



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

---

Tesis de Doctorado

**“Regulación de la síntesis de ácidos grasos en  
micobacterias”**

Presentada por Lic. Sonia S. Mondino

Rosario, Argentina  
2014

---

# Regulación de la síntesis de ácidos grasos en micobacterias

Sonia Soledad Mondino

Licenciada en Biotecnología- Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Fisiología y Genética de Actinomycetes del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), dependiente de CONICET y de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2009 y el 3 de febrero de 2014, bajo la dirección de la Dra. Gabriela Gago y la codirección del Dr. Hugo Gramajo.

Directora Dra. Gabriela Gago .....

Codirector Dr. Hugo Gramajo .....

Dra. Fabiana Bigi .....

Dr. Diego José Comerci .....

Dr. Diego de Mendoza .....

Defendida .....

---

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

#### Publicaciones

1- Mondino, S., Gago, G. and Gramajo, H. (2013) Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in mycobacteria. *Mol Microbiol* 89, 372-387.

2- 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.

#### Presentación a Congresos Internacionales

1- **Tuberculosis 2012: Biology, Pathogenesis, Intervention strategies, 2012.** Mondino, Sonia; Gramajo, Hugo y Gago, Gabriela. "Transcriptional regulation of lipid biosynthesis in mycobacteria".

2- **Gordon Research Conferences: Tuberculosis Drug Development, 2011.** Mondino, Sonia; Salzman, Valentina; Gago, Gabriela y Gramajo, Hugo. "Regulatory network of lipid biosynthesis in mycobacteria: possible new targets for drug discovery".

3- **Mycobacteria: Physiology, Metabolism and Pathogenesis- Back to the Basics, como parte de Keystone Symposia Global Health Series, 2011.** Salzman, Valentina; Mondino, Sonia; Gago, Gabriela y Gramajo, Hugo. "Dissecting the regulatory network of lipid homeostasis in mycobacteria".

#### Presentación a Congresos Nacionales

1- **IX Reunión de la Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE), 2013.** Mondino, Sonia; Gramajo, Hugo y Gago, Gabriela. "Dissecting the transcriptional regulation of *fas-*acpS** operon in mycobacteria".

2- **XLVIII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB), 2012.** Mondino, Sonia; Gramajo, Hugo y Gago, Gabriela. "FasR, a novel positive regulator of the *fas* gene of mycobacteria".

---

**3- XLVII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB), 2011.** Mondino, Sonia; Gramajo, Hugo y Gago, Gabriela. “FasR, a novel transcriptional activator of the *fas* gene of *Mycobacterium tuberculosis*”.

**4- XLVI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB), 2010.** Mondino, Sonia; Salzman, Valentina; Gramajo, Hugo y Gago, Gabriela. “Regulation of fatty acid biosynthesis in mycobacteria”.

**5- IV Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras micobacteriosis (SLAMTB), 2009.** Salzman, Valentina; Mondino, Sonia; Gago, Gabriela y Gramajo, Hugo. “Characterization of a transcriptional regulator of mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium*”.

**6- XLV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB), 2009.** Salzman, Valentina; Mondino, Sonia; Gago, Gabriela y Gramajo, Hugo. “MabR, a novel transcriptional regulator of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria”.

**7- XLIV Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB), 2008.** Salzman, Valentina; Mondino, Sonia; Gago, Gabriela y Gramajo, Hugo. “Characterization of a transcriptional regulator of mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium*”.

**8- XLIII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigaciones Bioquímicas (SAIB), 2007.** Salzman, Valentina; Mondino, Sonia; Gago, Gabriela y Gramajo, Hugo. “Regulation of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria”.

## Agradecimientos

Y aquí está, el momento en donde los abrazo fuerte a ustedes, y al universo:

Gracias a la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, al IBR y a CONICET, por la oportunidad de formarme profesionalmente y de trabajar en sus establecimientos.

Gracias al NIH, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, y a la Fundación Bunge y Born por el financiamiento del presente trabajo de tesis doctoral.

Gracias a la Fundación Josefina Prats por el reconocimiento otorgado, siendo estudiante de grado y de posgrado.

Gracias a EMBO por la beca otorgada (EMBO-STF) para visitar el laboratorio del Dr. Stewart Cole en Lausanne (Suiza) durante tres meses.

Gracias al Dr. Stewart Cole y a la Dra. Claudia Sala por su colaboración, y por la oportunidad de aprender y trabajar en su laboratorio durante tres meses.

Gracias a la Dra. Gabriela Gago; directora, maestra y guía. Porque desde el primer día estuvo a mi lado, marcando a paso firme el camino a seguir, y poniendo un gran voto de confianza que valoro desde el corazón. Gracias al Dr. Hugo Gramajo; director y tutor. Por el apoyo, el impulso, los espacios de debate y la enseñanza. Gracias a ambos, por los brindis que acompañaron éxitos, y los empujes que remontaron tropiezos. Gracias del corazón.

Gracias a mis viejos; pilares fundamentales, referentes y maestros, hoy y siempre. Por todo; la fuerza, el empuje, el amor, el ejemplo, las palabras, los abrazos, la compañía, la enseñanza y la vida. Los amo desde el alma.

Gracias a ustedes, amigos y confidentes entre experimentos; dadores de abrazos y cebadores expertos de mates con debate; a aquellos que se fueron del laboratorio y los que vinieron, a los que descubren y los que enseñan. Gracias a todos ustedes, locos lindos que bailan conmigo cada día; su compañía es un regalo del cielo.

Gracias a ellas, viajeras del mundo, maestras de la vida, confidentes del espíritu, sabias almas que el universo me regala cada día desde aquellos primeros días

de facultad. Gracias mujeres, porque ustedes son uno de los mejores regalos que la vida me ha podido dar. Gracias infinitas, y más allá.

Gracias a mi familia; cada uno de ustedes es ejemplo de vida. Gracias por ser, estar, pertenecer y latir conmigo. Me siento orgullosa de ser parte de ésta, nuestra historia.

Y por último, gracias a todos aquellos amigos/confidentes/conocidos. A aquellos que cultivo desde los primeros años de secundaria, a los que se han perdido, a aquellos que van y vienen, a aquellos que perduran, a aquellos que están sin estar. Todos ustedes han dejado conmigo momentos que el tiempo no puede borrar; y que seguramente me robarán una sonrisa, algún día, a mitad de camino, mientras observe con la mirada perdida algo, evocándolos sin buscar. Gracias.

**ÍNDICE**

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>VI</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
1.1 TUBERCULOSIS	4
1.2 EL GÉNERO <i>MYCOBACTERIUM</i>	8
1.2.1 <i>M. SMEGMATIS</i> COMO MODELO DE ESTUDIO	9
1.3 ENVOLTURA CELULAR DE LAS MICOBACTERIAS	10
1.3.1 MEMBRANA PLASMÁTICA	12
1.3.2 PARED CELULAR	12
1.3.3 LÍPIDOS LIBRES	13
1.4 BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN BACTERIAS	14
1.5 ASPECTOS GENERALES DE LA BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS Y ÁCIDOS MICÓLICOS EN LAS MICOBACTERIAS	17
1.5.1 CARACTERÍSTICAS DE LOS SISTEMAS FAS-I Y FAS-II MICOBACTERIANOS	17
1.5.2 BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS Y ÁCIDOS MICÓLICOS EN MICOBACTERIAS	18
1.6 ANTECEDENTES SOBRE LA REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN BACTERIAS	25
1.6.1 ANTECEDENTES SOBRE LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS Y MICÓLICOS EN LAS MICOBACTERIAS	32
1.6.1.1 Antecedentes sobre el control bioquímico de la síntesis de lípidos en micobacterias	32
1.6.1.2 Regulación transcripcional de los genes de la biosíntesis de ácidos micólicos	34
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>39</b>
2.1 CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS	39
2.2 MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO BACTERIANO	43
2.3 TRANSFORMACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS	44
2.3.1 TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i>	44
2.3.2 TRANSFORMACIÓN DE <i>M. SMEGMATIS</i>	45

2.3.3 TRANSFORMACIÓN DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	45
<b>2.4 MANIPULACIÓN DE ADN Y CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS</b>	<b>46</b>
2.4.1 TRATAMIENTO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN	46
2.4.2 ELECTROFORESIS DE ADN EN GELES DE AGAROSA	46
2.4.3 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA	46
2.4.4 SECUENCIACIÓN DE NUCLEÓTIDOS Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS	47
2.4.5 EXTRACCIÓN DE ADN	47
2.4.5.1 Extracción de ADN genómico de <i>M. smegmatis</i>	47
2.4.5.2 Extracción de ADN genómico de <i>M. tuberculosis</i>	47
2.4.5.3 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	48
2.4.6 CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS	48
2.4.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	53
2.4.8 ENSAYOS DE RETARDO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL (EMSA)	53
2.4.8.1 EMSA con extractos proteicos libres de células	53
2.4.8.2 EMSA con la proteína purificada His <sub>6</sub> -FasR <sub>MT</sub>	54
2.4.9 ENSAYO DE PROTECCIÓN A LA DNASA I	55
2.4.10 TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANAS DE NYLON E HIBRIDIZACIÓN CON SONDAS MARCADAS (SOUTHERN BLOT)	56
2.4.10.1 Southern blot de la cepa mutante condicional MS $\Delta$ fasR pFR5	56
2.4.10.2 Southern blot de la cepa mutante condicional <i>Mtb</i> $\Delta$ fasR pFR33	57
<b>2.5 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS</b>	<b>57</b>
2.5.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE FASR	57
2.5.2 EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE FASR <sub>MT</sub>	58
2.5.3 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE FASR <sub>MT</sub>	59
2.5.4 DOSAJE DE PROTEÍNAS Y SDS-PAGE	59
2.5.4.1. Análisis en <i>M. smegmatis</i>	59
2.5.4.2. Análisis en <i>M. tuberculosis</i>	60
2.5.5 TRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT)	61
2.5.5.1 Inmunización con FasR y obtención de suero	61
2.5.5.2 Western blot con extractos proteicos de <i>M. smegmatis</i>	61
2.5.5.3 Western blot con extractos proteicos de <i>M. tuberculosis</i>	62
2.5.6 ENSAYOS DE $\beta$ -GALACTOSIDASA	63



<b>2.6 MANIPULACIÓN DE ARN</b>	<b>65</b>
2.6.1 EXTRACCIÓN DE ARN DE <i>MYCOBACTERIUM</i>	65
2.6.2 RETROTRANSCRIPCIÓN Y AMPLIFICACIÓN POR PCR (RT-PCR)	65
2.6.3 DETERMINACIÓN DEL SITIO DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN	65
2.6.4 PCR EN TIEMPO REAL (QRT-PCR)	66
<b>2.7 ANÁLISIS DE LÍPIDOS</b>	<b>67</b>
2.7.1 ANÁLISIS DE LÍPIDOS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA (TLC)	67
<b>2.8 ANÁLISIS DE LA BIOSÍNTESIS DE MACROMOLÉCULAS</b>	<b>68</b>
<b>2.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>68</b>
<b><u>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b>	<b><u>69</u></b>
<b>3.1 CAPÍTULO 1</b>	
<b>IDENTIFICACIÓN DE FASR, UNA PROTEÍNA REGULADORA DEL OPERÓN <i>FAS-ACPS</i></b>	<b>69</b>
3.1.1 OBJETIVOS	70
3.1.1.1 Objetivo general	70
3.1.1.2 Objetivos particulares	70
3.1.2 RESULTADOS	71
3.1.2.1 Caracterización de la región promotora del gen <i>fas</i> en <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. smegmatis</i>	71
3.1.2.2 Identificación de un factor de transcripción de la familia TetR que se une a la región promotora del operón <i>fas-ACP</i> S en <i>Mycobacterium</i>	72
3.1.2.3 Expresión y purificación de FasR, un regulador transcripcional de la familia TetR que se une específicamente a la región promotora del operón <i>fas-ACP</i> S	75
3.1.2.4 Determinación del estado oligomérico de FasR en solución	78
3.1.2.5 Identificación de los sitios de unión de FasR <sub>MT</sub> en la región promotora del operón <i>fas-ACP</i> S de <i>M. tuberculosis</i>	78
3.1.2.6 FasR reconoce y se une a una secuencia palindrómica conservada en micobacterias	79
3.1.2.7 FasR es un regulador altamente conservado en actinomicetales productores de ácidos micólicos	83
3.1.3 DISCUSIÓN	85
<b>3.2 CAPÍTULO 2</b>	

<b>FASR ES UN ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL DEL OPERÓN <i>FAS-ACP</i>S MODULADO POR ACIL-CoAs DE CADENA LARGA</b>	<b>88</b>
3.2.1 OBJETIVOS	89
3.2.1.1 Objetivo general	89
3.2.1.2 Objetivos particulares	89
3.2.2 RESULTADOS	90
3.2.2.1 Construcción de cepas en <i>M. smegmatis</i> para el análisis de fusiones transcripcionales de <i>Pfas<sub>MT</sub></i> al gen de la $\beta$ -galactosidasa ( <i>lacZ</i> ) de <i>E. coli</i>	90
3.2.2.2 <i>FasR<sub>MT</sub></i> es un activador del operón <i>fas-ACP</i> S	91
3.2.2.3 Las cajas de reconocimiento de <i>FasR<sub>MT</sub></i> son esenciales para la función del regulador	92
3.2.2.4 Búsqueda de la molécula efectora de <i>FasR<sub>MT</sub></i>	93
3.2.2.5 Los acil-CoAs de cadena larga modulan la unión de <i>FasR<sub>MT</sub></i> a la región promotora del operón <i>fas-ACP</i> S	96
3.2.3 DISCUSIÓN	99
<b>3.3 CAPÍTULO 3</b>	
<b>ESTUDIO DEL ROL FISIOLÓGICO DE FASR EN <i>M. SMEGMATIS</i></b>	<b>102</b>
3.3.1 OBJETIVOS	103
3.3.1.1 Objetivo general	103
3.3.1.2 Objetivos particulares	103
3.3.2 RESULTADOS	104
3.3.2.1 Construcción de una cepa de <i>M. smegmatis</i> mutante en <i>fasR</i> , utilizando el plásmido termosensible pPR27	104
3.3.2.2 Construcción de una cepa de <i>M. smegmatis</i> mutante condicional en <i>fasR</i> , utilizando el sistema TetR/Pip OFF	107
3.3.2.3 Caracterización de la cepa MSPptr: <i>fasR<sub>MS</sub></i>	111
3.3.2.4 <i>FasR</i> es un activador del operón <i>fas-ACP</i> S <i>in vivo</i>	113
3.3.2.5 Influencia de los niveles de expresión de <i>fasR</i> sobre la expresión del operón <i>fasII in vivo</i>	116
3.3.2.6 Construcción de una cepa de <i>M. smegmatis</i> mutante condicional en el operón <i>fas-ACP</i> S, utilizando el sistema TetR/Pip OFF	118
3.3.2.7 Caracterización de la cepa MSPptr: <i>fas<sub>MS</sub></i>	118

3.3.3 DISCUSIÓN	124
<b>3.4 CAPÍTULO 4</b>	
<b>DETERMINACIÓN DE LA ESENCIALIDAD DE <i>FASR</i> EN <i>M. TUBERCULOSIS</i></b>	<b>128</b>
3.4.1 OBJETIVOS	129
3.4.1.1 Objetivo general	129
3.4.1.2 Objetivos particulares	129
3.4.2 RESULTADOS	131
3.4.2.1 Expresión de FasR en <i>M. tuberculosis</i> en cultivos <i>in vitro</i>	131
3.4.2.2 Construcción de una cepa de <i>M. tuberculosis</i> mutante condicional en <i>fasR</i> utilizando el sistema TetR/Pip OFF	131
3.4.2.3 Caracterización de la cepa <i>Mtb</i> $\Delta$ <i>fasR</i> pFR33	135
3.4.3 DISCUSIÓN	137
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>140</b>
<b>5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>142</b>

**Abreviaturas**

ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACP	Proteína transportadora de acilos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AG	Arabinogalactano
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
Am	Apramicina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNt	ARN de transferencia
ATc	Anhidrotetraciclina
ATP	trifosfato de adenosina
BCIP	sal de toluidina 5-bromo-4-cloro-3'-indol fosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
ChIP-seq	Inmunoprecipitación de la cromatina seguida de secuenciación
CoA	Coenzima A
DAT	Diacil-trehalosas
DNasal	Desoxirribonucleasa I
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMB	Etambutol
ETH	Etionamida
FAMEs	Metilésteres de ácidos grasos
FAS	Ácido graso sintasa
G+C	Guanina y Citosina

Gm	Gentamicina
GPL	Glicopeptidolípidos
Hyg	Higromicina
INH	Isoniacida
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
Km	Kanamicina
LAM	Lipoarabinomanano
LM	Lipomanano
LOS	Lipooligosacáridos
mAGP	Complejo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano
MAMEs	Metilésteres de ácidos micólicos
MDR-TB	Tuberculosis multiresistente
NBT	Cloruro de nitroblue tetrazolium
ONPG	<i>orto-nitrofenil-<math>\beta</math>-D-galactopiranosido</i>
PAT	Pentacil-trehalosas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDIM	Tiocerol dimicocerosato
PG	Peptidoglicano
PGL	Glicolípidos fenólicos
PIMs	Fosfatidilinositolmanósidos
Pip	Pristinamicina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPD	Derivado de proteína purificada
PZN	Pirazinamida
qRT-PCR	PCR en tiempo real
RACE	amplificación rápida de los extremos de ADNc
RIF	Rifampicina
RT	Reacción de retrotranscripción
SDS	Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SL	Sulfolípidos
Sm	Estreptomina
Sp	Espectinomicina
STPK	Serina/treonina proteína quinasa
TAGs	Triacilglicéridos
TB	Tuberculosis
TDM	Trehalosa dimicolato
TLC	Cromatografía en capa delgada
TLM	Tiolactomicina
TMM	Trehalosa monomicolato
TRC	Triclosan
Tris	N-tris-(hidroximetil) aminometano
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
TST	Prueba cutánea de la tuberculina
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
XDR-TB	Tuberculosis extremadamente resistente

## Resumen

Entre las enfermedades infecciosas, la tuberculosis (TB) continúa siendo una de las principales causas de muerte entre los adultos. Algunos años atrás se pensó que esta enfermedad estaba controlada y que sería erradicada a mediano plazo. Sin embargo, hoy en día la TB está restablecida debido a diversos factores, entre ellas la aparición del SIDA.

*Mycobacterium tuberculosis*, el agente etiológico de la tuberculosis, presenta una pared celular inusual, característica de todas las micobacterias. Esta envoltura celular resulta esencial para la viabilidad y supervivencia de las mismas en ambientes hostiles y consiste de una capa altamente impermeable de ácidos micólicos de 70-90 átomos de carbono unidos covalentemente al peptidoglicano (PG) a través de un polisacárido conector, el arabinogalactano (AG). Los ácidos micólicos son los componentes mayoritarios de la envoltura celular de las micobacterias y juegan un rol crucial en su compleja arquitectura y en su impermeabilidad. La biosíntesis de los ácidos micólicos requiere de dos tipos de sintetasas de ácidos grasos (FAS): la enzima multifuncional FAS-I, similar a la presente en eucariotas, y el sistema dependiente de la proteína transportadora de acilos (ACP), FAS-II, el cual consiste de una serie de enzimas donde cada una cataliza un paso en la vía de elongación de acil-CoAs de cadena mediana C<sub>12</sub>-C<sub>16</sub>, previamente sintetizados por FAS-I. Los componentes genéticos del sistema FAS-II han sido identificados en *M. tuberculosis* y se encuentran agrupados en tres unidades transcripcionales principales: *fabD-acpM-kasA-kasB-accD6* (operón *fasII*), *mabA-inhA* y *hadA-hadB-hadC*. Análisis de microarreglos demostraron que el tratamiento de *M. tuberculosis* con diversos antibióticos que afectan la síntesis de ácidos micólicos, como isoniacida (INH), etionamida (ETH) o tiolactomicina (TLM), inducen la transcripción de los genes de operón *fasII*. A su vez *fas*, el gen que codifica para la enzima multifuncional FAS-I, también se induce tras el tratamiento de *M. tuberculosis* con INH, sugiriendo la existencia de señales regulatorias comunes a los dos sistemas FAS. Esta información junto al concepto general sobre la existencia de sistemas reguladores que controlan la homeostasis lipídica en la mayoría de los organismos, llevó a que nuestro grupo de investigación se propusiera estudiar quién y cómo se regulan a nivel transcripcional los sistemas de síntesis de ácidos grasos en

micobacterias. Es así que fuimos capaces de identificar y caracterizar una proteína reguladora del operón *fasII*, a quien llamamos MabR (por sus siglas en inglés, Mycolic acid biosynthesis Regulator). Los resultados de esta investigación representaron la primera caracterización de un regulador clave para el metabolismo de ácidos grasos en *M. tuberculosis* y sentaron las bases para el desarrollo del trabajo de tesis aquí presentado.

Los estudios de microarreglos y proteómica antes detallados, junto con la evidencia de que la transcripción del gen *fas* se veía afectada cuando alterábamos los niveles fisiológicos de MabR, sugirieron la existencia de un mecanismo de regulación coordinado entre los dos sistemas FAS mediado por MabR. La identificación de una repetición invertida en la secuencia promotora del gen *fas*, similar a la reconocida por MabR en la región promotora del operón *fasII*, nos llevó a pensar que MabR podría estar regulando de manera directa la transcripción del mismo. Sin embargo, la incapacidad de evidenciar esta interacción *in vitro* nos condujo a la búsqueda de un nuevo regulador transcripcional del sistema FAS-I. Para alcanzar los objetivos propuestos, en el presente trabajo de tesis se caracterizó la región promotora del gen *fas* de *M. tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis*, comprobando que este gen forma parte de un operón al que denominamos operón *fas-ACP*S. Se identificó y purificó una proteína reguladora de dicho operón, denominada FasR (por sus siglas en inglés, Fatty acid synthase Regulator), la cual fue caracterizada mediante diversos análisis bioquímicos y genéticos. Pudimos determinar que FasR se une a tres repeticiones de una secuencia operadora conservada, en la región promotora del operón *fas-ACP*S. Estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que FasR es un activador transcripcional esencial en *M. smegmatis*, cuya afinidad por la región promotora del operón *fas-ACP*S es modulada por acil-CoAs de cadena larga, productos del sistema FAS-I. La mayoría de los experimentos realizados en este trabajo de tesis utilizaron a *M. smegmatis* como sistema modelo, elección que responde a razones prácticas.

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



comunicación conduce a un microorganismo altamente comprometido en su viabilidad y/o capacidad infectiva.

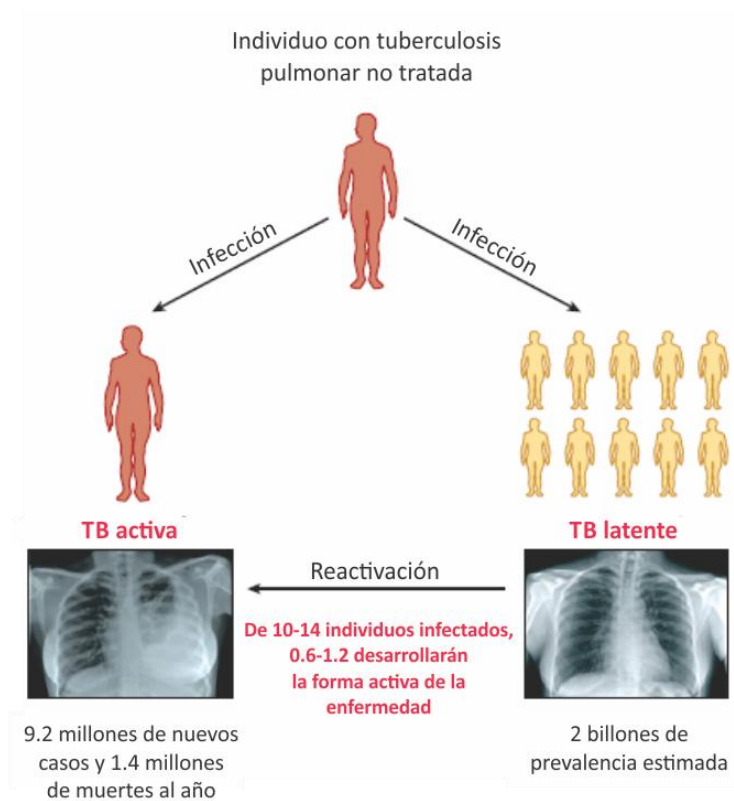
## 1. Introducción

### 1.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por especies del género *Mycobacterium*, pertenecientes a un grupo genéticamente relacionado denominado complejo *Mycobacterium tuberculosis*. 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 [1]. La TB es predominantemente una enfermedad pulmonar (tuberculosis pulmonar) representando el 70% de los casos; sin embargo *M. tuberculosis* puede diseminarse a otros órganos, incluyendo los nódulos linfáticos, huesos y meninges, provocando una enfermedad extrapulmonar (tuberculosis miliar o extrapulmonar) en 10-42% de los pacientes dependiendo de la edad, estado inmune y grupo étnico [2, 3]. 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 se piensa que 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 post-primaria (Fig. 1). Este riesgo de reactivación es mucho mayor para las personas cuyo sistema inmunitario está deprimido, como ocurre en casos de personas infectadas con el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), desnutrición, diabetes mellitus o abuso de drogas, alcohol o tabaco.

El impacto de la TB a nivel mundial sigue siendo extremadamente elevado. En 2012, 8.6 millones de personas enfermaron de TB y 1.4 millones murieron por esta enfermedad [4]. Se estima que una tercera parte de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* en forma latente [5]. La infección o exposición a esta bacteria puede demostrarse a través de la reactividad del huésped a antígenos del patógeno, mediante la prueba cutánea de la tuberculina (TST). En esta, el paciente es enfrentado intradérmicamente a un extracto de *M. tuberculosis*, actualmente

compuesto por un cóctel complejo de antígenos conocido como derivado de proteína purificada (PPD) [6]. Sin embargo, los antígenos presentes en la PPD también están en la vacuna BCG, obtenida a partir de cepas de *Mycobacterium bovis* atenuadas, y en otras micobacterias ambientales no tuberculosas, haciendo que la detección de las personas infectadas con *M. tuberculosis* esté sobre-estimada y no sea tan específica como se desea.



**Figura 1. Epidemiología de la infección por *M. tuberculosis*- TB activa y latente.** La TB resulta de la infección con el patógeno *M. tuberculosis*, el cual se contagia por transmisión aérea. La mayoría de los individuos infectados no desarrolla la forma activa de la enfermedad. Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis*, sin embargo se mantienen asintomáticos, presentando una forma latente de TB. Estudios epidemiológicos estiman que sólo el 5-10% de estos individuos desarrollarán la forma activa de la enfermedad a lo largo de su vida. Esquema obtenido de O'Garra y colaboradores [3].

El tratamiento de la TB activa involucra un régimen con cuatro drogas de primera línea: isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZN) y etambutol (EMB), alcanzándose un 90% de recuperación en los pacientes bajo tratamiento. El proceso es prolongado, abarca un mínimo de seis meses dividido en dos fases: una

fase intensiva inicial de dos meses con las cuatro drogas, necesaria para matar los bacilos en división activa, seguida por una fase de continuación de cuatro meses con INH y RIF para asegurar que los bacilos persistentes también sean eliminados. Durante la segunda mitad del siglo XX se pensó que la TB estaba controlada. Sin embargo, la aparición en 1981 del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) causado por el VIH, la intensificación de las migraciones masivas y las condiciones de pobreza en muchos países subdesarrollados (principalmente en Asia y África) fueron generando un terreno propicio para el resurgimiento de enfermedades que se creían en retroceso como la TB. Como consecuencia del incremento en el número de casos de personas infectadas, en 1993 la Organización Mundial de la Salud declara a esta enfermedad como una emergencia de la salud pública a nivel mundial. El control de la epidemia de TB se vio dificultada por la falta de una vacuna efectiva, de diagnósticos rápidos y eficaces y fundamentalmente por la emergencia de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiples drogas. La TB fármaco-resistente aparece principalmente como consecuencia del incumplimiento efectivo del tratamiento. La TB multiresistente (MDR-TB) es una forma de TB resistente a por lo menos dos de las drogas más importantes utilizadas para el tratamiento de esta enfermedad, INH y RIF [7]. En el año 2006 se han reportado casos de pacientes infectados con cepas de TB extremadamente resistente (XDR-TB), que presentaban resistencias adicionales a dos de las drogas de segunda línea más efectivas: las fluoroquinolonas y al menos una de las tres drogas inyectables de segunda línea, amikacina, kanamicina o capreomicina. En años más recientes se han detectado en distintos países, casos de TB con patrones de resistencia aún más amplios [8-10]. La aparición de estas formas resistentes de TB representa una de las amenazas más importantes para el control de esta enfermedad a nivel mundial. En la mayoría de los casos, se recomienda un tratamiento de veinte meses y requiere de la administración diaria de drogas más costosas, más tóxicas y menos efectivas que aquellas usadas para tratar las formas susceptibles de TB. A su vez, los pacientes infectados que no cumplen adecuadamente con el tratamiento, se vuelven portadores crónicos y diseminan cepas resistentes en su familia y comunidad.

En Argentina, la TB no está erradicada y continúa siendo un problema de salud pública. En 2012 se han registrado cerca de 15 000 casos de TB, de los cuales 10 000 han sido nuevos [4]. Existe aún una brecha considerable entre las diferentes

jurisdicciones del país, con elevada concentración de casos en provincias como Salta, Jujuy y Formosa. A su vez, la provincia de Buenos Aires y la Ciudad Autónoma de Buenos Aires notifican la mitad de los casos de todo el país. La pobreza, la marginalidad y el hacinamiento que experimenta gran parte de la población constituyen un obstáculo en la lucha contra esta enfermedad a nivel nacional.

La habilidad de *M. tuberculosis* de persistir bajo la forma de una infección asintomática por largos períodos de tiempo es un tema central en la biología de la enfermedad. Como consecuencia de ello, aún curando clínicamente al paciente, no se logra erradicar completamente al bacilo. En este estado, la mayoría de las bacterias están en un estado de dormancia, no replicativo y con baja actividad metabólica, y sólo una pequeña población se encuentra en división activa [11]. Entre las causas de su persistencia se encuentra la propia naturaleza del proceso infeccioso, que genera la ocupación de numerosas cavidades en el huésped con un gran número de bacilos; la resistencia fenotípica del estado dormante que representa uno de los mayores problemas para las quimioterapias y la capacidad limitada del sistema inmune de eliminar los bacilos presentes en las lesiones luego del tratamiento. Se considera que en este estado latente el uso de INH, que actúa sobre las bacterias en división activa, reduce el riesgo de reactivación mientras que la RIF colabora en la eliminación de la subpoblación en estado dormante. Esta resistencia intrínseca de *M. tuberculosis* está relacionada con la barrera de impermeabilidad que le proporciona su compleja pared celular [12]. En la actualidad se están realizando numerosos esfuerzos para desarrollar drogas que bloqueen la transición entre los distintos estados activos y dormantes, o que sean particularmente efectivos en la eliminación de esta población de bacilos de manera tal de que sirvan como antibióticos o adyuvantes que aumenten la eficacia del tratamiento. Recientemente la Organización Mundial de la Salud publicó la guía para el uso de Bedaquiline, la primera droga con un nuevo mecanismo de acción aprobada luego de 40 años y la primera en ser utilizada específicamente para el tratamiento de la MDR-TB en combinación con otras drogas [13].

La TB podría ser controlada mediante una mejor prevención de la infección, la interrupción de su progreso a enfermedad activa y la detección y aplicación del tratamiento en forma más rápida. Para acelerar el proceso se requiere de una mayor

intervención junto al desarrollo y la implementación de nuevas drogas, vacunas y herramientas de diagnóstico.

## 1.2 El género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* contiene más de 120 especies reconocidas hasta el momento, muchas de ellas descritas en los últimos años, incluyendo principalmente organismos patógenos de humanos y animales [14]. 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 [15]. Filogenéticamente, los miembros de este grupo pertenecen al dominio *Bacteria*, con alto contenido en G+C en su ADN, desde 53% para algunas especies de *Corynebacterium* hasta 70% para especies de *Nocardia*. Las micobacterias presentan un contenido de G+C cercano al 65%.

Las micobacterias son actinomicetes aerobios, ácido-alcohol resistente como consecuencia de su compleja pared celular rica en lípidos, que forman bacilos rectos o ligeramente curvos. La separación del género *Mycobacterium* en dos grupos principales en función de la velocidad de crecimiento de sus especies, constituye la base de la taxonomía micobacteriana. A pesar de no respetar exactamente esta división, la mayoría de las especies de crecimiento lento (tiempo de duplicación de ~24 h) están asociadas o son las causantes de enfermedades en humanos o animales. En consecuencia, la mayoría de las especies de crecimiento rápido (tiempo de duplicación de ~3 h), las cuales son comúnmente saprófitas de vida libre, son consideradas no patógenas. Sin embargo, este escenario no debería conducir a una subestimación de la patogenicidad de estas micobacterias, especialmente en huéspedes inmunocomprometidos como aquellos infectados con el VIH [16].

*M. tuberculosis* forma un complejo junto con otras especies, caracterizado por la alta conservación de sus genomas [17]. El complejo *M. tuberculosis* comprende varias especies: *M. tuberculosis*, el agente causal de la mayor parte de los casos de TB

humana; *M. africanum*, responsable de la TB humana en el África sub-Sahariana; *M. microti*, el agente causal de la TB en el ratón de campo; *M. bovis*, capaz de infectar una amplia variedad de especies de mamíferos incluyendo humanos; y *M. canettii*, una variante raramente encontrada pero capaz de infectar humanos [18]. Otras especies patógenas son *M. leprae*, agente causal de lepra, una enfermedad granulomatosa crónica de la piel y nervios periféricos [19] y *M. ulcerans*, que provoca la aparición de úlceras en la piel conocidas como úlceras de Buruli [20].

### 1.2.1 *M. smegmatis* como modelo de estudio

El estudio genético de *M. tuberculosis* se vió retrasado durante muchos años debido a ciertas características que dificultaban el trabajo con esta bacteria, entre ellas su crecimiento lento, el requerimiento de altos niveles de bioseguridad para su manipulación, su tendencia a formar grumos durante el crecimiento en medio líquido y la falta de sistemas eficientes para la transferencia de genes. En un principio, las funciones de determinados genes de *M. tuberculosis* se estudiaron utilizando *Escherichia coli* [21-23] y *Streptomyces lividans* [24] porque existían sistemas de clonado de ADN recombinante eficientes para estos microorganismos. Si bien estos estudios sirvieron para definir la función de algunas proteínas, el uso de hospedadores homólogos como modelo de estudio llevaría a un entendimiento más acertado de la biología de este patógeno [25].

A diferencia de *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* es una especie de crecimiento rápido, fácilmente cultivable *in vitro*, donde forma colonias visibles en un período de tres a cinco días. A pesar de haber sido inicialmente aislada de exudados de chancros luéticos en 1884, y de secreciones genitales en 1885, posteriormente no ha podido ser recuperada a partir de estas mismas muestras. Se la considera una micobacteria no patógena y dado que se ha encontrado en suelo y agua se lo considera un microorganismo ambiental. La cepa salvaje presenta una baja eficiencia de transformación con plásmidos, dificultad que fue superada con el aislamiento de una cepa mutante con alta eficiencia de transformación, denominada mc<sup>2</sup>155 [26], la cual presenta diferencias en la composición de su pared [27]. Por las características anteriormente detalladas, y la disponibilidad de su secuencia genómica, esta cepa de

*M. smegmatis* se ha convertido en un microorganismo modelo para el estudio de la función de los genes micobacterianos.

Por otro lado, *M. marinum* es un patógeno de hospedadores poiquilotermos como sapos y peces, y está muy relacionado genéticamente a *M. tuberculosis*. Es una micobacteria de crecimiento rápido, fácil de manipular en el laboratorio, ya que puede transformarse con ADN plasmídico y representa un mínimo riesgo para el laboratorista. La enfermedad que causa *M. marinum* en sus hospedadores tiene características similares a la TB, incluyendo la etapa de latencia y la formación de granulomas, lo que lo convirtió en un organismo modelo para el estudio del proceso de infección, siendo el pez cebra el hospedador más ampliamente utilizado [28, 29].

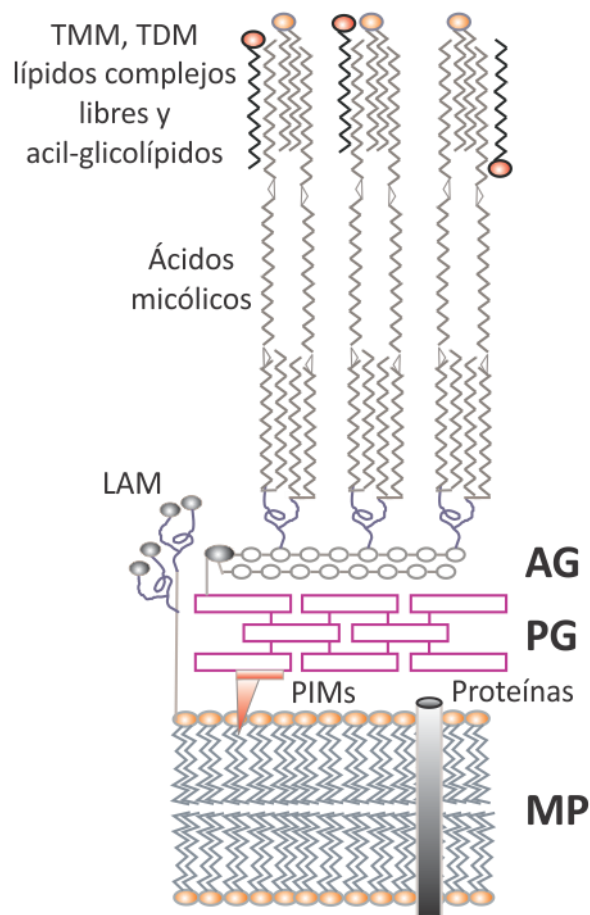
### **1.3 Envoltura celular de las micobacterias**

Las micobacterias son relativamente resistentes al desecamiento y al tratamiento con álcali y numerosos desinfectantes químicos, dificultando en consecuencia la prevención de la transmisión de *M. tuberculosis* en espacios comunes. Esta resistencia intrínseca general, y en particular a la mayoría de los antibióticos y agentes quimioterapéuticos, se debe a la presencia de una inusual envoltura celular, rica en polisacáridos y lípidos complejos [12]. La elevada impermeabilidad resulta, por un lado debido a la ineficiencia de las porinas micobacterianas de permitir la permeación de solutos hidrofílicos y su existencia en baja concentración [30] y por otro lado, al anormal grosor de la envoltura celular y su baja fluidez, lo cual repercute directamente en la permeación de compuestos hidrofóbicos. La contribución de la envoltura celular en el proceso infectivo y la persistencia de *M. tuberculosis* se refleja en la capacidad de algunos complejos lipídicos asociados a la pared de actuar en la modulación de la respuesta inmune del huésped y presentar propiedades antigénicas [31-33]. A su vez, numerosas drogas utilizadas actualmente en el tratamiento contra la TB están dirigidas a componentes esenciales de la pared celular de las micobacterias, como INH, etionamida (ETH), tiolactomicina (TLM), triclosán (TRC) y EMB, los cuales afectan la biosíntesis de ácidos micólicos y de otros componentes de la pared celular



[34-39], demostrando la importancia de esta estructura particular en la patogénesis y persistencia de *M. tuberculosis*.

El contenido lipídico de la envoltura celular de las micobacterias representa hasta un 40% de su peso seco [40], siendo responsable de su crecimiento agrumado en medio líquido y de sus propiedades de tinción ácido-alcohol resistente. En la figura 2 se observa un diagrama de la envoltura celular micobacteriana, compuesta por una membrana plasmática, similar a la presente en otras bacterias, rodeada por una compleja pared rica en carbohidratos y lípidos, la cual a su vez se encuentra rodeada por una estructura denominada cápsula, rica en polisacáridos y proteínas [40].



**Figura 2. Representación esquemática de la envoltura celular de *M. tuberculosis*.** Se muestran los ácidos micólicos unidos covalentemente a la capa de arabinogalactano, a su vez unida al peptidoglicano por una unión fosfodiéster. MP: membrana plasmática; PG: peptidoglicano; AG: arabinogalactano; PIMs: fosfatidilinositolmanósidos y LAM: lipoarabinomanano, anclados en la membrana plasmática. Otros lípidos complejos libres presentes en la pared celular son acil-glicolípidos, trehalosa monomicolato (TMM) y dimicolato (TDM)

### 1.3.1 Membrana plasmática

Los fosfolípidos de la membrana plasmática son 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 la base lípida del lipoarabinomanano (LAM) y lipomanano (LM), extensiones multiglicosiladas de los PIMs. Como consecuencia de la presencia de estos carbohidratos, la bicapa lipídica presenta una apariencia asimétrica por microscopía electrónica, sugiriendo que los PIMs se ubican preferentemente en la cara externa de la misma [12].

### 1.3.2 Pared celular

El principal componente estructural de la pared celular de las micobacterias es el complejo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP), una macromolécula compuesta por tres elementos unidos covalentemente: peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos, y que define la forma de las micobacterias [40].

El PG micobacteriano es similar al encontrado en la mayoría de las bacterias, presentando dos diferencias: algunos o todos los residuos de ácido murámico están N-glicosilados y los entrecruzamientos en las cadenas laterales peptídicas ocurren entre dos residuos de ácido diaminopimérico, así como también entre un residuo de éste y D-alanina [41]. Unido al PG, mediante una unión diglicosil-fosfato a la posición C-6 de algunos de los residuos de ácido murámico, se encuentra el AG. Éste es un heteropolisacárido complejo que consta de una cadena lineal formada por residuos de D-galactofuranosa, al cual se unen a su vez dos o tres cadenas laterales de arabinano, estas últimas compuestas por residuos de D-arabinofuranosil. En las dos terceras partes de los extremos no reductores disponibles de estas unidades de arabinano, se ubican los ácidos micólicos en grupos de cuatro [42]. Éstos son ácidos grasos  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxilados muy largos, formados por una cadena carbonada principal, conocida como ácido meromicólico, y una cadena lateral  $\alpha$ . Las micobacterias presentan los

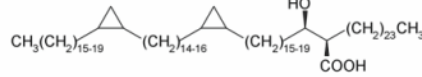
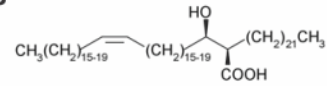
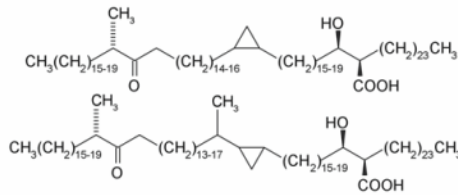
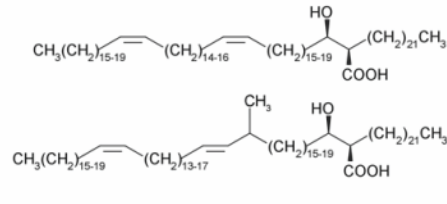
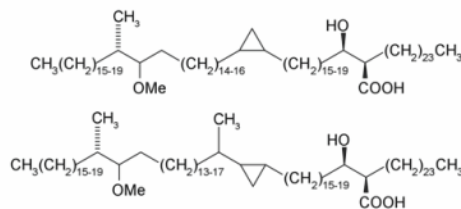
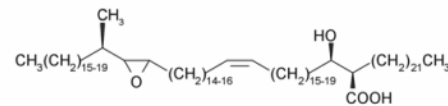
ácidos micólicos ( $C_{70}$ - $C_{90}$ ) y las cadenas laterales  $\alpha$  más largas ( $C_{22}$ - $C_{26}$ ) que se conocen en la naturaleza. Cada especie tiene una composición característica y esta distinción se ha empleado para la identificación y clasificación de las distintas especies de *Mycobacterium* [43]. En la figura 3 se muestra un esquema de los ácidos micólicos encontrados en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.

Los ácidos micólicos 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 [44-47], tinción ácido-alcohol resistente [48] y la habilidad de persistir en el hospedador [31, 47, 49].

Minnikin fue el primero en proponer un modelo para la organización del complejo mAGP y lípidos asociados a la pared celular. En éste, las cadenas de ácido micólico se disponen de forma paralela entre sí y perpendicularmente al plano de la superficie celular, dando lugar a la cara interna de una bicapa lipídica asimétrica [50]. Esta cara interna, a su vez está cubierta por una cara externa compuesta por lípidos complejos libres.

