuras reportadas en esta tesis superaron satisfactoriamente los requerimientos de calidad esperados, y serán depositados en la PDB.

- FasR_{33MT} sólo contiene α hélices en su estructura, las tres primeras hélices de cada protómero forman el dominio más pequeño de unión a ADN que contiene el motivo HTH, mientras que las seis hélices siguientes están plegadas formando un dominio independiente de mayor tamaño, correspondiente al dominio efector. En el dominio efector se identificó un túnel de carácter hidrofóbico que atraviesa la molécula de lado a lado; la unión con la molécula de C₂₀-CoA se produce dentro de este túnel.
- Las mutantes generadas para impedir la unión del ligando al dominio efector, diseñadas a partir del análisis estructural del regulador, confirmaron la funcionalidad de dicho dominio, como así también el rol del ligando sobre la unión FasR_{MT}-ADN.
- El análisis de las consecuencias de la unión proteína-ligando, basado en el análisis de las estructuras de FasR_{33MT} y FasR_{33MT}-C₂₀-CoA, sugiere que la presencia del ligando efector unido al túnel hidrofóbico, genera un homodímero más rígido, con una distancia fija entre los dominios HTH que podría ser incompatible con las distancias para la unión del mismo al ADN. La estructura de FasR_{33MT} muestra mayor flexibilidad en sus dominios HTH cuando el efector específico no está unido.
- Las características asociadas a la unión del ligando (flexibilidad de los dominios HTH o distancia entre los protómeros requerida para la unión al ADN), apoyan un modelo mecanístico de acuerdo al cual, la unión de una molécula de acil-CoA de cadena larga en el túnel de cada protómero, desestabiliza la unión de FasR_{MT} al ADN. Estas características, producto del análisis de la estructura de FasR_{33MT} con y sin C₂₀-CoA, permitieron el diseño de proteínas mutantes que en el futuro podrían explicar el

mecanismo concreto de inhibición de la unión de FasR al ADN por acil-CoAs de cadena larga.

5. RESUMEN

La tuberculosis continúa siendo una de las enfermedades infecciosas que provoca la mayor cantidad de muerte entre los adultos. *Mycobacterium tuberculosis* es el agente etiológico de la tuberculosis y el éxito de este patógeno se debe en gran medida a su notable capacidad para sobrevivir en el huésped infectado, donde puede persistir durante varias décadas; siendo su inusual pared celular un factor clave en esta supervivencia. Los ácidos micólicos son los componentes mayoritarios de su envoltura celular y los responsables de muchas de las características de esta bacteria, como ser, su patogenicidad y su alta resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados en la clínica. La biosíntesis de los ácidos micólicos involucra dos sintasas de ácidos grasos diferentes, denominadas FAS I y FAS II. A pesar de la relevancia de la co-existencia de los dos sistemas (FAS I y FAS II) en micobacterias, tanto por su rol en la síntesis de los ácidos grasos de membrana y de los ácidos micólicos, como por ser el blanco de poderosas drogas antituberculosas, es muy poco lo que se sabe acerca de cómo se regula el funcionamiento de estas dos rutas biosintéticas y cuáles serían las señales regulatorias que permiten la correcta interacción entre ambos sistemas metabólicos. En nuestro laboratorio nos propusimos estudiar cómo se regulan a nivel transcripcional los sistemas de síntesis de ácidos grasos y ácido micólicos en micobacterias y caracterizar cuál es la señal a la cual responden. Es así que se ha caracterizado un factor transcripcional de *M. tuberculosis* denominado FasR (*Fatty acid synthase Regulator*), al que llamamos FasR_{MT}. Se determinó que esta proteína es un activador transcripcional esencial para la síntesis de ácidos grasos en *Mycobacterium smegmatis*, y que regula la expresión de los genes del operón *fas-*acpS** mediante su unión a la región promotora de ese operón. De esta manera modula la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos, cuyo destino final son los fosfolípidos de membrana y los triacilglicéridos, como así también los sustratos del sistema FAS II para producir los ácidos micólicos. Además, a partir de una