### 1.3.3 Lípidos libres

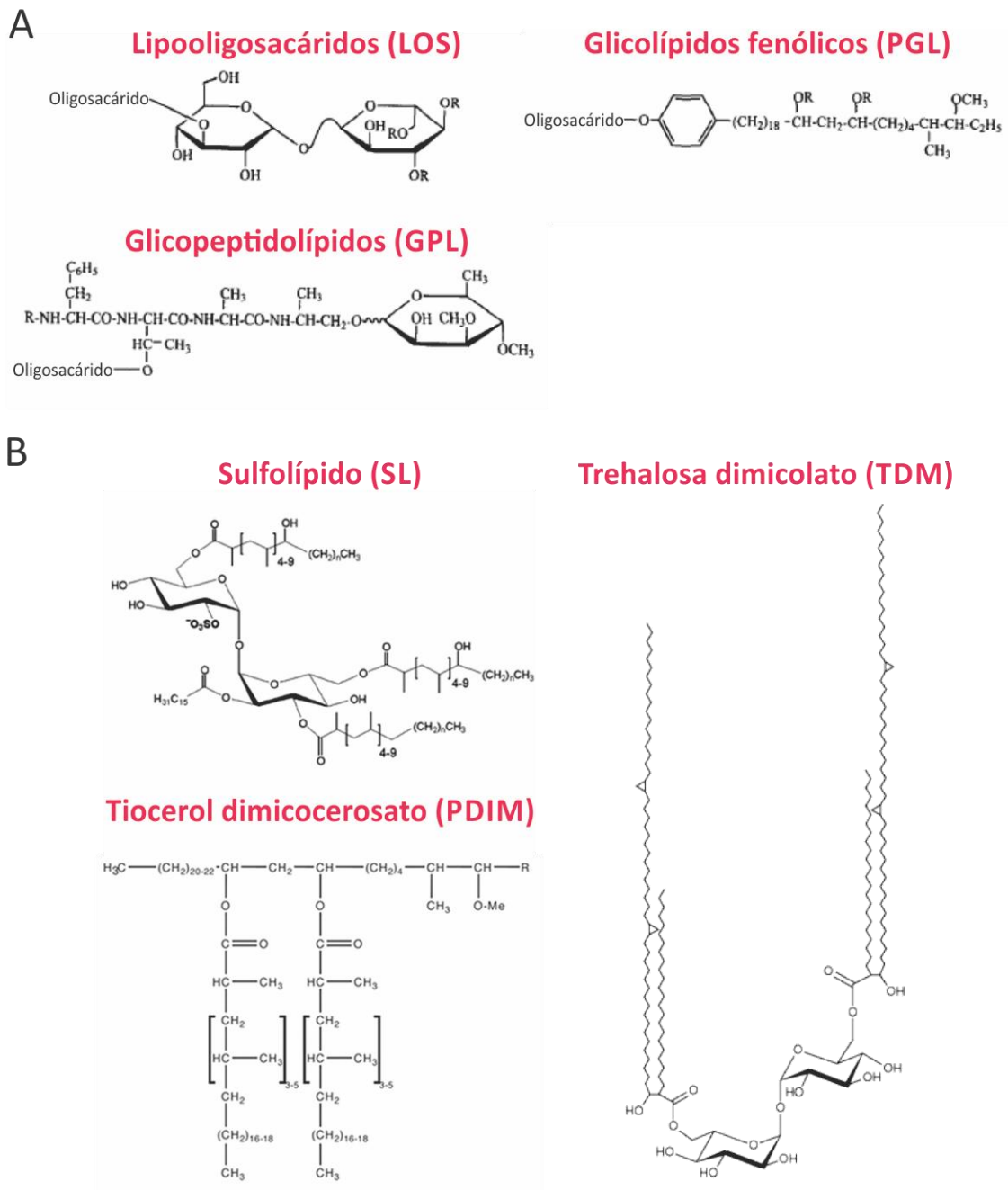
Existe una gran variedad de lípidos de estructuras inusuales en forma de lípidos libres; esto es, extraíbles con solventes orgánicos, que no forman parte del complejo mAGP pero que están asociados a éste. Las principales clases incluyen lipooligosacáridos (LOS), glicopeptidolípidos (GPL), glicolípidos fenólicos (PGL), ceras como el tiocerol dimicocerosato (PDIM), trehalosas aciladas como diacil- y pentacil-trehalosas (DAT y PAT) y la trehalosa dimicolato (TDM), y sulfolípidos (SL) (Fig. 4). Cada especie micobacteriana presenta clases y variantes características [12]. En *M. tuberculosis* los lípidos mejor caracterizados incluyen los PDIM, SL y trehalosas aciladas, que cumplen funciones en eventos de señalización, en la patogénesis y en la modulación de la respuesta inmune [51]. La TDM representa el lípido extraíble más abundante, granulogénico y significativamente tóxico de la envoltura celular de *M. tuberculosis* [52].

***M. tuberculosis******M. smegmatis*** **$\alpha$ - micolatos** **$\alpha'$ - micolatos****cetomicolatos** **$\alpha$ - micolatos****metoximicolatos****epoximicolatos**

**Figura 3. Estructura de los principales ácidos micólicos identificados en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.** Los ácidos micólicos son ácidos grasos  $\alpha$ -alquil  $\beta$ -hidroxilados formados por una cadena larga carbonada (ácido meromicólico) y una cadena lateral  $\alpha$  más corta. Adaptado de Brown y colaboradores [53].

### 1.4 Biosíntesis de ácidos grasos en bacterias

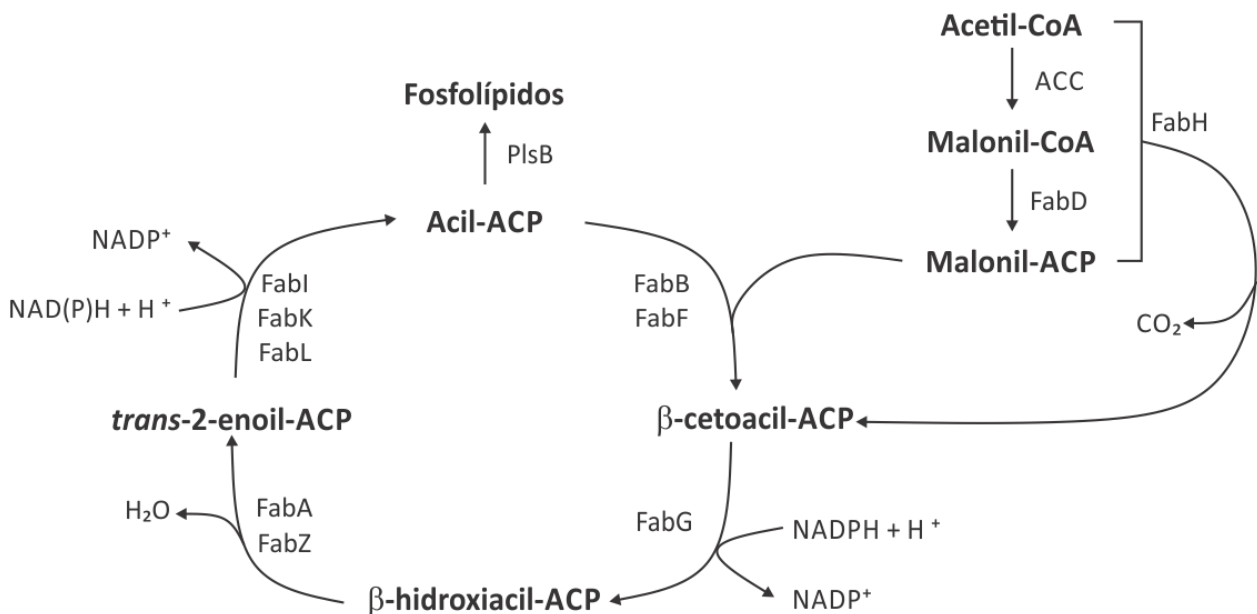
La biosíntesis de ácidos grasos es el primer paso en la formación de lípidos de membrana, y representa un aspecto esencial del metabolismo en todos los organismos. A pesar de existir una variación considerable en las estructuras moleculares de las distintas sintasas de ácidos grasos (FAS), el mecanismo de reacción de la síntesis *de novo* de ácidos grasos es esencialmente el mismo en todos los sistemas biológicos; y en bacterias, las enzimas involucradas y los pasos metabólicos han sido caracterizados utilizando *E. coli* como modelo de estudio.



**Figura 4. Lípidos complejos extraíbles de *Mycobacterium*.** A. Estructuras genéricas de las tres clases principales de glicolípidos extraíbles de la pared celular micobacteriana. R, cadena larga de acil-ácido graso. B. Ejemplos de algunos lípidos extraíbles de *M. tuberculosis*.

El primer paso de esta ruta biosintética consiste en la carboxilación de acetil-CoA mediada por una acetil-CoA carboxilasa (ACC), para dar malonil-CoA. El residuo malonato luego es transferido a la proteína transportadora de acilos (ACP) por la malonil-CoA:ACP transacilasa (FabD) para dar lugar a malonil-ACP. El primer paso del ciclo de elongación consiste en la condensación de malonil-ACP con acetil-CoA,

catalizada por la  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa III (FabH). Los pasos posteriores de elongación, que determinan la adición sucesiva de dos unidades de carbono hasta sintetizar un ácido graso  $C_{16-18}$ , son catalizados por una  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa (FabB-FabF). El  $\beta$ -cetoéster resultante, es reducido a un  $\beta$ -hidroxiacil-ACP por una  $\beta$ -cetoacil-ACP reductasa (FabG), seguida de la eliminación de una molécula de agua mediada por una  $\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa (FabA-FabZ). La reducción final del intermediario *trans*-2-enoil-ACP es catalizada por una enoil reductasa (FabI-FabK-FabL), dando como producto acil-ACPs saturados, que serán los sustratos de una nueva ronda de elongación [54, 55] (Fig. 5).



**Figura 5. Biosíntesis de ácidos grasos en bacterias.** ACC: acetil-CoA carboxilasa; FabD: acil-CoA:ACP transacilasa; FabH:  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa III; FabG:  $\beta$ -cetoacil-ACP reductasa; FabA/FabZ:  $\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa/isomerasa y  $\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa; FabI, FabK, FabL: enoil-ACP reductasas; FabB, FabF:  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasas. Adaptado de Marrakchi y colaboradores [56].

Las FAS son clasificadas en base a la estructura proteica como de tipo I o tipo II. Las FAS de tipo I consisten en una proteína multifuncional, que contiene en una única cadena polipeptídica las distintas actividades catalíticas de la secuencia de reacción, como dominios funcionales discretos. Estas enzimas se encuentran típicamente en el citoplasma de organismos eucariotas y excepcionalmente en el subgrupo productor de

ácidos micólicos de los actinomicetes [57]. Las FAS de tipo II constituyen un sistema disociado formado por proteínas independientes altamente conservadas, codificadas por una serie de genes individuales. Este sistema se encuentra presente en bacterias así como también en organelas de ascendencia procariota (cloroplastos y mitocondrias), donde catalizan la síntesis de ácidos grasos *de novo* [58]. Los únicos organismos procariotas que utilizan el sistema FAS de tipo I y no de tipo II para la síntesis de ácidos grasos *de novo* son aquellos productores de ácidos micólicos de la rama de los *Actinomycetales*, dentro de los cuales se encuentran las micobacterias [59-61].

## **1.5 Aspectos generales de la biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos en las micobacterias**

### **1.5.1 Características de los sistemas FAS-I y FAS-II micobacterianos**

Las micobacterias son procariotas inusuales dado que poseen los dos tipos de sistemas FAS: FAS-I y FAS-II, siendo ambos necesarios para la biosíntesis de ácidos micólicos [62]. La multienzima bacteriana FAS-I es un hexámero de subunidades idénticas, que cataliza la síntesis *de novo* de acil-CoAs de cadena larga, los cuales son utilizados para la síntesis de ácidos micólicos, fosfolípidos de membrana y en micobacterias patógenas, son sustratos para la síntesis de ácidos grasos multimetil ramificados (PDIM, TDM entre otros) [57]. Si bien la organización estructural de esta proteína micobacteriana en principio no presenta diferencias con la observada para otros sistemas FAS-I, ciertas propiedades parecerían ser únicas. Entre las más importantes se incluyen la síntesis de producto siguiendo un patrón bimodal, la estimulación debido a ciertos polisacáridos micobacterianos y su capacidad de funcionar como elongasa, catalizando la elongación de palmitoil-CoA [63, 64]. Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre en levaduras, la actividad 4'-fosfopanteteinil transferasa encargada de activar el dominio ACP del sistema FAS-I se encuentra codificada por un gen separado (*acpS*) [65]. A su vez, la multienzima bacteriana se diferencia de otras conocidas en utilizar diferentes reductores, NADPH y NADH, para sus pasos de cetoacil- y enoil-reducción, respectivamente [63].

Experimentos bioquímicos han demostrado que la síntesis mediada por FAS-I tiene un comportamiento bimodal *in vitro*, produciendo dos clases de acil-CoAs de cadena larga: C<sub>16-18</sub>-CoAs y C<sub>24-26</sub>-CoAs [59, 60, 63]. En presencia de *O*- acilpolisacáridos micobacterianos estas enzimas aumentarían la producción de C<sub>16-18</sub>-CoA, y la velocidad de síntesis de ácidos grasos en general. Esto se debería a la capacidad de los azúcares de formar un complejo selectivo con estos ácidos grasos, resultando en una regulación por remoción del producto final. Por otro lado, en ausencia de estos polisacáridos se produciría como forma predominante C<sub>26</sub>-CoA en *M. tuberculosis* y C<sub>24</sub>-CoA en *M. smegmatis*, liberándose el producto final de la enzima por formación de auto-agregados [63, 66]. Esta bimodalidad de FAS-I no sería solamente una propiedad intrínseca de la proteína, sino que estaría determinada también por factores externos que influirían en el proceso de elongación. Esto fue demostrado *in vivo* cuando, al intercambiar la enzima FAS-I de *M. smegmatis* por la de *M. tuberculosis*, se encontró que ésta produce principalmente C<sub>24</sub>-S-enzima y no C<sub>26</sub>-S enzima, como se esperaba. Esto sugeriría que existen complejas interacciones entre FAS-I y FAS-II, y posiblemente otros elementos aún no dilucidados [67]. Por otro lado, si bien se ha sugerido que el sistema FAS-I *in vitro* funcionaría como *de novo* sintasa y elongasa; en las micobacterias patógenas, las cuales posiblemente deriven la mayoría de sus ácidos grasos del huésped, el mismo actuaría principalmente como elongasa convirtiendo los ácidos grasos del huésped en productos C<sub>24-26</sub> [64].

Las micobacterias contienen también un sistema disociado FAS-II, dependiente de ACP [68]. Éste se diferencia únicamente de las sintasas de tipo II encontradas en otras bacterias, en su incapacidad de realizar la síntesis *de novo* de ácidos grasos. En cambio, elonga acil-CoAs de cadena media (C<sub>12-16</sub>) hasta obtener cadenas aciladas muy largas (C<sub>50-60</sub>) que dan lugar a la cadena meromicolato del ácido micólico.

### 1.5.2 Biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos en micobacterias

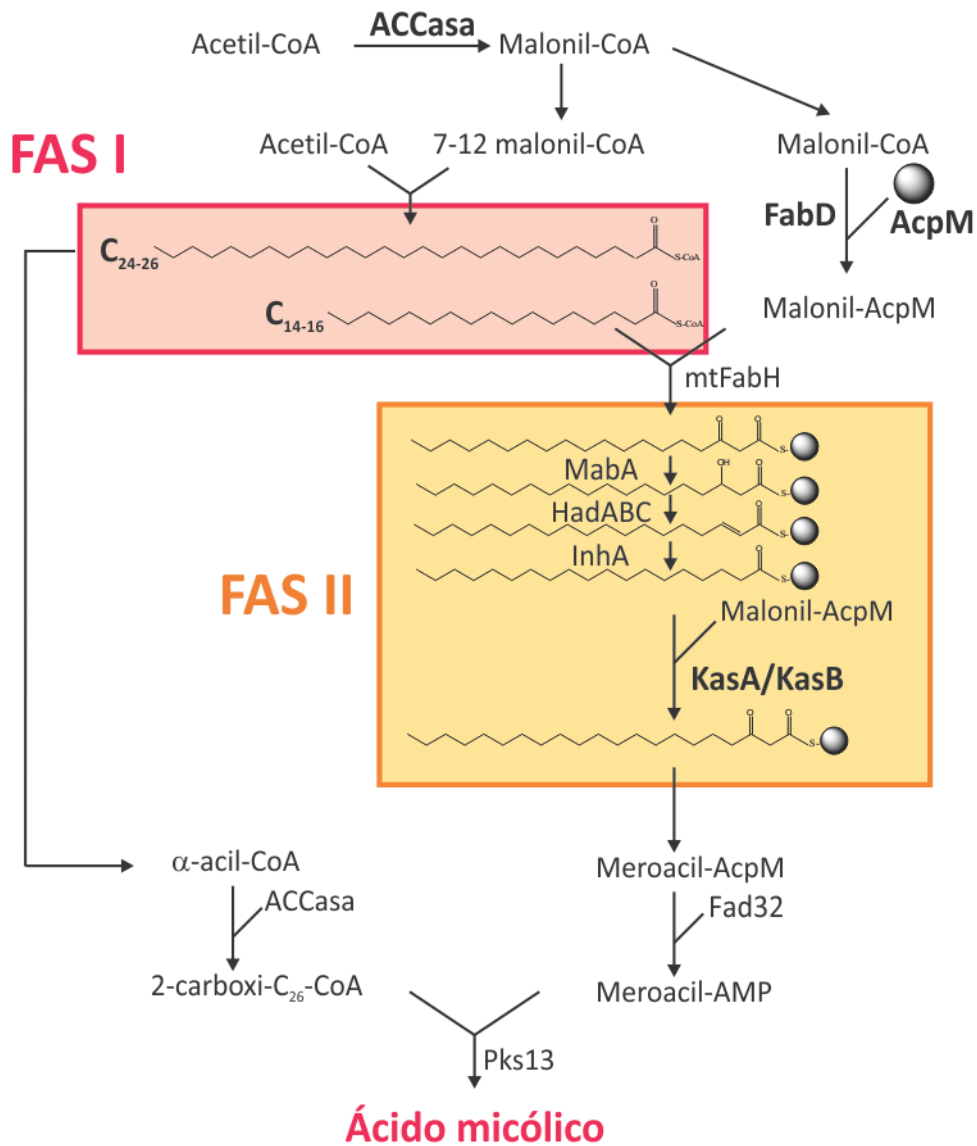
La biosíntesis de ácidos grasos/micólicos ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, dada la relevancia de los lípidos en la patogénesis de *M. tuberculosis* (Fig. 6). FAS-I cataliza la síntesis *de novo* de acil-CoAs de cadena larga a partir de acetil-CoA



y malonil-CoA para dar butiril-S-enzima. Las elongaciones subsiguientes mediadas por FAS-I producen C<sub>16</sub>- y C<sub>18</sub>-S-enzima, los cuales son convertidos a sus derivados acil-CoA y utilizados principalmente para la síntesis de fosfolípidos de la membrana plasmática. Por otro lado, FAS-I es capaz de continuar con la elongación del palmitoil-CoA para dar lugar en *M. tuberculosis*, por ejemplo, a C<sub>26</sub>-S-enzima que sería liberado como C<sub>26</sub>-CoA, y posteriormente activado mediante una carboxilasa específica para su condensación con el ácido meromicólico, mediada por la policétido sintasa Pks13, convirtiéndose así en la cadena  $\alpha$ -alquilo del ácido micólico [62, 69].

Los sistemas FAS del tipo I y II están conectados por una enzima condensante clave, la  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa III o mtFabH. Esta enzima cataliza la condensación decarboxilativa de malonil-ACP con los acil-CoAs producidos por FAS-I [70]. El producto de esta condensación, un  $\beta$ -cetoacil-ACP de cadena mediana, es el sustrato inicial del sistema FAS-II. Estudios bioquímicos llevados a cabo en presencia de malonil-ACP muestran que mtFabH puede utilizar un rango de C<sub>12-20</sub>-CoAs como sustrato, lo cual resulta consistente con los estudios estructurales realizados por Scarsdale y colaboradores [71], los cuales diferencian a esta enzima de las FabH de otros sistemas FAS-II, que típicamente usan como sustrato C<sub>2-6</sub>-CoAs [71, 72].

El mecanismo general de la síntesis de ácidos grasos es común a todas las bacterias, y los genes que codifican para las enzimas involucradas en cada uno de los pasos están generalmente conservados (Tabla 1). En las micobacterias, 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* [65, 73] (Tabla 2). Pawelczyk y colaboradores [74] demostraron recientemente que los genes *fabD, acpM, kasA, kasB* y *accD6* forman un operón, al que denominamos operón *fasII*. Su experimento consistió en la amplificación por PCR de las regiones intergénicas ubicadas entre cada uno de estos genes, utilizando como molde ADNc de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*. Mediante la obtención de los productos de PCR esperados confirmaron que efectivamente se trataba de una única unidad transcripcional [74].



**Figura 6. Representación esquemática de la vía de biosíntesis de los ácidos micólicos.** La biosíntesis de los precursores de los ácidos micólicos requiere de la actividad coordinada de dos ácido graso sintasas: FAS-I y FAS-II. Los pasos de la síntesis de ácidos micólicos se encuentran detallados en el texto. Los componentes del sistema FAS-II están codificados en tres operones. Se resaltan en negrita las proteínas codificadas por los genes del operón *fasII* (FabD: malonil-ACP transacilasa, AcpM: proteína transportadora de acilos, KasA y KasB: β-cetoacil-ACP sintasas y ACCasa: acil-CoA carboxilasa).

El primer gen del operón *fasII* codifica para la malonil-CoA:ACP transacilasa FabD [75] y el segundo codifica para la ACP micobacteriana (AcpM), involucrada en el transporte de la cadena acilo creciente de un sitio activo a otro dentro del sistema FAS-II durante la síntesis del ácido graso. Esta proteína es convertida a su forma activa holo-AcpM por la holo-ACP sintasa (AcpS), la cual cataliza la transferencia de un grupo 4-fosfopanteteína de la coenzima A (CoA) a la apo-ACP [76]. AcpM es una ACP inusual

en lo que respecta a su tamaño en comparación con la proteína ACP de *E. coli*; consiste en un polipéptido de mayor longitud el cual se diferencia de las ACPs bacterianas por presentar una extensión en su extremo carboxilo terminal. Mediante el secuestro de la cadena acilada hidrofóbica del solvente, esta característica adicional podría tener un rol importante en la transferencia del ácido meromicólico en crecimiento, a los diferentes centros del sistema enzimático FAS-II [75, 77].

**Tabla 1. Enzimas del sistema FAS-II en diferentes géneros bacterianos**

Grupo de enzimas	Organismo	Proteína	Actividad
Enzimas condensantes	<i>E. coli</i>	FabB	$\beta$ -cetoacil-ACP sintasa I
		FabF	$\beta$ -cetoacil-ACP sintasa II
		FabH	$\beta$ -cetoacil-ACP sintasa III
	<i>M. tuberculosis</i>	mtFabH	$\beta$ -cetoacil-ACP sintasa III
		KasA	$\beta$ -cetoacil-ACP sintasa
		KasB	$\beta$ -cetoacil-ACP sintasa
Enoil-ACP reductasas	<i>E. coli</i>	FabI	Enoil-ACP reductasa I
	<i>S. pneumoniae</i>	FabK	Enoil-ACP reductasa II
	<i>Bacillus subtilis</i>	FabL	Enoil-ACP reductasa III
	<i>M. tuberculosis</i>	InhA	Enoil-ACP reductasa
Deshidratasas	<i>E. coli</i>	FabA	$\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa/isomerasa
		FabZ	$\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasa
	<i>M. tuberculosis</i>	HadAB HadBC	$\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasas
ACPs	<i>E. coli</i>	AcpP	Proteína transportadora de acilos
	<i>M. tuberculosis</i>	AcpM	Proteína transportadora de acilos
$\beta$ -cetoacil-ACP reductasas	<i>E. coli</i>	FabG	$\beta$ -cetoacil-ACP reductasa
	<i>M. tuberculosis</i>	MabA	$\beta$ -cetoacil-ACP reductasa
Transacilasas	<i>E. coli</i>	FabD	Malonil-CoA:ACP transacilasa
	<i>M. tuberculosis</i>	FabD	Malonil-CoA:ACP transacilasa

Tabla 2. Genes y enzimas del sistema FAS-II en micobacterias

Operón putativo	Gen	Actividad enzimática
<b><i>fabD-acpM-kasA-kasB-accD6</i></b>	<i>fabD</i>	Malonil-CoA:ACP transacilasa
	<i>acpM</i>	Proteína transportadora de acilos
	<i>kasA</i>	$\beta$ -cetoacil-ACP sintasa
	<i>kasB</i>	$\beta$ -cetoacil-ACP sintasa
	<i>accD6</i>	Subunidad carboxil transferasa de la ACCasa 6
<b><i>mabA-inhA</i></b>	<i>mabA</i>	$\beta$ -hidroxiacil-ACP reductasa
	<i>inhA</i>	Enoil-ACP reductasa
<b><i>hadA-hadB-hadC</i></b>	<i>hadA, hadB</i>	Hidroxil-acil-deshidratasa
	<i>hadB, hadC</i>	Hidroxil-acil-deshidratasa

Los pasos de elongación del sistema FAS-II que siguen a continuación de la reacción de condensación dependiente de FabH son llevados a cabo por las  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasas codificadas por los genes *kasA* y *kasB*, del operón *fasII*. Las proteínas KasA y KasB de *M. tuberculosis* tienen un 67% de identidad y ambas enzimas catalizan la condensación de acil-AcpM con malonil-AcpM, elongando la cadena del meromicolato en dos átomos de carbono [78]. Las dos enzimas tienen distinta especificidad de sustrato, esto sugiere que cumplen roles diferentes en el proceso de elongación. En base a estudios *in vitro* se propuso que KasA estaría implicada en la elongación inicial de los micolatos, que serían luego extendidos por KasB hasta su longitud final [79, 80]. Las estructuras cristalográficas de estas enzimas son consistentes con la especificidad de sustrato propuesta [78, 81]. Esta hipótesis a su vez fue confirmada *in vivo* analizando cepas mutantes en el gen *kasB* de *M. marinum* y *M. tuberculosis*. En estas, los ácidos micólicos presentan pequeños cambios en su longitud y composición, lo que determina no sólo una marcada alteración en la permeabilidad de la envoltura celular de estas micobacterias sino también la pérdida de su característica de tinción ácido-alcohol resistente. Por otro lado, la cepa de *M. tuberculosis* mutante en *kasB* es incapaz de provocar una enfermedad activa en ratones, pudiendo persistir en estos durante 600 días. Cabe destacar que ninguna de estas anomalías pudo ser complementada por la sobre-expresión de *kasA*; demostrando que a pesar de ser altamente homólogas, ambas enzimas no presentan funciones redundantes [48, 82]. Por otro lado, a diferencia de KasB, KasA es un componente esencial del sistema FAS-II

cuya ausencia lleva a la lisis celular. Para caracterizar esta proteína, se construyó una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en *kasA* la cual presentó una disminución en los niveles de  $\alpha$ - y epoxi-micolatos, y una acumulación de  $\alpha'$ -micolatos. Nuevamente, múltiples copias de KasB no pudieron complementar la disminución en los niveles de KasA en esta cepa, confirmando el rol diferencial que presentan durante la vía de síntesis de la cadena de meromicolato [83].

El último gen de este operón es *accD6*, el cual codifica para la subunidad  $\beta$  de la acil-CoA carboxilasa 6 (ACCasa6), responsable de sintetizar malonil-CoA, el sustrato utilizado por ambos sistemas FAS durante los distintos pasos de elongación [84]. Si bien se ha demostrado que este gen es esencial en *M. tuberculosis* [74], existen controversias respecto de su esencialidad en *M. smegmatis* [74, 84].

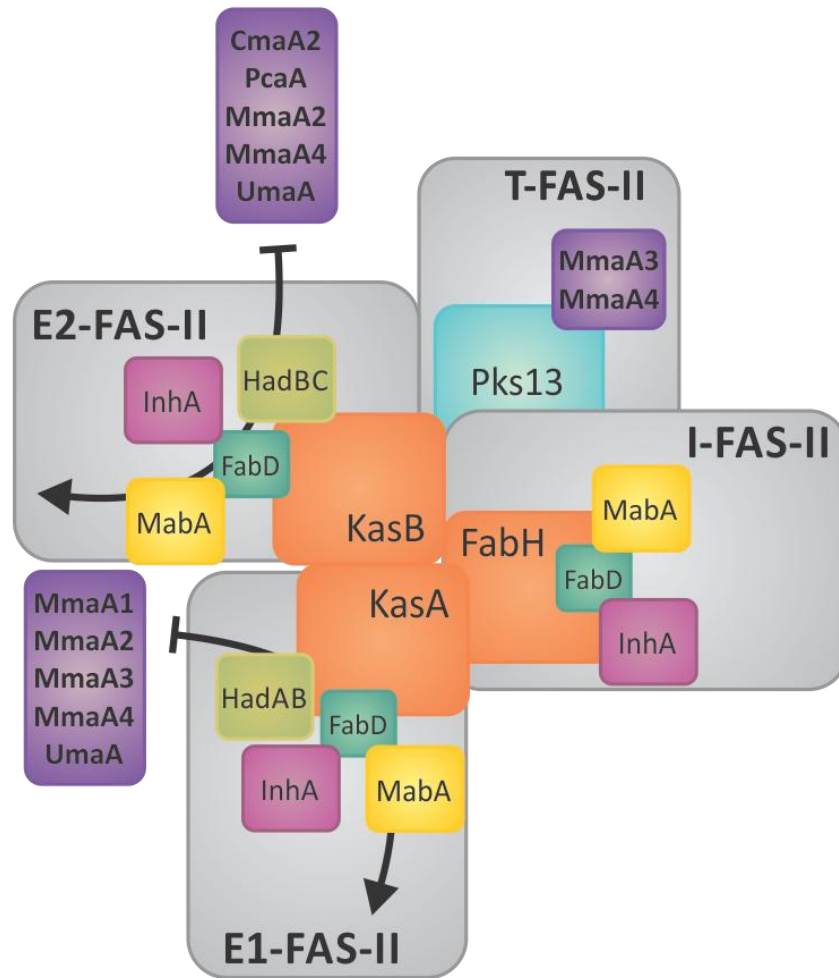
Las reductasas del sistema FAS-II están codificadas por los genes *mabA* e *inhA*, ubicados en la misma región cromosómica de *M. tuberculosis* formando un operón en esta especie [34]. MabA codifica para una  $\beta$ -cetoacil-ACP reductasa que a diferencia de otras cetoacil reductasas, presenta preferencia por sustratos de cadena larga consistente con su rol en la biosíntesis de ácidos micólicos [85]. El gen *inhA* codifica para la proteína que cataliza la *trans*-2-enoil-ACP reducción, con preferencia por sustratos largos [86] y fue identificado como blanco de acción de INH y ETH en *M. tuberculosis* [34, 87].

Por otro lado, el paso de deshidratación del intermediario  $\beta$ -hidroxiacil-ACP a *trans*-2-enoil-ACP está catalizado por las  $\beta$ -hidroxiacil-ACP deshidratasas del operón *hadA-hadB-hadC* de *M. tuberculosis*, siendo al menos uno de estos genes esenciales para la viabilidad bacteriana. Las proteínas codificadas por estos genes forman dos heterodímeros, HadAB y HadBC. Al igual de lo que ocurre para KasA, HadAB estaría involucrado en los ciclos iniciales de la vía de elongación, mientras que HadBC, al igual que KasB, estaría implicado en los últimos pasos de la biosíntesis del ácido meromicólico [73].

La última etapa en la vía de síntesis de los ácidos micólicos corresponde a la activación y condensación de las cadenas aciladas provenientes de los sistemas FAS-I y FAS-II. En primer lugar, la cadena del ácido meromicólico es activada a acil-AMP a través de la acción de una acil-AMP ligasa (FadD32) [88, 89]. A su vez, el C<sub>24-26</sub>-CoA

proveniente del sistema FAS-I, es carboxilado por una acil-CoA carboxilasa que involucra a la subunidad carboxil transferasa AccD4 [89, 90]. Finalmente, ambos sustratos activados son condensados por la enzima Pks13 dando lugar al precursor del ácido micólico [91]. Se ha demostrado que los genes que codifican para estas tres proteínas forman el operón *fadD32-pks13-accD4* y son esenciales para la viabilidad de las micobacterias [69, 89].

Las proteínas del sistema FAS-II de *M. tuberculosis* interactúan específicamente dando lugar a complejos especializados interconectados, sugiriendo que la organización de este sistema se asemejaría a la del sistema FAS-I de mamíferos (Fig. 7). En este modelo, denominado Interactoma de la biosíntesis de ácidos micólicos, un complejo de iniciación (I-FAS-II) formado por las reductasa MabA e InhA, FabD y mtFabH permitiría el pasaje de sustratos desde FAS-I a FAS-II. Luego, el complejo de elongación de tipo I (E1-FAS-II) formado por MabA, InhA, FabD, HadAB y KasA estaría involucrado en los ciclos iniciales de elongación y las cadenas acilo de longitud intermedia sintetizadas servirían entonces como sustratos para el complejo de elongación de tipo II (E2-FAS II), en el cual la deshidratasa sería el complejo HadBC y la enzima condensante sería KasB. Tras los sucesivos pasos de elongación, reducción y deshidratación llevados adelante por este último complejo, los meromicolil-AcpM de longitud completa resultantes son condensados con la cadena acilada  $\alpha$ -, por el complejo de terminación (T-FAS-II) que involucra a la proteína Pks13, la cual se encontraría interactuando preferentemente con KasB [92-94]. Las cadenas meromicólicas son modificadas en dos posiciones específicas: distal y proximal (Fig. 3), habiéndose identificado hasta el momento ocho metiltransferasas involucradas en estas modificaciones específicas (MmaA1-MmaA4, CmaA1, CmaA2, PcaA y UmaA). Se ha demostrado que estas proteínas interactuarían con las enzimas condensantes, siendo específicas de los complejos E-FAS-II, modificando de esta manera la cadena meromicólica durante el proceso de elongación [94]. En consecuencia, la especificidad de cada tipo de complejo de elongación y de las modificaciones realizadas en la cadena del meromicolato, estaría dada por las interacciones específicas ocurridas entre las enzimas condensantes, los heterodímeros de las deshidratasas y las metiltransferasas.



**Figura 7. Esquema de las interacciones proteína-proteína dentro del Interactoma de la biosíntesis de ácidos micólicos.** I-FAS-II, complejo de iniciación; E1-FAS-II complejo de elongación I; E2-FAS-II complejo de elongación II; T-FAS II complejo de terminación. Las enzimas condensantes interaccionan entre ellas y con el bloque compuesto por MabA, InhA y FabD. KasA y KasB interaccionan con HadAB y HadBC respectivamente. Las interacciones con las metiltransferasas (indicadas dentro de los recuadros violetas) están representadas con flechas negras. Cada complejo está representado por un recuadro gris. Adaptado de Cantaloube y colaboradores [94].

### 1.6 Antecedentes sobre la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos en bacterias

Los ácidos grasos son los componentes de las membranas biológicas energéticamente más costosos de producir. En consecuencia, las bacterias han desarrollado mecanismos sofisticados que les permiten controlar con precisión la expresión de los genes involucrados tanto en la biosíntesis como en la degradación de los mismos, así como también en la modificación de las cadenas aciladas existentes. De

esta manera, las bacterias pueden ajustar las propiedades biofísicas de los ácidos grasos y asegurar una correcta biogénesis y estabilidad de las membranas lipídicas [95]. Hasta el momento del comienzo de nuestros estudios, se habían identificado siete reguladores transcripcionales de la biosíntesis de ácidos grasos, tres de ellos ajustan los niveles de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de la membrana, FadR (*E. coli*) [95-98], FabR (*E. coli*) [99, 100] y DesT (*Pseudomonas aeruginosa*) [101, 102]; mientras que FapR (*B. subtilis*) [103-105] y FabT (*Streptococcus pneumoniae*) [106, 107] son represores transcripcionales globales que controlan simultáneamente la expresión de genes involucrados en el metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos. A su vez, dos reguladores de actinomicetes han sido caracterizados recientemente en nuestro laboratorio: FasR de *Streptomyces coelicolor*, que controla la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos destinados a fosfolípidos y triglicéridos [108] y MabR de *M. tuberculosis*, involucrado en la regulación de genes de la vía de biosíntesis de ácidos micólicos [109] (Tabla 3).

- **FadR**

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  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos [96, 110]. Posteriormente se demostró que esta proteína regula también la biosíntesis de ácidos grasos insaturados (AGI), actuando como activador transcripcional de los genes *fabA* ( $\beta$ -hidroxidecanoil-ACP deshidratasa/isomerasa) y *fabB* ( $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa I) [97, 98]. 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* (Fig. 5). De las dos hidroxiaxil-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 [111]. Posteriormente, FabB



elonga el *cis*-3-decenoil-ACP producido y a través de sucesivos pasos de elongación resulta en la producción de AGI [54, 112] (Fig. 8).

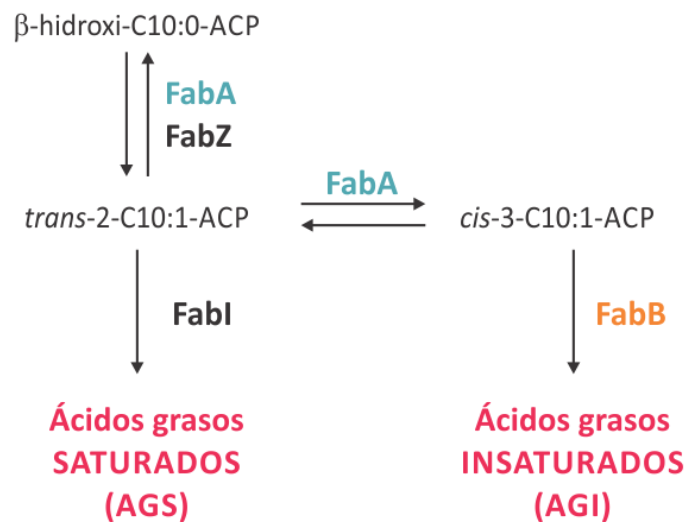
**Tabla 3. Reguladores transcripcionales de la biosíntesis de ácidos grasos en bacterias**

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

\*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.

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  $\beta$ -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 [96, 97, 110].



**Figura 8. Síntesis de ácidos grasos insaturados en *E. coli*.** El punto de ramificación para la síntesis de AGI en el sistema FAS-II implica la conversión del intermediario acil-ACP de diez átomos de carbono. Las deshidratasas FabA y FabZ son capaces de remover una molécula de agua del  $\beta$ -hidroxidecanoil-ACP para formar *trans*-3-decenoil-ACP. Sin embargo, FabA es la única deshidratasa capaz de catalizar la isomerización de *trans*-3- a *cis*-2-decenoil-ACP. Este intermediario *cis* es elongado por la enzima condensante FabB y mediante sucesivos ciclos de elongación da lugar a los AGI. El intermediario *trans* es reducido por FabI y posteriormente elongado para dar ácidos grasos saturados (AGS). Adaptado de Rock y Jackowski [54].

- **FabR**

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 [99]. Mientras que FadR tiene su mayor influencia sobre la expresión de *fabA*, FabR tiene un efecto más pronunciado sobre la expresión de *fabB* [113]. 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 [100, 113]. 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*  $\Delta$ *fadR*, y un inhibidor específico de FabA, demuestran que los niveles de expresión de *fabB* y *fabA* no se ven afectados en esta cepa, a pesar del bloqueo de la síntesis de los AGI (en ausencia de AGI exógenos) y la continua síntesis de 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* [100, 113]. En consecuencia, FadR y FabR actúan de manera concertada para balancear la producción de AGI y AGS en *E. coli*.

- **DesT**

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  $\Delta$ 9 desaturasa dependiente de oxígeno, que introduce dobles enlaces en la posición 9 de los acil-CoAs que derivan de ácidos grasos exógenos. Mientras que la principal vía de síntesis de AGI en *P. aeruginosa* involucra a FabA, ésta se ve suplementada por la acción de la desaturasa dependiente de oxígeno DesB [101, 114, 115]. *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 [114]. 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 [114]. 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 [101, 102, 115].

- **FabT**

FabT (por sus siglas en inglés, Fatty acid biosynthesis Transcriptional regulator) es un represor de los genes *fab/acc* de *S. 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) [106]. 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 [107].

- **FapR**

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*) [103]. 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 [104, 105]. 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 [95, 116].

- **FasR<sub>sc</sub> y MabR**

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.

En los últimos años, en nuestro grupo se han caracterizado dos reguladores transcripcionales del sistema FAS-II en actinomicetes. FasR, de *S. coelicolor* (por sus siglas en inglés, Fatty acid synthesis Regulator), aquí llamado FasR<sub>SC</sub>, es un activador del operón *fab* involucrado en la síntesis de ácidos grasos destinados a fosfolípidos y triglicéridos [108]. El segundo factor de transcripción, MabR (por sus siglas en inglés, Mycolic acid biosynthesis Regulator), es un regulador de *M. tuberculosis* homólogo a FasR<sub>SC</sub>, que controla la expresión del operón *fasII* involucrado en la síntesis de ácidos micólicos. A su vez, niveles no fisiológicos del mismo alteran los niveles de expresión del gen *fas*, que codifica para el sistema FAS-I en las micobacterias, lo que daría indicio de una regulación coordinada entre ambos sistemas de sintetas [109]. La existencia de reguladores homólogos altamente conservados corriente arriba de los operones *fab* en la mayoría de los actinomicetes cuyos genomas han sido secuenciados, remarca la importancia de esta nueva clase de reguladores transcripcionales para el mantenimiento de la homeostasis lipídica en este grupo de bacterias. Cabe destacar que a pesar de que FasR<sub>SC</sub> no es esencial para la viabilidad bacteriana, MabR sí lo es, siendo el primer regulador transcripcional de la síntesis de ácidos grasos caracterizado en bacterias que presenta esta característica [108, 109].

### **1.6.1 Antecedentes sobre la regulación de la síntesis de ácidos grasos y micólicos en las micobacterias**

#### **1.6.1.1 Antecedentes sobre el control bioquímico de la síntesis de lípidos 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* [62], se sabe muy poco sobre los mecanismos de regulación que le permiten adaptar su composición en respuesta a los cambios ambientales. Dada su implicancia en la patogénesis de *M. tuberculosis* [31], el estudio de los procesos que regulan la biosíntesis y composición de la pared celular resulta crucial para la comprensión de la

fisiología y la fisiopatología de este patógeno, como así también de las interacciones entre las micobacterias y su entorno en general. Se sabe que la actividad de enzimas claves en la biosíntesis de ácidos micólicos como FabD, FabH, MabA, KasA, KasB, Pks13, HadAB, HadBC e InhA, son moduladas por fosforilación mediada por serina/treonina proteína quinasas (STPKs) (Fig. 9) [117-119]. A través de experimentos realizados *in vitro* con las enzimas purificadas, los autores han demostrado que la fosforilación de las enzimas condensantes KasA y KasB, modula diferencialmente su actividad. Mientras que la fosforilación disminuye la actividad de KasA en el proceso de elongación, esta modificación aumenta la actividad de KasB en presencia de malonil-ACP o C<sub>16</sub>-ACP. Se propuso entonces que para asegurar la biosíntesis de los micolatos maduros, las micobacterias regulan diferencialmente sus sistemas E1-FAS-II comprendido por KasA, y E2-FAS-II comprendido por KasB, a través de la fosforilación mediada por STPK. También se demostró que mtFabD, la malonil-CoA:ACP transacilasa que provee el sustrato malonil-ACP necesario para la síntesis de ácidos micólicos, también es fosforilada por varias STPKs, sin embargo se desconoce si esta modificación regula positiva o negativamente su actividad enzimática [120]. Además, otra enzima condensante, mtFabH, es fosforilada eficientemente *in vitro* por varias STPKs, particularmente PknF y PknA, como así también *in vivo*. Se ha demostrado que esta modificación de mtFabH tendría un efecto negativo sobre la actividad de esta enzima. Dado que Pks13 también es fosforilada por STPK de *M. tuberculosis*, la expresión diferencial de estas quinasas como respuesta a condiciones medioambientales podría influenciar de manera directa en el perfil de fosforilación de las cuatro enzimas condensantes, modulando en consecuencia la actividad de los distintos sistemas FAS-II interconectados [121]. A su vez, se ha demostrado que las reductasas MabA e InhA son fosforiladas *in vitro* e *in vivo* por varias STPKs de *M. tuberculosis* incluída PknB. La modificación de estas enzimas conduce a una fuerte disminución de su actividad reductasa, y la inhibición de la síntesis de ácidos micólicos *in vivo*, siendo nocivo para el crecimiento bacteriano [118, 122]. Por último, las deshidratasas HadAB y HadBC también son fosforiladas *in vitro* por varias STPKs, así como también *in vivo*. Se ha demostrado que la fosforilación de estas enzimas aumenta durante la fase estacionaria de crecimiento bacteriano y conduce a una fuerte disminución de la actividad de las mismas [119]. Estos trabajos han demostrado que la regulación mediada por STPKs de

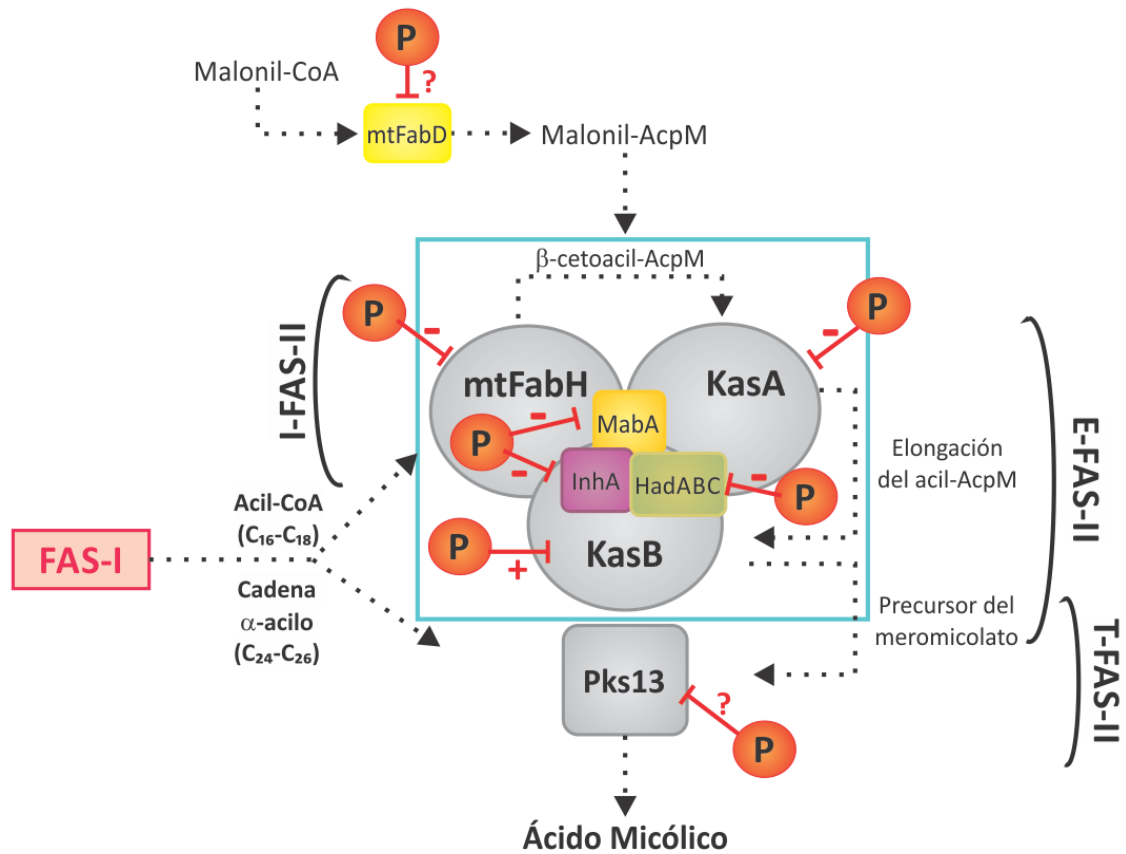
*M. tuberculosis* sería un mecanismo molecular que le permitiría a este patógeno adaptar rápidamente el metabolismo de los ácidos micólicos en respuesta a los cambios ambientales a los que se enfrenta. Se podría hipotetizar que las micobacterias patógenas podrían utilizar mecanismos similares que involucren a estas STPKs para regular la actividad de proteínas involucradas en la biosíntesis de otros lípidos/glicolípidos de membrana como respuesta a las señales que encuentra durante los procesos de infección y latencia [118].

#### **1.6.1.2 Regulación transcripcional de los genes de la biosíntesis de ácidos micólicos**

Si bien muchas de las enzimas que forman parte de los sistemas FAS-I y FAS-II han sido exhaustivamente estudiadas y muchas de ellas caracterizadas genética y bioquímicamente como blancos de diferentes drogas antimicobacterianas, es muy poco lo que se sabe acerca de cómo se regula la función de estas dos rutas biosintéticas y cuáles serían las señales regulatorias que permiten la correcta interacción entre ambos sistemas metabólicos. La transcripción de genes que codifican para componentes de rutas multienzimáticas es regulada frecuentemente en respuesta a la disponibilidad de cofactores, precursores, intermediarios o productos de la misma ruta metabólica. Es de esperar que compuestos que selectivamente inhiben una enzima de la ruta causando la acumulación de precursores y la disminución de productos, induzcan selectivamente cambios en la transcripción de genes que codifican enzimas involucradas en la vía metabólica afectada. La disponibilidad de la secuencia genómica completa de *M. tuberculosis* permitió analizar mediante el uso de microarreglos [123, 124] y de proteómica cuantitativa [125], cuáles eran los transcritos o proteínas inducidas en cultivos de *M. tuberculosis* luego de tratar a este organismo con INH, un poderoso inhibidor de la síntesis de ácidos micólicos. Ambos estudios demostraron que la inhibición de la síntesis de ácidos micólicos induce marcadamente la transcripción del operón *fasII* y la síntesis de las proteínas codificadas por este operón. Curiosamente, en estos experimentos no se observó la inducción de otros genes que codifican para enzimas que forman parte del sistema



FAS-II, como ser *InhA* o *MabA*, cuyos genes se encuentran formando un operón no asociado a *fasII*.



**Figura 9. Las enzimas involucradas en la síntesis de ácidos micólicos son reguladas por fosforilación.** La biosíntesis de ácidos micólicos se inicia con la síntesis de C<sub>16-18</sub>-CoA por FAS-I y la posterior elongación mediada por FAS-II hasta obtener la cadena de meromicolato. FAS-I provee también la cadena α-acilo (C<sub>24-26</sub>-CoA) utilizada por la enzima *Pks13* durante la formación del precursor del ácido micólico. Se muestra la organización de los complejos intervinientes. Las enzimas condensantes se indican en gris. Las evidencias experimentales han demostrado que las cuatro enzimas condensantes (*mtFabH*, *KasA*, *KasB* y *Pks13*), así como también *mtFabD*, las deshidratasas *HadAB* y *HadBC*, y las reductasas *MabA* e *InhA* son fosforiladas por STPKs de *M. tuberculosis*. Dicha modificación puede activar (+) o inhibir (-) la actividad enzimática. El signo de interrogación indica que el efecto de la fosforilación sobre la actividad enzimática no ha sido investigado hasta el momento. Adaptado de Veyron-Churlet y colaboradores [121].

Resultados similares se obtuvieron cuando se trataron los cultivos de *M. tuberculosis* con ETH, otro inhibidor de *InhA*, y con TLM, un producto natural que inhibe a las enzimas condensantes *KasA* y *KasB* [87]. Este paralelismo en la respuesta de *Mycobacterium* como consecuencia al tratamiento con INH, ETH y TLM, sugiere fuertemente que se trata de una respuesta característica del proceso celular afectado,

independientemente de la droga utilizada. A su vez, confirmaron que los genes del operón *fasII* se comportan como una única unidad transcripcional y dieron indicio de la existencia de un mecanismo de regulación a nivel transcripcional de la expresión de los mismos. Por otro lado, el análisis por microarreglos reveló que la transcripción de *fas*, el gen que codifica para la enzima multifuncional FAS-I, también está inducida debido al tratamiento con INH, sugiriendo la existencia de señales regulatorias comunes a los dos sistemas FAS [126]. Como puede deducirse, la interacción coordinada entre los sistemas enzimáticos FAS-I y FAS-II es fundamental para mantener un fino balance metabólico entre la síntesis de los ácidos grasos de membrana y los ácidos micólicos de la envoltura celular. Teniendo en cuenta la relevancia que posee el metabolismo lipídico tanto para el crecimiento *in vitro* como *in vivo* de *M. tuberculosis* y considerando además la información disponible acerca de la respuesta a nivel transcripcional del operón *fasII* en respuesta a los inhibidores antes detallados, en nuestro laboratorio se decidió comenzar con la caracterización de un regulador transcripcional que pudiera estar involucrado en la síntesis de lípidos, particularmente en la síntesis de ácidos micólicos, ya que son componentes esenciales tanto para la viabilidad como para la virulencia de este microorganismo. En una publicación reciente hemos reportado la identificación y caracterización bioquímica y funcional de un nuevo regulador, al que denominamos MabR [109]. En este trabajo se ha demostrado la unión de MabR a la región promotora del operón *fasII* tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo capaz de controlar la expresión de los genes que lo constituyen y por lo tanto la síntesis de ácidos micólicos. La sintenia de los elementos reguladores tanto *cis* como *trans* en todos los genomas de los actinomicetes cuya secuencia se encuentra disponible resalta la importancia de este arreglo génico a fines de permitir regular eficientemente la transcripción de los genes de la síntesis de ácidos grasos en este grupo de microorganismos. El rol fisiológico de este nuevo regulador se estudió en cepas de *M. smegmatis* conteniendo niveles no fisiológicos del mismo. Interesantemente, la transcripción del gen *fas*, se vio afectada de igual manera que la del operón *fasII*, lo que nos sugirió la existencia de un mecanismo de regulación coordinado entre ambos sistemas de sintasas. Por último, la comprobación de que una mutante en *mabR* sólo pudo ser obtenida en presencia de una copia extra del gen, confirmó la esencialidad de *mabR* ya predicha por Sasseti en experimentos de

transposición por alta densidad reafirmando el rol esencial de este regulador en la síntesis de lípidos en micobacterias [127]. Este trabajo, desarrollado por la Dra. Valentina Salzman como parte de su trabajo de tesis doctoral, representó la primera caracterización de un regulador clave para el metabolismo de ácidos grasos en el género *Mycobacterium* y sentó las bases para el desarrollo del presente trabajo de tesis.

Nuestra hipótesis de trabajo plantea que los sistemas FAS-I y FAS-II deberían estar estrictamente co-regulados en función de mantener la homeostasis lipídica en este microorganismo y que los componentes regulatorios involucrados podrían resultar excelentes blancos de drogas para el desarrollo de nuevos agentes antimicobacterianos. La presencia del motivo de unión a MabR corriente arriba del gen *fas*, junto con la evidencia de que la transcripción del mismo se veía afectada cuando alterábamos los niveles fisiológicos de este regulador, nos llevó a pensar que MabR podría estar regulando de manera directa la transcripción de *fas*. Sin embargo, a pesar de haber realizado numerosas pruebas *in vitro* para observar esta interacción mediante experimentos de retardo en gel, no fuimos capaces de detectar la unión de MabR a la región promotora del gen *fas*. A su vez, mediante una colaboración que se estableció con el Dr. Stewart T. Cole de la École polytechnique fédérale de Lausanne (EPFL- Suiza), realizamos un análisis global de la unión de MabR sobre el genoma de *M. tuberculosis* empleando la técnica de ChIP on chip y, si bien confirmamos la habilidad de MabR de unirse al promotor del operón *fasII in vivo*, tampoco pudimos detectar su unión a la región promotora del gen *fas*.

Estos resultados nos llevaron a pensar en la existencia de un nuevo regulador transcripcional involucrado en la regulación del gen *fas*. Nos propusimos entonces como principal objetivo de este trabajo de tesis, identificar y caracterizar dicho regulador ya que sería una pieza clave en la red de regulación necesaria para mantener la coordinación entre ambos sistemas FAS de micobacterias. Para ello se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Identificación y caracterización bioquímica y genética del regulador transcripcional del gen *fas*.

- Disección de los componentes regulatorios *cis*-genéticos del gen *fas* e identificación de la señal metabólica a la cual responde dicho regulador.
- Determinación de los efectos de la modulación de la expresión del gen *fas* sobre la biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos, *in vitro* e *in vivo*.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis contribuirán a lograr un mejor entendimiento de la fisiología de las micobacterias y de los mecanismos regulatorios asociados con la resistencia/sensibilidad a drogas relacionados con el metabolismo lipídico. A su vez, la caracterización del sistema de regulación de la síntesis de ácidos grasos y micólicos, constituyentes de la pared celular micobacteriana, podrían brindar nuevas herramientas para el desarrollo de drogas antimicobacterianas.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  [128] para los subclonados de rutina y su transformación se realizó según lo descrito por Sambrook y colaboradores [129]. Las transformantes se seleccionaron en medio suplementado con los antibióticos apropiados. La cepa de *E. coli* BL21 $\lambda$  (DE3) es una cepa de *E. coli* B lisogénizada con  $\lambda$ DE3, un profago que expresa la ARN polimerasa T7 a partir del promotor *lacUV5* inducible con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) [130]. La cepa BL21 $\lambda$  (DE3) codón Plus (Novagene) expresa ARNts para facilitar la expresión de genes que codifican codones no habituales en *E. coli*. *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 es una cepa mutante de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>6 [26].

**Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo de tesis.**

Cepa	Descripción	Referencia
DH5 $\alpha$	<i>E. coli</i> K12 F $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) <i>endA1</i> <i>recA1</i> <i>hsdR17</i> <i>deoR</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> $\lambda^-$ <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	[128]
BL21 $\lambda$ (DE3) codón plus	<i>E. coli</i> B F <i>ompt</i> <i>hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup></i> <i>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>dcm<sup>+</sup></i> <i>Tet<sup>r</sup></i> <i>gal</i> (DE3) <i>endA</i> <i>Hte</i> [ <i>argU</i> <i>ileY</i> <i>leuW</i> <i>Cm<sup>R</sup></i> ]	Stratagene
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	Cepa de <i>M. smegmatis</i> de alta eficiencia de transformación, mutante <i>ept</i> de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 6	[26]
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Cepa salvaje, virulenta de <i>M. tuberculosis</i>	[65]
MSpSM128	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pSM128, Sm <sup>r</sup>	Esta tesis
MSpFR9	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pFR9, Km <sup>r</sup>	Esta tesis
MSpFR47	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pFR47, Sm <sup>r</sup>	Esta tesis
MSpSM128 pFR9	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pSM128 y pFR9, Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Esta tesis
MSpFR47 pFR9	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pFR47 y pFR9, Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Esta tesis
MSpFR48 pFR9	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pFR48 y pFR9, Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Esta tesis
MSpFR49 pFR9	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pFR49 y pFR9, Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Esta tesis
MSpFR50 pFR9	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pFR50 y pFR9, Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Esta tesis

<b>MSpFR51 pFR9</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pFR51 y pFR9, Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MSpFR13</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pFR13, Gm <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MS SCO</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 con pFR13 integrado en el locus <i>fasR</i> <sub>MS</sub> , Gm <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MS SCO pFR5</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 con pFR13 integrado en el locus <i>fasR</i> <sub>MS</sub> , conteniendo pFR5 Gm <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MSΔ<i>fasR</i> pFR5</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 con un intercambio alélico intra-cromosomal en el locus <i>fasR</i> <sub>MS</sub> en presencia de pFR5, Hyg <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MSpFRA42B</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pFRA42B, Sm <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MSpFRA42B pFR20</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pFRA42B y pFR20, Sm <sup>r</sup> Am <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MSPptr:<i>fasR</i><sub>MS</sub></b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 mutante condicional en el gen <i>fasR</i> <sub>MS</sub> obtenida por recombinación homóloga mediante un único evento de recombinación del vector pFR20, conteniendo pFRA42B, Sm <sup>r</sup> Am <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MSpFRA42B pFR18</b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pFRA42B y pFR18, Sm <sup>r</sup> Am <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>MSPptr:<i>fas</i><sub>MS</sub></b>	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 mutante condicional en el gen <i>fas</i> <sub>MS</sub> obtenida por recombinación homóloga mediante un único evento de recombinación del vector pFR18, conteniendo pFRA42B, Sm <sup>r</sup> Am <sup>r</sup>	Esta tesis
<b><i>Mtb</i> pFR35</b>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv conteniendo pFR35, Km <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	Esta tesis
<b><i>Mtb</i> SCO</b>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv con pFR35 integrado en el locus <i>fasR</i> <sub>MT</sub> , Km <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	Esta tesis
<b><i>Mtb</i> SCO pFR33</b>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv con pFR35 integrado en el locus <i>fasR</i> <sub>MT</sub> conteniendo pFR33, Km <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup> Sm <sup>r</sup>	Esta tesis
<b><i>Mtb</i>Δ<i>fasR</i> pFR33</b>	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv con un intercambio alélico intra-cromosomal en el locus <i>fasR</i> <sub>MT</sub> en presencia de pFR33, Sm <sup>r</sup>	Esta tesis

Gm<sup>r</sup>, resistencia a gentamicina, Km<sup>r</sup>, resistencia a kanamicina; Am<sup>r</sup>, resistencia a apramicina; Sm<sup>r</sup>, resistencia a estreptomina; Hyg<sup>r</sup>, resistencia a higromicina.

Tabla 5. Plásmidos utilizados en el presente trabajo de tesis.

Plásmido	Genotipo relevante y/o información	Referencia
pCR BluntII TOPO	Vector utilizado para el clonado de productos de PCR, Km <sup>r</sup>	Invitrogen
pET24b (+)	Fagémido para la expresión de proteínas recombinantes bajo control de señales de transcripción y traducción fuertes (Km <sup>r</sup> lacZ')	Novagen
pFR3	pET24a(+) con el gen <i>Rv3208</i> como fusión a una cola de seis histidinas ( <i>his<sub>6</sub></i> ) N-terminal, bajo control del promotor T7, Km <sup>r</sup>	Esta tesis
pMR24	Vector derivado del pMV306 [131], conteniendo el gen <i>mabR<sub>MT</sub></i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv fusionado a una cola <i>his<sub>6</sub></i> N-terminal, bajo control del promotor inducible por acetamida <i>Pami</i> , Km <sup>r</sup>	[109]
pFR5	Vector derivado del pMV306 [131], conteniendo el gen <i>fasR<sub>MT</sub></i> fusionado a una cola <i>his<sub>6</sub></i> N-terminal, bajo control del promotor inducible por acetamida <i>Pami</i> , Km <sup>r</sup>	Esta tesis
pJAM2	Vector de expresión de <i>Mycobacterium</i> , que contiene el promotor inducible por acetamida <i>Pami</i> , <i>oriM</i> , Km <sup>r</sup>	[132]
pFR9	pJAM2 con <i>his<sub>6</sub>-fasR<sub>MT</sub></i> bajo control del promotor inducible por acetamida <i>Pami</i> , Km <sup>r</sup>	Esta tesis
pHP45Ωhyg	Contiene el cassette de <i>hyg</i> que confiere resistencia a Higromicina (Hyg <sup>r</sup> )	[133]
pTOPO1	Vector derivado del pCR BluntII TOPO con sitios <i>EcoRI</i> religados y cassette de <i>hyg</i> clonado en sitios <i>BamHI</i> , Km <sup>r</sup>	Esta tesis
pTOPO2	Vector derivado del pTOPO1 con un fragmento de 950 pb correspondiente a la región 3' del gen <i>fasR<sub>MS</sub></i> clonado en los sitios <i>SpeI/XhoI</i> , Km <sup>r</sup>	Esta tesis
pTOPO3	Vector derivado del pTOPO2 con un fragmento de 857 pb correspondiente a la región 5' del gen <i>fasR<sub>MS</sub></i> clonado en el sitio <i>KpnI</i> , Km <sup>r</sup>	Esta tesis
pPR27	Vector con origen de replicación para <i>E. coli</i> ( <i>oriE</i> ) y <i>Mycobacterium</i> ( <i>oriM temp<sup>s</sup></i> ), <i>sacB</i> , <i>xyIE</i> , Gm <sup>r</sup>	[134]
pFR13	Vector derivado del pPR27 que contiene <i>fasR<sub>MS</sub>::hyg</i> , Gm <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	Esta tesis
pFRA42B	Vector derivado del pFRA40; <i>Psmyc-tetR</i> (→); <i>PfurA102tetOpip</i> (→); <i>Pptr-lacZ</i> ; <i>int</i> ; Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	[135]
pBB22	Vector derivado del pMP349 [136] con origen de replicación para <i>E. coli</i> ( <i>oriE</i> ) y <i>Mycobacterium</i> ( <i>oriM</i> ) que permite la	Cedido por Bazet Lyonnet

	expresión de genes bajo el control del promotor <i>ptr</i> ( <i>Pptr</i> ) del pFRA50 [135], Am <sup>r</sup>	
<b>pFR40</b>	Vector derivado de pBB22 que contiene el gen <i>fasR<sub>MS</sub></i> bajo el control del <i>Pptr</i> , Am <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>pFR20</b>	Vector derivado del pPR27 que contiene <i>Pptr-5'fasR<sub>MS</sub></i> , Gm <sup>r</sup> Am <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>pFR42</b>	Vector derivado de pBB22 que contiene el gen <i>fas<sub>MS</sub></i> bajo el control del <i>Pptr</i> , Am <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>pFR18</b>	Vector derivado del pPR27 que contiene <i>Pptr-5'fas<sub>MS</sub></i> , Gm <sup>r</sup> Am <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>pGA80</b>	Vector suicida derivado del pMV261 [131] que provee la integrasa ( <i>int</i> ) necesaria para la inserción sitio específica de un plásmido en el sitio <i>attB</i> cromosomal del micobacteriófago L5 [137], Km <sup>r</sup>	Cedido por la Dra. Claudia Sala
<b>pGA44</b>	Vector integrativo <i>Psmyc-tetR</i> (→); <i>PfurA102tetOpip</i> (→), <i>Pptr</i> ; carece del gen <i>int</i> y en consecuencia requiere de la integrasa expresada a partir del pGA80, Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	Cedido por la Dra. Claudia Sala
<b>pFR33</b>	Vector derivado del pGA44 que contiene <i>Pptr:fasR<sub>MT</sub></i> , Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>pJG1100</b>	Vector suicida, Km <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup> , <i>sacB</i>	[138]
<b>pFR34</b>	Vector derivado del pJG1100 que contiene clonado un fragmento de 940 pb correspondiente a la región 5' del gen <i>fasR<sub>MT</sub></i> , <i>sacB</i> , Km <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>pFR35</b>	Vector derivado del pJG1100 que contiene clonado un fragmento correspondiente a las regiones 5' y 3' del gen <i>fasR<sub>MT</sub></i> , para la búsqueda de una mutante nula de <i>M. tuberculosis</i> en este gen, <i>sacB</i> , Km <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>pSM128</b>	Vector integrativo de <i>Mycobacterium</i> para la construcción de fusiones transcripcionales al gen <i>lacZ</i> , por clonado en el sitio único <i>Scal</i> , que contiene el gen de la integrasa del micobacteriófago L5 ( <i>int</i> ), Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	[139]
<b>pFR47</b>	Vector derivado del pSM128 que contiene una fusión transcripcional del <i>Pfas<sub>MT</sub></i> al gen <i>lacZ</i> , Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>pFR48</b>	Vector derivado del pSM128 que contiene una fusión transcripcional del <i>Pfas<sub>MT</sub></i> mutado (Mut1) al gen <i>lacZ</i> , Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>pFR49</b>	Vector derivado del pSM128 que contiene una fusión transcripcional del <i>Pfas<sub>MT</sub></i> mutado (Mut2) al gen <i>lacZ</i> , Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	Esta tesis
<b>pFR50</b>	Vector derivado del pSM128 que contiene una fusión transcripcional del <i>Pfas<sub>MT</sub></i> mutado (Mut3) al gen <i>lacZ</i> , Sm <sup>r</sup> /Sp <sup>r</sup>	Esta tesis



<b>pFR51</b>	Vector derivado del pSM128 que contiene una fusión transcripcional del <i>Pfas<sub>MT</sub></i> mutado (Mut4) al gen <i>lacZ</i> , <i>Sm<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup></i>	Esta tesis
--------------	---	------------

Gm<sup>r</sup>, resistencia a gentamicina, Km<sup>r</sup>, resistencia a kanamicina; Am<sup>r</sup>, resistencia a apramicina; Sm<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup>, resistencia a estreptomomicina/espectinomicina; Hyg<sup>r</sup>, resistencia a higromicina.

## 2.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano

Para el crecimiento de *M. smegmatis* en cultivo líquido se utilizó medio Middlebrook 7H9 (Difco) suplementado con 0.2% glicerol y 0.03% Tyloxapol. Cuando se indica se utilizó medio Luria Bertani (LB) con 0.025% Tyloxapol y medio Sauton con 0.025% Tyloxapol. Para el crecimiento en medio sólido se utilizó Middlebrook 7H10 agar (Difco) suplementado con 0.5% glicerol. Para la contraselección utilizando el marcador *sacB* se suplementó el medio sólido con 10% sacarosa. *M. tuberculosis* H37Rv se creció en medio Middlebrook 7H9 suplementado con 0.2% glicerol, 0.05% Tween 80 y 10% Middlebrook ADC (albúmina-dextrosa-catalasa). Para el crecimiento en medio sólido se utilizó Middlebrook 7H10 agar suplementado con 0.5% glicerol y 10% OADC (ácido oleico-albúmina-dextrosa-catalasa). Para la contraselección utilizando el marcador *sacB* se suplementó el medio sólido con 2.5% sacarosa. Para la propagación de *E. coli* en cultivo líquido se utilizó medio LB. Para su crecimiento en cultivo sólido, el mismo medio se suplementó con 2% agar.

En cada caso, una colonia de la cepa bacteriana en estudio se inoculó en medio de cultivo líquido y se incubó con agitación constante a la temperatura apropiada. Cuando este inóculo inicial llegó a saturación (1 día para las células de *E. coli* hasta 3-7 días para *M. smegmatis*) se diluyó 1:200 en medio fresco. El volumen de medio de cultivo en ningún caso superó la quinta parte del recipiente. La concentración final de los antibióticos empleados para el cultivo de los diferentes microorganismos se detalla en la Tabla 6.

La composición de los medios se detalla a continuación:

Luria Bertani (LB) [129]: 10 g Peptona de caseína, 5 g Extracto de levadura, 5 g NaCl, y H<sub>2</sub>O csp. 1 l. Llevar a pH 7 con NaOH.

Sauton: 0.5 g Fosfato Monopotásico, 0.5 g Sulfato de Magnesio, 0.4 g L-Asparagina, 60 ml Glicerol, 0.05 g Citrato Férrico de Amonio, 2 g Ácido Cítrico, 0.1 ml Sulfato de Zinc 1%, y H<sub>2</sub>O csp. 900 ml. Llevar a pH 7 con NaOH.

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 H<sub>2</sub>O.

ADC (BBL Middlebrook ADC Enrichment-Difco): 20 g Glucosa, 50 g Albúmina sérica bovina, 8.5 g NaCl, 0.03 g Catalasa, y H<sub>2</sub>O csp 1 l.

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 H<sub>2</sub>O.

OADC (BBL Middlebrook OADC Enrichment-Difco): 20 g Glucosa, 50 g Albúmina sérica bovina, 8.5 g NaCl, 0.03 g Catalasa, 0.6 ml Ácido oleico, y H<sub>2</sub>O csp 1 l.

**Tabla 6. Concentración de los antibióticos empleados**

Antibiótico	<i>E. coli</i>	<i>Mycobacterium</i>
<b>Kanamicina (Km)</b>	50 µg ml <sup>-1</sup>	15 µg ml <sup>-1</sup>
<b>Espectinomycin (Sp)</b>	100 µg ml <sup>-1</sup>	—
<b>Estreptomycin (Sm)</b>	—	20 µg ml <sup>-1</sup>
<b>Gentamicina (Gm)</b>	20 µg ml <sup>-1</sup>	5 µg ml <sup>-1</sup>
<b>Higromicina (Hyg)</b>	200 µg ml <sup>-1</sup>	50 µg ml <sup>-1</sup>
<b>Apramicina (Am)</b>	50 µg ml <sup>-1</sup>	50 µg ml <sup>-1</sup>

## 2.3 Transformación de las cepas bacterianas

### 2.3.1 Transformación de *E. coli*

Las células de *E. coli* se transformaron de acuerdo a Sambrook y colaboradores [129]. 10 ml de un cultivo crecido a 37 °C hasta fase logarítmica (DO<sub>600</sub> 0.5) se

recolectó por centrifugación (10 min, 2000 g, 4 °C). Las células correspondientes a 1 ml de cultivo se lavaron con 0.5 ml de Solución 1 de transformación estéril (10 mM MOPS pH 7 y 10 mM KCl). Posteriormente se resuspendieron en 0.5 ml de Solución 2 (100 mM MOPS pH 6.5, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 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 µl, y la mezcla se incubó 1 h a 4 °C. El choque térmico se realizó durante 1 min a 42 °C, con posterior incubación durante 2 min a 4 °C. Las células se recuperaron a 37 °C en 1 ml de medio LB durante 30 min a 1 h. Las transformantes se sembraron en medio LB agar con los antibióticos apropiados para su selección.

### **2.3.2 Transformación de *M. smegmatis***

50 ml de un cultivo fresco de *M. smegmatis* crecido en medio 7H9 hasta fase logarítmica (DO<sub>600</sub> 0.5-1) se incubó durante 20 min en hielo. Las células se recolectaron por centrifugación (10 min, 2000 g, 4 °C) y se lavaron dos veces con 1 volumen de glicerol 10% estéril y frío. Posteriormente el precipitado celular se resuspendió en 1:10 del volumen inicial de glicerol 10% frío y se dividió en alícuotas de 400 µl cada una para ser conservadas a -80 °C. Para la transformación, las células se incubaron a 4 °C con aproximadamente 1 µg de ADN durante 10 min, en una cubeta de electroporación de 0.2 cm (BioRad). La electroporación se realizó a un pulso de 2.5 kV, 25 µF y 1000 Ω [140], e inmediatamente después las células se recuperaron en 3 ml de medio LB con agitación a la temperatura adecuada para la replicación del plásmido (30 o 37 °C según el caso), durante 3 h. Las transformantes se seleccionaron por siembra en placas de LB agar con los antibióticos correspondientes, e incubación a la misma temperatura (30-37 °C) durante 5-7 días.

### **2.3.3 Transformación de *M. tuberculosis***

Las células de 50 ml de un cultivo fresco de *M. tuberculosis* crecido en medio 7H9-ADC hasta fase logarítmica (DO<sub>600</sub> 0.4-0.6), se recolectaron por centrifugación (10 min, 2000 g, temperatura ambiente) y se sometieron a dos lavados sucesivos con 1 y 0.5 volúmenes de glicerol 10% estéril a temperatura ambiente. El precipitado celular resultante se resuspendió en 1:100 del volumen inicial de glicerol 10% a temperatura

ambiente y se dividió en alícuotas de 200  $\mu$ l. Para la transformación, las células se incubaron con un máximo de 1  $\mu$ g de ADN durante 10 min a temperatura ambiente, en una cubeta de electroporación de 0.2 cm (BioRad). La electroporación se realizó a un pulso de 2.5 kV, 25  $\mu$ F y 1000  $\Omega$  [140], e inmediatamente después las células se recuperaron en 1 ml de medio 7H9-ADC con agitación a la temperatura adecuada para la replicación del plásmido, durante toda la noche. Las transformantes se seleccionaron por siembra en medio 7H10 con los antibióticos correspondientes, e incubación a la misma temperatura durante 3 a 6 semanas.

### **2.4 Manipulación de ADN y construcción de plásmidos**

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

El tratamiento del ADN con enzimas de restricción, fosfatasa alcalina y T4 ADN ligasa, se realizó según Sambrook y colaboradores [129] y siguiendo las recomendaciones de los manuales de los proveedores de las enzimas utilizadas.

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

La separación de fragmentos de ADN por electroforesis en geles de agarosa se realizó según Sambrook y colaboradores [129]. 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% xilencianol y 30% glicerol) y la corrida electroforética se realizó a corriente constante de 90 mA. Los fragmentos de ADN fueron visualizados por tinción con GelGreen™ (Biotium) y visualización en un transiluminador con luz azul (excitación a 488 nm).

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

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

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

Para la determinación de la secuencia de fragmentos de ADN se utilizó el servicio de secuenciación de la Universidad de Maine (DNA Sequence Facility-UMaine, Maine, USA). Los alineamientos de secuencias y análisis de árboles filogenéticos se realizaron utilizando los programas ClustalW [141] y MEGA versión 6 [142].

#### **2.4.5 Extracción de ADN**

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

Las células de 10 ml de un cultivo de *M. smegmatis* ( $DO_{600}$  0.8-1) se recolectaron por centrifugación (2000 g, 20 min). El precipitado celular se lavó con 1 ml de solución GTE (50 mM Glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8 y 10 mM EDTA) y se resuspendió en 450  $\mu$ l de la misma. Se agregaron 50  $\mu$ l de lisozima 10 mg ml<sup>-1</sup> y se incubó a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, a la suspensión se le adicionó 100  $\mu$ l de SDS 10% y 50  $\mu$ l de proteinasa K 10 mg ml<sup>-1</sup>, y se incubó durante 30 min a 55 °C. Posteriormente, se le agregó 330  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y 410  $\mu$ l NaCl 5 M, se agitó por inversión y se centrifugó durante 15 min a 10000 g. El sobrenadante se traspasó a un nuevo tubo y se trató dos veces con un volumen de una mezcla cloroformo:isoamílico (24:1), mezclando y centrifugando en cada etapa 10 min a 10000 g. El ADN se precipitó a partir de la fase acuosa recuperada tras el último paso de centrifugación, mediante el agregado de 0.7 volúmenes de isopropanol e incubación de la muestra a -20°C durante toda la noche. El precipitado de ADN se recuperó por centrifugación (15000 g, 20 min, 4 °C) y se lavó con 500  $\mu$ l de etanol 70% frío. Finalmente, el ADN obtenido se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua milli-Q estéril y se incubó un día en heladera para su completa solubilización. El ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso.

##### **2.4.5.2 Extracción de ADN genómico de *M. tuberculosis***

Las células de 10 ml de un cultivo de *M. tuberculosis* ( $DO_{600}$  0.8-1) se recolectaron por centrifugación (2000 g, 15 min) y el precipitado celular se resuspendió en 250  $\mu$ l de solución SET (25% Sacarosa, 50 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl pH 8). Se agregaron 50  $\mu$ l de lisozima 20 mg ml<sup>-1</sup> y se incubó a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se le adicionó 10  $\mu$ l de ARNasa A 10 mg ml<sup>-1</sup> y se incubó

nuevamente durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se agregó 250 µl de una solución de proteinasa (0.5% SDS, 400 µg ml<sup>-1</sup> proteinasa K y 100 mM Tris-HCl pH 8) y se incubó durante 2 h a 55 °C. La mezcla se trató una vez con un volumen de una mezcla fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y una vez con un volumen de una mezcla cloroformo:isoamílico (24:1), mezclando y centrifugando cada vez durante 5 min a 10000 g. El ADN se precipitó a partir de la fase acuosa recuperada tras el último paso de centrifugación por agregado de un volumen de isopropanol y 1:10 de volumen de NaAc 3 M, incubando la muestra a -20 °C durante toda la noche. Tras un paso de centrifugación (15000 g, 20 min), el ADN recuperado se lavó una vez con 500 µl de etanol 70% frío, se resuspendió en 40 µl de solución TE (10 mM Tris-HCl pH 8 y 1 mM EDTA) y se incubó 10 min a 55 °C para su completa solubilización. El ADN se almacenó a -20 °C hasta su uso.

#### 2.4.5.3 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. Para la obtención de ADN plasmídico de buena calidad y en concentraciones elevadas necesario para la transformación de micobacterias, se utilizó el kit comercial GenElute™ HP Plasmid Midiprep (Sigma), según indicaciones del proveedor. Los plásmidos obtenidos en un volumen final de 1 ml se concentraron por precipitación con 0.7 volúmenes de isopropanol y 1:10 volumen de NaAc 3M pH 5.2, y posterior resuspensión en 40 µl de agua milli-Q estéril. El ADN plasmídico se recuperó en concentraciones de 1-5 µg µl<sup>-1</sup>.

#### 2.4.6 Construcción de plásmidos

**pFR3.** *fasR*<sub>MT</sub> (*Rv3208*) se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv utilizando los oligonucleótidos F-Rv3208 (5'-CATATGAGCGATCTCGCCAAGACA-3') que introduce un sitio *NdeI* en el codón de inicio de la traducción del gen *fasR*, y R-Rv3208 (5'-GAATTCCTACGAGCGGGTAAGCGG-3') que introduce un sitio *EcoRI* al final del marco abierto de lectura. Para construir una fusión del gen *fasR*<sub>MT</sub> a una cola de seis histidinas (*his*<sub>6</sub>) N-terminal, el producto de PCR

obtenido se digirió con *NdeI* y *EcoRI*, y el fragmento se clonó dentro del pET24b (+) cortado con *NdeI/EcoRI*, dando lugar al vector pFR3.

**pFR9.** Para expresar *fasR<sub>MT</sub>* en un plásmido multicopia en *M. smegmatis*, el vector pFR3 se digirió con *NdeI* y *EcoRI*, y el fragmento obtenido se clonó dentro del vector pMR24 [109] derivado del pMV306 [131] digerido previamente con las mismas enzimas, dando lugar al pFR5. El plásmido pFR5 se digirió con las enzimas *KpnI* y *XbaI*, y el fragmento, conteniendo *fasR<sub>MT</sub>* como fusión a una cola *his<sub>6</sub>* N-terminal bajo control del promotor inducible por acetamida *Pami*, se clonó dentro del pJAM2 [132, 143] cortado *KpnI/XbaI* dando origen al plásmido pFR9.

**pFR13.** Para la construcción del alelo mutante *fasR<sub>MS</sub>::hyg* de *M. smegmatis*, el cassette de resistencia a Hyg (*hyg*) se obtuvo a partir del vector pHP45Ω*hyg* [133] por digestión con *BamHI* y ligación al sitio *BamHI* de un vector derivado del pCR BluntII TOPO (Invitrogen) con los sitios *EcoRI* religados, dando lugar al plásmido pTOPO1. Un fragmento de 950 pb, incluyendo la región 3' de *fasR<sub>MS</sub>* más 828 pb corriente arriba de este marco abierto de lectura, se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, utilizando los oligonucleótidos 1935\_3up: (5'-ATACGGACTAGTCGCGCTACTGGCTCAACAAC-3') y 1935\_4down: (5'-ATGCGCTCGAGCCACCCCGGCGACCCAGAT-3'). El producto de PCR se digirió con *SpeI/XhoI* y se clonó en el vector pTOPO1 digerido con las mismas enzimas, para generar pTOPO2. Un fragmento de 857 pb, incluyendo la región 5' de *fasR<sub>MS</sub>* junto a 799 pb corriente abajo de este marco abierto de lectura, se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, utilizando los oligonucleótidos 1935\_1up: (5'-TATGGCGGTACCTCTAGACCGAACGGCGTGGTGTCC-3') y 1935\_2down: (5'-TAACGGGGTTACCGCGCTTTTCGCCTCTCCTC-3'). El producto de PCR obtenido se digirió con *KpnI* y se clonó en el vector pTOPO2 digerido con la misma enzima, para generar pTOPO3. Finalmente, el constructo utilizado para el intercambio alélico se obtuvo por transferencia del fragmento de 4.1 kb del pTOPO3 digerido con *XbaI*, conteniendo *fasR<sub>MS</sub>::hyg*, al vector pPR27 digerido con la misma enzima [134] dando origen al pFR13.

**pFR18.** Para la construcción de la mutante condicional de *M. smegmatis* *Pptr:fas<sub>MS</sub>*, la región 5' de *fas<sub>MS</sub>* se amplificó con los oligonucleótidos FasMS-FNsil (5'-

TGGATGCATGTGACGATCTACGAACACGA-3') y FasMS-RXbal (5'-GGTCTAGACTGCAGCTTCCACAGGTAGG-3'). El producto de PCR de 1517 pb se clonó en el vector pCR BluntII TOPO (Invitrogen) y se digirió con *NsiI/XbaI*. El fragmento obtenido se insertó en el vector pBB22 (cedido por Bazet-Lyonnet), derivado del pMP349 [136] que contiene el promotor *Pptr* obtenido a partir del pFRA50 clonado en los sitios *EcoRI/PvuII* [135], obteniendo el plásmido pFR42. Este plásmido fue secuenciado para corroborar que no se haya incorporado ningún error durante el paso de amplificación. Finalmente, pFR42 se digirió con *SpeI/XbaI* y se clonó en los mismos sitios del plásmido termosensible (*ts*) pPR27 [134], generando el plásmido pFR18. Este vector se utilizó para obtener la cepa mutante de *M. smegmatis* MSP*ptr:fas<sub>MS</sub>*. El evento correcto de recombinación homóloga en la mutante condicional MSP*ptr:fas<sub>MS</sub>* se chequeó por PCR utilizando el oligonucleótido *Pptr* (5'-TCTAGAGTAGATCTCCATCCTGACG-3') que hibrida sobre el *Pptr* y un oligonucleótido interno al gen *fas<sub>MS</sub>*, el cual hibrida por fuera del sitio de posible recombinación: P5 (5'-CTGATGCCGACCTCGTTGAGT-3'). Como control el ADN genómico se amplificó también con el oligonucleótido FasMS-RXbal, indicado anteriormente.

**pFR20.** Para la construcción de la mutante condicional de *M. smegmatis* *Pptr:fasR<sub>MS</sub>*, la región 5' de *fasR<sub>MS</sub>* se amplificó con los oligonucleótidos FasRMS-FNsiI (5'-TGCATGCATATGAGCGATCTCGCCAACAC-3') y FasRMS-RXbal (5'-CCTCTAGACGATGAAATCGAAGAACGCCT-3'). El producto de PCR de 372 pb se clonó en el vector pCR BluntII TOPO (Invitrogen) y el plásmido obtenido se digirió con *NsiI/XbaI*. El fragmento se insertó en el vector pBB22 (cedido por Bazet-Lyonnet), derivado del pMP349 [136] que contiene el promotor *Pptr* obtenido a partir del pFRA50 clonado en los sitios *EcoRI/PvuII* [135], obteniendo el plásmido pFR40. Este plásmido fue secuenciado para corroborar que no se haya incorporado ningún error durante el paso de amplificación. Finalmente, pFR40 se digirió con *SpeI/XbaI* y se clonó en los mismos sitios del plásmido termosensible (*ts*) pPR27 [134], generando el plásmido pFR20. Este vector se utilizó para obtener la cepa mutante de *M. smegmatis* MSP*ptr:fasR<sub>MS</sub>*. El evento correcto de recombinación homóloga en la mutante condicional MSP*ptr:fasR<sub>MS</sub>* se chequeó por PCR utilizando el oligonucleótido *Pptr* (5'-TCTAGAGTAGATCTCCATCCTGACG-3') que hibrida sobre el *Pptr* y dos oligonucleótidos internos al gen *fasR<sub>MS</sub>*, los cuales hibridan por fuera del sitio de posible recombinación:



P1 (5'-GAATTCCTAGGAGCGTGTGAGCGG-3') y P3 (5'-ATCAGATCGAACACGGCATC-3'). Como control el ADN genómico se amplificó también con el oligonucleótido FasRMS-RXbaI, indicado anteriormente.

**pFR33.** Para la construcción del plásmido complementante utilizado en la búsqueda de la mutante condicional de *M. tuberculosis* en *fasR<sub>MT</sub>*, el vector pFR3 se digirió con *XbaI*/*EcoRI* y el fragmento resultante de 660 pb se clonó en el plásmido pGA44 (cedido por la Dra. Claudia Sala) digerido con las enzimas *AvrII*/*MfeI*. El vector resultante, pFR33 es un plásmido integrativo que presenta al gen *fasR<sub>MT</sub>* bajo control del promotor *ptr* y el sistema TetR/Pip OFF necesario para regular su expresión.

**pFR35.** Para la construcción del alelo mutante  $\Delta fasR_{MT}$  de *M. tuberculosis*, un fragmento de 946 pb, incluyendo la región 5' de *fasR<sub>MT</sub>* más 882 pb corriente arriba de este marco abierto de lectura, se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv, utilizando los oligonucleótidos 3208\_1up (5'-CTCGAGCCGGAATTCGTAGCC-3') y 3208\_2down (5'-CATATGGAGCGCTGCCGGACGATCTG-3'). El producto de PCR se clonó en el vector pCR BluntII TOPO (Invitrogen) y se digirió, primero con *EcoRV*, y posteriormente con *XhoI*/*NdeI*. El fragmento resultante de 940 pb se clonó en el vector suicida pJG1100 [138] digerido con las mismas enzimas *XhoI*/*NdeI*, para generar pFR34. Un fragmento de 883 pb, incluyendo la región 3' de *fasR<sub>MT</sub>* junto a 784 pb corriente abajo de este marco abierto de lectura, se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv, utilizando los oligonucleótidos 3208\_3up (5'-CATATGAAGCCGATTTCCAAGTCCGAC-3') y 3208\_4down (5'-ACTAGTTGCCACCGTGGTGACCGTCTC-3'). El producto de PCR obtenido se clonó en el vector pCR BluntII TOPO (Invitrogen) y se digirió, primero con *EcoRI*, y posteriormente con *NdeI*/*SpeI*. El fragmento resultante de 877 pb se clonó en el vector pFR34 digerido con las mismas enzimas *NdeI*/*SpeI*, para generar pFR35. Este plásmido se utilizó para la búsqueda de la mutante nula de *M. tuberculosis* en *fasR<sub>MT</sub>*. El primer evento de recombinación homóloga se chequeó por PCR de colonia utilizando los pares de oligos U1 (5'-CCGCCGAACGACGGTTGTAG-3')-D1 (5'-CCTCGACGGCGTCGGACTTGG-3'), y U2 (5'-ATGAGCGATCTCGCCAAGACA-3')-D2 (5'-TTCGCGTCGGCACGGTAGTAG-3'). Las colonias que cursaron un segundo evento de recombinación homóloga correcto se

identificaron inicialmente por PCR de colonia utilizando los oligos SONIA-MUT FasR-F (5'-CCGATGCCGCAGGTAGTAATGTCA-3') y SONIA-MUT FasR-R (5'-CCTGCCGGCGGATGGGGTGTCTG-3').