mutante de FasR_{MT} en *M. tuberculosis*, se ha demostrado que la disminución de FasR_{MT} genera una cepa notablemente afectada en su virulencia. Los resultados de dicha investigación representaron la caracterización de un regulador clave en *M. tuberculosis* y sentaron las bases para el desarrollo del trabajo de tesis aquí presentado. En este trabajo se presentan los resultados de los experimentos biofísicos y moleculares llevados a cabo para el análisis de la interacción entre FasR_{MT} y las señales regulatorias a las cuales responde por unión específica y directa, los acil-CoA de cadena larga, y la región del ADN que reconoce en el promotor del operón *fas-accP*. Además, se validó el modelo de regulación transcripcional propuesto para esta proteína mediante análisis de transcripción *in vitro*. Se resolvió la estructura tridimensional de una forma truncada del activador transcripcional de la síntesis de ácidos grasos, FasR_{33MT}, como así también la estructura de FasR_{33MT} en presencia de una de sus moléculas ligando, C₂₀-CoA. A partir de la resolución de estas estructuras, se llevó a cabo el análisis de las mismas para comenzar a comprender los mecanismos moleculares por los cuales la proteína FasR_{MT} modula su actividad. Aún no podemos precisar en detalle cuáles son los cambios que se producen sobre FasR_{MT} y cómo se propagan a partir de la unión al ligando para modular su afinidad por el ADN específico. Sin embargo, se observan características asociadas a la unión del ligando que apoyan un modelo mecanístico de acuerdo al cual, la unión de moléculas de acil-CoA de cadena larga en un túnel hidrofóbico de la proteína desestabilizan la unión de FasR_{MT} al ADN. Considerando que este regulador es esencial para la sobrevivencia de *Mycobacterium*, la resolución de la estructura tridimensional de esta proteína permite iniciar la búsqueda y el diseño racional de inhibidores que actúen como nuevos agentes antimicrobianos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Tortoli, E. (2006) The new mycobacteria: An update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **48**, 159–178.
2. Embley, T. M. (1994) The Molecular Phylogeny and sistematics of the actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 257–289.
3. Falkinham, J. O. (1996) Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria . Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 177–215.
4. Kaufmann, S. H. E. (2003) A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: Those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis.* **83**, 86–90.
5. Daniel, T. M. (2006) The history of tuberculosis. *Respir. Med.* **100**, 1862–1870.
6. Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Connell, N. D., Kreiswirth, B. N., Whittam, T. S., and Musser, J. M. (1997) Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 9869–9874.
7. Cole, S. T. (2002) Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology.* **148**, 2919–2928.
8. Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., Truman, R. W., and Williams, D. L. (2006) The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 338–381.
9. Sizaire, V., Nackers, F., Comte, E., and Portaels, F. (2006) *Mycobacterium ulcerans* infection: control, diagnosis, and treatment. *Lancet. Infect. Dis.* **6**, 288–96.
10. Harisinghani, M. G., McLoud, T. C., Shepard, J. A., Ko, J. P., Shroff, M. M., and Mueller, P. R. (2000) Tuberculosis from head to toe. *Radiographics.* **20**, 449,532.
11. O'Garra, A., Redford, P. S., McNab, F. W., Bloom, C. I., Wilkinson, R. J., and Berry, M. P. R. (2013) *The immune response in tuberculosis.*, *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 475-527.
12. Tiemersma, E. W., van der Werf, M. J., Borgdorff, M. W., Williams, B. G., and Nagelkerke, N. J. D. (2011) Natural history of tuberculosis: Duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: A systematic review. *PLoS One.* **6**, e17601.

13. World Health Organization (2015) *Global Tuberculosis Report 2015*.
14. Bacon, J., and Marsh, P. D. (2007) Transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* exposed to adverse conditions in vitro. *Curr. Mol. Med.* **7**, 277–86.
15. Daffé, M., and Draper, P. (1997) *The Envelope Layers of Mycobacteria with Reference to their Pathogenicity*. *Adv. Microb. Physiol.* **39**, 131-203.
16. Choi, K., Kremer, L., Besra, G., and Rock, C. (2000) Identification and Substrate Specificity of β -Ketoacyl-[Acyl Carrier Protein] Synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **275**, 28201–7.
17. Jackson, M., McNeil, M. R., and Brennan, P. J. (2013) Progress in targeting cell envelope biogenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol.* **8**, 855–75.
18. Abrahams, K., Besra, G.S. (2016) Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. *Parasitology*.**2**, 1-18.
19. Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Pitzko, J. M., and Engelhardt, H. (2008) Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3963–3967.
20. Brennan, P. J. (1989) Structure of mycobacteria: Recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. *Rev. Infect. Dis.* **11**, S420–S430.
21. Brennan, P. J., and Nikaido, H. (1995) The Envelope of Mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 29–63.
22. Daffé M, Lanéelle MA, Asselineau C, Lévy-Frébault V, D. H. (1983) Taxonomic value of mycobacterial fatty acids: proposal for a method of analysis. *Ann Microbiol.* **134B**, 241–256.
23. Barry, C. E., and Mdluli, K. (1996) Drug sensitivity and environmental adaptation of mycobacterial cell wall components. *Trends Microbiol.* **4**, 275–281.
24. Glickman, M. S., and Jacobs, W. R. (2001) Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a discipline. *Cell.* **104**, 477–485.
25. Bhatt, A., Fujiwara, N., Bhatt, K., Gurcha, S. S., Kremer, L., Chen, B., Chan, J., Porcelli, S. A., Kobayashi, K., Besra, G. S., and Jacobs, W. R. (2007) Deletion of kasB in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5157–62.
26. Bhatt, A., Molle, V., Besra, G. S., Jacobs, W. R., and Kremer, L. (2007) The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: Their role in mycolic acid

- biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Mol. Microbiol.* **64**, 1442–1454.
27. Yuan, Y., Mead, D., Schroeder, B. G., Zhu, Y., and Iii, C. E. B. (1998) The Biosynthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **273**, 21282–21290.
 28. Draper, P. (1998) The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front Biosci.* **3**, D1253-61.
 29. Fenton, M. J. (1996) Immunopathology of Tuberculosis : Roles of Macrophages and Monocytes. *Infect. Immun.* **64**, 683–690.
 30. Besra GS, C. J. L. (1994) Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*. En: *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control* (Bloom B.R.) Howard Hughes Medical Research Institute, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York pp. 285–306.
 31. Brennan, P. J. (2003) Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* **83**, 91–97.
 32. Takayama, K., Wang, C., and Besra, G. S. (2005) Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 81–101.
 33. Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G., and Jacobs, W. R. (1994) *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* **263**, 227–30.
 34. Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, 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., and Barrell, B. G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* **393**, 537–544.
 35. Sacco, E., Covarrubias, A. S., O'Hare, H. M., Carroll, P., Eynard, N., Jones, T. A., Parish, T., Daffé, M., Bäckbro, K., and Quémard, A. (2007) The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 14628–33.
 36. Pawelczyk, J., Brzostek, A., Kremer, L., Dziadek, B., Rumijowska-Galewicz, A., Fiolka,

- M., and Dziadek, J. (2011) *Accd6*, a key carboxyltransferase essential for mycolic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*, is dispensable in a nonpathogenic strain. *J. Bacteriol.* **193**, 6960–6972.
37. Banis, R. J., Peterson, D. O., and Bloch, K. (1977) *Mycobacterium smegmatis* fatty acid synthetase. Polysaccharide stimulation of the rate-limiting step. *J. Biol. Chem.* **252**, 5740–5744.
38. Zimhony, O., Vilchèze, C., and Jacobs, W. R. (2004) Characterization of *Mycobacterium smegmatis* expressing the *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I (*fasI*) gene. *J. Bacteriol.* **186**, 4051–4055.
39. Kikuchi, S., Rainwater, D. L., and Kolattukudy, P. E. (1992) Purification and characterization of an unusually large fatty acid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* var. bovis BCG. *Arch. Biochem. Biophys.* **295**, 318–326.
40. Banerjee, A., Sugantino, M., Sacchettini, J. C., and Jacobs, W. R. (1998) The *mabA* gene from the *inhA* operon of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3-ketoacyl reductase that fails to confer isoniazid resistance. *Microbiology.* **144**, 697–704.
41. Schaeffer, M. L., Agnihotri, G., Volker, C., Kallender, H., Brennan, P. J., and Lonsdale, J. T. (2001) Purification and biochemical characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases KasA and KasB. *J. Biol. Chem.* **276**, 47029–37.
42. Kremer, L., Dover, L. G., Carrère, S., Nampoothiri, K. M., Lesjean, S., Brown, A. K., Brennan, P. J., Minnikin, D. E., Locht, C., and Besra, G. S. (2002) Mycolic acid biosynthesis and enzymic characterization of the beta-ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **364**, 423–430.
43. Portevin, D., De Sousa-D’Auria, C., Houssin, C., Grimaldi, C., Chami, M., Daffé, M., and 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**, 314–9.
44. Alvarez, H. M. (2016) Triacylglycerol and wax ester-accumulating machinery in prokaryotes. *Biochimie.* **120**, 28–39.
45. Zhang, Y. M., and Rock, C. O. (2008) Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat Rev Microbiol.* **6**, 222–233.
46. Cronan, J. E., and Subrahmanyam, S. (1998) FadR, transcriptional co-ordination of metabolic expediency. *Mol. Microbiol.* **29**, 937–943.