**pFR47.** El fragmento conteniendo la región promotora *Pfas<sub>MT</sub>* utilizada para los ensayos de β-galactosidasa como fusión al gen *lacZ*, se generó por amplificación por PCR a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv, utilizando los oligonucleótidos N2fasIMTprom (5'-CATAACGATTTGATAACAAAACACTGC-3') y CfasIMTprom (5'-CACCCGGTCGTGCTCGTGGATCGTC-3'). El fragmento amplificado de 398 pb se digirió con *EcoRI*, se completó con Klenow y se ligó al sitio *ScaI* del vector integrativo pSM128 [139] generando el plásmido reportero de micobacterias, pFR47. El vector pSM128 contiene una fusión *cII-lacZ*, el gen que codifica para la integrasa del micobacteriófago L5, sitios de inserción *att*, y un cassette de resistencia a estreptomicina/espectinomicina (*Sm<sup>r</sup>/Sp<sup>r</sup>*). El fragmento clonado se analizó por secuenciación para confirmar tanto la identidad del producto amplificado como la correcta fusión transcripcional del inserto al gen *lacZ* sin promotor del vector pSM128.

**pFR48-51.** Versiones sintéticas de la región promotora *Pfas<sub>MT</sub>* con sitios flanqueantes *ScaI* y el reemplazo de alguno o ambos de los sitios de unión de la proteína FasR<sub>MT</sub> (RI) por una secuencia no relacionada, se obtuvieron a partir de Epoch Biolabs. Las mismas fueron clonadas en el vector pBluescript-SK dando lugar a pBSK-*Mut1* (reemplazo de ambas RIs salvajes presentes en la región protegida 1 5'-TACCCGTACGTAGAACTCGCCAGTA-3' por la secuencia diseñada al azar 5'-CGAATTATGAGCTCGTAACATGAGC-3'), pBSK-*Mut2* (reemplazo de la RI salvaje presente en la región protegida 2 5'-TACTCCACCGTA-3' por 5'-CGAATTATGAGC-3'), pBSK-*Mut3* (reemplazo de las tres RIs salvajes identificadas, por las secuencias indicadas previamente) y pBSK-*Mut4* (reemplazo de la RI salvaje más próxima al sitio de inicio de la transcripción del gen *fas<sub>MT</sub>*, presente en la región protegida 1, 5'-AACTCGCCAGTA-3' por la secuencia diseñada al azar 5'-CGAATTATGAGC-3'). Los fragmentos utilizados para la fusión transcripcional al gen *lacZ*, se generaron por digestión de los plásmidos pBSK-*Mut1*, pBSK-*Mut2*, pBSK-*Mut3* y pBSK-*Mut4* con *ScaI*. Cada fragmento se ligó al sitio *ScaI* del vector integrativo pSM128 [139] generando los plásmidos reporteros micobacterianos pFR48, pFR49, pFR50 y pFR51 respectivamente. Los fragmentos

clonados se analizaron por secuenciación para confirmar tanto la identidad del producto sintetizado como la correcta fusión transcripcional de los insertos al gen *lacZ* sin promotor del vector pSM128.

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

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l, utilizando 20 pmol de cada oligonucleótido cebador y aproximadamente 5 pmol de ADN molde. Para la PCR de colonia, se recuperó una colonia bacteriana en 10  $\mu$ l de agua y se incubó a 100 °C durante 5 min (en el caso de *E. coli*) o 1 h (en el caso de *M. tuberculosis*); 5-7  $\mu$ l del extracto resultante se utilizó como molde en la reacción de amplificación. Se emplearon las ADN polimerasas Taq, Pfu (PB-L, Productos BioLógicos) 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 correspondiente al par de cebadores empleados) y polimerización (el tiempo adecuado según el largo del fragmento a amplificar, 72 °C); y una extensión final de 10 min a 72 °C.

#### 2.4.8 Ensayos de retardo de la movilidad electroforética en gel (EMSA)

##### 2.4.8.1 EMSA con extractos proteicos libres de células

Las células en 15 ml de un cultivo en fase exponencial de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 se lavaron y se lisaron por sonicación (10 pulsos, 30 s ON y 30 s OFF, 20% amplitud, 4 °C) en 0.3 ml de solución de lisis [50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 20% (v/v) glicerol, 1 mM DTT y 1 mM PMSF]. El extracto obtenido se clarificó por centrifugación (23000 g, 30 min, 4 °C) y el sobrenadante resultante fue utilizado para determinar la capacidad de unión de las proteínas allí presentes a las regiones promotoras *Pfas<sub>MS</sub>* (448 pb) o *Pfas<sub>MT</sub>* (398 pb). Los fragmentos promotores utilizados en estos ensayos se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de *M. smegmatis* con oligonucleótidos N2fasI MS (5'-GATAACGATTAGATAACAATGCTGC-3') y CfasI MS (5'-GTCGTGTTTCGTAGATCGTCACTGGG-3'), o a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv con oligonucleótidos N2fasIMTprom (5'-CATAACGATTTGATAACAAAACACTGC-3') y CfasIMTprom (5'-CACCCGGTCGTGCTCGTGGATCGTC-3'). Ambos oligonucleótidos, N2fasI MS y N2fasIMTprom, fueron marcados en su extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci

mmol<sup>-1</sup>) utilizando la enzima T4 polinucleótido quinasa (NEB) y purificados usando las columnas de desalado Zeba™ Spin Desalting Columns (Pierce chemical). Los productos de PCR se purificaron a partir de geles de agarosa al 2% (p/v) y su actividad específica fue determinada utilizando un contador de centelleo. Concentraciones crecientes de extractos proteicos libres de células se incubaron con la correspondiente sonda marcada (6000 cpm) en un volumen total de 25 µl de solución de unión [25 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM PMSF, 5% (v/v) glicerol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl y 1 µg poli-dIdC] a temperatura ambiente durante 15 min. Los complejos ADN-proteína se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% (p/v) no desnaturalizantes en 1xTBE (89 mM Tris Base; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), 5%(v/v) glicerol a 150 V a 4 °C, y se visualizaron y digitalizaron con un escáner Storm167 840 (Amersham).

El ADN competidor específico y no específico no marcado (en un exceso molar de 85 veces) se incubó con 52 µg de extracto proteico crudo durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de la adición de la sonda marcada e incubación por 15 min a temperatura ambiente. Los complejos resultantes ADN-proteína se sometieron a electroforesis. Los resultados se visualizaron y digitalizaron con un escáner Storm167 840 (Amersham).

#### **2.4.8.2 EMSA con la proteína purificada His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub>**

La proteína recombinante purificada His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> se utilizó para determinar su capacidad de unión a la región promotora *Pfas<sub>MT</sub>* (398 pb). El fragmento de ADN del promotor (*Pfas<sub>MT</sub>*) utilizado en estos ensayos fue generado como se indica previamente. Una vez purificado de un gel de agarosa al 2% (p/v), la sonda marcada con <sup>32</sup>P (3000 cpm) se incubó con concentraciones diferentes de His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> en un volumen total de 25 µl de solución de unión a temperatura ambiente durante 15 min. Cuando se indica, un acil-CoA, acil-ACP o ácido graso se adicionó a la solución de unión y se incubó con la proteína durante 5 min a 4 °C antes de la adición de la sonda marcada. Los complejos ADN-proteína se resolvieron por electroforesis en un gel no desnaturalizante 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). Las soluciones stock de los compuestos fueron preparadas a una concentración final de 0.1 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 Tris-HCl 100 mM pH 7.4.

El ADN competidor específico y no específico no marcado (en un exceso molar de 60 veces) se incubó con His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de la adición de la sonda marcada e incubación por 15 min a temperatura ambiente. Los complejos resultantes ADN-proteína se sometieron a electroforesis. Los resultados se visualizaron y digitalizaron con un escáner Storm167 840 (Amersham).

Para analizar la capacidad de unión de la proteína a las regiones promotoras mutadas *Pfas<sub>MT</sub>* (Mut1, Mut2, Mut3 y Mut4), los fragmentos de ADN de 371 pb utilizados en el ensayo se generaron mediante amplificación por PCR a partir de los plásmidos *pBSK-Mut1-4* (ver construcción de los plásmidos pFR48-51), con oligonucleótidos N2fasIMTprom (5'-CATAACGATTTGATAACAAAAGTGC-3') marcados en su extremo 5' con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, y CfasIMTpromMUT (5'-GGTCTATGTCTCCCTATGTGCATC-3'). En la sonda Mut1, las dos Ris presentes en la región protegida 1 fueron reemplazadas por la secuencia diseñada al azar 5'-CGAATTATGAGCTCGTAACATGAGC-3'; en la sonda Mut2, la RI presente en la región protegida 2 fue reemplazada por la secuencia diseñada al azar 5'-CGAATTATGAGC-3'; en la sonda Mut3, las tres RIs fueron reemplazadas por las mismas secuencias diseñadas al azar indicadas anteriormente, y en la sonda Mut4, la RI más próxima al sitio de inicio de la transcripción del gen *fas<sub>MT</sub>*, presente en la región protegida 1, fue reemplazada por la secuencia diseñada al azar 5'-CGAATTATGAGC-3'. Una vez purificadas del gel de agarosa, las sondas salvaje y mutadas marcadas radioactivamente (1000 cpm) se incubaron con 1.2  $\mu$ M His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> en un volumen total de 25  $\mu$ l de solución de unión a temperatura ambiente por 15 min. Los complejos ADN-proteína se visualizaron y digitalizaron como se indica previamente.

#### **2.4.9 Ensayo de protección a la DNasa I**

La región promotora *Pfas<sub>MT</sub>* marcada radioactivamente (50 000 cpm) se incubó a temperatura ambiente durante 15 min, con diferentes cantidades de la proteína purificada His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub>, en 25  $\mu$ l de solución de unión. Las concentraciones de proteína utilizadas fueron seleccionadas previamente de manera tal de que toda la sonda se

encuentre formando el complejo ADN-proteína. Seguidamente, el ADN fue parcialmente digerido con DNasa I (Promega) por 3 min a temperatura ambiente y la digestión se detuvo por adición de 204  $\mu\text{l}$  de solución de detención [20 mM EDTA pH 8, 200 mM NaCl, 100  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  ARN de levadura (Ambion, 7120G)] y 235  $\mu\text{l}$  de una mezcla fenol:cloroformo (1:1). Tras una precipitación con etanol, el precipitado se lavó con etanol 70% (v/v), se diluyó en 6  $\mu\text{l}$  de una solución de formamida, fue calentado hasta desnaturalización (2 min, 94 °C) y puesto inmediatamente en hielo. Los productos de la digestión fueron resueltos mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante [6% (p/v) poliacrilamida: bisacrilamida 38:2, 48% (p/v) urea, TBE 1X]. Reacciones de secuenciación apropiadas fueron sembradas en los geles junto a las muestras y usadas como marcador de tamaño para la identificación de las secuencias protegidas. Los resultados fueron visualizados y digitalizados con un escáner Storm167 840 (Amersham).

#### **2.4.10 Transferencia de ADN a membranas de nylon e hibridación con sondas marcadas (Southern blot)**

##### **2.4.10.1 Southern blot de la cepa mutante condicional *MS $\Delta$ fasR* pFR5**

10  $\mu\text{g}$  de ADN genómico de las cepas a analizar fueron digeridos toda la noche a 37 °C, con un exceso de *Pst*I. Los fragmentos resultantes fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 0.7% (p/v) y transferidos a una membrana de nylon (Hybond-N<sup>+</sup>, GE Healthcare) por capilaridad. Para ello, en primer lugar el gel de agarosa conteniendo los fragmentos de ADN a transferir se lavó con solución de depurinación (HCl 0.125 M) durante 10 min, con el fin de provocar una hidrólisis parcial de los fragmentos de mayor tamaño, mejorando la eficiencia de su transferencia y unión a la membrana. Seguidamente, el gel se lavó con agua destilada y el ADN se desnaturalizó por tratamiento con solución de desnaturalización (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH), durante 30 min. Luego de lavar el gel dos veces con agua destilada se lo neutralizó por lavado con solución de neutralización (0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl) durante 30 min. El gel tratado se colocó sobre un papel Whatman 3MM, dos de cuyos extremos deben estar sumergidos en la solución de transferencia [20xSSC (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M, pH 7)]. Sobre el gel se colocó la membrana, y sobre ella una columna de papel absorbente. Luego de 12-16 h se retiró la membrana y el ADN se

fijó por exposición de la misma a luz UV, durante 3 min. La sonda utilizada consistió de un fragmento de 933 pb correspondiente a la región 3' del gen *fasR<sub>MS</sub>* más el gen completo *MSMEG\_1934* amplificado por PCR usando los oligonucleótidos 1935\_3up (5'-ATACGGACTAGTCGCGCTACTGGCTCAACAAC-3') y 1935\_4down (5'-ATGCGCTCGAGCCACCCCGGCGACCCAGAT-3'). El marcado de la sonda se realizó con el sistema Prime-a-Gene labelling system (Promega) usando 5  $\mu$ Ci (185 MBq) [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP. El paso de prehibridación se realizó durante 2 h y la hibridación durante toda la noche, a 65 °C en solución de prehibridización [5xSSC, 5xDenhardt (Albúmina 0.1% p/v, ficoll 0.1% p/v, polivinilpirrolidona 0.1% p/v) y SDS 0.5% (p/v)]. Luego se hicieron tres lavados sucesivos de 15 min a 65 °C, dos de ellos con 2xSSC, 0.1% SDS, y el tercero con 1xSSC, 1% SDS. El filtro fue visualizado y digitalizado con un escáner Storm167 840 (Amersham).

#### 2.4.10.2 Southern blot de la cepa mutante condicional *Mtb* $\Delta$ *fasR* pFR33

10  $\mu$ g de ADN genómico de las cepas a analizar fueron digeridos toda la noche a 37 °C, con un exceso de *Xho*I. Los fragmentos resultantes fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 0.7 % (p/v) y transferidos a una membrana de nylon (Hybond-N<sup>+</sup>, GE Healthcare) por capilaridad como se indica previamente. Posteriormente, el ADN se fijó por exposición de la membrana a luz UV, durante 3 min. La sonda utilizada consistió de un fragmento de 594 pb corriente arriba del gen *fasR<sub>MT</sub>* amplificado por PCR usando los oligonucleótidos Southern\_1fasRTB (5'-GAACACTTTGACGGTGCCTTG-3') y Southern\_2fasRTB (5'-GGAATGACATTACTACCTGCG-3'). El marcado de la sonda, los pasos de prehibridación e hibridación, y la detección se realizó con el sistema DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter kit II (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante.

## 2.5 Análisis de proteínas

### 2.5.1 Aislamiento e identificación de FasR

Para la purificación de proteínas de unión a *Pfas* utilizamos una modificación del procedimiento descrito por Jourlin-Castelli y colaboradores [144]. Las células de

400 ml de un cultivo de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 crecido a 37 °C en medio 7H9 hasta una DO<sub>600</sub> de 0.9, se recolectaron por centrifugación (10000 g, 10 min, 4 °C), y se lavaron con solución A [20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% (v/v) glicerol] suplementada con 50 mM NaCl y 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). El precipitado celular se resuspendió en la misma solución y las células se rompieron por sonicación (10 pulsos, 30 s ON y 30 s OFF, 20% amplitud, 4 °C). Tras un paso de centrifugación (23000 g, 30 min, 4 °C) y posteriormente de ultracentrifugación (1 h, 160 000 g, 4 °C), el extracto crudo resultante se sometió a dos pasos de precipitación salina con sulfato de amonio (25% y 75% de saturación). El precipitado recuperado se resuspendió y se dializó contra la solución A para reducir la fuerza iónica. Simultáneamente se preparó una columna de estreptavidina, a la cual se adhirieron fragmentos de ADN conteniendo la región promotora *Pfas<sub>MS</sub>* de la siguiente manera. Una versión biotinilada de la región promotora de *M. smegmatis* (*Pfas<sub>MS</sub>*) se obtuvo por amplificación por PCR a partir de ADN genómico de *M. smegmatis*, utilizando los oligonucleótidos N2fasIMS (5'-GATAACGATTAGATAACAATGCTGC-3') y CfasIMTpromBIOT (5'-Biotin-CACCCGGTCGTGCTCGTGGATCGTC-3'). Una vez purificado, el promotor biotinilado se unió a una columna de estreptavidina (Streptavidin MagneSphere® Paramagnetic Particles, Promega) y la columna se equilibró con solución de unión [25 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM PMSF, 5% (v/v) glicerol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 mM NaCl y 1 µg poli-dIdC] a temperatura ambiente. La fracción dializada se pasó a través de la columna de estreptavidina-*Pfas*. Tras un lavado con solución de unión y dos lavados con esta misma solución sin poli-dIdC, las proteínas unidas al ADN se eluyeron con 0.8 M NaCl. Posteriormente, se precipitaron con 80% acetona y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS (SDS-PAGE) [145]. Tras tinción con Coomassie blue, las bandas se escindieron del gel y se analizaron por espectrometría de masa. El análisis se realizó utilizando un espectrómetro MALDI-TOF-TOF, Ultraflex II (Bruker), en el servicio de espectrometría de masa CEQUIBIEM, Argentina.

### 2.5.2 Expresión y purificación de FasR<sub>MT</sub>

La inducción de la expresión de *fasR<sub>MT</sub>* a partir de la cepa de *E. coli* BL21λ (DE3) codón plus transformada con el vector pFR3, se realizó a DO<sub>600</sub> 0.5 con IPTG 0.5 M (5 h,



37 °C). 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  $\beta$ -mercaptoetanol y 5 mM imidazol], y se lisaron por sonicación (10 pulsos, 10 s ON y 10 s OFF, 20% de amplitud, 4 °C). Los restos celulares se clarificaron por centrifugación (20000 g, 4 °C, 30 min) y la proteína His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> se purificó a partir de la fracción soluble obtenida por cromatografía de afinidad, utilizando una columna de Ni-NTA agarosa (Qiagen), y siguiendo las instrucciones del fabricante. El extracto proteico total libre de células se incubó 1 h a 4 °C con 1 ml de la resina de afinidad de Ni-NTA agarosa, equilibrada previamente con la solución B. Tras el lavado de la columna con 25 volúmenes de la solución B, la proteína His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> se eluyó con concentraciones crecientes de imidazol (20, 40, 60, 80, 100, y 250 mM). Cada una de las fracciones recolectadas se analizaron por SDS-PAGE. Aquellas que contenían la proteína pura se dializaron a 4 °C durante toda la noche, contra una solución de diálisis [20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glicerol]. Las proteínas obtenidas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

### **2.5.3 Determinación del peso molecular de FasR<sub>MT</sub>**

El peso molecular y el estado oligomérico de la proteína purificada His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> se determinaron mediante la utilización de una columna de exclusión molecular Superdex 200 GL (GE Healthcare) en un equipo AKTA Basic (Amersham), y una curva patrón construida con proteínas de peso molecular conocido: lisozima (~14 kDa), anhidrasa carbónica (monómero ~29 kDa, dímero ~58 kDa) y albúmina sérica bovina (~66 kDa). La corrida se realizó en solución de diálisis [20 mM Tris-HCl pH 8, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glicerol] a un flujo de 0.5 ml min<sup>-1</sup>.

### **2.5.4 Dosaje de proteínas y SDS-PAGE**

#### **2.5.4.1. Análisis en *M. smegmatis***

La concentración de proteínas fue determinada mediante los métodos descritos por Bradford [146], 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. 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 [145]. 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  $\beta$ -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: lizozima (14.4 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), albúmina sérica bovina (BSA, 66.2 kDa) y fosforilasa B (97.4 kDa). Para detectar proteínas totales los geles se fijaron en una solución de ácido acético-H<sub>2</sub>O (3:7) y se tiñeron con una solución de azul brillante de Coomassie (0.25% Azul brillante de Coomassie R250, 50% etanol y 10% ácido acético).

#### **2.5.4.2. Análisis en *M. tuberculosis***

La concentración de proteínas fue determinada mediante el ensayo del ácido bicinconínico [147] utilizando el kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce). El mismo se utilizó siguiendo las recomendaciones del fabricante y usando como patrón una solución de BSA comercial (Promega). Los extractos proteicos y las proteínas purificadas se separaron mediante SDS-PAGE, utilizando un gel NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Mini gel (Life technologies™), solución de siembra NuPAGE® Novex® LDS Sample buffer (Life technologies™) y solución de corrida NuPAGE® Novex® MES SDS Running buffer (Life technologies™). La corrida se realizó en una celda XCell SureLock® Mini-Cell (Novex®, Life technologies™) a 200 v, durante 35 min (85 mA). Se utilizó el marcador de peso molecular pre-teñido Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard (Life technologies™).

## 2.5.5 Transferencia e inmunodetección de proteínas (western blot)

### 2.5.5.1 Inmunización con FasR y obtención de suero

Para la producción de anticuerpos policlonales anti-FasR<sub>MT</sub> se inmunizaron conejos con 200 µg de la proteína His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> purificada, en PBS estéril (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), mediante la aplicación de inyecciones subcutáneas con adyuvante de Freund completo en relación 1:1. A las tres semanas posteriores se inyectaron 200 µg de la proteína en forma subcutánea con adyuvante de Freund incompleto (1:1). Previo a la inmunización se extrajo sangre para chequear la ausencia de reacciones inespecíficas con el antígeno. A partir de la segunda inyección, se extrajo sangre cada 15 días para monitorear la producción de anticuerpos específicos, hasta que se alcanzaron los títulos adecuados contra el antígeno de interés. La sangre se dejó coagular a 37 °C durante 1 h y se dejó enfriar. El suero se separó por centrifugación (10 min, 3000 g) y se guardaron alícuotas del mismo a -20 °C hasta su uso.

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

Las células de 10 ml de un cultivo de *M. smegmatis* se recolectaron por centrifugación (10 min, 2000 g, 4 °C) y se resuspendieron en 200 µl de solución Tris-HCl pH 8 50 mM. La disrupción se realizó por sonicación (10 pulsos, 30 s ON y 30 s OFF, amplitud máxima, 4 °C) y el extracto resultante se clarificó por centrifugación (15000 g, 20 min, 4 °C). Las proteínas se cuantificaron, se separaron por SDS-PAGE y se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (BIORAD) utilizando la celda Mini-Trans-Blot transfer (BIORAD) y siguiendo la técnica descrita por Burnette [148] y Sambrook y colaboradores [129]. La transferencia húmeda se realizó en solución de transferencia [25 mM Tris, 150 mM glicina, 20% (v/v) metanol] durante 2 h a 250 mA a 4 °C. La eficiencia de la transferencia y la localización de las bandas se corroboró por tinción de las proteínas sobre la membrana con una solución de Rojo Ponceau [0.1% (p/v) Rojo Ponceau en 5% (v/v) ácido acético].

Para detectar proteínas fusionadas a colas de histidina, se empleó la técnica recomendada por el fabricante de los anticuerpos anti-His (Qiagen). Después de la transferencia, las membranas se lavaron dos veces en solución TBS (10 mM Tris-HCl pH

7.5, 150 mM NaCl) durante 10 min, y se incubaron 1 h con solución de bloqueo [3% (p/v) BSA en TBS]. Posteriormente, se lavaron dos veces con TBS-Tween-Tritón [20 mM Tris·Cl pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.2% (v/v) Tritón X-100], y una vez con TBS, durante 10 min. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-His (dilución 1:1500) en solución de bloqueo por 1 h, tras lo cual se volvieron a repetir los lavados indicados previamente. Finalmente, se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (BIORAD, dilución 1:3000), en solución de bloqueo durante 1 h. Tras tres lavados con TBS-Tween-Tritón, el revelado se llevó a cabo incubando la membrana con los sustratos de la fosfatasa alcalina, cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT) y sal de toluidina 5-bromo-4-cloro-3'-indol fosfato (BCIP) (Sigma), en solución fosfatasa (100 mM Tris·Cl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>).

Para identificar FasR<sub>MS</sub> y KasA<sub>MS</sub>, se siguieron los mismos pasos indicados anteriormente con algunas diferencias. En el primero de los casos, la membrana se enfrentó a una dilución de suero de conejo conteniendo el anticuerpo primario policlonal anti-FasR<sub>MT</sub>, obtenido en nuestro laboratorio e indicado previamente en el punto 2.5.5.1 (dilución 1:100) y seguidamente al anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (BIORAD, dilución 1:5000). Para identificar KasA<sub>MS</sub>, se utilizó el anticuerpo primario anti-KasA<sub>MT</sub> de rata (dilución 1:1000) [149] y el anticuerpo secundario anti-IgG de rata conjugado con peroxidasa de rábano (BIORAD, dilución 1:100 000). Para identificar AccA3<sub>MS</sub>, tras la etapa de bloqueo y los lavados con TBS-Tween-Tritón y TBS, la membrana se enfrentó a estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano que reconoce proteínas biotiniladas (dilución 1:100 000). En todos los casos, el revelado se llevó a cabo utilizando el kit Amersham ECL Plus Western Blotting (GE Healthcare) siguiendo las especificaciones del fabricante.

### **2.5.5.3 Western blot con extractos proteicos de *M. tuberculosis***

Las células de 10 ml de un cultivo de *M. tuberculosis* se lavaron con solución PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), se recolectaron por centrifugación (10 min, 2000 g, 4 °C) y se resuspendieron en 300 µl de solución TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) complementado con un inhibidor de proteasas (cComplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets- Roche).

La disrupción se realizó por sonicación (15 pulsos, 30 s ON y 30 s OFF, amplitud máxima, 4 °C), y el extracto resultante se clarificó por centrifugación (15000 g, 20 min, 4 °C) y se filtró utilizando un filtro de 0.22 µm. Las proteínas se cuantificaron, se separaron por SDS-PAGE y se electrotransfirieron utilizando el dispositivo de transferencia en seco iBlot® Dry Blotting System (Life technologies™) y el sistema iBlot® Transfer Stack (nitrocelulosa, mini- Life technologies™) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La eficiencia de la transferencia y la localización de las bandas se corroboró por tinción de las proteínas sobre la membrana con una solución de Rojo Ponceau [0.1% (p/v) Rojo Ponceau en 5% (v/v) ácido acético]

Para identificar FasR<sub>MT</sub> la membrana se incubó durante 2 h en solución de bloqueo TNT-leche [TNT (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween), 5% (p/v) leche descremada]. Posteriormente, se enfrentó al anticuerpo primario monoclonal contra FasR<sub>MT</sub>, el cual consiste únicamente del fragmento de unión al antígeno (anti-FasR<sub>MT</sub> Fab) en solución de bloqueo TNT-leche (dilución 1:1000) durante toda la noche. Tras cuatro lavados sucesivos de 10 min cada uno con solución TNT, la membrana se enfrentó al anticuerpo secundario anti-cadena kappa de ratón conjugada a la peroxidasa de rábano (SouthernBiotech) (dilución 1:100 000) en solución de bloqueo TNT-leche por 2 h. Finalmente, se repitieron los lavados con solución TNT y la membrana se reveló utilizando el kit Chemiluminescent Peroxidase Substrate (Sigma) siguiendo las especificaciones del fabricante. La identificación de RpoB<sub>MT</sub> se llevó a cabo siguiendo los pasos descritos anteriormente con algunas diferencias. En este caso, para la detección se utilizó el anticuerpo primario monoclonal comercial contra la subunidad β de la ARN polimerasa de *E. coli* (anti-RpoB<sub>EC</sub>, NeoClone Biotechnology International) (dilución 1:20000), y el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (dilución 1:100 000). Este anticuerpo primario reconoce numerosas ARN polimerasas bacterianas incluida la presente en micobacterias.

### **2.5.6 Ensayos de β-galactosidasa**

La actividad β-galactosidasa en cultivos fue medida como lo describe Miller [150], con las siguientes modificaciones. Cultivos saturados de *M. smegmatis* crecidos en medio 7H9 en presencia de los correspondientes antibióticos, se diluyeron 100

veces en el mismo medio y se incubaron a 37 °C. En fase exponencial temprana ( $DO_{600} \sim 0.2$ ), se suplementaron (cuando se indica) con acetamida 0.2% y/o ácidos grasos a una concentración final de 0.01%. Tras un determinado tiempo de incubación, las células de 10 ml de cada cultivo se recuperaron por centrifugación, se lavaron y se resuspendieron en 250  $\mu$ l solución Z (0.06 M  $Na_2HPO_4$ , 0.04 M  $NaH_2PO_4$ , 0.01 M KCl, 0.001 M  $MgSO_4$  y 0.05 M  $\beta$ -mercaptoetanol). Las células se rompieron por sonicación (5 pulsos, 30 s ON y 30 s OFF, máxima potencia, 4 °C) y la suspensión se clarificó por centrifugación (23000 g, 30 min, 4 °C). El extracto proteico obtenido se cuantificó y se utilizó para los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa. Una alícuota del mismo se llevó a volumen final de 250  $\mu$ l con la misma solución Z, y luego de 5 min de incubación en un baño termostatzado a 28 °C, se le adicionó 50  $\mu$ l del sustrato orto-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG, 4 mg  $ml^{-1}$ ). La suspensión se mezcló por inversión y se incubó un tiempo fijo a 28 °C. La reacción se detuvo por adición de 125  $\mu$ l de  $Na_2CO_3$  1 M y se midió la DO a 420 nm, utilizando como blanco una mezcla de reacción a la cual no se le adicionó un volumen de extracto proteico. La actividad específica  $\beta$ -galactosidasa expresada en nmol ONPG por min por mg de proteína se calculó con la siguiente ecuación  $(188888 \times DO_{420}) / (c \times v \times t)$ , donde  $DO_{420}$  es la densidad óptica medida a 420 nm,  $c$  es la concentración proteica del extracto ( $mg\ ml^{-1}$ ),  $v$  es el volumen de extracto utilizado en el ensayo (ml), y  $t$  es el tiempo de reacción (min). En todos los casos se utilizó un volumen de extracto proteico y un tiempo de reacción tal que los valores de  $DO_{420}$  estuvieran comprendidos entre 0.15 y 0.3. Los datos se obtuvieron por triplicado para al menos tres experimentos independientes ( $n=3$ ) y los valores de actividad reportados corresponden al promedio de los resultados obtenidos para tres experimentos independientes  $\pm$  desvío estándar. El nivel promedio de actividad  $\beta$ -galactosidasa debido al plásmido parental pSM128 constituye el ruido experimental y su valor se restó de cada conjunto de datos obtenido. Para ello, el plásmido pSM128 se utilizó para transformar una cepa salvaje de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y la cepa MSpFR9, dando lugar a las cepas control MSpSM128 y MSpSM128 pFR9 respectivamente.

## 2.6 Manipulación de ARN

### 2.6.1 Extracción de ARN de *Mycobacterium*

El ARN se extrajo a partir de cultivos de *M. smegmatis* o *M. tuberculosis* H37Rv en fase exponencial media utilizando el sistema SV total RNA isolation system (Promega) y cuando fue necesario, se trató con la enzima DNasa RQ1 libre de RNasa (Promega), en ambos casos siguiendo las indicaciones del fabricante. La calidad (pureza e integridad) del ARN obtenido se analizó mediante determinación de la relación  $DO_{260}/DO_{280}$  y  $DO_{260}/DO_{230}$ , y por electroforesis en geles de agarosa 1% (p/v) teñidos con GelGreen™ (Biotium) con posterior visualización en un transiluminador con luz azul (excitación a 488 nm).

### 2.6.2 Retrotranscripción y amplificación por PCR (RT-PCR)

Para determinar si *fas* y *acpS* forman un operón en micobacterias, el ARN extraído a partir de cultivos de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *M. tuberculosis* H37Rv en fase exponencial media fue utilizado como molde para la síntesis de ADNc, usando la transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen), según las especificaciones del fabricante, y hexanucleótidos degenerados como cebadores de la reacción. La amplificación por PCR de las regiones intergénicas se realizó sobre el ADNc sintetizado utilizando oligonucleótidos específicos sobre *fas* y *acpS* (Para *fas*<sub>MS</sub>-*acpS*<sub>MS</sub> = oligonucleótidos F-MS *acpS*-*fas* 5'-CTCGGCGAGAACGATCAGTA-3' y R-MS *acpS*-*fas* 5'-GCCTTGATCACGGCTTCCTT-3'; Para *fas*<sub>MT</sub>-*acpS*<sub>MT</sub> = oligonucleótidos F-TB *acpS*-*fas* 5'-CGAGGCGTATATCGGCTGAC-3' y R-TB *acpS*-*fas* 5'-CGGCGAAATCGGGAATGGAG-3').

### 2.6.3 Determinación del sitio de inicio de la transcripción

El método utilizado para el mapeo del sitio de inicio de la transcripción (TSS) en *Mycobacterium* depende fuertemente del análisis de los productos de amplificación por PCR obtenidos a partir de muestras de ADNc sintetizados utilizando como molde ARN tratados o no con la pirofosfatasa ácida del tabaco (TAP). Para mapear el TSS del gen *fas* de *Mycobacterium*, usamos el kit GeneRacer™ (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante con algunas diferencias. Las muestras de ARN no se trataron con la fosfatasa alcalina (CIP), sino que el protocolo se inició directamente con la remoción del pirofosfato con TAP. Se trabajó por duplicado con muestras de ARN

tratadas o no tratadas con TAP para convertir el trifosfato 5' a monofosfato. Posteriormente, un oligonucleótido de ARN de secuencia conocida se ligó al monofosfato en los extremos 5' de los ARNs y los mismos fueron utilizados como molde para la síntesis del ADNc utilizando hexanucleótidos degenerados como cebadores de la reacción y la transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen). A la transcripción reversa le siguieron dos rondas de amplificación por PCR de los ADNc resultantes, en los cuales se utilizaron un oligonucleótido de anclaje y dos juegos de oligonucleótidos específicos: la primera PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos específicos RACE-GSP *fasI* 5'-ACTCGATACCGCCGAGGACACCAG-3' para 5'*fas*<sub>MS</sub> y RACE *fas* MT 5'-CACCGAATGCGACAGCGTAGGG-3' para 5'*fas*<sub>MT</sub>; y la segunda PCR anidada se realizó usando un oligonucleótido específico interno en cada caso (RACE-GSP *fasI* nested 5'-GGTCAGATCCGGACTCGTCGTT-3' para 5'*fas*<sub>MS</sub>; RACE *fas* MT nested 5'-TGAGGCGATCGACCAGAGCGTG-3' para 5'*fas*<sub>MT</sub>). Los productos de PCR resultantes se clonaron en el vector pCR BluntII TOPO (Invitrogen) y se determinó la secuencia de ADN a partir de varios clones. Cualquier producto de amplificación obtenido a partir de las muestras tratadas con TAP y ausente en las muestras no tratadas, correspondería a un ARNm completo con un trifosfato en su extremo 5', indicando que el oligonucleótido de ARN se ligó a un punto de inicio de la transcripción verdadero. Se consideró como TSS el primer nucleótido que le sigue al adaptador 5'-RACE.

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

El nivel de expresión de los genes *fasR*<sub>MS</sub>, *fas*<sub>MS</sub>, *acpS*<sub>MS</sub> y *kasA*<sub>MS</sub> se determinó tras la normalización de los correspondientes niveles de ARN a la expresión del gen *sigA*<sub>MS</sub>. Un cultivo saturado de la cepa *MSPptr:fasR*<sub>MS</sub> crecida en medio 7H9 suplementado con estreptomicina y apramicina fue diluido 200 veces en el mismo medio e incubado por aproximadamente 40 h a 42 °C (DO<sub>600</sub>~0.25). Posteriormente, el cultivo se dividió en dos fracciones iguales y una de ellas se suplementó con ATc 200 ng ml<sup>-1</sup>. Tras la incubación de ambos cultivos a 42 °C durante 9 h, se extrajo el ARN de cada uno de ellos. El ADNc fue sintetizado utilizando la transcriptasa reversa SuperScript III (Invitrogen) y hexanucleótidos degenerados, y posteriormente fue utilizado como molde para la amplificación por qRT-PCR usando una mezcla de reacción concentrada comercial la cual utiliza fluorocromo verde como colorante



indicador (qPCR Mezcla Real, Biodynamics). Para la amplificación por qRT-PCR se utilizó el equipo Mastercycler® ep *realplex* de Eppendorf, siguiendo las siguientes condiciones: 95 °C por 2 min seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 58 °C por 15 s y 68 °C por 20 s. Los datos de qRT-PCR se presentan como la diferencia de expresión relativa en la cepa MSP*ptr:fasR*<sub>MS</sub> con ATc 200 ng ml<sup>-1</sup> respecto a la misma cepa sin ATc, usando el método de Pfaffl [151]. El gen *sigA*<sub>MS</sub> se utilizó como gen normalizador. En la Tabla 7 se indican los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de cada uno de los genes por qRT-PCR.

**Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de qRT-PCR.**

Nombre	Secuencia (5'-3')
L- <i>sigA</i>	CCAAGGGCTACAAGTTCTCG
R- <i>sigA</i>	TGGATCTCCAGCACCTTCTC
L- <i>fasR</i>	AGGCGTTCTTCGATTTTCATC
R- <i>fasR</i>	ATCAGATCGAACACGGCATC
L- <i>fas</i>	CGATGCAGACCATGTACCAC
R- <i>fas</i>	CCCACATACGACTGCATGAC
L- <i>acpS</i>	GTCGAGCTCTCGGTTCTCC
R- <i>acpS</i>	GTCACGTCCTCCAGGTGTTT
L- <i>KasA</i>	CCGACGCTGAACTACGAGAC
R- <i>KasA</i>	AACCCGAACGAGTTGTTGAT

## 2.7 Análisis de lípidos

### 2.7.1 Análisis de lípidos por cromatografía en capa delgada (TLC)

La biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos se analizó por incorporación de [<sup>14</sup>C] acetato. Se marcaron 5 ml de cada cultivo durante 1 h con [<sup>14</sup>C] acetato (59 mCi mmol<sup>-1</sup>) (New England Nuclear) a una concentración de 1 μCi ml<sup>-1</sup>. Los metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) y ácidos micólicos (MAMES) se extrajeron siguiendo el protocolo reportado previamente [37]. Las células marcadas se recuperaron por centrifugación y se sometieron a hidrólisis alcalina en 2 ml de hidróxido de terbutilamonio (TBHA) 12% (v/v) a 95 °C durante toda la noche. Posteriormente, se adicionó a la mezcla de reacción 2 ml de diclorometano y 100 μl de yoduro de metilo, y se agitó en agitador rotatorio durante 1 h. Las fases se separaron por centrifugación

(1000 g, 10 min), y la fase orgánica inferior se lavó con 2 ml de agua y se evaporó hasta sequedad a 55 °C. Los metil ésteres se disolvieron en 2 ml de éter etílico. El éter se traspasó a un nuevo contenedor y se evaporó nuevamente hasta sequedad. El residuo final se disolvió en 200 µl de diclorometano, y 10 µl de la solución resultante de FAMES y MAMEs fue utilizada para medir radioactividad en un contador de centelleo Beckman. A su vez, la mezcla se sometió a TLC utilizando una placa de silica gel (5735 silica gel 60 F254; Merck) normalizando la siembra por densidad óptica o número de cuentas. Las placas se corrieron en una mezcla de hexano:etil-acetato (9:1 v/v). Los autoradiogramas se obtuvieron por exposición de los cromatogramas a placas Kodak X-Omat AR, durante toda la noche.

### **2.8 Análisis de la biosíntesis de macromoléculas**

La biosíntesis de macromoléculas se analizó por incorporación de [<sup>3</sup>H] uracilo y [<sup>3</sup>H] leucina. Se marcaron 5 ml de cada cultivo durante 1 h con L-[<sup>3</sup>H] leucina (0.5 µCi ml<sup>-1</sup>) (10.96 GBq mmol<sup>-1</sup>) y [<sup>3</sup>H] uracilo (0.5 µCi ml<sup>-1</sup>) (18.56 GBq mmol<sup>-1</sup>) (New England Nuclear). Las células se recolectaron por centrifugación, se lavaron dos veces con Tris-HCl 50 mM pH 8 y se resuspendieron en líquido de centelleo. La radioactividad incorporada se determinó utilizando un contador de centelleo Beckman.

### **2.9 Análisis estadístico**

Los datos se reportan como promedios aritméticos de los resultados obtenidos a partir de tres experimentos independientes ± desvío estándar. La significancia estadística se calculó utilizando los tests ANOVA (Fig. 21C y 22B) y Mann-Whitney (Fig. 22A). La significancia estadística fue aceptada con p<0.05.

### **3.1 CAPÍTULO 1**

## **Identificación de FasR, una proteína reguladora del operón *fas-acpS***

### 3.1.1 Objetivos

#### 3.1.1.1 Objetivo general

Si bien la actividad de las enzimas de los sistemas FAS-I y FAS-II ha sido estudiada y caracterizada genética y bioquímicamente como blanco de diversas drogas antimicobacterianas, nada se conoce respecto a la regulación de la transcripción de los genes que las codifican. Los estudios de microarreglos y proteómica llevados a cabo para explorar la respuesta genética global de *M. tuberculosis* frente al tratamiento con antibióticos, junto con la evidencia de que la transcripción del gen *fas*, y por ende los niveles de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, se veía afectada cuando alterábamos los niveles de MabR, nos llevaron a pensar en la existencia de un mecanismo de regulación coordinado entre los dos sistemas FAS mediado por MabR. La identificación de una repetición invertida en la secuencia promotora del gen *fas*, similar a la reconocida por MabR en la región promotora del operón *fasII*, nos llevó a pensar que esta proteína podría estar regulando de manera directa la transcripción de *fas*. Sin embargo, la incapacidad de evidenciar esta interacción *in vitro* bajo diversas condiciones experimentales nos condujo a la búsqueda de un nuevo regulador transcripcional del sistema FAS-I de micobacterias, objetivo principal del presente trabajo de tesis.

#### 3.1.1.2 Objetivos particulares

A partir del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Caracterizar la región promotora del gen *fas* de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*
- Purificar e identificar a partir de extractos celulares de *M. smegmatis*, la proteína reguladora capaz de reconocer específicamente la región promotora del gen *fas*
- Identificar la secuencia operadora a la cual se une específicamente el regulador en la región promotora del gen *fas*

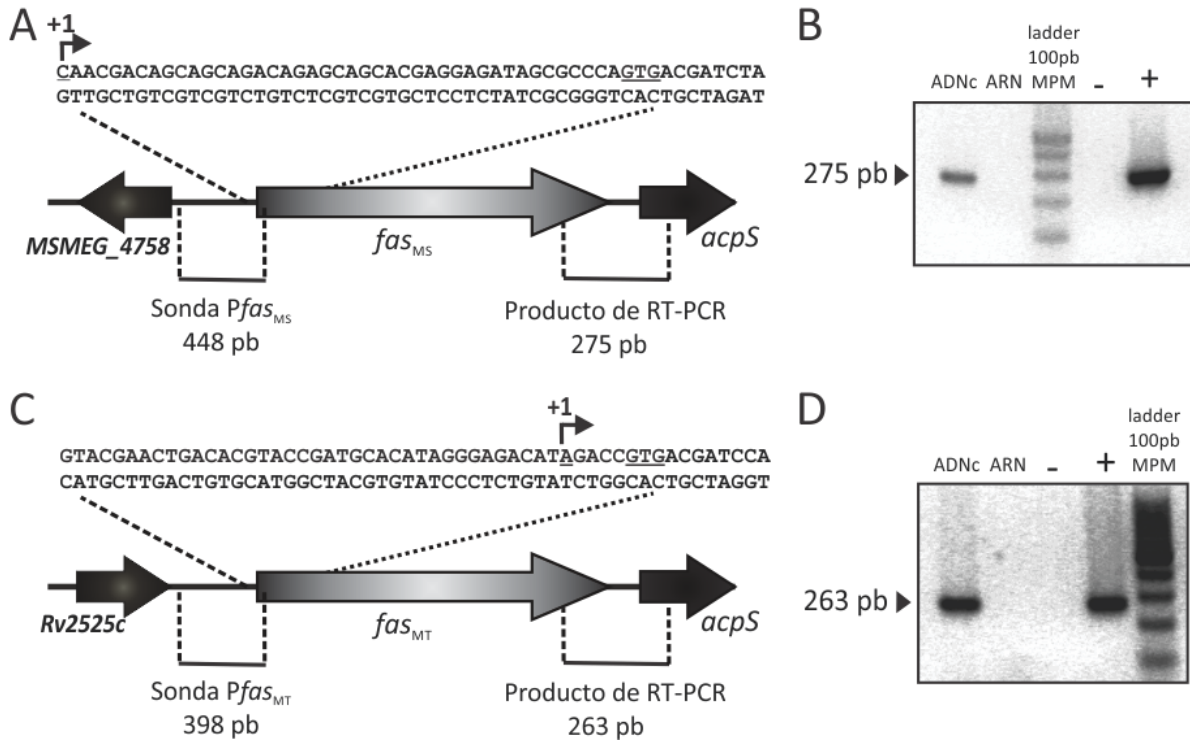
### 3.1.2 Resultados

#### 3.1.2.1 Caracterización de la región promotora del gen *fas* en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*

Para comenzar con la identificación del putativo factor(es) de transcripción involucrado en la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos en *Mycobacterium*, caracterizamos en primer lugar la secuencia promotora del gen *fas* de *M. smegmatis* (*MSMEG\_4757*, *fas<sub>MS</sub>*) y *M. tuberculosis* (*Rv2524c*, *fas<sub>MT</sub>*) determinando el sitio de inicio de la transcripción (TSS). Para ello se aisló ARN total de cultivos de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *M. tuberculosis* H37Rv en fase exponencial, y se utilizó como molde para la determinación del TSS mediante la técnica de 5' RACE (amplificación rápida de los extremos de ADNc). En ambos casos se obtuvo un único producto de PCR y el análisis por secuenciación reveló que el TSS está situado a 43 pb y 5 pb corriente arriba de los codones de inicio de la traducción de *fas<sub>MS</sub>* y *fas<sub>MT</sub>* respectivamente (Fig. 10A y C).