47. Zhang, Y. M., White, S. W., and Rock, C. O. (2006) Inhibiting bacterial fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **281**, 17541–17544.
48. Matsuoka, H., Hirooka, K., and Fujita, Y. (2007) Organization and function of the YsiA regulon of *Bacillus subtilis* involved in fatty acid degradation. *J. Biol. Chem.* **282**, 5180–5194.
49. Schujman, G. E., Guerin, M., Buschiazzo, A., Schaeffer, F., Llarrull, L. I., Reh, G., Vila, A. J., Alzari, P. M., and de Mendoza, D. (2006) Structural basis of lipid biosynthesis regulation in Gram-positive bacteria. *EMBO J.* **25**, 4074–83.
50. Schujman, G. E., Paoletti, L., Grossman, A. D., and de Mendoza, D. (2003) FapR, a bacterial transcription factor involved in global regulation of membrane lipid biosynthesis. *Dev. Cell.* **4**, 663–672.
51. Arabolaza, A., D'Angelo, M., Comba, S., and Gramajo, H. (2010) FasR, a novel class of transcriptional regulator, governs the activation of fatty acid biosynthesis genes in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **78**, 47–63.
52. Salzman, V., Mondino, S., Sala, C., Cole, S. T., Gago, G., and Gramajo, H. (2010) Transcriptional regulation of lipid homeostasis in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **78**, 64–77.
53. Mondino, S., Gago, G., and Gramajo, H. (2013) Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **89**, 372–387.
54. DiRusso, C. C., Heimert, T. L., and Metzger, A. K. (1992) Characterization of FadR, a global transcriptional regulator of fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. Interaction with the fadB promoter is prevented by long chain fatty acyl coenzyme A. *J Biol Chem.* **267**, 8685–8691.
55. Henry, M. F., and Cronan, J. E. (1992) A new mechanism of transcriptional regulation: Release of an activator triggered by small molecule binding. *Cell.* **70**, 671–679.
56. Campbell, J. W., and Cronan, J. E. J. (2001) *Escherichia coli* FadR positively regulates transcription of the *fabB* fatty acid biosynthetic gene. *J. Bacteriol.* **183**, 5982–5990.
57. Zhang, Y. M., Marrakchi, H., and Rock, C. O. (2002) The FabR (YijC) transcription factor regulates unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **277**, 15558–15565.
58. Cronan, J. E., Birge, C. H., and Vagelos, P. R. (1969) Evidence for Two Genes Specifically Involved in Unsaturated Fatty Acid Biosynthesis in *Escherichia coli*. *J.*

- Bacteriol.* **100**, 601–604.
59. Feng, Y., and Cronan, J. E. (2011) Complex binding of the FabR repressor of bacterial unsaturated fatty acid biosynthesis to its cognate promoters. *Mol. Microbiol.* **80**, 195–218.
 60. Zhu, K., Zhang, Y.-M., and Rock, C. O. (2009) Transcriptional regulation of membrane lipid homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **284**, 34880–34888.
 61. Zhang, Y.-M., Zhu, K., Frank, M. W., and Rock, C. O. (2007) A *Pseudomonas aeruginosa* transcription factor that senses fatty acid structure. *Mol. Microbiol.* **66**, 622–632.
 62. Subramanian, C., Rock, C. O., and Zhang, Y. M. (2010) DesT coordinates the expression of anaerobic and aerobic pathways for unsaturated fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **192**, 280–285.
 63. Miller, D. J., Zhang, Y., Subramanian, C., Rock, C. O., and White, S. W. (2010) Structural basis for the transcriptional regulation of membrane lipid homeostasis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 971–975.
 64. Lu, Y.-J., and Rock, C. O. (2006) Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **59**, 551–566.
 65. Jerga, A., and Rock, C. O. (2009) Acyl-acyl carrier protein regulates transcription of fatty acid biosynthetic genes via the FabT repressor in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **284**, 15364–15368.
 66. Schujman, G. E., Altabe, S., and De Mendoza, D. (2008) A malonyl-CoA-dependent switch in the bacterial response to a dysfunction of lipid metabolism. *Mol. Microbiol.* **68**, 987–996.
 67. Zhang, Y.-M., and Rock, C. O. (2009) Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *J. Lipid Res.* **50**, S115–S119.
 68. Davis, M. S., and Cronan J.E., J. (2001) Inhibition of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase by acyl-acyl carrier protein. *J. Bacteriol.* **183**, 1499–1503.
 69. Brown, P. O., Wilson, M., DeRisi, J., Kristensen, H. H., Imboden, P., Rane, S., Schoolnik, G. K., Brown, P. O., and Schoolnik, G. K. (1999) Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12833–12838.
 70. Boshoff, H. I. M., Myers, T. G., Copp, B. R., McNeil, M. R., Wilson, M. A., and Barry, C. E. (2004) The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to

- inhibitors of metabolism. Novel insights into drug mechanisms of action. *J. Biol. Chem.* **279**, 40174–40184.
71. Wang, R., Prince, J. T., and Marcotte, E. M. (2005) Mass spectrometry of the *M. smegmatis* proteome: Protein expression levels correlate with function, operons, and codon bias. *Genome Res.* **15**, 1118–1126.
 72. Fu, L. M. (2006) Exploring drug action on *Mycobacterium tuberculosis* using affymetrix oligonucleotide genechips. *Tuberculosis.* **86**, 134–143.
 73. Zhang, Y., and Amzel, L. (2002) Tuberculosis drug targets. *Curr. Drug Targets.* **3**, 131-54.
 74. Clatworthy, A. E., Pierson, E., and Hung, D. T. (2007) Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 541–548.
 75. Dover, L. G., Corsino, P. E., Daniels, I. R., Cocklin, S. L., Tatituri, V., Besra, G. S., and F??tterer, K. (2004) Crystal structure of the TetR/CamR family repressor *Mycobacterium tuberculosis* EthR implicated in ethionamide resistance. *J. Mol. Biol.* **340**, 1095–1105.
 76. Villemagne, B., Flipo, M., Blondiaux, N., Crauste, C., Malaquin, S., Leroux, F., Piveteau, C., Villeret, V., Brodin, P., Villoutreix, B. O., Sperandio, O., Soror, S. H., Wohlkönig, A., Wintjens, R., Deprez, B., Baulard, A. R., and Willand, N. (2014) Ligand efficiency driven design of new inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional repressor EthR using fragment growing, merging, and linking approaches. *J. Med. Chem.* **57**, 4876–4888.
 77. Zheng, H., Colvin, C. J., Johnson, B. K., Kirchhoff, P. D., Wilson, M., Jorgensen-Muga, K., Larsen, S. D., and Abramovitch, R. B. (2016) Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* DosRST signaling and persistence. *Nat. Chem. Biol.* 10.1038/nchembio.2259.
 78. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* **96**, 23–28.
 79. Sambrook J, Fritsch EF, M. T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. in *New York*, pp. 931–957.
 80. Studier, F. W., and Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130.
 81. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.*

- Mol. Biol.* **166**, 557–580.
82. Mukherjee, R., and Chatterji, D. (2008) Stationary phase induced alterations in mycobacterial RNA polymerase assembly: A cue to its phenotypic resistance towards rifampicin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 899–904.
 83. Mondino, S. (2013) *Regulación de la síntesis de ácidos grasos en micobacterias*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina. pp 39-139.
 84. Hartkoorn, R. C., Sala, C., Magnet, S. J., Chen, J. M., Pojer, F., and Cole, S. T. (2010) Sigma factor F does not prevent rifampin inhibition of RNA polymerase or cause rifampin tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **192**, 5472–5479.
 85. Van Den Berg, S., Löfdahl, P. Å., Härd, T., and Berglund, H. (2006) Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *J. Biotechnol.* **121**, 291–298.
 86. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D., Higgins, D. G., Aniba, M., Poch, O., Thompson, J., Blackshields, G., Sievers, F., Shi, W., Wilm, A., Higgins, D., Bradley, R., Roberts, A., Smoot, M., Juvekar, S., Do, J., Dewey, C., Holmes, I., Pachter, L., Clamp, M., Cuff, J., Searle, S., Barton, G., Do, C., Mahabhashyam, M., Brudno, M., Batzoglou, S., Eddy, S., Edgar, R., Edgar, R., Finn, R., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J., Gavin, O., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E., Eddy, S., Bateman, A., Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., Hogeweg, P., Hesper, B., Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T., Katoh, K., Toh, H., Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J., Gibson, T., Higgins, D., Lassmann, T., Sonnhammer, E., Liu, Y., Schmidt, B., Maskell, D., Löytynoja, A., Goldman, N., Mizuguchi, K., Deane, C., Blundell, T., Overington, J., Morgenstern, B., Frech, K., Dress, A., Werner, T., Notredame, C., Higgins, D., Heringa, J., Pirovano, W., Feenstra, K., Heringa, J., Söding, J., Thompson, J., Koehl, P., Ripp, R., Poch, O., Wilm, A., Higgins, D., and Notredame, C. (2014) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539–539.
 87. Banerjee, R., Rudra, P., Prajapati, R. K., Sengupta, S., and Mukhopadhyay, J. (2014) Optimization of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* RNA polymerase expression and purification. *Tuberculosis.* **94**, 397–404.
 88. China, A., and Nagaraja, V. (2010) Purification of RNA polymerase from

- mycobacteria for optimized promoter-polymerase interactions. *Protein Expr. Purif.* **69**, 235–242.
89. Van Der Merwe, P. A. (2001) Surface Plasmon Resonance. in *Protein-Ligand Interactions: Hydrodynamics and Calorimetry (Practical Approach Series)*, pp. 137–170, **1**, 137–170.
90. Maenaka, K. K. and K. M. K. K. (2011) Analysis of Receptor–Ligand Interactions by Surface Plasmon Resonance. in *Methods in Molecular Biology*, pp. 227–241, **748**, 227–241.
91. O’Shannessy, D. J., Brigham-Burke, M., Soneson, K. K., Hensley, P., and Brooks, I. (1993) Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods. *Anal Biochem.* **212**, 457–468.
92. Kodoyianni, V. (2011) Label-free analysis of biomolecular interactions using SPR imaging. *Biotechniques.* **50**, 32–40.
93. Polayes, D. a, Parks, T. D., Johnston, S. a, and Dougherty, W. G. (1998) Application of TEV Protease in Protein Production. *Methods Mol. Med.* **13**, 169–83.
94. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
95. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411–2423.
96. Gill, S. C., and von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319–326.
97. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685.
98. Bourne, Y., Vincentelli, R., Frassinetti, F., Valencia, C., Bignon, C., Cambillau, C., Scappucini-Calvo, L., Maurin, D., Campanacci, V., and Canaan, S. (2004) High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. *Protein Sci.* **13**, 2782–2792.
99. Wilkins, M., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Appel, R., Hochstrasser, D. (1999) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Methods Mol Biol.* **112**, 531-52.
100. Buchan, D. W. A., Minneci, F., Nugent, T. C. O., Bryson, K., and Jones, D. T. (2013)

- Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res.* **41**, W349-57.
101. Slabinski, L., Jaroszewski, L., Rychlewski, L., Wilson, I. A., Lesley, S. A., and Godzik, A. (2007) XtalPred: A web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics.* **23**, 3403–3405.
 102. Dessau, M. A., and Modis, Y. (2011) Protein crystallization for X-ray crystallography. *J. Vis. Exp.* **9**, 1- 6.
 103. Smatanová, I. K. (2002) Crystallization of biological macromolecules. *Mater. Struct.* **9**, 14–15.
 104. Tung, M., and Gallagher, D. T. (2009) The Biomolecular Crystallization Database Version 4: Expanded content and new features. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **65**, 18–23.
 105. Marchand, M., Viola, J., Tetreault, S., Houde, C., and Biotechnologies, N. (2005) How a new chemical compatibility test facilitates protein crystallization. *Acta Cryst.* **61**, c446.
 106. Chayen, N., Saridakis, E., (2008) Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nat. Methods.* **5**, 147 - 153.
 107. Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R., and Leslie, A. G. W. (2011) iMOSFLM: A new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 271–281.
 108. Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132.
 109. Evans, P. R., and Murshudov, G. N. (2013) How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **69**, 1204–1214.
 110. Brünger, a T. (1993) Assessment of phase accuracy by cross validation: the free R value. Methods and applications. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **49**, 24–36.
 111. French, S., and Wilson, K. (1978) On the treatment of negative intensity observations. *Acta Crystallogr. Sect. A.* **34**, 517–525.
 112. Fernández-Seara, J., Uhía, F. J., Sieres, J., and Campo, A. (2007) A general review of the Wilson plot method and its modifications to determine convection coefficients in heat exchange devices. *Appl. Therm. Eng.* **27**, 2745–2757.
 113. Millán, C., Sammito, M., and Usón, I. (2015) Macromolecular ab initio phasing enforcing secondary and tertiary structure. *IUCrj.* **2**, 95–105.
 114. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and

- Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674.
115. Thorn, A., and Sheldrick, G. M. (2013) Extending molecular-replacement solutions with SHELXE. in *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, pp. 2251–2256, **69**, 2251–2256.
116. Smart, O. S., Womack, T. O., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Sharff, A., Vonrhein, C., and Bricogne, G. (2012) Exploiting structure similarity in refinement: Automated NCS and target-structure restraints in BUSTER. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **68**, 368–380.
117. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132.
118. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501.
119. Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2010) MolProbity: All-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21.
120. Holm, L., Kääriäinen, S., Wilton, C., and Plewczynski, D. (2006) Using Dali for structural comparison of proteins. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. Chapter **5**, Unit 5.5.
121. Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797.
122. Rother, K. (2005) Introduction to PyMOL. *Methods Mol. Biol. Clift. Nj.* **635**, 0–32.
123. Seeliger D., De Groot B. L., (2010) Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **24**, 417–422.
124. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. (2004) UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J Comput Chem.* **25**, 1605–1612.
125. Blow, N. (2009) Proteins and proteomics: life on the surface. *Nat. Methods.* **6**, 389–393.
126. Homola, J., Yee, S. S., and Gauglitz, G. (1999) Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors Actuators B Chem.* **54**, 3–15.
127. McDonnell, J. M. (2001) Surface plasmon resonance: Towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **5**, 572–

- 577.
128. Rich, R. L., and Myszka, D. G. (2008) Survey of the year 2007 commercial optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* **21**, 355–400.
 129. Constantinides, P. P., and Steim, J. M. (1985) Physical properties of fatty acyl-CoA. Critical micelle concentrations and micellar size and shape. *J. Biol. Chem.* **260**, 7573–7580.
 130. Süel, G. M., Lockless, S. W., Wall, M. a, and Ranganathan, R. (2003) Evolutionarily conserved networks of residues mediate allosteric communication in proteins. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 59–69.
 131. Beckett, D. (2009) Regulating transcription regulators via allostery and flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 22035–6.
 132. Hinrichs, W., Kisker, C., Düvel, M., Müller, A., Hillen, W., Saenger, W., Hinrichs, W., Kisker, C., Duvel, M., Muller, A., Tovar, K., and Hillen, W. (1994) Structure of the Tet Repressor-Tetracycline Complex and Regulation of Antibiotic Resistance. *Science (80-)*. **264**, 418–420.
 133. Reichheld, S. E., Yu, Z., and Davidson, A. R. (2009) The induction of folding cooperativity by ligand binding drives the allosteric response of tetracycline repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 22263–22268.
 134. Bhukya, H., Bhujbalrao, R., Bitra, A., and Anand, R. (2014) Structural and functional basis of transcriptional regulation by TetR family protein CprB from *S. coelicolor*A3(2). *Nucleic Acids Res.* **42**, 10122–10133.
 135. Engohang-Ndong, J., Baillat, D., Aumercier, M., Bellefontaine, F., Besra, G. S., Locht, C., and Baulard, A. R. (2004) EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator. *Mol. Microbiol.* **51**, 175–188.
 136. Nickel, J., Irzik, K., Van Ooyen, J., and Eggeling, L. (2010) The TetR-type transcriptional regulator FasR of *Corynebacterium glutamicum* controls genes of lipid synthesis during growth on acetate. *Mol. Microbiol.* **78**, 253–265.
 137. Kumarevel, T. (2012) *The MarR Family of Transcriptional Regulators–A Structural Perspective, En: Antibiotic Resistant Bacteria (Pana, M.) InTech, Croacia. pp 403-576.*
 138. Wilkinson, S. P., and Grove, A. (2006) Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Curr. Issues Mol. Biol.* **8**,