El gen *fas* codifica para la sintasa de ácidos grasos de tipo I (FAS-I) responsable del inicio de la biosíntesis de ácidos grasos en micobacterias. Este gen esencial se encuentra asociado genéticamente con *acpS*, el cual codifica para la 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa) encargada de transferir un grupo fosfopanteteino desde la coenzima A (CoA) al dominio ACP de FAS, y a la proteína ACP soluble de micobacterias (AcpM). Por lo tanto, AcpS es la enzima responsable de la modificación post-traducciona necesaria para la activación de ACP, una proteína central que se encuentra covalentemente unida a todos los intermediarios acilados durante la biosíntesis de ácidos micólicos. Dado que FAS y AcpS están involucrados en la misma vía metabólica y los genes que las codifican están relacionados genéticamente en el genoma de las micobacterias, nos propusimos analizar si *fas* y *acpS* forman parte de una única unidad transcripcional. Para ello, se extrajo ARN total de cultivos de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *M. tuberculosis* H37Rv en fase exponencial y se sometieron a transcripción reversa seguida de amplificación por PCR (RT-PCR) utilizando pares de oligonucleótidos diseñados para amplificar específicamente la región intergénica entre *fas* y *acpS* a partir de sus correspondientes ADNc. Como se puede observar en las figuras 10B y D, un fragmento del tamaño esperado fue detectado en ambos microorganismos, sugiriendo que los dos genes forman parte de una única unidad

transcripcional. Tras un extensivo análisis bioinformático se pudo corroborar la conservación de la organización de dicho operón en *Mycobacterium sp.*, resaltando su importancia biológica dentro del género.

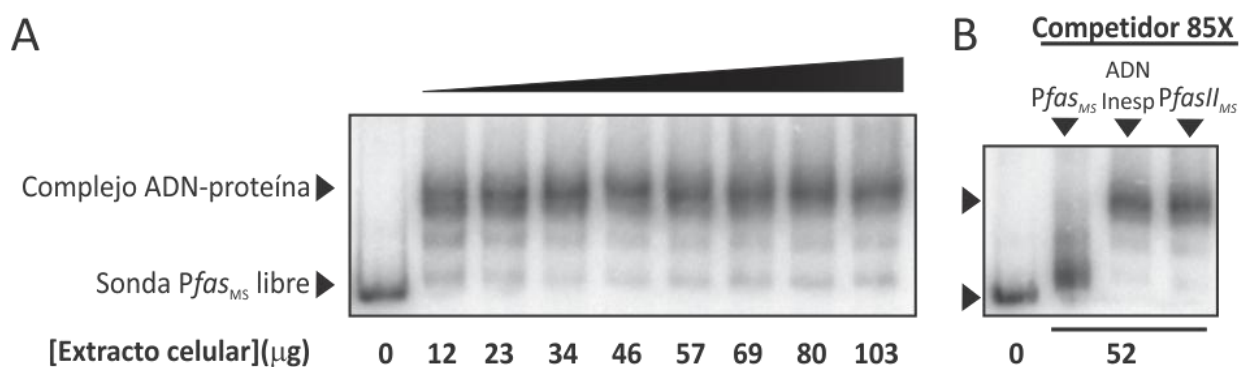


**Figura 10A y C. Determinación del TSS de *fas* por la técnica 5' RACE.** Las sondas *Pfas* se construyeron a partir de las regiones promotoras *Pfas* así definidas. **B y D. *fas* y *acpS* forman parte de una única unidad transcripcional.** Los oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar las regiones intergénicas de 275 pb y 263 pb, entre los genes *fas<sub>MS</sub>* o *fas<sub>MT</sub>* y *acpS* respectivamente, a partir de ADNc de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 o *M. tuberculosis* H37Rv, por RT-PCR. Se muestran los productos de amplificación obtenidos para las correspondientes regiones intergénicas. Como control se utilizó ARN no sometido a retrotranscripción. Los controles negativos y positivos se realizaron utilizando agua y ADN genómico respectivamente.

### 3.1.2.2 Identificación de un factor de transcripción de la familia TetR que se une a la región promotora del operón *fas-acpS* en *Mycobacterium*

Los estudios de microarreglos presentes en las bases de datos indican que la expresión de *fas* responde al agregado de ácidos grasos al medio de cultivo (<http://www.tdb.org/cgi-bin/data/prd.pl?e=22793>). A su vez, nuestro grupo ha demostrado también que la transcripción del gen *fas*, y consecuentemente los niveles de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, se encuentran afectados por cambios en las concentraciones fisiológicas del regulador MabR, aunque este efecto parecería no ser

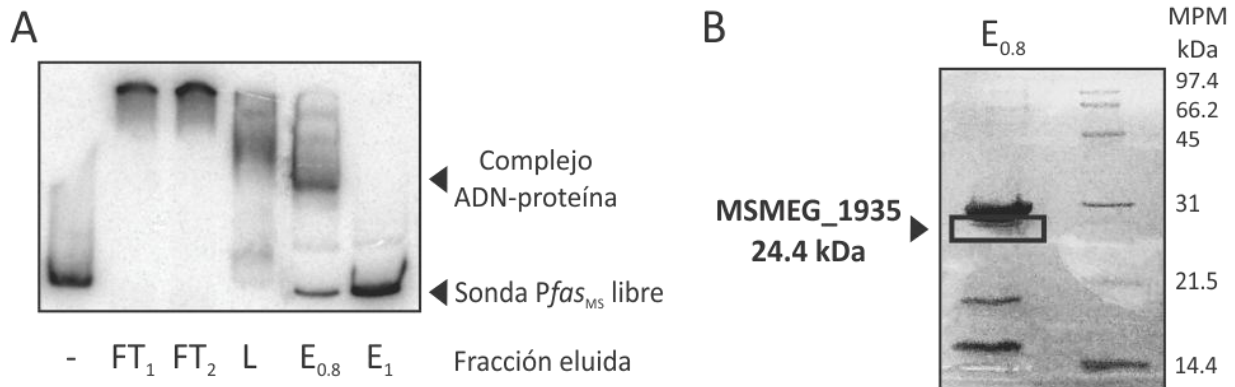
consecuencia de un reconocimiento directo del regulador por la región promotora del gen *fas* [109]. En función de los datos presentados y habiendo identificado el TSS de *fas*, nos propusimos buscar una proteína reguladora que fuese capaz de unirse a la región promotora del operón *fas-accS* (*Pfas*). En primer lugar, se realizaron experimentos de retardo de la movilidad electroforética en gel (EMSA) utilizando extractos proteicos totales de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, observando que alguna/s proteína/s presente en los extractos eran capaces de retrasar específicamente la movilidad de un fragmento de ADN de 448 pb conteniendo la región *Pfas<sub>MS</sub>* marcada radioactivamente con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP (Fig. 11A y B).



**Figura 11A y B. Detección de proteínas de unión a *Pfas<sub>MS</sub>* en extractos proteicos totales de la cepa *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. A.** El EMSA fue realizado con la sonda *Pfas<sub>MS</sub>* de 448 pb marcada radioactivamente y concentraciones crecientes (de 0 a 103 μg) de un extracto proteico total obtenido a partir de un cultivo de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 en fase exponencial, en presencia de poli-dIdC. **B.** La especificidad de la unión fue confirmada por competencia de la sonda marcada *Pfas<sub>MS</sub>* con un exceso de 85 veces de la sonda *Pfas<sub>MS</sub>* fría o un exceso de 85 veces de un ADN inespecífico, o la sonda *PfasII<sub>MS</sub>*, que contiene la región promotora del operón *fasII* de *M. tuberculosis*.

Para purificar la proteína asociada a *Pfas*, diseñamos un protocolo a partir del procedimiento descrito por Jourlin-Castelli y colaboradores [144]. En resumen, un cultivo de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 fue crecido hasta DO<sub>600</sub> 0.9, a 37 °C en medio 7H9. La fracción soluble recuperada tras ruptura de las células por sonicación y sucesivos pasos de centrifugación y ultracentrifugación, fue sometida a precipitación salina con sulfato de amonio al 25% y 75% de saturación. El precipitado resultante fue resuspendido y dializado para reducir la fuerza iónica, y posteriormente sometido a cromatografía de afinidad utilizando una columna de streptavidina (Streptavidin MagneSphere®

Paramagnetic Particles, Promega) cargada con la región promotora *Pfas<sub>MS</sub>* biotinilada. Las fracciones obtenidas luego de sucesivos lavados de la columna, y elución de las proteínas unidas al ADN con NaCl 0.8 M, se analizaron por EMSA utilizando la sonda *Pfas<sub>MS</sub>* marcada radioactivamente. Las proteínas presentes en la fracción que presentó capacidad para retrasar específicamente la movilidad de la sonda *Pfas<sub>MS</sub>*, eluidas a alta concentración salina, se precipitaron con acetona 80% y se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% en presencia de SDS (SDS-PAGE). La tinción del gel con azul de Coomassie permitió identificar cuatro bandas principales, las cuales fueron escindidas y analizadas por espectrometría de masa utilizando un espectrómetro MALDI TOF TOF, Ultraflex II (Bruker) (Fig. 12A y B). Las proteínas presentes en las tres bandas de mayor intensidad resultaron ser proteínas asociadas al nucleóide: Hup (MSMEG\_2389) y Lsr2 (MSMEG\_1060 y MSMEG\_6092). La cuarta proteína correspondía al producto del gen *MSMEG\_1935*, un putativo regulador transcripcional de la familia TetR hasta entonces no caracterizado.



**Figura 12A y B. Purificación de la proteína de unión a *Pfas<sub>MS</sub>* presente en extractos celulares de *M. smegmatis mc<sup>2</sup>155*.** **A.** El EMSA fue realizado con la sonda *Pfas<sub>MS</sub>* de 448 pb marcada radioactivamente y las distintas fracciones eluidas de la columna de afinidad. FT<sub>1</sub> y FT<sub>2</sub>: fracciones conteniendo parte del extracto celular no adherido a la columna; L: lavado de la columna; E<sub>0.8</sub>: fracción eluida a concentración salina 0.8 M; E<sub>1</sub>: fracción eluida a concentración salina 1 M. **B.** Las proteínas en la fracción E<sub>0.8</sub> fueron sometidas a análisis por SDS-PAGE y espectrometría de masa. Se indica la banda correspondiente al regulador transcripcional de la familia TetR identificado, *MSMEG\_1935*.

*MSMEG\_1935* tiene una masa molecular calculada de 24410 Da con 219 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. La



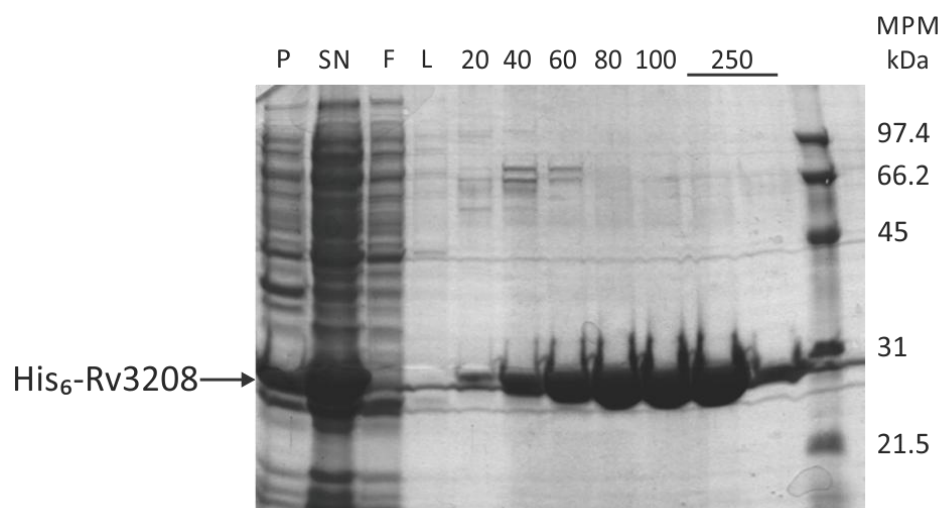
proteína modelo de esta familia de reguladores es TetR del transposón Tn10 de *Escherichia coli*; el cual regula la expresión de la bomba de eflujo de tetraciclina en bacterias Gram negativas [152]. Otra característica distintiva entre los miembros de esta familia es la presencia de un motivo hélice-giro-hélice en la región N-terminal de unión a ADN [153]; MSMEG\_1935 presenta este motivo en la región comprendida entre los aminoácidos 51-72. Las proteínas de la familia TetR generalmente actúan como represores y están ampliamente distribuidas en bacterias, regulando diversos procesos celulares entre los cuales se incluye la biosíntesis de ácidos grasos [153]. Una búsqueda bioinformática de proteínas ortólogas a MSMEG\_1935 en *M. tuberculosis* identificó a Rv3208. Esta proteína de *M. tuberculosis* tiene 81% de identidad con MSMEG\_1935 y ambas están localizadas en la misma región de los correspondientes cromosomas bacterianos. Hemos identificado así proteínas ortólogas de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* cuyo rol más probable es el de regular la expresión del operón *fas-acpS* a través de su unión específica a la correspondiente región *Pfas* en cada una de estas especies.

### **3.1.2.3 Expresión y purificación de FasR, un regulador transcripcional de la familia TetR que se une específicamente a la región promotora del operón *fas-acpS***

Para determinar si el factor de transcripción identificado en *M. tuberculosis* era una proteína de unión a ADN con la habilidad de unirse específicamente a la región promotora *Pfas* y así controlar la expresión de los genes del operón *fas-acpS*, construimos una versión de Rv3208 fusionada a seis residuos de Histidina (*his*<sub>6</sub>) en su extremo N-terminal para ser utilizada en EMSA. Para ello, el gen *Rv3208* se clonó en el vector pET24b, y el plásmido resultante pFR3 fue utilizado para transformar la cepa de *E. coli* BL21λ (DE3) codón plus, que contiene copias extras de los genes que codifican para ARNt que frecuentemente limitan la traducción de proteínas heterólogas en *E. coli*. La inducción se realizó a DO<sub>600</sub> 0.5 con IPTG 0.5 mM durante 5 h, a 37 °C. La proteína recombinante His<sub>6</sub>-Rv3208 se purificó hasta homogeneidad utilizando una columna de afinidad Ni-NTA agarosa (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las distintas fracciones se analizaron por SDS-PAGE (Fig. 13). Las fracciones eluidas con una concentración de imidazol de 100 y 250 mM (primera elución),

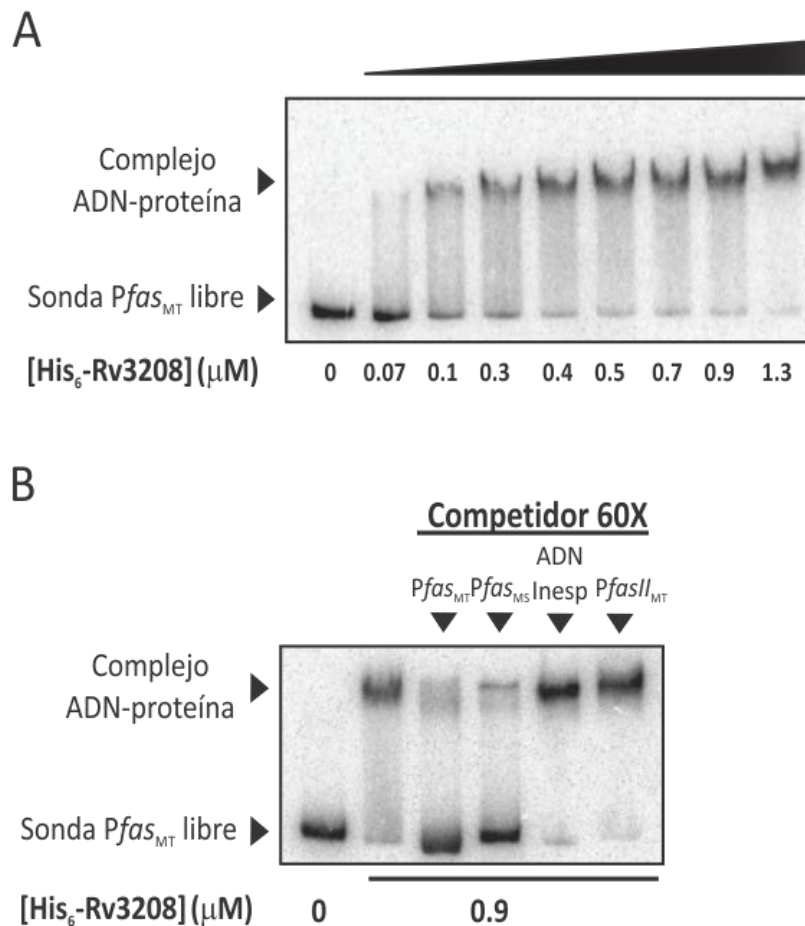
conteniendo la proteína purificada, fueron dializadas y almacenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

La unión de Rv3208 a Pfas se analizó por EMSA utilizando la proteína recombinante His<sub>6</sub>-Rv3208 y un fragmento amplificado por PCR conteniendo la región promotora del gen *fas* de *M. tuberculosis* (Pfas<sub>MT</sub>) marcado radioactivamente. La sonda de 398 pb se extiende 366 pb y 31 pb corriente arriba y corriente abajo del TSS respectivamente (Fig. 10C). Como se muestra en la figura 14A, His<sub>6</sub>-Rv3208 se une a la región promotora Pfas<sub>MT</sub> formando un único complejo ADN-proteína y la formación del mismo depende en forma directa de la concentración de proteína utilizada. La especificidad de la unión de Rv3208 a la región Pfas<sub>MT</sub> fue estudiada por ensayos de competición (Fig. 14B), en los cuales la unión de Rv3208 a la sonda marcada radioactivamente fue competida con un exceso de 60 veces de la sonda fría Pfas<sub>MT</sub> o Pfas<sub>MS</sub>, con un exceso de 60 veces de un fragmento de ADN inespecífico de 260 pb o con un fragmento de 272 pb que contiene la región promotora del operón *fasII* de *M. tuberculosis* (PfasII<sub>MT</sub>).



**Figura 13. Purificación de His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> a partir de extractos proteicos de *E. coli*.** El gen *Rv3208* se clonó como fusión a seis residuos de histidina en un vector de la serie pET y se expresó en *E. coli* BL21λ (DE3) codón plus. La proteína se purificó utilizando una columna de afinidad Ni-NTA agarosa y las fracciones eluidas se analizaron por SDS-PAGE. P, fracción insoluble; SN, fracción soluble; F, fracción no unida a la columna; L, lavado; 20-250, fracciones eluidas con 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM y 250 mM Imidazol (primera y segunda elución); MPM, marcador de peso molecular.

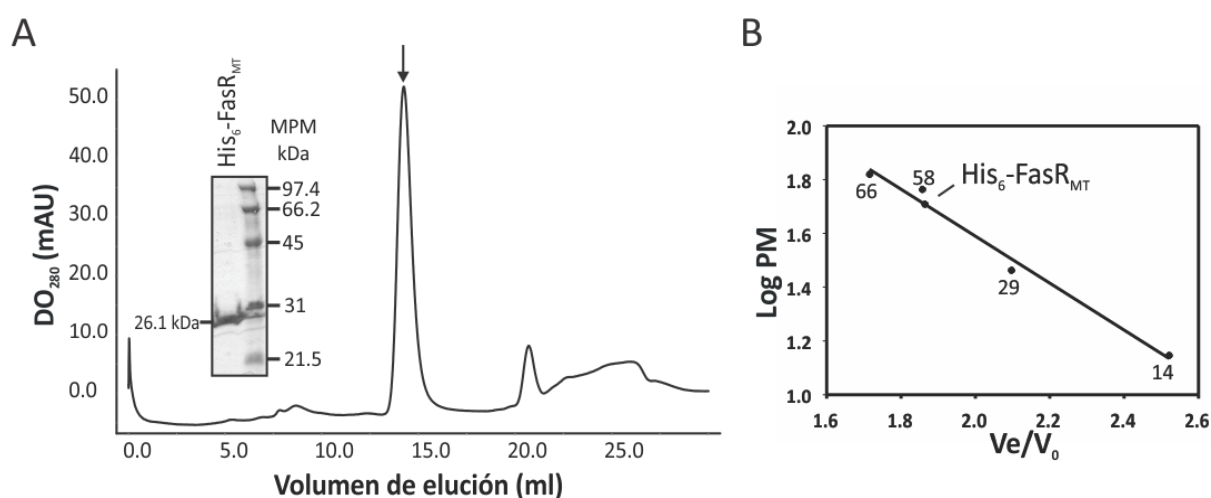
En la figura 14B se puede observar que la unión de Rv3208 a  $Pfas_{MT}$  es inhibida en presencia de las sondas frías correspondientes a los promotores  $Pfas$  de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* pero no se encuentra afectada por la presencia de fragmentos de ADN inespecíficos, confirmando la especificidad de la unión. Estos datos demuestran que Rv3208 se une a los promotores  $Pfas_{MT}$  o  $Pfas_{MS}$  y sugiere fuertemente que podría actuar como un regulador transcripcional del operón *fas-acpS* en micobacterias. En consecuencia, basándonos en la habilidad de Rv3208 de unirse a  $Pfas_{MT}$ , hemos llamado a este gen *fasR* por sus siglas en inglés fatty acid synthesis Regulator.



**Figura 14A y B.** His<sub>6</sub>-Rv3208 se une específicamente a la región promotora  $Pfas_{MT}$ . **A.** El EMSA fue realizado con la sonda  $Pfas_{MT}$  de 398 pb marcada radioactivamente y concentraciones crecientes de His<sub>6</sub>-Rv3208 (de 0 a 1.3 μM) en presencia de poli-dIdC. **B.** La especificidad de la unión fue confirmada por competencia de la sonda marcada  $Pfas_{MT}$  con un exceso de 60 veces de la sonda  $Pfas_{MT}$  o  $Pfas_{MS}$  fría, y un exceso de 60 veces de un ADN inespecífico o la sonda  $PfasII_{MT}$ .

### 3.1.2.4 Determinación del estado oligomérico de FasR en solución

Para determinar el estado oligomérico de FasR en solución, se analizó la proteína recombinante His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub>, purificada de *E. coli*, por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Superdex 200 GL (GE Healthcare). La comparación del volumen de elución de FasR<sub>MT</sub> con una curva patrón construida con proteínas de peso molecular conocido, indicó que FasR<sub>MT</sub> se encuentra en solución predominantemente como un dímero de peso molecular aparente ~52 kDa (Fig. 15).



**Figura 15A y B. His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> es un dímero en solución.** **A.** Perfil del cromatograma de exclusión molecular de la proteína recombinante His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> utilizando una columna Superdex 200 GL (GE Healthcare). El pico esperado para la proteína His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> purificada salió a los 14.24 ml (se indica con una flecha). El gel en el recuadro corresponde al análisis por SDS-PAGE de la proteína His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> purificada. El peso molecular aparente de His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> es 26.1 kDa. DO<sub>280</sub>, densidad óptica a 280 nm; mAU, unidades de milli-absorbancia; MPM, marcador de peso molecular. **B.** Determinación del estado oligomérico de His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> en solución de acuerdo a los patrones de elución de una serie de proteínas patrón. Las proteínas utilizadas como estándar fueron lisozima (~14 kDa), anhidrasa carbónica (monómero ~29 kDa, dímero ~58 kDa) y albúmina sérica bovina (~66 kDa). La posición de elución de His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> se indica con una flecha. V<sub>e</sub>/V<sub>0</sub>, Volumen de elución relativo.

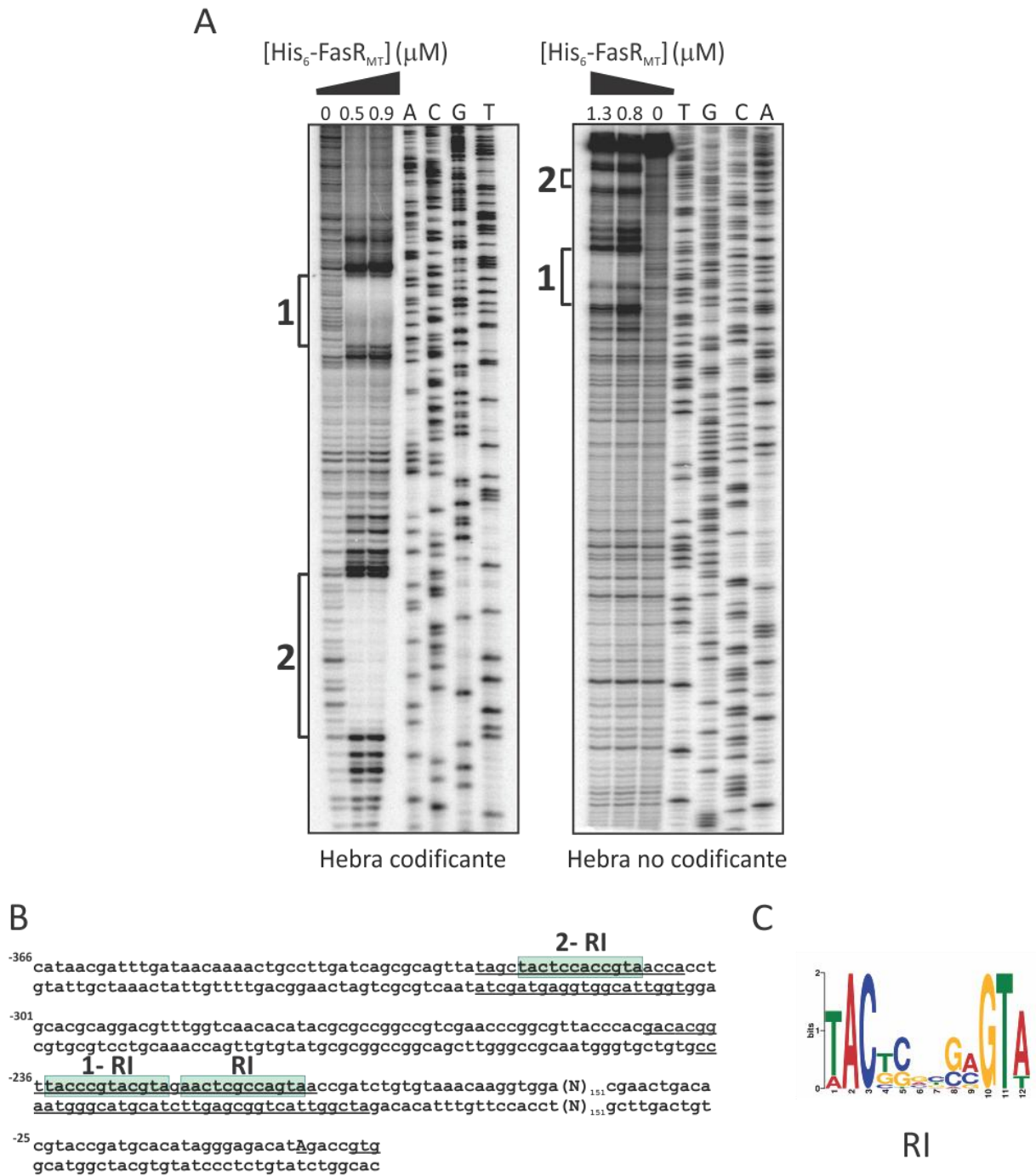
### 3.1.2.5 Identificación de los sitios de unión de FasR<sub>MT</sub> en la región promotora del operón *fas-acpS* de *M. tuberculosis*

Para identificar los sitios de unión de FasR en la región *Pfas*, se realizaron ensayos de protección del ADN frente a la digestión con la enzima DNasa I en ambas hebras de la región promotora *Pfas*<sub>MT</sub> de 398 pb, en presencia o ausencia de His<sub>6</sub>-

FasR<sub>MT</sub> (Fig. 16A). Las sondas radioactivas utilizadas en el ensayo se obtuvieron por marcación de los extremos 5' de la hebra codificante y no codificante de *Pfas*<sub>MT</sub> con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP. Las relaciones His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub>:sonda se eligieron a partir de los resultados obtenidos en ensayos de retardo en gel realizados previamente, de manera tal de que la cantidad de sonda libre fuese mínima. Junto a las reacciones de protección se sembraron las reacciones de secuenciación correspondientes a cada una de las hebras utilizadas en el ensayo. Como se muestra en la figura 16A y B, la unión de FasR protege de la digestión a dos regiones de ADN que se extienden desde las posiciones -324 a -304 y -243 a -209 en la hebra codificante, y desde las posiciones -324 a -304 y -238 a -204 en la hebra no codificante, posiciones relativas al TSS de *fas*<sub>MT</sub>. Además de las regiones protegidas, se observan bandas de hipersensibilidad, posiblemente debido a la torsión de la hélice de ADN.

### 3.1.2.6 FasR reconoce y se une a una secuencia palindrómica conservada en micobacterias

El alineamiento de las secuencias de diferentes promotores *Pfas* resaltó la conservación existente en las secuencias específicamente reconocidas por FasR en diferentes especies del género *Mycobacterium* (Fig. 17). El posterior análisis de dichas regiones utilizando la herramienta MEME de análisis de secuencias basado en motivos [154, 155] condujo a la identificación de una secuencia palindrómica de 12 pb altamente conservada (Fig. 16C) y compartida por todos los promotores de los operones *fas-*acpS** de *Mycobacterium*, sugiriendo fuertemente que este motivo es parte de la región operadora reconocida por FasR. Esta repetición invertida (RI) se encuentra presente en dos copias en la región protegida de mayor longitud (región protegida 1) y en una copia en la región protegida más corta (región protegida 2) (Fig. 16B y 17). Estas regiones están ubicadas alrededor de 200-300 pb corriente arriba del TSS del gen *fas*, una notable diferencia con la mayoría de los sitios operadores TetR, los cuales están localizados alrededor del TSS previniendo de esta manera la transcripción del gen corriente abajo por bloqueo de la unión de la ARN polimerasa a su secuencia promotora [153].



**Figura 16A y B. Identificación de los sitios de unión de FasR<sub>MT</sub> en la región promotora Pfas<sub>MT</sub>.** **A.** Ambas hebras conteniendo la secuencia promotora Pfas<sub>MT</sub> fueron marcadas radioactivamente con [γ-<sup>32</sup>P]dATP y sometidas a digestión con la nucleasa DNasa I, empleando dos concentraciones diferentes de His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> (0.5 y 0.9 μM para la hebra codificante; 0.8 y 1.3 μM para la hebra no codificante). Las regiones protegidas se indican en cada hebra con barras negras. Líneas A-T: secuencia de ADN de la sonda. **B. Secuencia de Pfas<sub>MT</sub>.** Las regiones protegidas en cada hebra están subrayadas e indicadas como 1 y 2. Las repeticiones invertidas (RI) conservadas están resaltadas en verde. **C.** Utilizando la herramienta MEME de análisis de secuencias en base a motivos, el análisis de las putativas secuencias promotoras de los operones *fas-*acpS** de distintas especies de micobacterias llevó a la identificación de un motivo altamente conservado en *Mycobacterium*.

A

<i>M. tb</i>	AACTGCCTTGATCAGCGCAGTTATAGCTACTCCACCGTA <u>ACCACCTGCACGCAGGACGTT</u>
<i>M. bovis</i>	AACTGCCTTGATCAGCGCAGTTATAGCTACTCCACCGTAACCACCTGCACGCAGGACGTT
<i>M. smegmatis</i>	TGCTGCCTTGATCTGCGGTGTTGTCCTACTCGGCCGTAACCACCTGCCAACAGGACGTT
<i>M. sp</i>	TAATGCTTTGATCAGCGTAGTTATAGCTACTCGACCGTAACCACCCGCCAGCAGGACGTT
<i>M. marinum</i>	TACTGCCTTGATCAGCGCAGTTATAGCTACTCAGGCGTAACCACCTGCATGCAGGACGTT
<i>M. ulcerans</i>	TACTGCCTTGATCAGCGCAGTTATAGCTACTCAGGCGTAACCACCTGCATGCAGGACGTT
<i>M. avium</i>	AACTGCCTTGATCTGCGCAGTTATAGCTACTCGACCGTAACCACCTGCACGCAGCAGGTT
<i>M. abscessus</i>	TCGATGCTGATCTGCGATGTTATACCTACTCGACCGTAACCACCTGCATGCAGCAGGTT
	***** ** * * * ***** * * * * * * * *

B

<i>M. tb</i>	CGGCGTTACCCACGACACGGTTACCCGTACGTAGAACTCGCCAGTA <u>ACCGATCTG-TGTA</u>
<i>M. bovis</i>	CGGCGTTACCCACGACACGGTTACCCGTACGTAGAACTCGCCAGTAACCGATCTG-TGTA
<i>M. smegmatis</i>	GCGCGTAACGTTACCGACGGTTACCCGTGCGTAGAACTCATCAGTAACCGATCCG-CGCC
<i>M. sp</i>	GGGTGTTACCCAAGCGATGGTTACCCGAGCGTAGAACTCGCCAGTAACCGATTCCGGCGAC
<i>M. marinum</i>	CGGTGTTACCCATGACACGGTTACCCGTGCGTAGAACTCGCCAGTAACCTATTGG-CGTC
<i>M. ulcerans</i>	CGGTGTTACCCATGACACGGTTACCCGTGCGTAGAACTCGCCAGTAACCTATTGG-CGTC
<i>M. avium</i>	CGGTGTTACCCACAACACGGTTACCCATGCGTAGAACTCACCAGTAACCGATCAG-CACG
<i>M. abscessus</i>	TGGTGTACGTAAGCGGTGGTTACTCCCGGTAGAACTCGGCAGTAACCTATTACG-CCAG
	* * * * * ***** * * * * * * * * * * * *

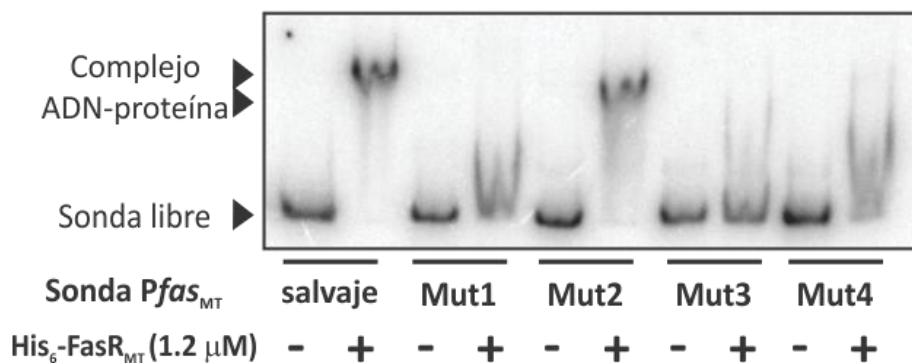
Figura 17A y B. Alineamiento de las regiones promotoras *Pfas* de micobacterias. Las regiones protegidas 2 (A) y 1 (B) fueron alineadas usando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) [141]. Los asteriscos indican los residuos invariables en todos los genomas analizados. Las zonas protegidas en *M. tuberculosis* se encuentran subrayadas y la repetición invertida conservada (RI), resaltada en verde.

Para identificar si la secuencia palindrómica de 12 pb se encuentra presente en las regiones promotoras de otros genes del genoma, el perfil del motivo encontrado (Fig. 16C) fue utilizado para analizar una base de datos de regiones intergénicas de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* usando el programa MAST [154, 156]. Los resultados obtenidos sugirieron que el motivo reconocido por FasR se encuentra presente únicamente en la región promotora del operón *fas-acpS*. Para confirmar la importancia de las RIs en la unión de FasR, construimos cuatro variantes de la región promotora de 371 pb *Pfas<sub>MT</sub>* (llamadas Mut1, Mut2, Mut3 y Mut4) y evaluamos la capacidad de las mismas de ser reconocidas por FasR en ensayos de retardo en gel. En Mut1, ambas RIs presentes en la región protegida 1 fueron reemplazadas por la secuencia diseñada al azar 5'-CGAATTATGAGCTCGTAACATGAGC-3'; En Mut2, la RI presente en la región protegida 2 fue reemplazada por la secuencia diseñada al azar 5'-CGAATTATGAGC-3', en Mut3, las tres RIs identificadas fueron simultáneamente reemplazadas por las respectivas secuencias utilizadas en Mut1 y Mut2, y en Mut4, una de las RIs presentes



en la región protegida 1 fue reemplazada por la secuencia diseñada al azar 5'-CGAATTATGAGC-3' (aquella más próxima al TSS del gen *fas*). Al incubar las regiones promotoras *Pfas<sub>MT</sub>* salvaje y mutadas con 1.2  $\mu$ M His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub>, condición en la cual prácticamente toda la sonda salvaje *Pfas<sub>MT</sub>* se encontraba formando un complejo con FasR<sub>MT</sub>, observamos que FasR<sub>MT</sub> era incapaz de unirse a las sondas conteniendo la versión mutada de la RI en la región protegida 1 (Mut1, Mut3 y Mut4). Sin embargo, aún era capaz de unirse a la sonda Mut2, formando en este caso un complejo ADN-proteína de diferente movilidad electroforética en el EMSA (Fig. 18).

Estos resultados confirmaron que FasR es una proteína de unión a ADN que se une específicamente a la región promotora *Pfas* por reconocimiento de un motivo de ADN altamente conservado dentro del género *Mycobacterium*. En consecuencia, FasR y sus proteínas ortólogas serían los reguladores transcripcionales del operón *fas-acs* en micobacterias y probablemente en la mayoría de los actinomicetes que contienen FAS-I.



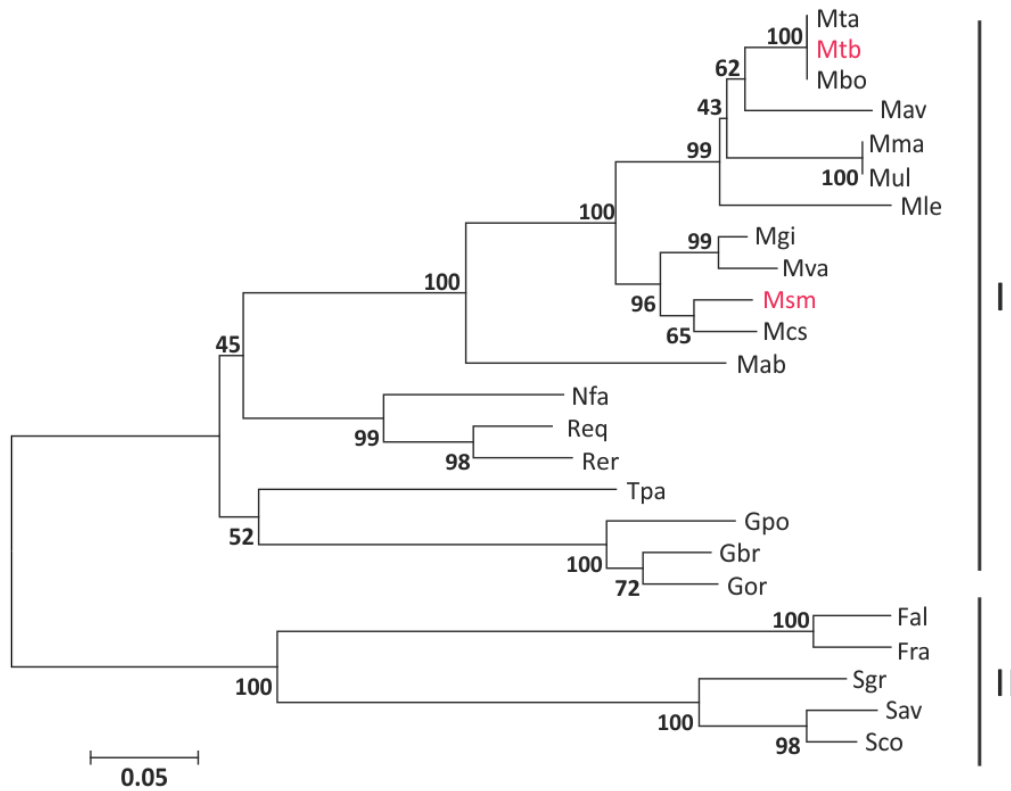
**Figura 18. Las RIs son necesarias para la unión de FasR a la región promotora *Pfas*.** El EMSA fue realizado incubando las regiones promotoras de 371 pb *Pfas<sub>MT</sub>* salvaje y mutadas (Mut1, Mut2, Mut3 y Mut4) con His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> en presencia de poli-dIdC. En Mut1, ambas RIs presentes en la región protegida 1 fueron reemplazadas por la secuencia diseñada al azar 5'-CGAATTATGAGCTCGTAACATGAGC-3'; en Mut2, la RI presente en la región protegida 2 fue reemplazada por la secuencia diseñada al azar 5'-CGAATTATGAGC-3'; en Mut3, las tres RIs identificadas fueron simultáneamente reemplazadas por las respectivas secuencias diseñadas al azar usadas en Mut1 y Mut2; y en Mut4, una de las RIs presentes en la región protegida 1 fue reemplazada por la secuencia diseñada al azar 5'-CGAATTATGAGC-3' (aquella más próxima al TSS del gen *fas*).



### 3.1.2.7 FasR es un regulador altamente conservado en actinomicetales productores de ácidos micólicos

El análisis por BLAST, utilizando la secuencia aminoacídica de MSMEG\_1935, reveló la presencia de proteínas con significativa homología (>50% identidad) exclusivamente en algunos actinomicetales productores de ácidos micólicos del suborden *Corynebacterineae*. La presencia de un ortólogo en *M. leprae* (ML0815) sugirió que la proteína podría jugar un rol fisiológico importante, ya que ha escapado de la reducción evolutiva de genes que ha sufrido esta micobacteria [157]. Cuando se compararon las regiones genómicas de *fasR* mediante un análisis utilizando la plataforma MBGD: *The microbial genome database for comparative analysis* (<http://mbgd.genome.ad.jp/>), se observó que en todas las especies indicadas anteriormente los homólogos de MSMEG\_1935 presentan una sintenia altamente conservada. Es importante remarcar que todos estos organismos productores de ácidos micólicos presentan ambos sistemas de sintasas de ácidos grasos, FAS-I y FAS-II. También se identificaron proteínas homólogas en actinomicetales no productores de ácidos micólicos, del género *Streptomyces* y *Frankia*, aunque su porcentaje de identidad es relativamente menor (<50% identidad), y hay menor sintenia. Resulta interesante destacar que en las diferentes especies del género *Corynebacterium*, que poseen ácidos micólicos en su envoltura pero que emplean únicamente el sistema FAS-I para su síntesis, no hemos encontrado ninguna proteína con homología a MSMEG\_1935. Si bien se ha identificado en *C. glutamicum* un regulador transcripcional del sistema FAS-I perteneciente a la familia TetR, el mismo sólo tiene actividad cuando la bacteria utiliza acetato como fuente de carbono y no presenta ninguna homología con el regulador aquí estudiado [158].

En este contexto se realizó un análisis filogenético para examinar la relación entre estas proteínas (Fig. 19). En el árbol filogenético obtenido se pueden evidenciar dos grupos claramente separados: uno conteniendo todos los organismos productores de ácidos micólicos (I) y el otro incluyendo el resto de los actinomicetes analizados (II).