51–62.

139. Browning, D. F., and Busby, S. J. W. (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 57–65.
140. Cuthbertson, L., and Nodwell, J. R. (2013) The TetR Family of Regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**, 440–475.
141. Grkovic, S., Brown, M. H., Roberts, N. J., Paulsen, I. T., and Skurray, R. A. (1998) QacR Is a Repressor Protein That Regulates Expression of the *Staphylococcus aureus* Multidrug Efflux Pump QacA. *J. Biol. Chem.* **273**, 18665–18673.
142. Grkovic, S., Brown, M. H., Schumacher, M. A., Brennan, R. G., and Skurray, R. A. (2001) The staphylococcal QacR multidrug regulator binds a correctly spaced operator as a pair of dimers. *J. Bacteriol.* **183**, 7102–7109.
143. Yee, A. A., Savchenko, A., Ignachenko, A., Lukin, J., Xu, X., Skarina, T., Evdokimova, E., Liu, C. S., Semesi, A., Guido, V., Edwards, A. M., and Arrowsmith, C. H. (2005) NMR and X-ray crystallography, complementary tools in structural proteomics of small proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 16512–16517.
144. Cheng, Y. (2015) Single-Particle Cryo-EM at Crystallographic Resolution. *Cell.* **161**, 450–457.
145. Ornes, S. (2016) Let the structural symphony begin. *Nature.* **536**, 361–363.
146. Callaway, E. (2015) The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology. *Nat. News.* **525**, 172.
147. Binshtein, E., and Ohi, M. D. (2015) Cryo-electron microscopy and the amazing race to atomic resolution. *Biochemistry.* **54**, 3133–3141.
148. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242.
149. Freegarde, T. (2012) Fraunhofer diffraction. En: *Introduction to the Physics of Waves* (Cambridge University Press) Cambridge, Inglaterra, pp. 106–124..
150. Smyth, M., Martin., (2000) X-Ray Crystallography, *Mol. Pathol.* **53**, 8–14.
151. Ramos, J. L., Martínez-bueno, M., Antonio, J., Terán, W., Watanabe, K., Gallegos, M. T., Brennan, R., Martí, M., Molina-henares, A. J., and Tera, W. (2005) The TetR Family of Transcriptional Repressors The TetR Family of Transcriptional Repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 326–356.
152. McMurry, L., Petrucci, R. E., and Levy, S. B. (1980) Active efflux of tetracycline

- encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 3974–7.
153. Hinrichs, W., Kisker, C., Düvel, M., Müller, a, Tovar, K., Hillen, W., and Saenger, W. (1994) Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science*. **264**, 418–420.
 154. Alatoon, A. a, Aburto, R., Hamood, A. N., and Colmer-Hamood, J. a (2007) VceR negatively regulates the vceCAB MDR efflux operon and positively regulates its own synthesis in *Vibrio cholerae* 569B. *Can. J. Microbiol.* **53**, 888–900.
 155. Chou, T. H., Delmar, J. A., Wright, C. C., Kumar, N., Radhakrishnan, A., Doh, J. K., Licon, M. H., Bolla, J. R., Lei, H. T., Rajashankar, K. R., Su, C. C., Purdy, G. E., and Yu, E. W. (2015) Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional regulator Rv0302. *Protein Sci.* **24**, 1942–1955.
 156. Hirano, S., Tanaka, K., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2008) Conditionally positive effect of the TetR-family transcriptional regulator AtrA on streptomycin production by *Streptomyces griseus*. *Microbiology*. **154**, 905–914.
 157. Palanca, C., and Rubio, V. (2016) Structure of AmtR, the global nitrogen regulator of *Corynebacterium glutamicum*, in free and DNA-bound forms. *FEBS J.* **283**, 1039–1059.
 158. Goeke, D., Kaspar, D., Stoeckle, C., Grubm??ller, S., Berens, C., Klotzsche, M., and Hillen, W. (2012) Short peptides act as inducers, anti-inducers and corepressors of tet repressor. *J. Mol. Biol.* **416**, 33–45.
 159. Liu, L., Huang, C., and He, Z. G. (2014) A TetR family transcriptional factor directly regulates the expression of a 3-methyladenine DNA glycosylase and physically interacts with the enzyme to stimulate its base excision activity in *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Biol. Chem.* **289**, 9065–9075.
 160. Finn, R. D., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Bateman, A., Bork, P., Bridge, A. J., Chang, H.-Y., Dosztányi, Z., El-Gebali, S., Fraser, M., Gough, J., Haft, D., Holliday, G. L., Huang, H., Huang, X., Letunic, I., Lopez, R., Lu, S., Marchler-Bauer, A., Mi, H., Mistry, J., Natale, D. A., Necci, M., Nuka, G., Orengo, C. A., Park, Y., Pesseat, S., Piovesan, D., Potter, S. C., Rawlings, N. D., Redaschi, N., Richardson, L., Rivoire, C., Sangrador-Vegas, A., Sigrist, C., Sillitoe, I., Smithers, B., Squizzato, S., Sutton, G., Thanki, N., Thomas, P. D., Tosatto, S. C. E., Wu, C. H., Xenarios, I., Yeh, L.-S., Young, S.-Y., and Mitchell, A. L. (2016) InterPro in 2017-beyond protein family and domain