**Figura 19. Análisis filogenético de los reguladores tipo FasR en actinomicetes.** Los números en los nodos indican el valor de soporte de bootstrap, basados en el método de Neighbour-joining y utilizando 1000 pseudorréplicas. La longitud de la barra indica la distancia genética entre dos especies (número relativo de sustituciones por unidad de tiempo). Las especies analizadas se indican de la siguiente manera: Sgr, *Streptomyces griseus*; Sco, *Streptomyces coelicolor*; Sav, *Streptomyces avermitilis*; Fra, *Frankia sp. Ccl3*; Fal, *Frankia alni*; Mtb, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; Mta, *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra; Mbo, *Mycobacterium bovis* BCG str. Pasteur; Mav, *Mycobacterium avium*; Mul, *Mycobacterium ulcerans*; Mma, *Mycobacterium marinum*; Mle, *Mycobacterium leprae*; Mcs, *Mycobacterium sp. MCS*; Msm, *Mycobacterium smegmatis*; Mva, *Mycobacterium vanbaalenii*; Mgi, *Mycobacterium gilvum*; Mab, *Mycobacterium abscessus*; Tpa, *Tsukamurella paurometabola*; Gpo, *Gordonia polyisoprenivorans*; Gor, *Gordonia sp. KTR9*; Gbr, *Gordonia bronchialis*; Nfa, *Nocardia farcinica*; Rer, *Rhodococcus erythropolis*; Req, *Rhodococcus equi*.

### 3.1.3 Discusión

El metabolismo lipídico juega un rol crucial en la patogénesis de *M. tuberculosis* y en la adaptación metabólica al hospedador. A pesar de que las micobacterias pueden utilizar una variedad de fuentes de carbono para el crecimiento *in vitro*, se cree que los ácidos grasos del huésped son la principal fuente de carbono durante el proceso infeccioso [159-161]. Esto sugiere que las dos sintetas de ácidos grasos presentes en micobacterias, FAS-I y FAS-II, deben estar estrictamente co-reguladas, tanto *in vitro* como *in vivo*, para preservar la homeostasis de la pared celular, optimizar la alta demanda de energía requerida para la biosíntesis de ácidos grasos y modular la respuesta inmune del hospedador durante la infección. Cualquier alteración de esta regulación resultaría en un daño metabólico severo del microorganismo y sería letal para el patógeno. Por lo tanto, el entendimiento de las bases moleculares de dicha regulación no sólo permitirá una mejor comprensión de la fisiología de este patógeno sino que posiblemente también nos provea de nuevas herramientas para combatir la TB.

Nuestros estudios sobre la regulación transcripcional de la biosíntesis de ácidos micólicos permitieron identificar a MabR, un factor de transcripción involucrado en la regulación de la expresión del operón *fasII*. Nuestros estudios sugirieron que la regulación coordinada de ambos sistemas FAS no sólo ocurría a nivel post-transcripcional, como había sido previamente reportado [119-121], sino también a nivel transcripcional. A pesar de que la expresión de MabR en niveles no fisiológicos produjo un efecto negativo en los niveles de expresión de *fas*, no hemos sido capaces de evidenciar un rol directo de MabR sobre la regulación transcripcional de *fas*, sugiriendo que en micobacterias existiría una compleja red de regulación de la biosíntesis de ácidos grasos/micólicos. En este trabajo, a través de la implementación de un método clásico para la purificación de proteínas de unión al ADN, hemos identificado a FasR, un regulador transcripcional de la familia TetR que se une específicamente a la región promotora del operón *fas-acpS* para regular la expresión de sus genes (Fig. 12 y 14). El gen *acpS* codifica para una 4'-fosfopanteteinil transferasa (PPTasa), encargada de transferir el grupo fosfopanteteino del CoA al ACP, una proteína central involucrada en la biosíntesis de lípidos [162, 163]. En *M. tuberculosis*

se han identificado dos PPTasas [65, 164]: PptT (codificada por el gen *Rv2794c*) activa específicamente los dominios ACP de numerosas policétidos sintetas tipo-I (PKS) y péptido sintetas no-ribosomales (NRPS), mientras que AcpS está involucrada en la modificación post-traducciona de FAS-I y de la subunidad AcpM de FAS-II [76]. Por lo tanto, FasR, la proteína reguladora del operón *fas-acpS* podría ser considerada como un factor clave involucrado en la coordinación de la actividad de los dos sistemas FAS que coexisten en micobacterias.

El análisis realizado por BLAST reveló la existencia de proteínas hipotéticas que poseen más del 40% de identidad con FasR<sub>MT</sub>, todas ellas presentes exclusivamente en actinomicetes, incluyendo miembros del género *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia*, *Frankia* y *Streptomyces*. Interesantemente, los mayores porcentajes de identidad (por encima del 51%) fueron observados en las proteínas presentes en los actinomicetes productores de ácidos micólicos. Esta evidencia sumada a la sintenia conservada que presentan estos genes, sugiere que estas proteínas podrían tener el mismo rol fisiológico y por lo tanto podrían ser consideradas ortólogas. Por el contrario, su existencia en especies de actinomicetales no productoras de ácidos micólicos (con un único sistema FAS del tipo II) suponen que esta proteína podría estar involucrada simultáneamente en la regulación de otros pasos relevantes de esta ruta biosintética (Fig. 19).

Resulta interesante destacar que a pesar de que *Corynebacterium* sp. utiliza sólo el sistema FAS-I para la biosíntesis de ácidos grasos y corinomicólicos, nuestros análisis bioinformáticos indicaron que no existe una proteína que presente similitud con FasR<sub>MT</sub> en los genomas analizados, indicando que las corinebacterias siguieron un camino evolutivo diferente para la regulación de este metabolismo esencial. Recientemente, se ha descrito un regulador transcripcional de los dos genes *fas* presentes en *Corynebacterium* [158]. A pesar de que esta proteína también pertenece a la familia TetR de reguladores transcripcionales, la misma no presenta ninguna homología significativa con *fasR<sub>MT</sub>* (<20%), no es esencial para la viabilidad de la bacteria y sólo afecta la expresión de los genes *fasA* and *fasB* cuando utiliza acetato como única fuente de carbono [158].

Está reportado que las proteínas de la familia TetR se unen generalmente a secuencias de ADN palindrómicas cortas [152, 153, 165]. Teniendo en cuenta que la unión de proteínas regulatorias a determinadas secuencias limita la evolución de los nucleótidos reconocidos por ellas, los motivos pueden identificarse debido a su relativa conservación respecto a secuencias vecinas de ADN. El alineamiento de las regiones promotoras del operón *fas-acpS* de diferentes especies de micobacterias, seguido de un análisis bioinformático utilizando la herramienta de análisis de secuencias MEME, llevó a la identificación de una secuencia consenso altamente conservada TAC[TG][CG][GAC][CTG][GC][A/C]GTA (Fig. 16 y 17). Por ensayos de retardo en gel pudimos confirmar que esta secuencia es necesaria para el correcto reconocimiento y unión de FasR<sub>MT</sub> a la región promotora *Pfas* (Fig. 18).

Si bien una búsqueda *in silico* del motivo de unión a FasR sugirió que éste sólo se encuentra presente en la región promotora del operón *fas-acpS*, no podemos descartar que esta proteína se una a un motivo diferente en un contexto genético distinto, o asociada a otro elemento regulatorio como sucede con otros reguladores transcripcionales como LexA de *E. coli* o AdpA de *Streptomyces griseus* [166, 167]. Para determinar el regulón completo *in vivo* de FasR<sub>MT</sub> en *M. tuberculosis*, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina seguida de secuenciación (ChiP-seq) en el laboratorio del Dr. Stewart Cole con la supervisión de la Dra. Claudia Sala (SV-GHI-UPCOL-EPFL, Lausanne, Suiza). A pesar de numerosos intentos y condiciones evaluadas, no pudimos obtener resultados favorables y evidenciar un enriquecimiento selectivo de la región *Pfas* frente a otros genes analizados, en presencia de un anticuerpo específico anti-FasR<sub>MT</sub>. Como hemos discutido previamente, la existencia de proteínas homólogas a FasR<sub>MT</sub> en actinomicetales sin un sistema FAS-I supondría un rol alternativo a la regulación del operón *fas-acpS* supuesta para las micobacterias y la identificación de nuevos genes blanco de este regulador por ChiP-seq podría asistir al completo entendimiento del rol fisiológico de este regulador.

## **3.2 CAPÍTULO 2**

**FasR es un activador transcripcional del operón *fas-acpS* modulado por acil-CoAs de cadena larga**

### **3.2.1 Objetivos**

#### **3.2.1.1 Objetivo general**

Si bien las proteínas involucradas en la vía de síntesis de ácidos grasos y micólicos han sido caracterizadas, poco se sabe respecto de su regulación transcripcional. Teniendo en cuenta los resultados presentados en el Capítulo 1, hemos identificado a FasR como un putativo regulador del operón *fas-accS* en micobacterias, ya que reconoce y se une específicamente a su región promotora. Nos propusimos entonces caracterizar el rol fisiológico de este regulador e identificar la molécula señal involucrada en la modulación de su función.

#### **3.2.1.2 Objetivos particulares**

A partir del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Diseñar cepas de *M. smegmatis* que expresen *fasR<sub>MT</sub>* en forma condicional y que contengan en su genoma fusiones reporteras del promotor *Pfas<sub>MT</sub>* al gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*
- Identificar el rol de *FasR<sub>MT</sub>* *in vivo* utilizando las cepas de *M. smegmatis* previamente construidas
- Determinar la relevancia de las RIs conservadas en la regulación mediada por FasR
- Identificar la(s) molécula(s) efectora responsable de modular la actividad de FasR en micobacterias

### 3.2.2 Resultados

#### 3.2.2.1 Construcción de cepas en *M. smegmatis* para el análisis de fusiones transcripcionales de $P_{fas_{MT}}$ al gen de la $\beta$ -galactosidasa (*lacZ*) de *E. coli*

Para analizar el rol fisiológico del regulador FasR en micobacterias, construimos distintas cepas reporteras en *M. smegmatis* (Tabla 4). Como se detalla en la Introducción, la elección de *M. smegmatis* como modelo de estudio se debe no sólo a que la misma comparte numerosas características con *M. tuberculosis* sino que además presenta diversas ventajas frente el trabajo experimental: no es una micobacteria patógena y es de crecimiento rápido, por lo que es utilizada por numerosos laboratorios como organismo modelo [83, 168-170]. Además, es importante resaltar que tanto la organización del operón *fas-acpS*, como también la localización genómica relativa del gen *fasR* y su motivo de unión al ADN, están altamente conservados en ambas especies. A su vez, FasR<sub>MT</sub> y FasR<sub>MS</sub> comparten 81% de identidad en sus secuencias aminoacídicas.

La utilización de fusiones reporteras para el estudio de la actividad de distintas regiones promotoras es una herramienta comúnmente utilizada en microbiología. El plásmido pFR47, derivado del vector integrativo pSM128 [139], que contiene una fusión transcripcional reportera de la región promotora  $P_{fas_{MT}}$  al gen *lacZ* de *E. coli* se utilizó para transformar la cepa salvaje de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, dando lugar a la cepa MSpFR47. A su vez, y para investigar la relevancia de las RIs en la regulación mediada por FasR<sub>MT</sub>, construimos versiones mutadas de las fusiones  $P_{fas_{MT}}:lacZ$ , obteniéndose los plásmidos reporteros pFR48, pFR49, pFR50 y pFR51. En pFR48, ambas RIs presentes en la región protegida 1 fueron reemplazadas por la secuencia diseñada al azar 5'-CGAATTATGAGCTCGTAACATGAGC-3' (Mut1); en pFR49, la RI presente en la región protegida 2 fue reemplazada por la secuencia diseñada al azar 5'-CGAATTATGAGC-3' (Mut2); en pFR50, las tres RIs identificadas fueron reemplazadas simultáneamente por las secuencias utilizadas en pFR48 y pFR49 (Mut3); y en pFR51, la RI más próxima al TSS del gen *fas* presente en la región protegida 1 fue reemplazada por la secuencia diseñada al azar 5'-CGAATTATGAGC-3' (Mut4) (Fig. 16B). Estos plásmidos, junto con el pFR47, fueron utilizados para transformar una cepa de *M. smegmatis* previamente transformada con el plásmido pFR9 (MSpFR9), derivado del vector multicopia pJAM2



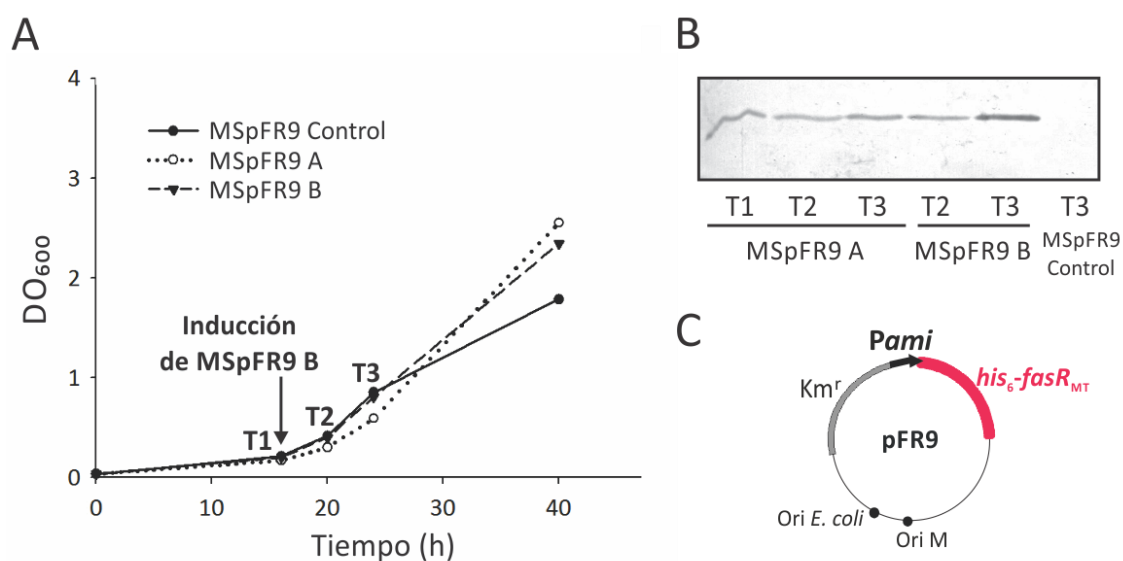
[132] que expresa *fasR<sub>MT</sub>* bajo control de un promotor inducible por acetamida, *Pami* [132, 143]. De esta manera se obtuvieron las cepas de trabajo MSpFR47 pFR9, MSpFR48 pFR9, MSpFR49 pFR9, MSpFR50 pFR9 y MSpFR51 pFR9. La construcción detallada de cada uno de los plásmidos se explica en la sección 2.4.6 de Materiales y Métodos. En todos los experimentos se utilizaron como blanco las correspondientes cepas control MSpSM128 y MSpSM128 pFR9, que contienen el vector reportero vacío.

### 3.2.2.2 *FasR<sub>MT</sub>* es un activador del operón *fas-acpS*

Para caracterizar el rol fisiológico de *FasR* determinamos los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa MSpFR47 pFR9 a distintos tiempos luego de la inducción con acetamida 0.2%. La expresión del regulador como fusión a una cola de histidinas (*His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub>*) en la cepa MSpFR9 se verificó por ensayos de western blot utilizando anticuerpos anti-histidinas. Se realizaron curvas de crecimiento de la cepa MSpFR9 en medio 7H9 suplementado con acetamida 0.2% desde el momento de la inoculación (MSpFR9 A) o en fase exponencial temprana ( $DO_{600}$  0.2; MSpFR9 B). Como control, se emplearon cultivos de la misma cepa que no fueron inducidos (MSpFR9 Control). Como se observa en la figura 20A, no se evidencian diferencias en el crecimiento de la cepa MSpFR9 en presencia de acetamida. Para analizar los niveles intracelulares de *His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub>*, se analizaron mediante western blot extractos proteicos de cada cultivo obtenidos a distintos tiempos (T1, T2 y T3), usando anticuerpos anti-histidina. Como se evidencia en la figura 20B, la proteína *His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub>* se expresa a niveles constantes cuando la inducción se realiza desde el momento de la inoculación, mientras que sus niveles aumentan con el tiempo, cuando el agregado de acetamida se realiza en fase exponencial. Confirmamos así que la proteína de fusión *His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub>* se expresa correctamente en la cepa MSpFR9.

Utilizando la cepa reportera MSpFR47 pFR9, analizamos la actividad del promotor *Pfas<sub>MT</sub>* en condiciones de inducción de la expresión de *FasR<sub>MT</sub>*. Las células se crecieron en medio 7H9 sin o con acetamida 0.2%, adicionada en fase exponencial temprana ( $DO_{600} \sim 0.2$ ), sin observarse diferencias significativas con el crecimiento de una cepa control que contiene el plásmido reportero vacío (MSpSM128 pFR9). A

distintos tiempos post-inducción (120, 180, 240, 360 y 480 min) se recolectaron muestras de cada cultivo y se midió actividad  $\beta$ -galactosidasa a partir de los extractos proteicos obtenidos. En la figura 21B podemos observar que la expresión de FasR<sub>MT</sub> en la cepa MSpFR47 pFR9 condujo a un aumento de hasta el 100% en la actividad  $\beta$ -galactosidasa, en comparación con las células no inducidas. La cepa MSpSM128 pFR9 se utilizó como blanco. Este resultado sugirió fuertemente que FasR es un activador transcripcional del operón *fas-acpS*.



**Figura 20A y B. Expresión de His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> en la cepa MSpFR9.** **A.** Curva de crecimiento de la cepa MSpFR9 en medio 7H9 suplementado con Km y acetamida 0.2% en el momento de la inoculación (MSpFR9 A) o al tiempo T1 (DO<sub>600</sub> 0.2, MSpFR9 B), indicado con una flecha. La cepa MSpFR9 Control se creció sin acetamida. **B.** Análisis de los niveles intracelulares de His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> en la cepa MSpFR9. Se tomaron muestras de los distintos cultivos a los tiempos T1, T2 y T3 (indicados en la curva de crecimiento). Los extractos celulares obtenidos se analizaron por western blot con anticuerpos anti-histidinas. **C.** Esquema del plásmido multicopia pFR9 que expresa *fasR<sub>MT</sub>* como fusión a una cola de histidinas, bajo control del promotor inducible por acetamida, *Pami*.

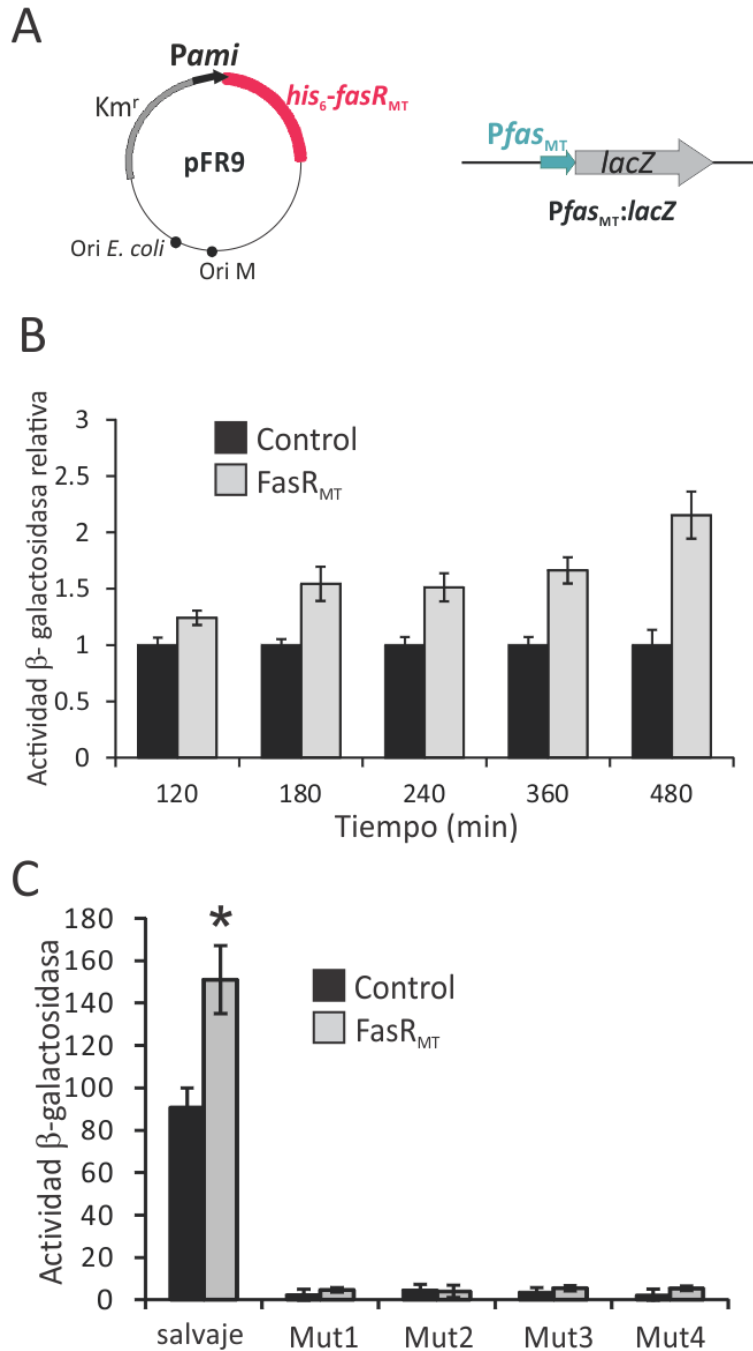
### 3.2.2.3 Las cajas de reconocimiento de FasR<sub>MT</sub> son esenciales para la función del regulador

Para confirmar que el aumento en la actividad  $\beta$ -galactosidasa observada en presencia de FasR<sub>MT</sub> está asociada a la unión del regulador a la región promotora *Pfas<sub>MT</sub>*, construimos versiones mutadas de las fusiones transcripcionales *Pfas<sub>MT</sub>:lacZ* (pFR48, pFR49, pFR50 y pFR51) y analizamos la actividad  $\beta$ -galactosidasa en las cepas

MSpFR48 pFR9, MSpFR49 pFR9, MSpFR50 pFR9 y MSpFR51 pFR9. Las células se crecieron en 7H9 sin y con acetamida 0.2%, adicionada en fase exponencial temprana ( $DO_{600} \sim 0.2$ ). La actividad  $\beta$ -galactosidasa se midió 4 h post-inducción de la expresión de *fasR<sub>MT</sub>*. La figura 21C muestra que la actividad  $\beta$ -galactosidasa es prácticamente indetectable en las cepas que contienen las versiones mutadas de *Pfas<sub>MT</sub>*, confirmando que los sitios de unión a FasR son necesarios para la función del regulador y sugiriendo que la actividad basal del promotor *Pfas* es muy baja.

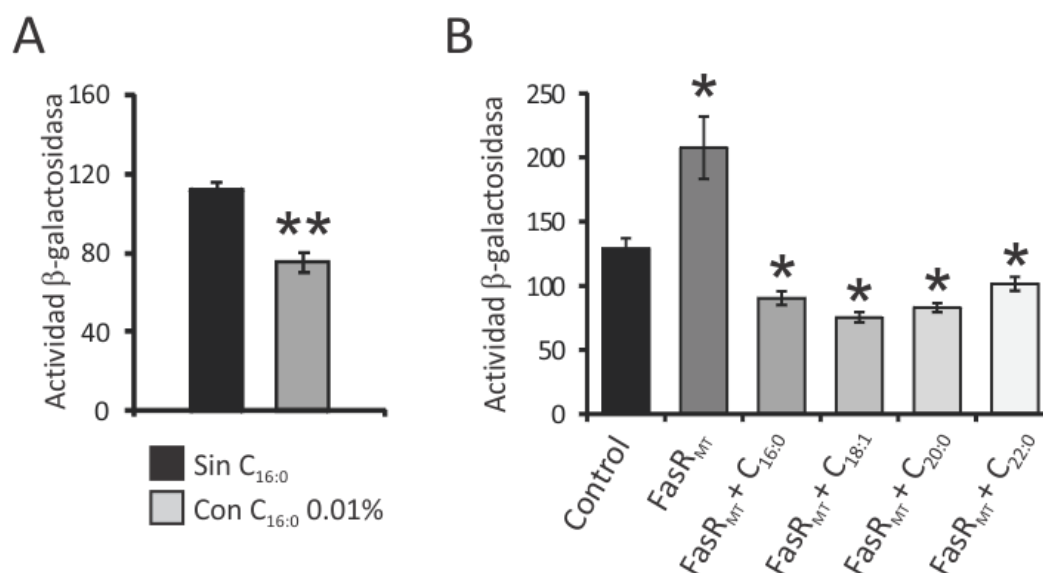
#### 3.2.2.4 Búsqueda de la molécula efectora de FasR<sub>MT</sub>

Los reguladores transcripcionales actúan ajustando la expresión de sus genes blanco de acuerdo a las señales intracelulares que sensan, y su accionar puede estar regulado tanto mediante el control de su expresión como de su actividad. Todos los reguladores transcripcionales involucrados en la vía de síntesis de ácidos grasos descritos hasta el momento y detallados en la sección 1.6 de la Introducción, responden a los niveles intracelulares de determinados metabolitos intermediarios, como son malonil-CoA, acil-CoAs o acil-ACPs. De esta manera y teniendo en cuenta lo reportado para los reguladores de la biosíntesis de ácidos grasos, es probable que ciertos intermediarios de la síntesis de ácidos grasos/micólicos sean los efectores del regulador FasR en micobacterias. En consecuencia, nos propusimos identificar la(s) molécula(s) que podrían modular la unión de FasR al promotor *Pfas*. Se ha demostrado que el sistema FAS-I de *Mycobacterium* presenta una actividad bimodal, liberando acil-CoAs de cadena mediana a larga para la biosíntesis de fosfolípidos y ácidos micólicos, así como también acil-CoAs de cadena muy larga ( $C_{24}$ ) para la producción de la cadena  $\alpha$ -acilada de los ácidos micólicos. En función de esta observación, ensayamos la capacidad de un ácido graso de cadena larga suplementado exógenamente, de modular la actividad del promotor *Pfas<sub>MT</sub>* *in vivo*, midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en una cepa de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 transformada con el plásmido pFR47 (MSpFR47). Las células se crecieron en medio 7H9 suplementado o no con ácido palmítico 0.01% en fase exponencial temprana ( $DO_{600} \sim 0.4$ ). La actividad  $\beta$ -galactosidasa se midió 4 h luego de la adición del ácido graso.



**Figura 21: FasR es un activador transcripcional del operon *fas-*acpS**.** **A.** Las cepas utilizadas en los ensayos presentan el plásmido multicopia pFR9, que expresa *fasR<sub>MT</sub>* como fusión a una cola de histidina bajo control del promotor inducible por acetamida, *Pami*, y una fusión transcripcional *Pfas<sub>MT</sub>:lacZ* integrada por recombinación sitio específica en el genoma de *M. smegmatis*. **B.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa intracelular de la cepa MSpFR47 pFR9 crecidas en 7H9 sin (Control) y con acetamida 0.2% (*FasR<sub>MT</sub>*). La inducción se realizó en fase exponencial temprana ( $DO_{600} \sim 0.2$ ). Se tomaron muestras de cada cultivo a distintos tiempos post-inducción y se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa específica. Los niveles de actividad se muestran relativos a la cepa no inducida y los valores corresponden al promedio de los resultados de tres experimentos independientes  $\pm$  desvío estándar. **C.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa intracelular de las cepas MSpFR47 pFR9 (salvaje), MSpFR48 pFR9 (Mut1), MS pFR49 pFR9 (Mut2), MSpFR50 pFR9 (Mut3) y MSpFR51 pFR9 (Mut4) crecidas en 7H9 sin (Control) y con acetamida 0.2% (*FasR<sub>MT</sub>*). La inducción se realizó en fase exponencial temprana ( $DO_{600} \sim 0.2$ ). Se tomaron muestras de cada cultivo 4 h post-inducción y se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa específica. Los niveles de actividad se muestran como nmol ONPG por min por mg de proteína, y los valores corresponden al promedio de los resultados de tres experimentos independientes  $\pm$  desvío estándar ( $n=3$ ). \* $p < 0.05$ .

El ácido palmítico presente en el medio de cultivo es captado por las células y transformado en su correspondiente éster de CoA. El aumento intracelular de los niveles de  $C_{16}$ -CoA condujo a una disminución en los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa medidos, sugiriendo que esta molécula podría ejercer como posible efector de FasR (Fig. 22A). Para analizar si el efecto observado era dependiente de la longitud de cadena del ácido graso, medimos la actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa MSpFR47 pFR9 crecida en presencia de distintos ácidos grasos. Las células se crecieron en 7H9 sin o con acetamida 0.2% y ácidos grasos 0.01%, suplementados en fase exponencial temprana ( $DO_{600} \sim 0.2$ ), y la actividad  $\beta$ -galactosidasa se midió a partir de los extractos proteicos obtenidos 4 h luego de la suplementación. En la figura 22B podemos observar que la presencia de ácidos grasos de cadena larga en el medio de cultivo ( $C_{16}$  a  $C_{22}$ ) condujo a una disminución de dos a tres veces en la actividad  $\beta$ -galactosidasa medida, sugiriendo fuertemente que la expresión del operón *fas-acpS* es regulada como respuesta del metabolismo celular a la disponibilidad de estas moléculas.

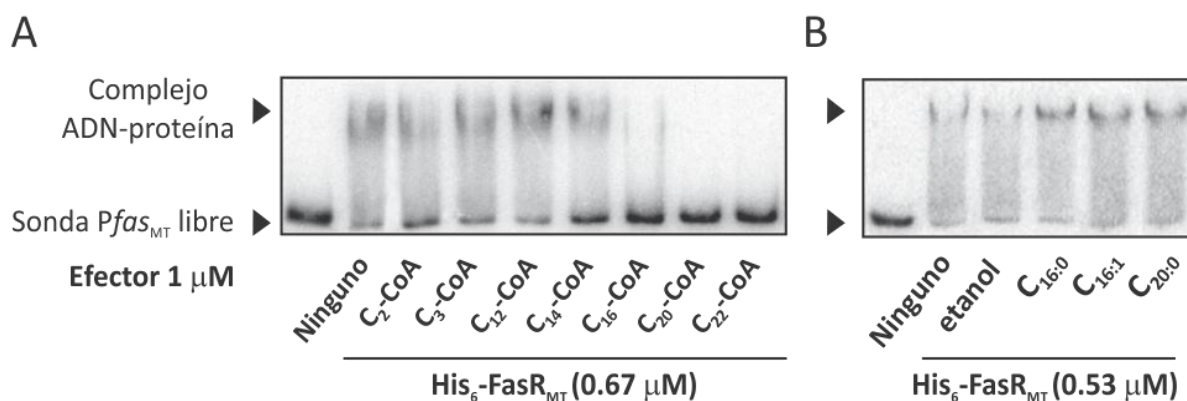


**Figura 22A.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa intracelular de la cepa MSpFR47 crecida en medio 7H9 sin o con  $C_{16:0}$  0.01%. Los niveles de actividad se muestran como nmol ONPG por min por mg de proteína, y los valores corresponden al promedio de los resultados de tres experimentos independientes  $\pm$  desvío estándar ( $n=3$ ). \*\* $p=0.015$ . **B.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa intracelular de la cepa MSpFR47 pFR9 crecida en medio 7H9 sin acetamida (Control), MSpFR47 pFR9 crecida en medio 7H9 con acetamida 0.2% (FasR<sub>MIT</sub>) y MSpFR47 pFR9 crecida en medio 7H9 con acetamida 0.2% en presencia de distintos ácidos grasos a una concentración final 0.01% (FasR<sub>MIT</sub> +  $C_{16:0}$  a FasR<sub>MIT</sub> +  $C_{22:0}$ ). Se tomaron muestras de cada cultivo 4 h post-inducción y se midió actividad  $\beta$ -galactosidasa específica. Los niveles de actividad se muestran como nmol ONPG por min por mg de proteína y los valores corresponden al promedio de los resultados de tres experimentos independientes  $\pm$  desvío estándar ( $n=3$ ). \* $p < 0.0001$ .

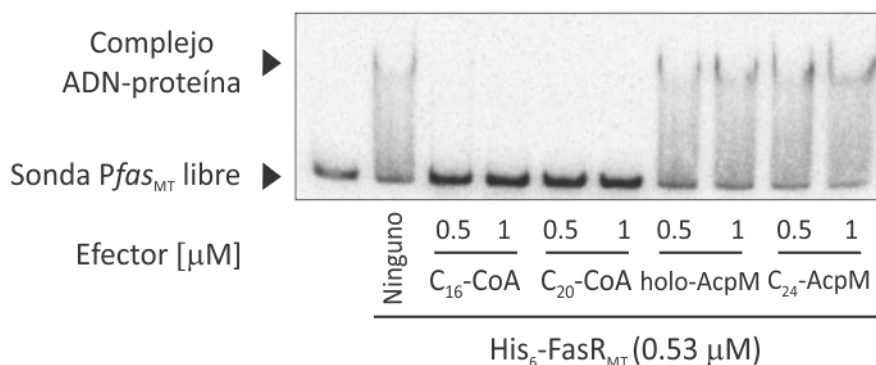
### 3.2.2.5 Los acil-CoAs de cadena larga modulan la unión de FasR<sub>MT</sub> a la región promotora del operón *fas-*acpS**

La reducción de la actividad promotora de *Pfas* observada en células de *M. smegmatis* crecidas en un medio suplementado con ácidos grasos de cadena larga, junto con el hecho de que FasR es un activador transcripcional del operón *fas-*acpS**, nos llevó a la suposición de que los ácidos grasos o sus derivados activados como acil-CoAs pudieran interactuar directamente con FasR de manera de prevenir su unión al ADN. En consecuencia, para identificar la molécula que pudiera servir como señal metabólica para la regulación de la expresión del operón *fas-*acpS**, investigamos por EMSA la capacidad de distintos compuestos intermediarios del metabolismo de ácidos grasos y lípidos en micobacterias de modular la afinidad del regulador FasR<sub>MT</sub> por su sitio operador en el promotor *Pfas<sub>MT</sub>*. Se utilizaron los ácidos: palmítico, palmitoleico y araquídico, y los compuestos derivados de CoA: acetil-CoA, malonil-CoA, lauril-CoA, miristoil-CoA, palmitoil-CoA, araquidoil-CoA y behenoil-CoA. En estos experimentos la proteína His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> se incubó en primer lugar con el compuesto a ensayar, a 4 °C durante 5 min, y posteriormente a temperatura ambiente por 15 min con la sonda *Pfas<sub>MT</sub>* marcada radioactivamente. Se utilizaron concentraciones 0.5 y 1 μM de cada compuesto. Como se muestra en la figura 23, los acil-CoAs de cadena larga (C<sub>14</sub> a C<sub>22</sub>-CoAs) impiden la formación del complejo FasR<sub>MT</sub>-ADN, mientras que los ácidos grasos y los acil-CoAs de cadena corta no tienen efecto sobre la interacción de FasR<sub>MT</sub> con la sonda *Pfas<sub>MT</sub>*, a una concentración final de 1 μM. Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que los acil-CoAs de cadena larga modulan la actividad de FasR en *M. tuberculosis*.

Considerando la estricta coordinación que debe existir entre los dos sistemas FAS en micobacterias, también ensayamos la habilidad de los intermediarios del sistema FAS-II de modular la unión de FasR a *Pfas*. Para ello, siguiendo el protocolo detallado anteriormente utilizamos un acil-AcpM de cadena larga (lignoceroil-AcpM), y holo-AcpM como putativos ligandos, pero ninguno de estos tuvieron algún efecto en la unión de FasR a su secuencia operadora, sugiriendo que la actividad de este regulador no se ve afectada por los intermediarios de la biosíntesis de los ácidos micólicos (Fig. 24).



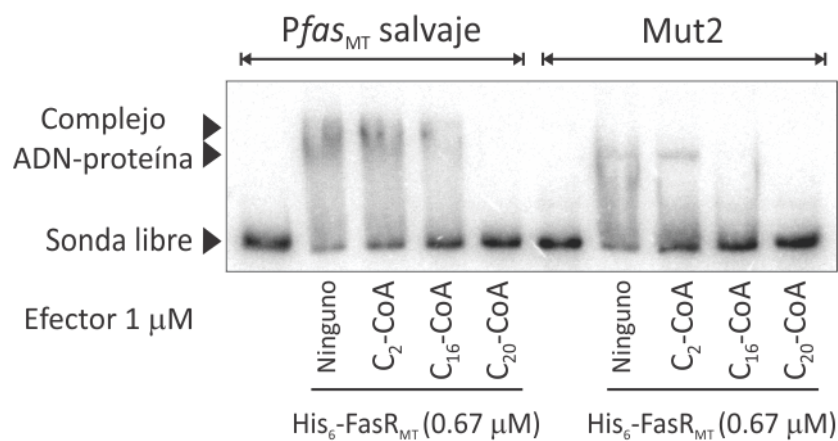
**Figura 23. La unión de FasR a la región promotora *Pfas* es inhibida en presencia de acil-CoAs de cadena larga.** Los ensayos de retardo en gel se realizaron incubando la sonda *Pfas*<sub>MT</sub> marcada radioactivamente con una concentración 0.53 μM o 0.67 μM de His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> en presencia de **A.** acil-CoAs de distinta longitud de cadena a una concentración final 1 μM (C<sub>2</sub>-CoA a C<sub>22</sub>-CoA) **B.** ácidos grasos (C<sub>16:0</sub>, C<sub>16:1</sub>, C<sub>20:0</sub>) a una concentración final 1 μM. Debido a que los ácidos grasos son solubilizados en etanol, se realizó un control con este solvente para verificar que el mismo no produce ningún efecto sobre la interacción ADN-proteína analizada (calle etanol)



**Figura 24. La unión de FasR a la región promotora *Pfas* es inhibida en presencia de acil-CoAs de cadena larga.** El EMSA se realizó incubando la sonda *Pfas*<sub>MT</sub> marcada radioactivamente con una concentración 0.53 μM de His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> en presencia de acil-CoAs (C<sub>16</sub>-CoA, C<sub>20</sub>-CoA) y acil-AcpM (C<sub>24</sub>-AcpM) a una concentración final de 0.5 y 1 μM. Se utilizó holo-AcpM como control.

Como se ha descrito en el capítulo 1, si bien el reemplazo de la RI en la región protegida 2 (Mut2) de la secuencia promotora *Pfas*<sub>MT</sub> por una secuencia diseñada al azar resulta en la formación de un complejo FasR<sub>MT</sub>-ADN, este es diferente al complejo formado con la región promotora salvaje (Fig. 18), e insuficiente para una correcta

activación del operón cuya expresión regula (Fig. 21C). Dado que la unión de FasR a su región operadora está modulada por acil-CoAs de cadena larga, los cuales al interactuar con la proteína podrían alterar su conformación, nos preguntamos si la formación del complejo FasR<sub>MT</sub> con la sonda Mut2 responde de la misma manera a la presencia del efector. En consecuencia, la proteína His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> se incubó en primer lugar con el acil-CoA ensayado a concentración final 1 μM y posteriormente con la sonda Mut2 marcada radioactivamente. Como control, el ensayo se realizó en simultáneo utilizando la sonda Pfas<sub>MT</sub> salvaje, en las mismas condiciones. Como se observa en la figura 25, la unión de FasR<sub>MT</sub> a la sonda Mut2 también se ve comprometida únicamente en presencia de acil-CoAs de cadena larga.



**Figura 25. La unión de FasR a la región promotora Pfas es inhibida en presencia de acil-CoAs de cadena larga.** El ensayo de retardo en gel se realizó incubando las sondas Pfas<sub>MT</sub> salvaje y Mut2 marcadas radioactivamente con una concentración 0.67 μM de His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> en presencia de acil-CoAs (C<sub>2</sub>-CoA, C<sub>16</sub>-CoA y C<sub>20</sub>-CoA).



### 3.2.3 Discusión

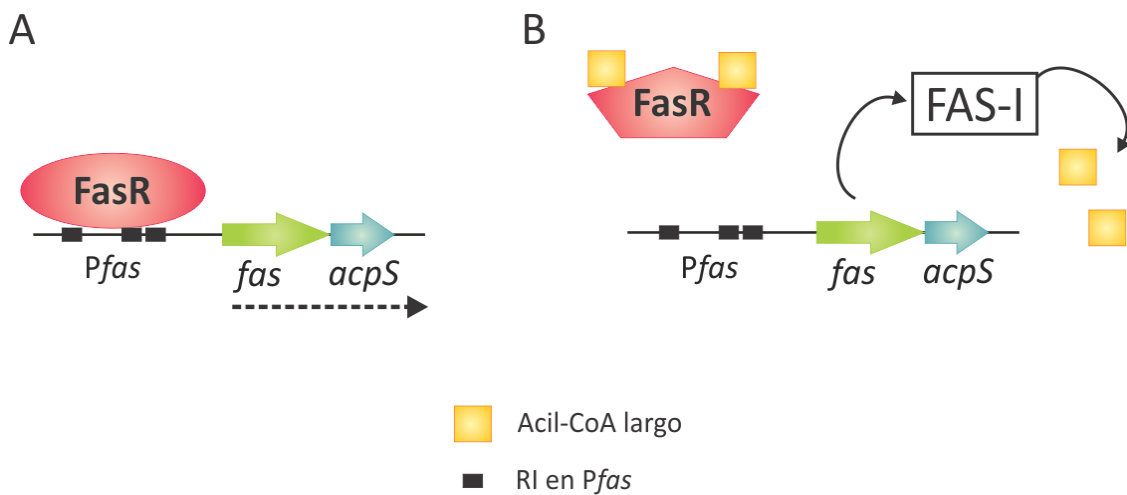
Los resultados obtenidos en el presente capítulo a través de estudios transcripcionales realizados utilizando la fusión reportera *Pfas<sub>MT</sub>-lacZ*, indican que FasR es un activador de la expresión de los genes del operón *fas-accS* (Fig. 21). Esto estaría de acuerdo con la localización de los sitios de unión de este regulador respecto al TSS del gen *fas* (200-300 pb corriente arriba). La naturaleza activadora de FasR es una diferencia importante con la mayoría de los reguladores transcripcionales de la biosíntesis de ácidos grasos en bacterias, que son principalmente proteínas represoras [95]. Las únicas excepciones conocidas hasta el momento corresponden a FadR de *E. coli*, que actúa como represor de los genes de la  $\beta$ -oxidación y activador de los genes de la biosíntesis de ácidos grasos *fabA* y *fabB* (específicamente involucrados en la síntesis de ácidos grasos insaturados) [171] y FasR de *Streptomyces coelicolor*, el cual fue el primer activador del conjunto de genes *fab* descrito en bacterias [108]. En el mismo sentido, FasR difiere de la mayoría de los reguladores de la familia TetR conocidos, que actúan como represores de sus genes blanco [153].

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 la vía de síntesis. Así, mientras en numerosos sistemas bacterianos, los productos finales de estas rutas biosintéticas actúan como efectores comunes de los correspondientes reguladores transcripcionales, como sucede para FadR y FabR (*E. coli*), FabT (*S. pneumoniae*) y DesT (*P. aeruginosa*) [98, 100, 104, 106, 107, 110, 113], en el caso de FapR de *B. subtilis* su regulación ocurre por un mecanismo de prealimentación por malonil-CoA, metabolito utilizado al comienzo de la vía de biosíntesis [104] cuya concentración se encuentra a su vez determinada por la actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa. En función de esta evidencia, uno de los objetivos planteados en este capítulo fue la identificación de la(s) molécula(s) efectoras capaces de modular la afinidad del regulador FasR por la secuencia reconocida en *Pfas*. Teniendo en cuenta que FasR está involucrado en la regulación de la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos, a través de la activación de la expresión del operón *fas-accS*, 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. Debido a que la interacción entre FasR y su sitio de unión al ADN ocurre *in vitro* en ausencia del efector, decidimos evaluar si alguna de estas moléculas podría afectar la formación del complejo FasR-*Pfas*. En consecuencia, EMSAs realizados en presencia de acil-CoAs de distinta longitud de cadena dieron indicio de que los ésteres de ácidos grasos de cadena carbonada  $\geq C_{16}$  son los ligandos sensados por FasR<sub>MT</sub> para liberarse del promotor *Pfas* y de esta manera detener su función activadora (Fig. 23A). El efecto más fuerte se evidenció en presencia de C<sub>20</sub>-CoA; sin embargo, resulta difícil definir con esta técnica si acil-CoAs de mayor longitud de cadena podrían tener un efecto más pronunciado sobre la afinidad de FasR por el ADN. De manera contraria, la presencia de ácidos grasos libres o de un acil-ACP de cadena larga no disminuyó la capacidad de unión de FasR a *Pfas* (Fig. 23B y 24). En este sentido, el mecanismo de modulación de la actividad de FasR 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.