- annotations. *Nucleic Acids Res.* **45**, 190–199.
161. Balhana, Singla, A., Sikder, M. H., Withers, M., and Kendall, S. L. (2015) Global analyses of TetR family transcriptional regulators in mycobacteria indicates conservation across species and diversity in regulated functions. *BMC Genomics.* **16**, 479.
162. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402.
163. Guruprasad, K., Reddy, B. V. B., and Pandit, M. W. (1990) Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting *in vivo* stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng. Des. Sel.* **4**, 155–161.
164. Carson, M., Johnson, D. H., McDonald, H., Brouillette, C., and DeLucas, L. J. (2007) His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **63**, 295–301.
165. Jahandideh, S., Jaroszewski, L., and Godzik, A. (2014) Improving the chances of successful protein structure determination with a random forest classifier. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **70**, 627–635.
166. Kurgan, L. (2009) Sequence-Based Protein Crystallization Propensity Prediction for Structural Genomics: Review and Comparative Analysis. *Nat. Sci.* **1**, 93–106.
167. Radivojac, P., Obradovic, Z., Smith, D. K., Zhu, G., Vucetic, S., Brown, C. J., Lawson, J. D., and Dunker, a K. (2004) Protein flexibility and intrinsic disorder. *Protein Sci.* **13**, 71–80.
168. Vonrhein, C., Flensburg, C., Keller, P., Sharff, A., Smart, O., Paciorek, W., Womack, T., and Bricogne, G. (2011) Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **67**, 293–302.
169. Nonaka, T. (1994) The CCP4 Suite-Computer Programs for Protein Crystallography. *Nihon Kessho Gakkaishi.* **36**, 224–227.
170. Sammito, M., Meindl, K., de Ilarduya, I. M., Millán, C., Artola-Recolons, C., Hermoso, J. A., and Usón, I. (2014) Structure solution with ARCIMBOLDO using fragments derived from distant homology models. *FEBS J.* **281**, 4029–4045.
171. Vagin, A., and Teplyakov, A. (2010) Molecular replacement with MOLREP. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **66**, 22–25.
172. Keegan, R. M., and Winn, M. D. (2007) MrBUMP: An automated pipeline for

- molecular replacement. in *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, pp. 119–124, **64**, 119–124.
173. Marrakchi, H., Lanéelle, M. A., and Daffé, M. (2014) Mycolic acids: Structures, biosynthesis, and beyond. *Chem. Biol.* **21**, 67–85.
174. Miller, D. J., Zhang, Y.-M., Subramanian, C., Rock, C. O., and White, S. W. (2011) Structural Basis for the Transcriptional Regulation of Membrane Lipid Homeostasis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 971–975.
175. Panca, R., and Tompa, P. (2016) Essential functions linked with structural disorder in organisms of minimal genome. *Biol. Direct.* **11**, 45.
176. Jordan, S. R., Whitcombe, T. V., Berg, J. M., and Pabo, C. O. (1985) Systematic variation in DNA length yields highly ordered repressor-operator cocrystals. *Science.* **230**, 1383–5.
177. Chung, Y. S., and Guarné, A. (2012) Iterative optimization of DNA duplexes for crystallization of SeqA-DNA complexes. *J. Vis. Exp.* **69**, e4266.
178. Nguyen Le Minh, P., de Cima, S., Bervoets, I., Maes, D., Rubio, V., and Charlier, D. (2015) Ligand binding specificity of RutR, a member of the TetR family of transcription regulators in *Escherichia coli*. *FEBS Open Bio.* **5**, 76–84.
179. Yu, Z., Reichheld, S. E., Savchenko, A., Parkinson, J., and Davidson, A. R. (2010) A comprehensive analysis of structural and sequence conservation in the TetR family transcriptional regulators. *J. Mol. Biol.* **400**, 847–864.