El análisis *in vivo* de las fusiones transcripcionales *Pfas*<sub>MT</sub>: *lacZ*, realizado en medios de cultivo suplementados o no con ácidos grasos de distinta longitud de cadena, sirvió como soporte de los resultados obtenidos *in vitro* (Fig. 22). Estos también sugirieron que los acil-CoAs largos serían las moléculas señal sensadas por FasR *in vivo* para modular su actividad ya que los ácidos grasos captados del medio son inmediatamente convertidos a sus correspondientes derivados acil-CoAs dentro de las células. En este sentido, el efecto negativo sobre la transcripción del gen *fas* observado en presencia de niveles no fisiológicos de MabR [109] podría deberse al efecto que tendría la acumulación de acil-CoAs de cadena larga sobre FasR, ocurrida como consecuencia de una menor expresión de los genes del operón *fasII* y por ende del sistema FAS-II. Nuestra hipótesis sería entonces que FasR sensa la cantidad de acil-CoAs de cadena larga en la célula liberando así la activación del operón *fas-accpS*. A pesar de que aún desconocemos cuáles serían los metabolitos sensados por MabR, resulta interesante especular que los productos de FAS-I podrían cumplir esta función; en consecuencia los niveles celulares de estos compuestos resultarían clave para esta compleja red de regulación.

Este estudio junto con nuestro trabajo previo sobre MabR han contribuido a la identificación del mínimo conjunto de elementos *cis* y *trans* que definen la red de regulación de la biosíntesis de ácidos grasos y micólicos en las micobacterias. A su vez, nuestros resultados sugieren que sería necesario un estricto mecanismo de regulación transcripcional de los genes involucrados en estas vías para mantener la homeostasis lipídica en las micobacterias. Los resultados obtenidos nos permiten postular un modelo de regulación de la biosíntesis de ácidos grasos mediado por FasR. En éste, FasR activa la expresión del operón *fas-acpS* durante el crecimiento exponencial de las micobacterias por unión a su secuencia consenso en la región promotora *Pfas*. Cuando la cantidad de acil-CoAs de cadena larga sintetizados por FAS-I excede los requerimientos metabólicos de la célula, estos interactúan con FasR conduciendo a la liberación del regulador de la región promotora *Pfas*, 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* disminuyen y se restablece el equilibrio en la biosíntesis de ácidos grasos (Fig. 26).



**Figura 26A y B. Modelo de regulación de la expresión del operón *fas-acpS* por FasR.** **A.** Durante el crecimiento exponencial de las micobacterias, FasR activa la expresión del operón *fas-acpS* por unión a las RIs sobre la región promotora *Pfas*. **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 conduciendo a la liberación del regulador de la región promotora *Pfas*, posiblemente como consecuencia de un cambio conformacional de la proteína tras la unión del efector. Como resultado, se inhibe la expresión de los genes del operón *fas-acpS* y se restablece el equilibrio en la biosíntesis de ácidos grasos.

### **3.3 CAPÍTULO 3**

#### **Estudio del rol fisiológico de FasR en *M. smegmatis***

### 3.3.1 Objetivos

#### 3.3.1.1 Objetivo general

Los resultados presentados en el Capítulo 2 indican que FasR sería un regulador positivo (activador) de la síntesis de ácidos grasos en micobacterias. Estudios de mutagénesis de alta densidad y posterior secuenciación sugirieron que *fasR* es esencial en *M. tuberculosis* [172]. Para validar dicha hipótesis nos propusimos analizar la esencialidad de *fasR* en *Mycobacterium*, utilizando *M. smegmatis* como modelo de estudio. La construcción de esta cepa mutante en *fasR* nos permitirá a su vez caracterizar en detalle el rol fisiológico del regulador en el metabolismo de ácidos grasos *in vivo*.

Por otro lado, para analizar si los cambios metabólicos provocados por una disminución de la actividad FAS-I en una mutante en *fasR* son similares a aquellos producidos por la disminución en los niveles transcripcionales de la sintasa, nos propusimos construir una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en *fas*, gen esencial en *Mycobacterium*, en la cual se analizará también la influencia de esta enzima en el perfil lipídico del microorganismo.

#### 3.3.1.2 Objetivos particulares

A partir del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Determinar la esencialidad de *fasR* en *M. smegmatis*.
- Construir una cepa de *M. smegmatis* mutante en *fasR*, que permita el estudio del rol fisiológico del regulador.
- Analizar el efecto de la disminución en los niveles transcripcionales de *fasR* en el metabolismo de ácidos grasos de *Mycobacterium*.
- Construir una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en *fas*, gen esencial en *Mycobacterium*.
- Comparar el efecto fisiológico observado para la cepa de *M. smegmatis* mutante en *fasR*, con aquel evidenciado en una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en *fas*.

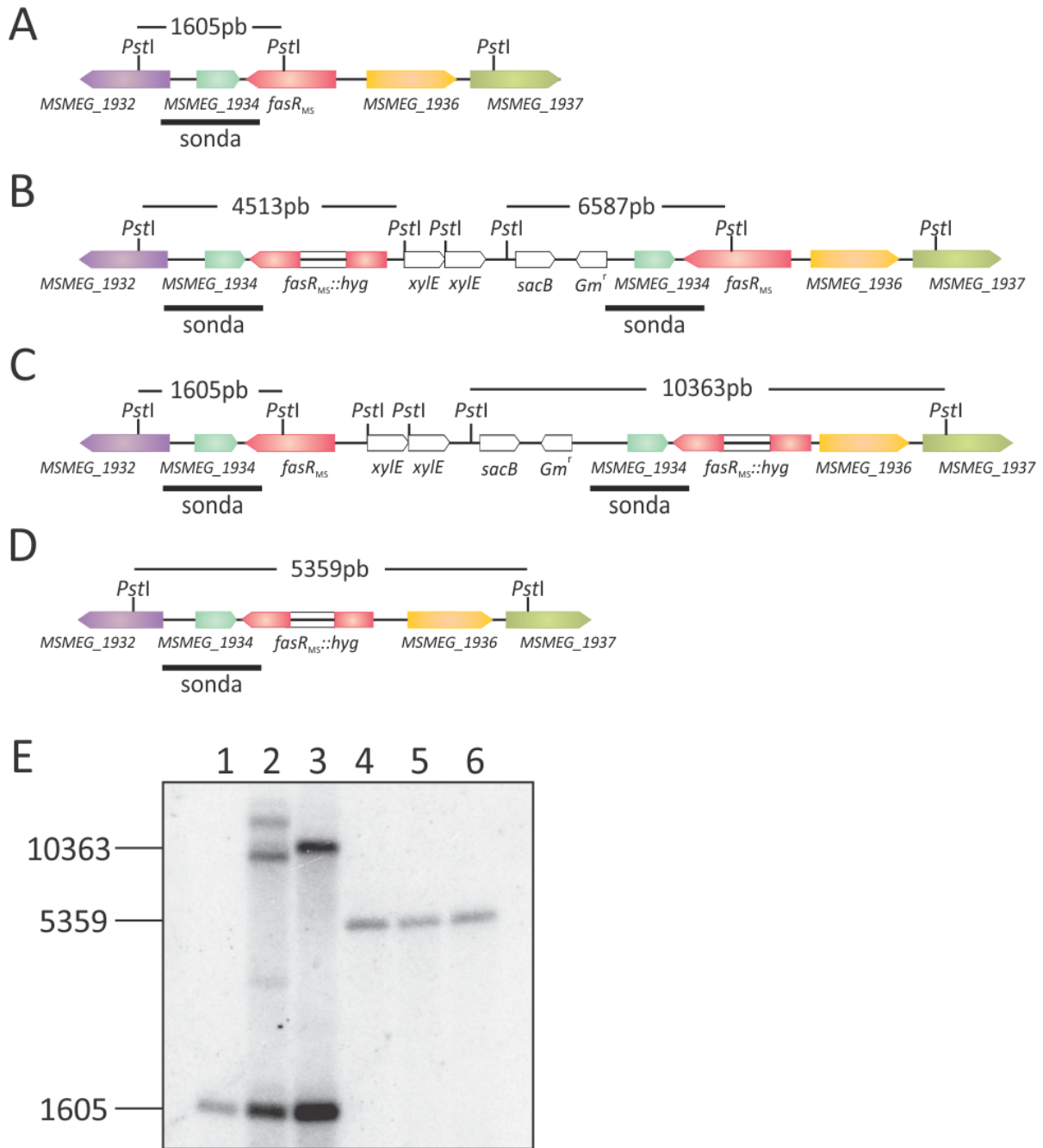
### 3.3.2 Resultados

#### 3.3.2.1 Construcción de una cepa de *M. smegmatis* mutante en *fasR*, utilizando el plásmido termosensible pPR27

Mediante experimentos combinados de mutagénesis de alta densidad y análisis por secuenciación masiva se ha postulado que *fasR* sería un gen esencial en *M. tuberculosis* [172]. Este método se basa en la construcción de una biblioteca de mutantes por transposición de *M. tuberculosis* H37Rv, de manera tal que cada cepa que sobrevive a la mutagénesis contenga sólo una única copia del transposón integrada en su genoma. Mediante amplificación por PCR y secuenciación, se identifican los genes cuya mutación no resulta perjudicial para la viabilidad celular. Los genes que caen fuera de este grupo y no presentan inserciones en su secuencia se clasifican, por defecto, como esenciales. Como consecuencia, los resultados obtenidos a partir de este tipo de análisis son solamente orientativos y resulta necesario realizar experimentos de mutagénesis dirigida para determinar si un gen en particular es esencial o no para la viabilidad de un microorganismo. Por otro lado, resulta importante destacar que la mayoría de los reguladores de la biosíntesis de ácidos grasos descritos hasta el momento en bacteria no son esenciales para su viabilidad [103, 106, 173]. La única excepción es MabR, una proteína involucrada en la regulación de la biosíntesis de ácidos micólicos en micobacterias [109].

En función de lo descrito anteriormente, para confirmar la esencialidad de *fasR* en la viabilidad de *Mycobacterium* nos propusimos mutar este gen en *M. smegmatis* utilizando una estrategia de recombinación homóloga en dos pasos [134]. Para el primer evento de recombinación, el vector termosensible (*ts*) pFR13, derivado del pPR27 que contiene una copia del gen *fasR* interrumpida por un cassette de higromicina (*fasR::hyg*), se utilizó para transformar una cepa salvaje de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 por electroporación. Una de las colonias transformantes resistentes a higromicina (Hyg) fue crecida a la temperatura permisiva de 30 °C y plaqueada a la temperatura restrictiva de 42 °C para seleccionar un primer evento de recombinación. En estas condiciones, donde el plásmido pFR13 no puede replicar, se espera que las colonias resistentes a Hyg se originen por integración del mismo en el genoma, mediada por un evento de recombinación homóloga. Además, la integración del

plásmido también aporta el gen *xylE*, el cual codifica para la enzima catecol 2,3-dioxigenasa y confiere a la bacteria la capacidad de oxidar el compuesto catecol dando una coloración amarilla a las colonias. Las colonias Hyg<sup>r</sup>, XylE<sup>+</sup> se chequearon mediante southern blot (Fig. 27) y se seleccionó aquella que presentaba un evento de recombinación legítimo en la copia cromosomal de *fasR*. Para seleccionar el intercambio alélico intra-cromosomal, la colonia de *M. smegmatis* con la correcta integración de pFR13 (MS SCO) se creció en 7H9 a 37 °C y se plaqueó en LB-Hyg-Sacarosa a 42 °C [134]. En este caso, se espera que la recombinación de lugar al reemplazo de la copia salvaje del gen por aquella interrumpida por el cassette de Hyg, perdiéndose de esta manera casi la totalidad del vector pFR13. Dado que el mismo presenta una copia del gen *sacB*, que confiere sensibilidad a Sacarosa, las bacterias que hayan cursado una recombinación homóloga y perdido consecuentemente el plásmido, podrán crecer en medios suplementados con Sacarosa. Sin embargo ninguna de las colonias analizadas presentaron el fenotipo esperado (Hyg<sup>r</sup>, Sacarosa<sup>r</sup>, blanca tras rociar con catecol) dando indicio de que el reemplazo alélico no era posible y sugiriendo de este modo que *fasR* sería un gen esencial en *M. smegmatis*. En consecuencia, para poder obtener el segundo evento de recombinación construimos una cepa merodiploide transformando la cepa MS SCO con el vector pFR5 (vector integrativo con *fasR<sub>MT</sub>* bajo control del promotor inducible por acetamida, *Pami*). La cepa transformante Km<sup>r</sup> Hyg<sup>r</sup> (MS SCO pFR5) se creció a 37 °C en 7H9-Hyg-Km y se plaqueó en LB-Hyg-Km-Sacarosa a 42 °C. Un 80% del total de las colonias recuperadas en estas condiciones resultaron blancas tras rociar con catecol, indicando que el segundo evento de recombinación había ocurrido satisfactoriamente dando lugar al intercambio alélico intra-cromosomal *fasR/fasR::hyg* en la cepa MSΔ*fasR* pFR5. Utilizando ADN genómico extraído a partir de tres de estas colonias confirmamos mediante southern blot el correcto reemplazo alélico en el locus *fasR* (Fig. 27). Estos experimentos confirmaron que *fasR* sería un gen esencial en *M. smegmatis* y sugieren fuertemente que FasR<sub>MT</sub> y FasR<sub>MS</sub> tienen funciones similares en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, respectivamente.



**Figura 27. Obtención de una mutante condicional de *fasR* en *M. smegmatis*.** Organización genética, mapa de restricción parcial y perfiles de hibridación esperados de la región cromosómica de *fasR<sub>MS</sub>* en **A.** una cepa salvaje *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, **B-C.** los dos posibles eventos de recombinación para una cepa MS SCO y **D.** una cepa de *M. smegmatis* mutante por delección en el gen *fasR<sub>MS</sub>*. **E.** Southern blot de las distintas cepas de *M. smegmatis*. El ADN cromosomal se digirió con *Pst*I y se analizó por hibridación con una sonda marcada de 950 pb correspondiente a la región 3' del gen *fasR<sub>MS</sub>* (indicada con una barra). Calles: 1, cepa salvaje de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155; 2, cepa con un primer evento de recombinación ilegítimo; 3, MS SCO pFR5, con la organización genética que se muestra en C; 4-6, MSΔ*fasR* pFR5 (se muestran tres clones diferentes DCO1, DCO2 y DCO3, respectivamente).

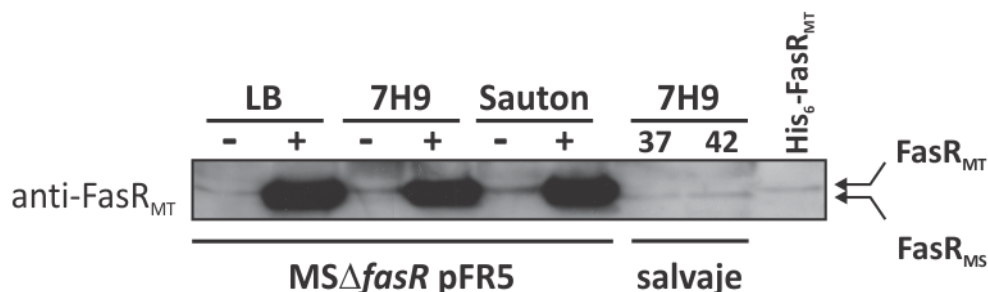


La cantidad de herramientas genéticas disponibles para el desarrollo de mutantes condicionales en *Mycobacterium* es escasa y la mayoría no permite un control estricto de la expresión del gen en estudio. Dado que nuestro trabajo se centra en el estudio de reguladores transcripcionales, los cuales ejercen su función celular a concentraciones relativamente bajas en comparación con las demás proteínas bacterianas, resulta importante determinar si los niveles de expresión de *fasR* en la mutante condicional MS $\Delta$ *fasR* pFR5, en ausencia del inductor, son menores a los encontrados en una cepa de *M. smegmatis* salvaje. Para ello crecimos la cepa mutante a 37 °C en diferentes medios de cultivo: LB, 7H9 o Sauton, en presencia o ausencia de acetamida 0.2% agregada al momento de la inoculación. En paralelo, se creció la cepa de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, a 37 °C y 42 °C, en medio 7H9. En fase exponencial temprana se tomaron muestras de cada cultivo a partir de las cuales se prepararon extractos proteicos libres de células. Los mismos se analizaron por western blot utilizando anticuerpos anti-FasR<sub>MT</sub> obtenidos en conejos en nuestro laboratorio e igualando el contenido sembrado por calle en función de la concentración de los extractos proteicos. En primer lugar y como se observa en la figura 28, confirmamos que la proteína FasR<sub>MS</sub> no se expresa en la mutante condicional, evidenciándose únicamente su ortólogo FasR<sub>MT</sub> de mayor peso molecular, el cual se sintetiza a partir del plásmido utilizado en la complementación. Por otro lado, si bien en presencia del inductor acetamida se evidencia un aumento considerable de los niveles de síntesis de FasR a partir del promotor *Pami*, en ausencia del mismo el regulador se está expresando y sus niveles resultarían ser comparables a los hallados en una cepa de *M. smegmatis* salvaje. En consecuencia, la mutante condicional MS $\Delta$ *fasR* pFR5 no resulta apropiada para el estudio del rol fisiológico de FasR, lo que nos llevó a utilizar un sistema que ofrezca un mejor control de la expresión del gen en estudio.

### **3.3.2.2 Construcción de una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en *fasR*, utilizando el sistema TetR/Pip OFF**

Con el objetivo de obtener una mutante condicional en la cual pudiésemos controlar apropiadamente la expresión de *fasR*, utilizamos una adaptación del sistema desarrollado por Boldrin y colaboradores [135]. Este sistema permite regular de forma

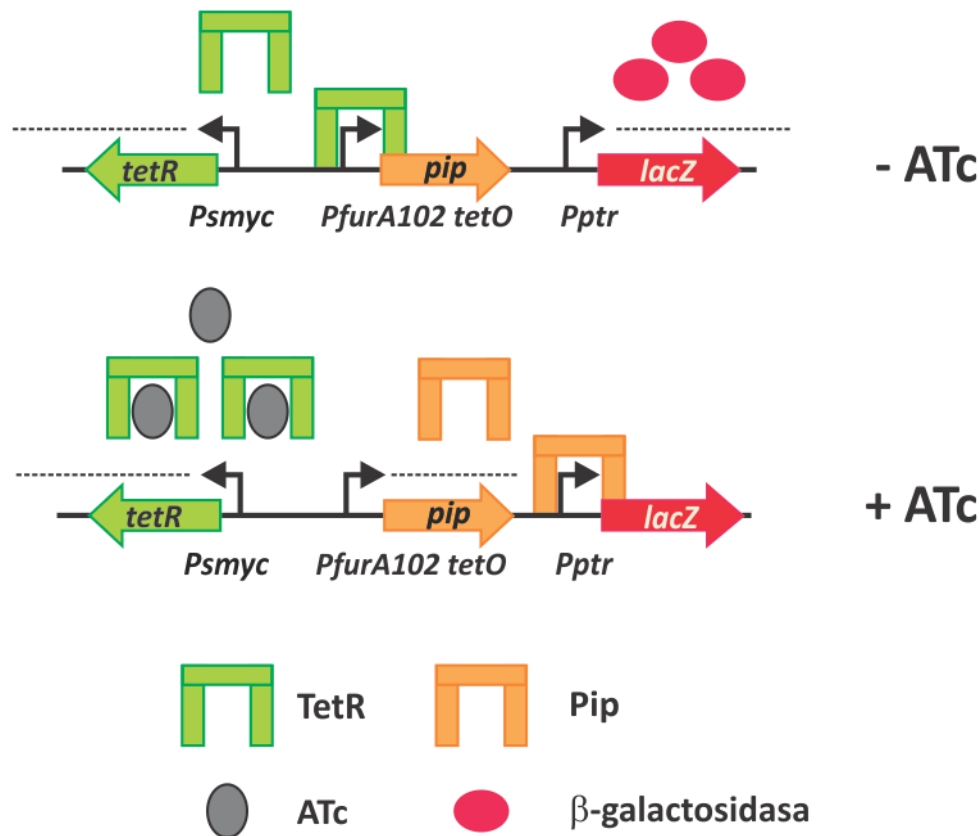
estricta los niveles de expresión de un gen de interés, mediante la utilización de dos represores diferentes (TetR y Pip) codificados a nivel cromosómico y la adición de anhidrotetraciclina (ATc), la cual permite una fuerte represión del gen en estudio.



**Figura 28. Expresión de *fasR*<sub>MT</sub> en la cepa *MSΔfasR* pFR5 a partir del promotor *Pami*.** La cepa *MSΔfasR* pFR5 se creció a 37 °C en medio LB, 7H9 y Sauton, con (+) y sin (-) acetamida 0.2%. En fase exponencial temprana se tomaron muestras de cada cultivo y se analizaron por western blot. La detección de los niveles intracelulares de FasR<sub>MT</sub> se realizó utilizando anticuerpos anti-FasR<sub>MT</sub> obtenidos en conejo. Como control, se analizaron los niveles del regulador en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (salvaje) crecida hasta fase exponencial temprana, en medio 7H9 a 37 °C y 42 °C. Como control positivo se sembraron 15 ng de la proteína purificada His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub>.

Como se muestra en la figura 29, el gen es clonado bajo el control del promotor *ptr* (*Pptr*), dependiente del represor pristinamicina (Pip) de *Streptomyces pristinaespiralis* [174]. El gen *pip*, a su vez está regulado por el represor TetR. La estrategia consiste en agregar ATc al medio de cultivo, que ingresa a la bacteria y se une a la proteína TetR, liberándola de la región promotora y permitiendo la expresión del gen *pip*. Tras su síntesis, Pip se une al *Pptr* y reprime la expresión del gen en estudio. El sistema TetR/Pip OFF completo se encuentra en el vector integrativo pFRA42B, el cual a su vez confiere a la bacteria resistencia a estreptomycin (Sm) [135].

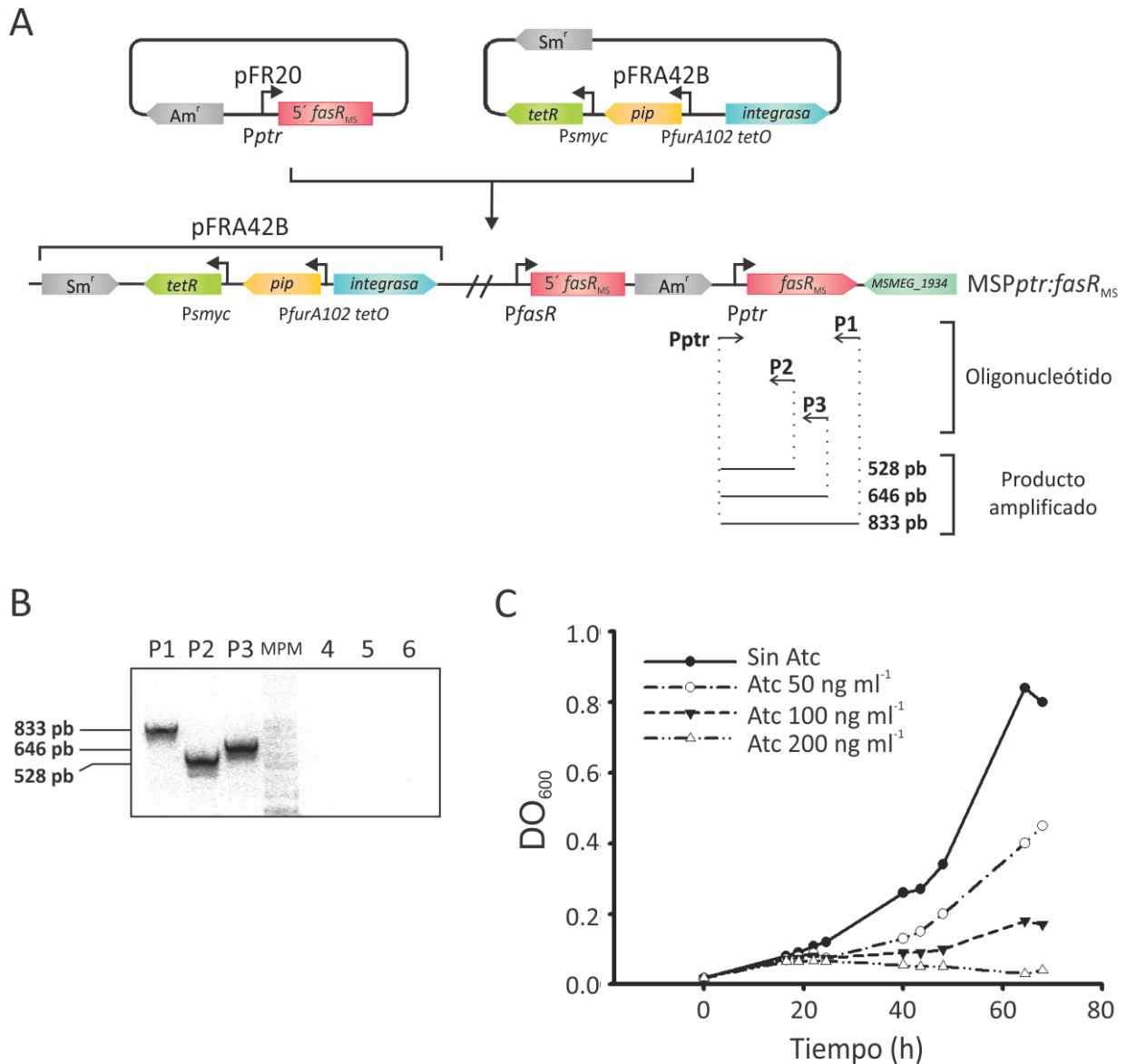
Para la construcción de la mutante condicional en *fasR*, la región 5' de *fasR*<sub>MS</sub> se clonó bajo control del *Pptr*, dependiente de Pip en el plásmido *ts* pPR27 [134], obteniéndose el plásmido pFR20. Este último se utilizó para transformar una cepa de *M. smegmatis* conteniendo el plásmido pFRA42B, que posee el sistema TetR/Pip OFF completo. Se seleccionó una de las transformantes resistente a Sm y apramicina (Am), se creció a 30 °C y se plaqueó a 42 °C para promover la recombinación del plásmido.



**Figura 29. Modelo del sistema TetR/Pip OFF.** En ausencia de anhidrotetraciclina (ATc), TetR se une a sus regiones operatorias apagando la transcripción de *pip* y permitiendo la expresión del gen de interés (*lacZ*). En presencia de ATc, *pip* se transcribe y como resultado Pip reprime la expresión de *lacZ*.

Se obtuvo así la cepa de *M. smegmatis* MSP*ptr:fasR*<sub>MS</sub> la cual presenta el gen *fasR*<sub>MS</sub> bajo control de ATc (Fig. 30A). Cuando la mutante condicional MSP*ptr:fasR*<sub>MS</sub> se plaqueó en medio sólido con ATc 200 ng ml<sup>-1</sup>, no se observó formación de colonias confirmando así la esencialidad de *fasR* en *M. smegmatis*. El evento correcto de recombinación se confirmó por PCR (Fig. 30B).

La cepa mutante se creció en medio 7H9 suplementado con Sm y Am, en presencia de distintas concentraciones de ATc (50 a 200 ng ml<sup>-1</sup>). En estas condiciones la mutante *fasR* detuvo su crecimiento tras 20 h de incubación. Sin embargo, el crecimiento se restableció a distintos tiempos dependiendo de la concentración de ATc en el medio. Esto posiblemente se deba a la inestabilidad de la ATc sugerida previamente [135]. A partir de este experimento se seleccionó la concentración de trabajo de 200 ng ml<sup>-1</sup> como la más apropiada para una correcta represión de la expresión de *fasR* bajo control del *Pptr* en esta cepa (Fig. 30C).



**Figura 30A-C. Obtención de una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en *fasR* mediante el sistema TetR/Pip OFF. A.** Esquema de la estrategia que involucra al plásmido *ts* pFR20 derivado del vector pPR27 y al plásmido integrativo pFRA42B. Organización genética de los plásmidos utilizados y de la cepa *MSPptr:fasR<sub>MS</sub>* resultante. Se indican los oligonucleótidos utilizados para el chequeo del evento de recombinación correcto y el tamaño de los productos amplificados resultantes. *Sm<sup>r</sup>*, resistencia a estreptomycin; *Am<sup>r</sup>*, resistencia a apramicina. **B.** Chequeo del evento de recombinación correcto en la mutante condicional *MSPptr:fasR<sub>MS</sub>* por PCR. Se extrajo ADN genómico de la cepa recuperada a 42 °C y se analizó por PCR utilizando el oligonucleótido *Pptr* que hibrida sobre el *Pptr* y dos oligonucleótidos internos al gen *fasR<sub>MS</sub>*, los cuales hibridan por fuera del sitio de posible recombinación (P1, 833 pb; y P3, 646 pb). Como control también se realizó la amplificación con el oligonucleótido *FasRMS-RXbaI* (P2), el cual se utilizó para la construcción del plásmido pFR20 (P2, 528 pb). MPM, Marcador de peso molecular. Calles 4-6, controles negativos realizados con cada par de oligonucleótidos *Pptr* con P2, P1 y P3 respectivamente, y H<sub>2</sub>O. **C.** El crecimiento de la cepa *MSPptr:fasR<sub>MS</sub>* responde al agregado de ATc al medio de cultivo. La cepa *MSPptr:fasR<sub>MS</sub>* se creció en medio 7H9 suplementado con *Sm* y *Am*, en presencia de distintas concentraciones de ATc (50 a 200 ng ml<sup>-1</sup>) a 42 °C. El crecimiento de la misma se detiene tras 20 h de incubación en todos los casos.

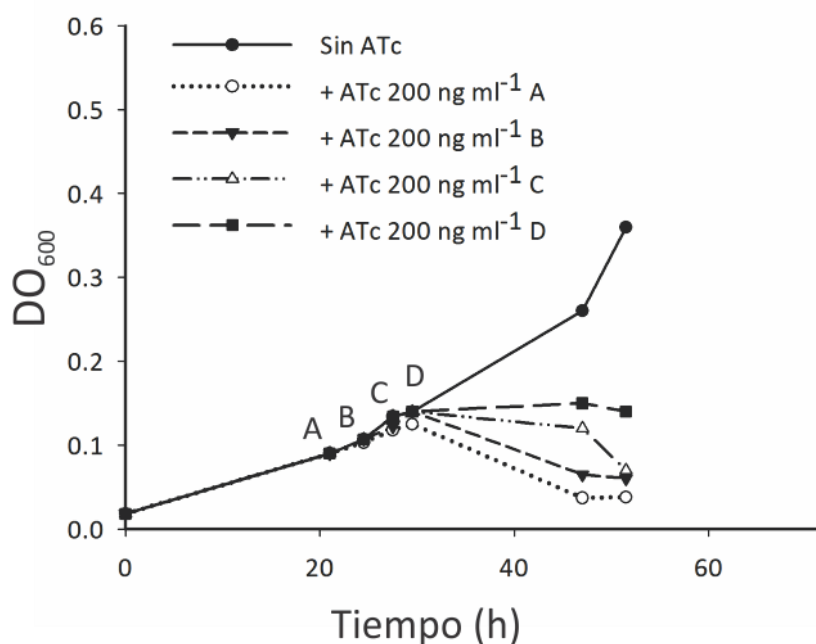
### 3.3.2.3 Caracterización de la cepa MSPptr:fasR<sub>MS</sub>

Hemos observado que el agregado de ATc 200 ng ml<sup>-1</sup> al medio de cultivo desde el momento de la inoculación sería suficiente para reprimir la expresión de *fasR* e impedir así el crecimiento de la cepa mutante MSPptr:fasR<sub>MS</sub>. Nos preguntamos entonces si el agregado de ATc en un punto determinado de la curva de crecimiento era capaz de detener el crecimiento bacteriano como efecto de una disminución en la expresión del regulador, permitiendo la utilización de esta cepa para los análisis posteriores. En función de ello, se creció la mutante condicional MSPptr:fasR<sub>MS</sub> en medio 7H9-Sm-Am a 42 °C, y a distintos tiempos se separaron alícuotas para ser suplementadas con ATc 200 ng ml<sup>-1</sup>. En la figura 31 podemos observar que el agregado de ATc en fase exponencial temprana provocó la inhibición del crecimiento bacteriano.

Con el fin de corroborar que los niveles de transcripto *fasR* sean menores cuando se adiciona ATc al medio de cultivo, cuantificamos los niveles del ARNm correspondiente por PCR en tiempo real (qRT-PCR) utilizando el método de Pfaffl [151]. En éste, los niveles de expresión relativa de un gen blanco se calculan teniendo en cuenta la eficiencia de los oligonucleótidos (E) y el valor del punto de corte (Ct) para una muestra desconocida respecto a la muestra control, y se expresa en comparación a un gen de referencia. El modelo matemático es:

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

En esta fórmula,  $E_{\text{blanco}}$  y  $E_{\text{ref}}$  son las eficiencias de los pares de oligonucleótidos utilizados en la qRT-PCR para amplificar el transcripto de un gen blanco y un gen de referencia respectivamente; y  $\Delta Ct_{\text{blanco}}$  y  $\Delta Ct_{\text{ref}}$  son las desviaciones de los valores de Ct del transcripto de un gen blanco y un gen de referencia respectivamente, en la muestra tratada respecto al control. El gen de referencia debe ser un gen de expresión constitutiva cuya expresión no varíe en las condiciones de análisis, en este caso empleamos el gen *sigA* que codifica para el factor sigma vegetativo de *Mycobacterium* ( $\sigma^A$ ), perteneciente a la familia  $\sigma^{70}$  [175].



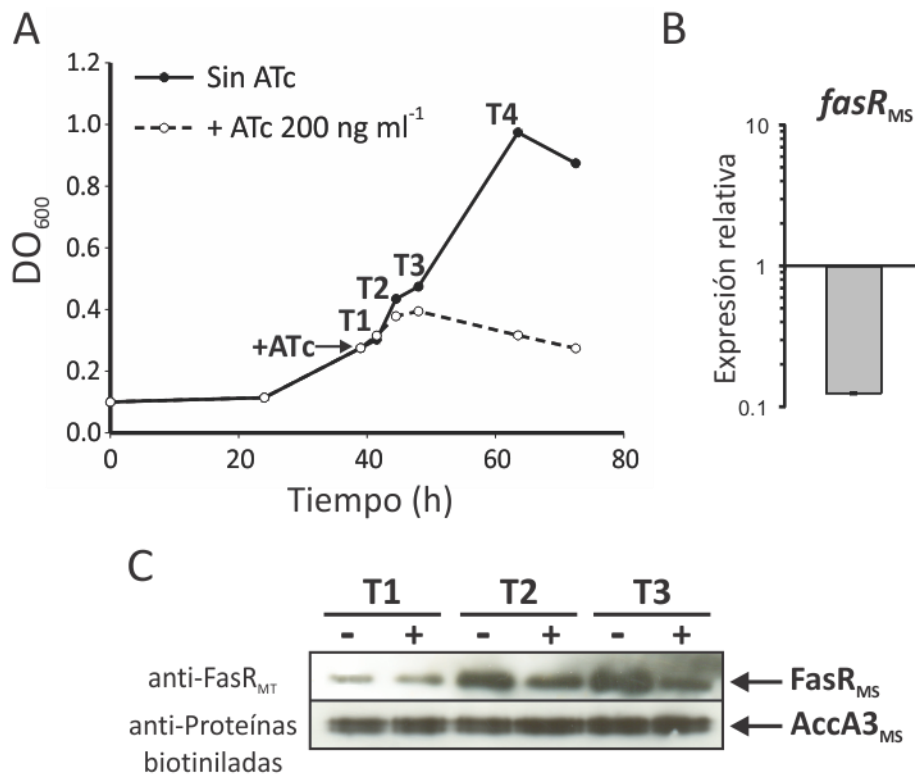
**Figura 31. Efecto del agregado de ATc 200 ng ml<sup>-1</sup> a distintos tiempos en el crecimiento de la mutante condicional MSPptr:fasR<sub>MS</sub>.** La cepa se creció en medio 7H9-Sm-Am a 42 °C. A distintos tiempos (A-D) se separaron alícuotas y se trataron con ATc 200 ng ml<sup>-1</sup>. Se siguió el crecimiento de cada uno de estos cultivos por densidad óptica (DO<sub>600</sub>).

La mutante condicional MSPptr:fasR<sub>MS</sub> se creció en medio 7H9-Sm-Am durante 40 h (hasta DO<sub>600</sub>~0.25), tras lo cual el cultivo fue dividido en dos fracciones iguales y una de ellas se suplementó con ATc 200 ng ml<sup>-1</sup>. El crecimiento bacteriano en presencia del mismo se vio inhibido a partir de las 3 h del agregado de ATc (Fig. 32A). A las 9 h (T3) de exposición a ATc, se extrajo ARN total a partir de una alícuota de cada cultivo y se sometió a retrotranscripción (RT) utilizando hexanucleótidos degenerados. Los ADNc resultantes se utilizaron para cuantificar la cantidad relativa de transcrito *fasR<sub>MS</sub>* por qRT-PCR. Como se muestra en la figura 32B, la expresión de *fasR<sub>MS</sub>* se encuentra severamente reprimida en la muestra suplementada con ATc (~90%) en comparación a la muestra no tratada. La represión de la expresión de *fasR* se confirmó también por western blot utilizando anticuerpos anti-FasR<sub>MT</sub> obtenidos en conejo, evidenciándose una clara disminución de los niveles proteicos de FasR<sub>MS</sub> tras 6 (T2) y 9 (T3) h de tratamiento con ATc (Fig 32C).

#### 3.3.2.4 FasR es un activador del operón *fas-*acpS** *in vivo*

Habiendo corroborado la disminución de los niveles proteicos de FasR<sub>MS</sub> en presencia de ATc en la cepa mutante, y para continuar con la caracterización del rol de FasR en la biosíntesis de ácidos grasos, analizamos la expresión de los genes del operón *fas-*acpS** en la cepa *MSPptr:fasR<sub>MS</sub>*. Las cantidades relativas de los ARNm de *fas<sub>MS</sub>* y *acpS<sub>MS</sub>* se midieron por qRT-PCR a las 9 h (T3) luego del agregado de ATc y se compararon con una muestra no tratada. Nuevamente, en este punto se extrajo el ARN total a partir de alícuotas de cada cultivo y se sintetizó el correspondiente ADNc utilizando hexanucleótidos degenerados. Como se indica en la figura 33A, la transcripción de ambos genes se encuentra disminuida ~40% cuando las células presentan niveles menores de FasR. Estos resultados confirman que *fas* y *acpS* forman parte de una misma unidad transcripcional y que FasR es un activador transcripcional de este operón.

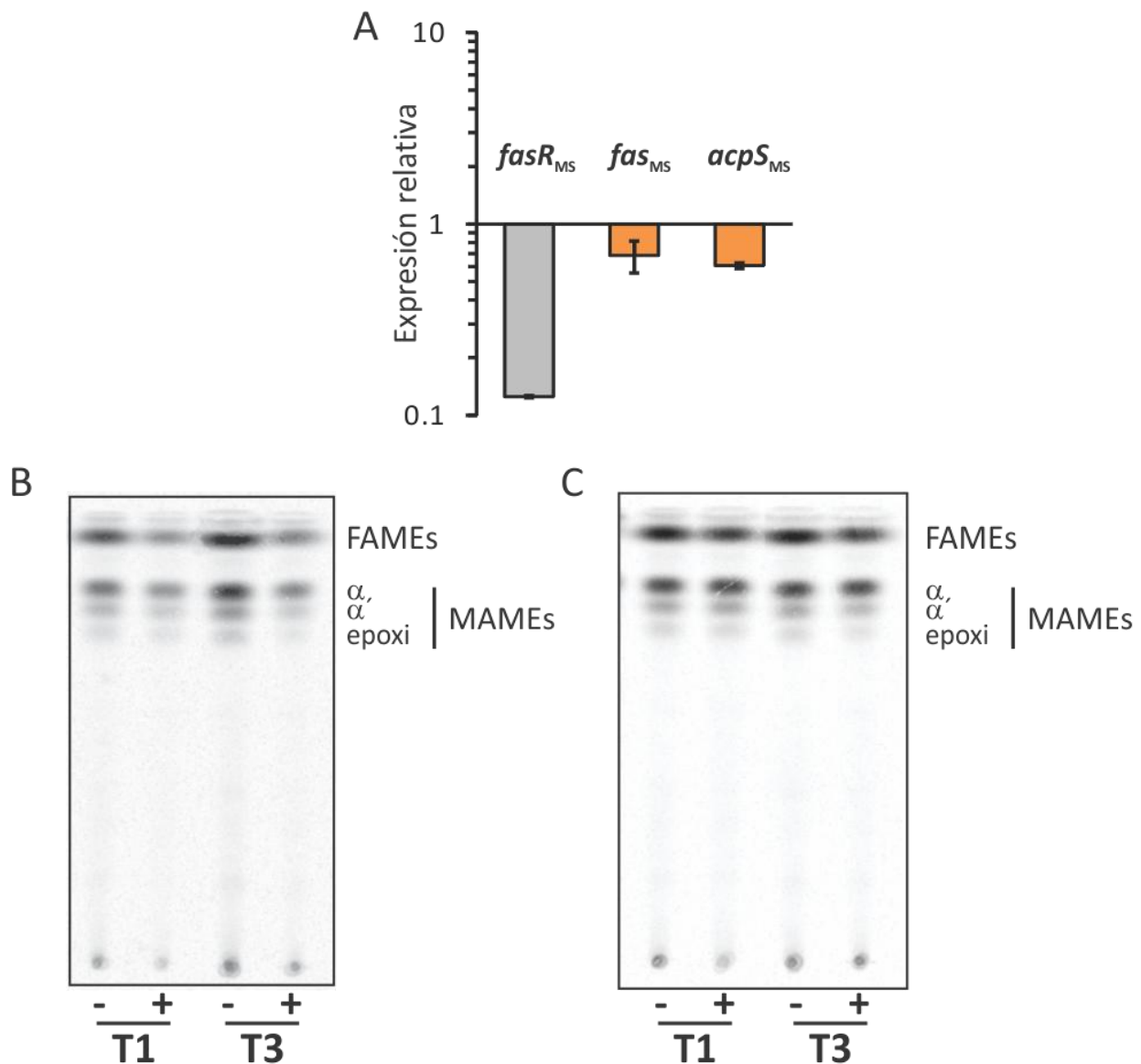
Para estudiar las consecuencias fisiológicas de la disminución en el contenido celular de FasR, se realizaron experimentos de marcación con [<sup>14</sup>C] acetato en la cepa *MSPptr:fasR<sub>MS</sub>*. La cepa se creció en medio 7H9-Sm-Am durante 40 h, tras lo cual el cultivo fue dividido en dos fracciones iguales y una de ellas fue suplementada con ATc 200 ng ml<sup>-1</sup>. A las 3 h y 9 h posteriores a la suplementación, 5 ml de cada cultivo se marcaron con [<sup>14</sup>C] acetato durante 1 h. Los lípidos se extrajeron de las células y se metilaron utilizando yodometano. Los metil ésteres de ácidos grasos (FAMEs) y ácidos micólicos (MAMEs) obtenidos se sometieron a cromatografía en capa delgada (TLC) seguida de autoradiografía, normalizando la siembra por densidad óptica. Como se muestra en la figura 33B, la síntesis *de novo* de ácidos grasos y ácidos micólicos se ve progresivamente reprimida tras 3 h (T1) y 9 h (T3) de tratamiento con ATc, confirmando el rol activador de FasR.



**Figura 32A-C. El agregado de ATc inhibe la expresión de *fasR<sub>MS</sub>* en la cepa *MSPptr:fasR<sub>MS</sub>*. A.** Curva de crecimiento de la cepa *MSPptr:fasR<sub>MS</sub>* en medio 7H9-Sm-Am. Luego de 40 h ( $DO_{600} \sim 0.25$ ), el cultivo se dividió en dos fracciones iguales y una de ellas fue suplementada con ATc 200 ng ml<sup>-1</sup> (indicado con una flecha). Para los análisis posteriores, las muestras fueron tomadas a las 3 h (T1), 6 h (T2), 9 h (T3) y 20 h (T4) posteriores al agregado de ATc. **B.** Nivel de transcripto *fasR<sub>MS</sub>* medido a las 9 h luego del agregado de ATc (T3) por qRT-PCR. Se muestra el nivel de transcripto en la cepa *MSPptr:fasR<sub>MS</sub>* crecida con ATc 200 ng ml<sup>-1</sup> respecto a la crecida en ausencia del mismo. La normalización se realizó utilizando el transcripto de *sigA<sub>MS</sub>* como invariable. **C.** Análisis por western blot de extractos proteicos libres de células de la cepa *MSPptr:fasR<sub>MS</sub>* crecida con (+) y sin (-) ATc 200 ng ml<sup>-1</sup>. La detección se realizó utilizando anticuerpos anti-FasR<sub>MT</sub> obtenidos en conejo (panel superior) y estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano para detectar la proteína biotinilada AccA3<sub>MS</sub> como control de carga (panel inferior).

Por otro lado, y con el propósito de detectar si la distribución de marca entre FAMEs y MAMEs se veía modificada en estas condiciones, realizamos una TLC con los mismos extractos sembrando en este caso igual número de cuentas en todas las calles. A diferencia del ejemplo anterior, en este caso no se observaron diferencias significativas entre ambas muestras, indicando que la disminución en la incorporación de acetato radioactivo en ácidos grasos y ácidos micólicos ocurre de manera proporcional en ambos casos (Fig. 33C).

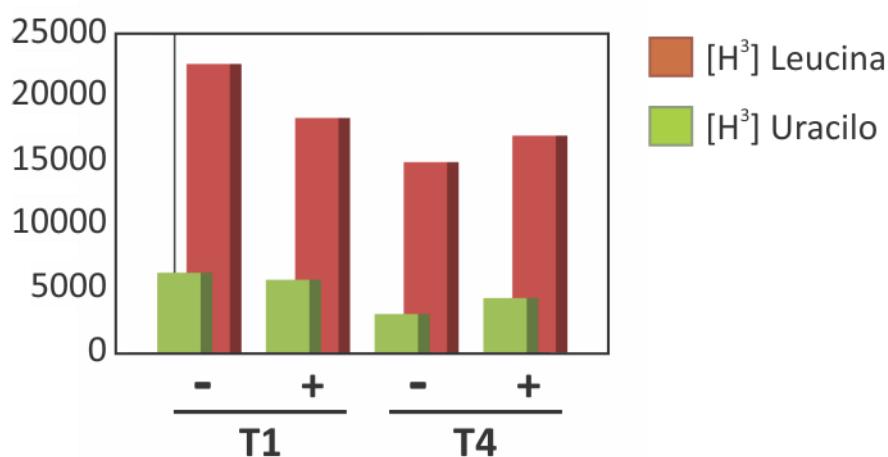




**Figura 33A-C. FasR es un activador del operón *fas-acpS* in vivo.** **A.** Niveles de transcripto *fasR*<sub>MS</sub>, *fas*<sub>MS</sub> y *acpS*<sub>MS</sub> medidos por qRT-PCR 9 h después del agregado de ATc (T3), en la cepa *MSPptr:fasR*<sub>MS</sub> crecida con ATc 200 ng ml<sup>-1</sup> respecto a la crecida en ausencia del mismo. La normalización se realizó utilizando el transcripto de *sigA*<sub>MS</sub> como invariable. **B-C.** Cromatografía de capa delgada (TLC) de metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) y ácidos micólicos (MAMES). La cepa *MSPptr:fasR*<sub>MS</sub> crecida con (+) y sin (-) ATc 200 ng ml<sup>-1</sup> fue marcada con [<sup>14</sup>C] acetato a los tiempos T1 y T3 durante 1 h a 42 °C. Los volúmenes sembrados se normalizaron de acuerdo a las densidades ópticas (**B**) o al número de cuentas (**C**) de los cultivos. Sistema de solventes: hexano:etil acetato (9:1 v/v).

Para confirmar que el efecto observado sobre estas rutas biosintéticas era específico y no consecuencia de un desorden metabólico pleiotrópico, nos propusimos analizar el efecto de la disminución en el contenido de FasR sobre la biosíntesis de otras macromoléculas. En función de esto, realizamos experimentos de marcación con [<sup>3</sup>H] leucina y [<sup>3</sup>H] uracilo para determinar los niveles de actividad metabólica en la

cepa MSP*ptr:fasR<sub>MS</sub>*. En la figura 34 podemos observar que 3 h después del agregado de ATc (T1) y 14 h después de que la mutante condicional dejara de crecer (T4) (Fig. 32A), la actividad metabólica de las células era aún comparable a la cepa control sin ATc.

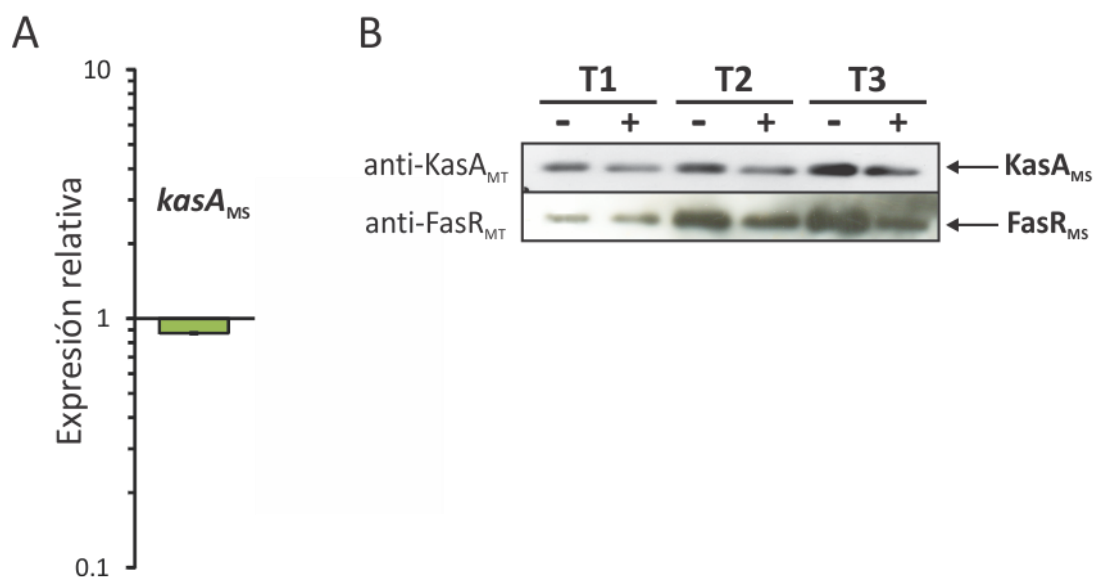


**Figura 34. Efecto de la disminución de los niveles de FasR sobre la síntesis de macromoléculas.** Alícuotas de la cepa MSP*ptr:fasR<sub>MS</sub>* crecida con (+) y sin (-) ATc 200 ng ml<sup>-1</sup> se marcaron a los tiempos T1 y T4 de la curva de crecimiento (ver Fig. 32A) durante 1 h con [<sup>3</sup>H] leucina y [<sup>3</sup>H] uracilo. La radioactividad total incorporada en las células se midió como se describe en la sección 2.8 de Materiales y Métodos. Los resultados fueron normalizados por la densidad óptica de los cultivos a cada punto de la curva.

### 3.3.2.5 Influencia de los niveles de expresión de *fasR* sobre la expresión del operón *fasII* *in vivo*

Sabemos que los sistemas FAS-I y FAS-II deben estar co-regulados a fin de mantener la homeostasis lipídica en las micobacterias, y el objetivo principal de nuestro grupo de investigación es elucidar los mecanismos de regulación transcripcionales involucrados en dicho proceso. Si bien no hemos podido evidenciar una regulación directa de MabR y FasR sobre los genes del operón *fas-acpS* y *fasII*, respectivamente, sabemos que al menos la expresión de MabR en cantidades no fisiológicas conduce a una alteración en los niveles de expresión de *fas* [109]. En consecuencia, en un intento de analizar si la expresión de los genes del operón *fasII* se ve alterada cuando los niveles de FasR disminuyen, cuantificamos los niveles relativos de expresión de *kasA<sub>MS</sub>*, el tercer gen de dicho operón, en la mutante condicional

MSP*ptr:fasR*<sub>MS</sub>. De esta manera, a las 9 h (T3) posteriores a la suplementación con ATc se extrajo el ARN total a partir de alícuotas de cultivos con y sin ATc 200 ng ml<sup>-1</sup> y se sintetizó el correspondiente ADNc utilizando hexanucleótidos degenerados. La cantidad relativa del ARNm de *kasA*<sub>MS</sub> se midió por qRT-PCR notando una leve disminución de su transcripción (~13%) en presencia de ATc (Fig. 35A). Para analizar si esta leve disminución en la transcripción de *kasA*<sub>MS</sub> se veía representada en una menor síntesis proteica, determinamos por western blot los niveles de KasA<sub>MS</sub> en la cepa MSP*ptr:fasR*<sub>MS</sub>. A las 3 h (T1), 6 h (T2) y 9 h (T3) posteriores al agregado de ATc se tomaron muestras de cada cultivo con y sin ATc 200 ng ml<sup>-1</sup> y se prepararon extractos proteicos libres de células. El western blot se realizó sembrando en cada calle la misma cantidad de proteínas totales y utilizando anticuerpos anti-KasA<sub>MT</sub> obtenidos en rata [149]. Como se puede observar en la figura 35B, la disminución en los niveles de expresión del gen *kasA*<sub>MS</sub> se correlaciona con cantidades intracelulares menores de la proteína en presencia de ATc.



**Figura 35A y B. Niveles no fisiológicos de FasR alteran la expresión de *kasA* in vivo.** **A.** El nivel de transcripto *kasA*<sub>MS</sub> se midió por qRT-PCR 9 h posteriores al agregado de ATc (T3). La determinación se realizó en la cepa MSP*ptr:fasR*<sub>MS</sub> crecida con ATc 200 ng ml<sup>-1</sup> respecto a la crecida en ausencia del mismo. La normalización se efectuó utilizando el transcripto de *sigA*<sub>MS</sub> como invariable. **B.** Análisis por western blot de lisados celulares de la cepa MSP*ptr:fasR*<sub>MS</sub> crecida con (+) y sin (-) ATc 200 ng ml<sup>-1</sup>. Las muestras se tomaron a las 3 h (T1), 6 h (T2) y 9 h (T3) posteriores al agregado de ATc y la detección se realizó utilizando anticuerpos anti-KasA<sub>MT</sub> de rata (panel superior). Se muestra nuevamente el western blot de la figura 32C, realizado con anticuerpos anti-FasR<sub>MT</sub> (panel inferior), a partir del mismo extracto proteico.

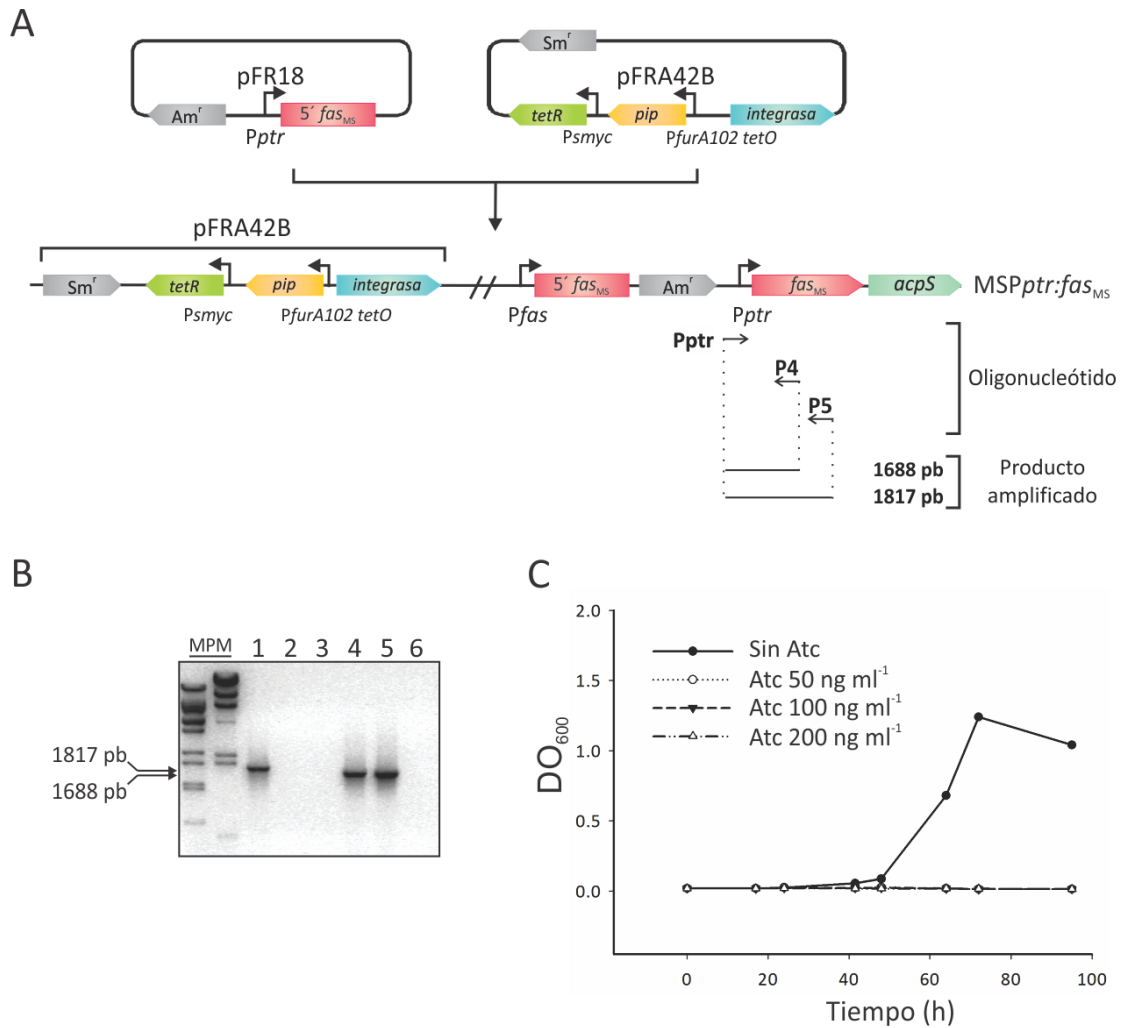
### 3.3.2.6 Construcción de una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en el operón *fas-acpS*, utilizando el sistema TetR/Pip OFF

Para la construcción de una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en el operón *fas-acpS*, se utilizó el sistema TetR/Pip OFF siguiendo el mismo procedimiento empleado para la construcción de la mutante condicional en *fasR*. Así, la región 5' de *fas<sub>MS</sub>* se clonó bajo control del *Pptr*, dependiente de Pip en el plásmido *ts pPR27* [134], obteniéndose el plásmido *pFR18*. Este último se utilizó para transformar una cepa de *M. smegmatis* conteniendo el plásmido *pFRA42B*, con el sistema TetR/Pip OFF. Se seleccionó una de las transformantes *Sm<sup>r</sup> Am<sup>r</sup>*, se creció a 30 °C y se plaqueó a 42 °C para promover la recombinación del plásmido. Se obtuvo así la cepa *MSPptr:fas<sub>MS</sub>* la cual presenta el operón *fas-acpS* bajo control de ATc. Cuando la cepa *MSPptr:fas<sub>MS</sub>* se plaqueó en medio sólido con ATc 200 ng ml<sup>-1</sup> no se observó formación de colonias, confirmando así la esencialidad de *fas* en *M. smegmatis*. El evento correcto de recombinación homóloga se confirmó por PCR (Fig. 36A y B).

Posteriormente, la mutante condicional *MSPptr:fas<sub>MS</sub>* se creció en medio 7H9-Sm-Am en presencia de distintas concentraciones de ATc (50 a 200 ng ml<sup>-1</sup>) observándose la inhibición de su crecimiento en todas las concentraciones ensayadas. A partir de este experimento, se seleccionó la concentración de 50 ng ml<sup>-1</sup> como la más apropiada para su uso en análisis posteriores (Fig. 36C).

### 3.3.2.7 Caracterización de la cepa *MSPptr:fas<sub>MS</sub>*

Con el objetivo de encontrar una condición en la cual pudiésemos inhibir la expresión del operón *fas-acpS* y luego analizar su efecto, la mutante condicional *MSPptr:fas<sub>MS</sub>* se creció en medio 7H9-Sm-Am a 42 °C, y a distintos tiempos se separaron alícuotas para ser tratadas con ATc 50 ng ml<sup>-1</sup>. En la figura 37A se observa que el agregado de ATc en fase exponencial temprana provoca la inhibición del crecimiento bacteriano. Encontramos así una condición de trabajo en la cual la suplementación de un cultivo de *MSPptr:fas<sub>MS</sub>* en medio 7H9-Sm-Am con ATc se realiza a las 32 h de incubación ( $DO_{600} \sim 0.15$ ) (Tiempo D en la Fig. 37).



**Figura 36A-C. Obtención de una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en el operón *fas-acpS* mediante el sistema TetR/Pip OFF. A.** Esquema de la estrategia que involucra al plásmido *ts* pFR18 derivado del plásmido pPR27 y al plásmido integrativo pFRA42B. Organización genética de los plásmidos utilizados y de la cepa MSP*ptr:fas<sub>MS</sub>* resultante. Se indican los oligonucleótidos utilizados para el chequeo del evento de recombinación correcto y el tamaño de los productos amplificados resultantes. *Sm<sup>r</sup>*, resistencia a estreptomicina; *Am<sup>r</sup>*, resistencia a apramicina. **B.** Análisis de la organización genética resultante en la mutante MSP*ptr:fas<sub>MS</sub>* por PCR. Se extrajo ADN genómico de la cepa recuperada a 42 °C y se analizó por PCR. La amplificación se realizó utilizando el oligonucleótido *Pptr* que hibrida sobre el *Pptr* y un oligonucleótido P5, interno al gen *fas<sub>MS</sub>* el cual hibrida por fuera del sitio de posible recombinación (producto: 1817 pb; Calle 1-3). Como control también se realizó la amplificación con el oligonucleótido FasMS-RXbaI (P4) el cual se utilizó para la construcción del plásmido pFR18 (producto: 1688 pb; Calles 4-6). Calles: 1 y 4, ADN genómico de la cepa recuperada a 42 °C; 2 y 5, plásmido pFR18; 3 y 6, control negativo realizado con H<sub>2</sub>O. MPM, Marcador de peso molecular. **C.** El crecimiento de la cepa MSP*ptr:fas<sub>MS</sub>* responde al agregado de distintas concentraciones de ATc al medio de cultivo. La cepa MSP*ptr:fas<sub>MS</sub>* se creció en medio 7H9-Sm-Am en presencia de distintas concentraciones de ATc (50 a 200 ng ml<sup>-1</sup>) a 42 °C.

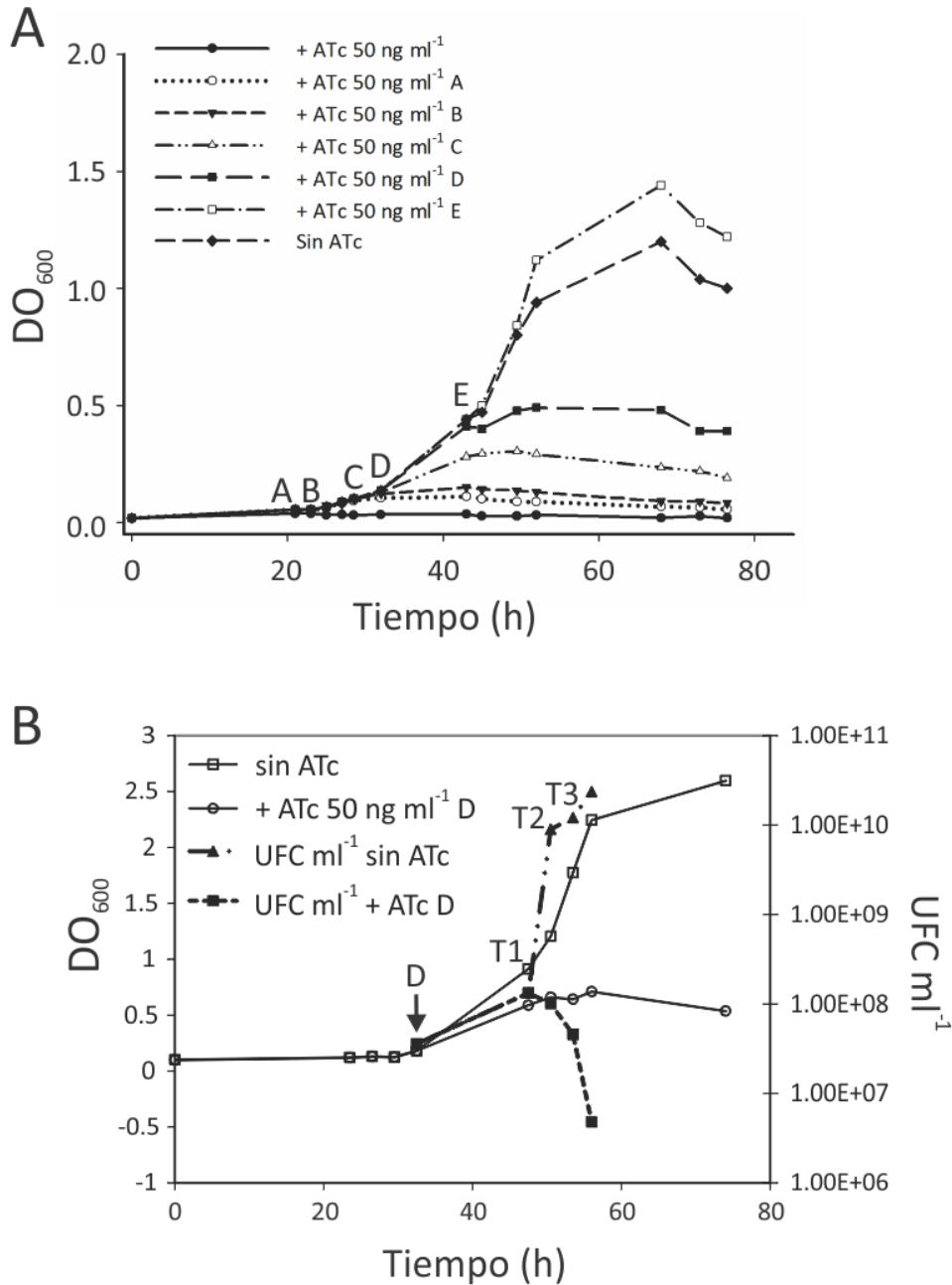
Posteriormente, para determinar cómo afecta la disminución del contenido celular de FAS-I a la viabilidad bacteriana, cuantificamos las unidades formadoras de

colonias por ml de cultivo (UFC ml<sup>-1</sup>) aplicando las condiciones de crecimiento e inducción definidas previamente. En la figura 37B podemos observar que inmediatamente después del agregado de ATc al medio de cultivo, la viabilidad celular disminuye en aproximadamente dos órdenes de magnitud, diferencia que se incrementa a lo largo de la curva.

Teniendo en cuenta que el gen *fas* es parte de la misma unidad transcripcional que el gen *acpS* (Fig. 10), la cepa mutante MSP*ptr:fas*<sub>MS</sub> no sólo presentará menores niveles de FAS-I ante el agregado de ATc sino también de AcpS. AcpS es una 4'-fosfopanteteinil transferasa responsable de la activación de dos dominios ACP en micobacterias: el dominio ACP-I del sistema FAS-I y la proteína AcpM del sistema FAS-II [76]. Esta proteína es la responsable de catalizar la modificación post-traducciona necesaria para la actividad de ACP, la cual media la transferencia de los intermediarios acilados durante la biosíntesis de ácidos grasos y lípidos. Debido a que esta modificación afecta ambos sistemas FAS, una alteración en los niveles de expresión de *acpS* podría influir en la biosíntesis de ácidos grasos y micólicos simultáneamente. En consecuencia, el estudio fisiológico de la cepa MSP*ptr:fas*<sub>MS</sub> y el análisis comparativo con la cepa MSP*ptr:fasR*<sub>MS</sub>, ayudaría a elucidar la complejidad del mecanismo de regulación de la biosíntesis de ácidos grasos/micólicos que involucra a FasR y podría dar luz sobre la posible existencia de otros genes regulados por esta proteína.

En primer lugar nos propusimos analizar el efecto de la disminución de los niveles de FAS-I y AcpS sobre la expresión de los genes del operón *fasII* y en consecuencia sobre la biosíntesis de ácidos micólicos. Para ello, identificamos por western blot la cantidad relativa de la β-cetoacil ACP sintasa KasA en la cepa MSP*ptr:fas*<sub>MS</sub>. La misma se creció en medio 7H9-Sm-Am durante 32 h (DO<sub>600</sub>~0.15), tras lo cual el cultivo fue dividido en dos fracciones iguales y una de ellas se suplementó con ATc 50 ng ml<sup>-1</sup>. A las 15 h (T1), 18 h (T2), y 21 h (T3) posteriores al agregado de ATc (Fig. 37B) se tomaron muestras de cada cultivo con y sin ATc 50 ng ml<sup>-1</sup> y se prepararon extractos proteicos libres de células. El western blot se realizó sembrando en cada calle la misma cantidad de proteínas totales y utilizando anticuerpos anti-KasA<sub>MT</sub> obtenidos en rata [149]. En la figura 38A podemos observar

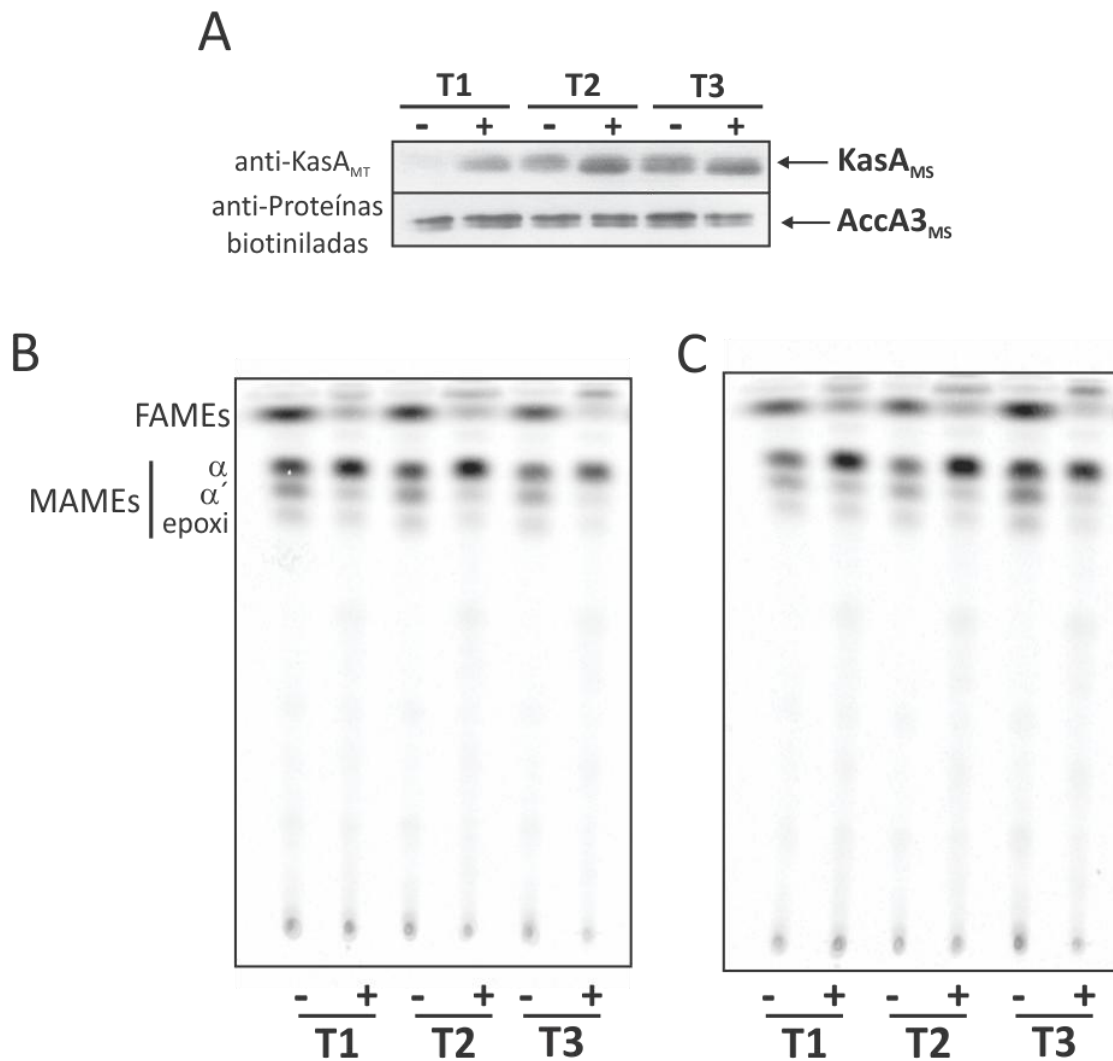
que a diferencia de lo que ocurre con la mutante condicional en *fasR*, los niveles de KasA aumentan en la cepa *MSPptr:fas<sub>MS</sub>* en presencia de ATc.



**Figura 37A y B. Efecto del agregado de ATc 50 ng ml<sup>-1</sup> sobre el crecimiento de la mutante condicional *MSPptr:fas<sub>MS</sub>*.** **A.** La cepa se creció en medio 7H9-Sm-Am a 42 °C. A distintos tiempos (A-E) se separaron alícuotas y se trataron con ATc 50 ng ml<sup>-1</sup>. Se monitoreó el crecimiento de cada uno de estos cultivos por densidad óptica (DO<sub>600</sub>). **B.** El agregado de ATc reduce la viabilidad celular de la cepa *MSPptr:fas<sub>MS</sub>*. La cepa se creció en medio 7H9-Sm-Am a 42 °C. A las 32 h de crecimiento (tiempo D- DO<sub>600</sub>~0.15) el cultivo se dividió en dos y uno de ellos se suplementó con ATc 50 ng ml<sup>-1</sup>. A distintos tiempos se tomaron alícuotas de ambos cultivos y se plaquearon en medio 7H10-Sm-Am en ausencia de ATc. Se determinaron las unidades formadoras de colonias por ml de cultivo (UFC ml<sup>-1</sup>). Para los análisis posteriores, las muestras fueron tomadas a las 15 h (T1), 18 h (T2) y 21 h (T3) posteriores al agregado de ATc 50 ng ml<sup>-1</sup> (tiempo D).

Con el fin de analizar el perfil de ácidos grasos y micólicos en la mutante condicional en el operón *fas-acpS*, se realizaron experimentos de marcación con [<sup>14</sup>C] acetato. A las 15 h (T1), 18 h (T2), y 21 h (T3) luego del agregado de ATc, 5 ml de cada cultivo se marcaron con [<sup>14</sup>C] acetato durante 1 h. Los lípidos se extrajeron de las células y se metilaron utilizando yodometano. Los extractos de FAMEs y MAMEs obtenidos se sometieron a TLC seguida de autoradiografía, normalizando la siembra por densidad óptica. Como se muestra en la figura 38B, la síntesis *de novo* de ácidos grasos y de las especies  $\alpha'$ - y epoxi- de los ácidos micólicos se ve fuertemente reprimida tras el agregado de ATc, resultado esperado dado el rol fisiológico postulado para FAS-I en la biosíntesis de ácidos grasos/micólicos. Por otro lado, y con el propósito de detectar si la distribución de la marca entre FAMEs y MAMEs se veía alterada en estas condiciones, realizamos una TLC con los mismos extractos sembrando esta vez igual número de cuentas en todas las calles. En este caso, se observaron diferencias significativas entre ambas muestras, como la aparición de un compuesto apolar con un patrón de migración diferencial ausente en la cepa control sin ATc. Por otro lado, la distribución de los MAMEs en  $\alpha$ -,  $\alpha'$ - y epoxi-micolatos se ve alterada, aumentando la proporción de  $\alpha$ -, y disminuyendo considerablemente la fracción de  $\alpha'$ - y epoxi-micolatos en presencia de ATc (Fig. 38C).





**Figura 38A-C. Análisis de la mutante condicional MSPptr:fas<sub>MS</sub>.** **A.** Análisis por western blot de lisados celulares de la cepa MSPptr:fas<sub>MS</sub> crecida con (+) y sin (-) ATc 50 ng ml<sup>-1</sup>. Las muestras se tomaron a las 15 h (T1), 18 h (T2) y 21 h (T3) luego del agregado de ATc. La detección se realizó con anticuerpos anti-KasA<sub>MT</sub> obtenidos en rata (panel superior) y estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano para detectar la proteína biotinilada AccA3<sub>MS</sub> como control de carga (panel inferior). **B-C.** Cromatografía de capa delgada (TLC) de metil ésteres de ácidos grasos (MAMES) y ácidos micólicos (FAMES) de la cepa MSPptr:fas<sub>MS</sub> crecida con (+) y sin (-) ATc 50 ng ml<sup>-1</sup>. Las células se marcaron con [<sup>14</sup>C] acetato a los tiempos T1, T2 y T3 durante 1 h a 42 °C. Los volúmenes sembrados se normalizaron de acuerdo a las densidades ópticas (**B**) o al número de cuentas (**C**) de los cultivos. Sistema de solventes: hexano: etil acetato (9:1 v/v).

### 3.3.3 Discusión

Con el objetivo de estudiar el rol fisiológico de FasR, así como también de analizar la esencialidad del gen que lo codifica, nos propusimos como primer objetivo de este tercer capítulo construir una cepa mutante en *fasR* utilizando *M. smegmatis* como modelo de estudio. La eliminación de la copia cromosómica de *fasR* mediante un doble evento de recombinación resultó imposible de obtener excepto en presencia de un plásmido conteniendo una copia extra de *fasR*, en este caso bajo control de un promotor inducible (Fig. 27). Este resultado confirmó la esencialidad postulada para *fasR* de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis*. Es interesante destacar que los únicos dos factores de transcripción involucrados específicamente en la regulación de la síntesis de ácidos grasos descritos en micobacterias son esenciales (FasR y MabR), a diferencia de lo que ocurre con el resto de los reguladores descritos hasta el momento en bacterias [103, 106, 108, 109, 173]. Esta notoria diferencia podría deberse a que las micobacterias necesitan mantener un control muy preciso de la síntesis de sus ácidos grasos para ser viables, probablemente debido a la atípica longitud de los mismos, a la importancia de su rol tanto en el crecimiento como en el proceso infeccioso y a la complejidad de su envoltura celular en general.

Numerosos estudios realizados con inhibidores de las vías de síntesis de ácidos grasos y/o ácidos micólicos, así como también con mutantes condicionales en genes que codifican para proteínas involucradas en este metabolismo, han demostrado que la integridad de estas vías resulta esencial para mantener la homeostasis lipídica y en consecuencia, la sobrevivencia de las micobacterias. En este sentido, se ha observado que una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en el gen esencial *kasA* se lisa en condiciones no permisivas [83]. Este mismo efecto es también evidenciado en cepas de *M. smegmatis* y *M. bovis* mutantes en el gen *inhA* [176]. La biosíntesis de ácidos grasos en micobacterias es iniciada por FAS-I, el cual cataliza la síntesis *de novo* de C<sub>16</sub>-CoA y C<sub>18</sub>-CoA a partir de acetil-CoA y malonil-CoA, los cuales son utilizados principalmente para la síntesis de fosfolípidos y a su vez capturados por el sistema FAS-II como precursores en la vía de síntesis del ácido meromicrobiano. Por otro lado, la naturaleza bimodal reportada para FAS-I, dada no sólo por propiedades intrínsecas de la proteína sino también por factores externos que influirían en el proceso de elongación, llevarían

a la producción de C<sub>24</sub>-CoA y C<sub>26</sub>-CoA en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* respectivamente [66, 67, 177], las cuales dan origen a la cadena  $\alpha$ -alquilo del ácido micólico luego de su condensación con el ácido meromicólico producto de FAS-II, mediado por la policétido sintasa Pks13 [69]. A su vez, en estos microorganismos existe un nivel adicional de complejidad que proviene de la capacidad de las micobacterias de utilizar los acil-CoAs generados por FAS-I para la síntesis de triacilglicéridos, compuestos de almacenamiento presentes en micobacterias y organismos relacionados [178, 179]. Dada la relevancia de este sistema en el metabolismo lipídico y en la biosíntesis de moléculas estructurales esenciales de la pared celular, cualquier alteración del mismo podría ser nociva para la viabilidad celular. Por otro lado, la baja actividad promotora del gen *fas*, evidenciada en los análisis realizados con fusiones reporteras del promotor *Pfas* con las cajas de reconocimiento de FasR mutadas (Fig. 21C), supone que este regulador estaría activando constitutivamente la expresión del operón *fas-*acpS**, siendo modulada su actividad por la concentración intracelular de acil-CoAs de cadena larga, productos del sistema FAS-I. Teniendo en cuenta todo lo antes detallado, cualquier alteración en los niveles de FasR tendría consecuencias directas sobre la biosíntesis de la pared celular y el metabolismo lipídico de las micobacterias, procesos que requieren de una estricta regulación para el adecuado crecimiento bacteriano.

Continuando con el análisis, y con el fin de encontrar una condición en la cual pudiésemos analizar las consecuencias fisiológicas de la disminución en los niveles de FasR en *Mycobacterium*, decidimos utilizar una estrategia diferente para la construcción de una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en *fasR*. La estrategia más efectiva se obtuvo por modificación del método de Boldrin y colaboradores [135], reemplazando el vector suicida por un vector termosensible, con el fragmento 5' del gen *fasR*<sub>MS</sub> clonado bajo el control del *Pptr* (Fig. 30A). De esta manera se obtuvo la cepa MSP*ptr:fasR*<sub>MS</sub>, cuyo crecimiento se vio alterado cuando la expresión de *fasR* se veía reprimida en presencia de ATc 200 ng ml<sup>-1</sup> (Fig. 32). El análisis de esta mutante condicional nos permitió corroborar *in vivo* el rol activador de FasR, dado que una disminución de los niveles intracelulares del regulador se tradujo en una represión de la expresión de los genes del operón *fas-*acpS** y una reducción concomitante en la síntesis de ácidos grasos/micólicos (Fig. 33).

Nuestra hipótesis de trabajo reside en que los sistemas FAS-I y FAS-II deben estar co-regulados a fin de mantener la homeostasis lipídica en las micobacterias, siendo nuestro objetivo elucidar los mecanismos de regulación transcripcionales involucrados en este proceso. Si bien no hemos podido evidenciar una regulación directa de MabR sobre los genes del operón *fas-ACP5*, sabemos que al menos la expresión de MabR en cantidades no fisiológicas altera los niveles de expresión de *fas* [109]. Teniendo en cuenta que el sistema FAS-II requiere del sistema FAS-I para su actividad, podríamos suponer que una alteración en el sistema FAS-I podría también tener algún efecto sobre los niveles de expresión de los genes que codifican para proteínas involucradas en el sistema FAS-II. En este sentido, observamos una leve represión en la expresión de *kasA* (y en sus niveles proteicos) en la cepa MSP*ptr:fasR<sub>MS</sub>* en presencia de ATc (Fig. 35). En consecuencia, la disminución en los niveles de FasR y la inhibición de la síntesis de ácidos grasos influirían en los niveles de expresión y síntesis de alguna de las proteínas del sistema FAS-II, dando mayor indicio de una regulación coordinada a nivel transcripcional entre ambas sintetas de ácidos grasos.

Para profundizar en la caracterización de la red de regulación involucrada en la coordinación funcional entre ambos sistemas de sintetas, construimos una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en el operón *fas-ACP5*, utilizando el mismo método desarrollado para la construcción de la cepa MSP*ptr:fasR<sub>MS</sub>*, y obteniendo de esta manera la cepa MSP*ptr:fas<sub>MS</sub>* (Fig. 36). Esta nueva mutante nos permitió analizar específicamente el efecto fisiológico de la ausencia del sistema FAS-I, ya que en la mutante condicional MSP*ptr:fasR<sub>MS</sub>* podríamos estar observando no sólo el efecto debido a la menor actividad del sistema FAS-I, sino también aquel debido a la de otros genes blanco de FasR cuya expresión podría estar alterada en esta mutante. En particular nos interesaba analizar en esta nueva mutante cómo se veía afectado el sistema FAS-II, dado que el análisis simultáneo de ambas mutantes y de las diferencias fisiológicas encontradas entre ellas podría ayudar al entendimiento de la complejidad del mecanismo de regulación de la biosíntesis de ácidos grasos/micólicos que involucra a FasR, y podría dar luz sobre la posible existencia de otros genes regulados por esta proteína. Por otro lado, sabemos que el gen *ACP5* codifica para una 4'-fosfopanteteinil transferasa responsable de la activación de dos dominios ACP en micobacterias. Debido a que esta modificación post-traducciona afecta a ambos sistemas FAS, una

alteración en los niveles de expresión de *acpS* alteraría la biosíntesis de ácidos grasos y micólicos simultáneamente, y ésta podría ser una señal común a la regulación de ambos sistemas. En consecuencia, en primer lugar analizamos el efecto de la represión del operón *fas-acpS* en la cepa MSP*ptr:fas*<sub>MS</sub> sobre la síntesis de ácidos grasos/micólicos. Para ello, identificamos por western blot las cantidades relativas de la  $\beta$ -cetoacil ACP sintasa KasA en la cepa MSP*ptr:fas*<sub>MS</sub> y a diferencia de lo que ocurre con la mutante condicional en *fasR*, la síntesis de KasA parecería verse inducida frente a la disminución de los niveles celulares de FAS-I y AcpS (Fig. 38A). Al estudiar el perfil lipídico de la cepa MSP*ptr:fas*<sub>MS</sub>, observamos en primer lugar que la síntesis *de novo* de ácidos grasos se ve fuertemente reprimida tras la suplementación del medio de cultivo con ATc, debido a la menor expresión del gen *fas*. Por otro lado, al comparar la distribución de la marca radioactiva entre las distintas fracciones de MAMEs, se observa un aumento en la proporción de  $\alpha$ -, respecto a la fracción de  $\alpha'$ - y epoximicolatos (Fig. 38B-C). Se postula que KasA es la enzima condensante involucrada en la elongación inicial de los micolatos, que posteriormente son extendidos hasta su longitud final por KasB [80], y que la sobre-expresión de KasA en *M. smegmatis* conduciría a una disminución en los niveles de producción de la fracción de  $\alpha'$ -micolatos [79]. En función de esto, podríamos suponer que el aumento de la proporción de  $\alpha$ -micolatos respecto a los  $\alpha'$ -micolatos, detectado en la mutante condicional MSP*ptr:fas*<sub>MS</sub> en presencia de ATc, podría ser una consecuencia del aumento en los niveles proteicos de KasA observados.

A pesar de estar involucrados en la misma vía metabólica, los efectos fisiológicos resultantes de mutar el gen *fasR* o el operón *fas-acpS* varían entre sí, dando indicio de la compleja red de regulación encargada de mantener la homeostasis lipídica en las micobacterias. Las diferencias encontradas posiblemente se deban a la existencia de otros genes regulados por FasR cuyos productos proteicos estén involucrados en el metabolismo lipídico de estas bacterias, o a diferentes respuestas metabólicas globales dadas como consecuencia del grado de alteración del metabolismo lipídico en cada una de las cepas analizadas.

## **3.4 CAPÍTULO 4**

### **Determinación de la esencialidad de *fasR* en *M. tuberculosis***

### 3.4.1 Objetivos

#### 3.4.1.1 Objetivo general

El incumplimiento de los tratamientos con antibióticos, el escaso seguimiento de los pacientes bajo medicación, la epidemia de SIDA y la aparición de cepas multi-y extremadamente resistentes a las drogas comúnmente utilizadas ha llevado a que la TB se convierta en una enfermedad infecciosa de emergencia a nivel mundial. 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.

*M. tuberculosis* requiere que su envoltura celular esté correctamente conformada para poder ser viable. Si bien algunos lípidos en particular sólo son esenciales para la virulencia [47, 180-185], los ácidos grasos y en particular los ácidos micólicos son esenciales para el crecimiento de *M. tuberculosis*. Asimismo, muchas de las drogas actualmente utilizadas en el tratamiento de la TB actúan sobre proteínas involucradas en estas vías. En el presente trabajo de tesis se ha caracterizado un regulador del metabolismo de ácidos grasos en *M. smegmatis* que resultó ser esencial para la viabilidad de este microorganismo. Los resultados obtenidos sugirieron que no sólo las enzimas involucradas en la biosíntesis de los ácidos grasos/micólicos son esenciales, sino también que el control estricto necesario para la estrecha coordinación entre los dos sistemas FAS que co-existen en la célula resulta esencial para la viabilidad de estas bacterias. En consecuencia, como objetivo principal de este capítulo nos proponemos analizar la esencialidad del gen *fasR* en *M. tuberculosis*, ya que podría ser un atractivo blanco para el desarrollo de nuevos antimicobacterianos.

#### 3.4.1.2 Objetivos particulares

A partir del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Analizar los niveles de expresión de FasR durante el crecimiento de *M. tuberculosis* en cultivos *in vitro*.

- Construir una cepa de *M. tuberculosis* mutante en *fasR*, que permita el estudio del rol fisiológico del regulador en esta especie.
- Determinar la esencialidad de *fasR* en *M. tuberculosis* durante su crecimiento *in vitro*.



### 3.4.2 Resultados

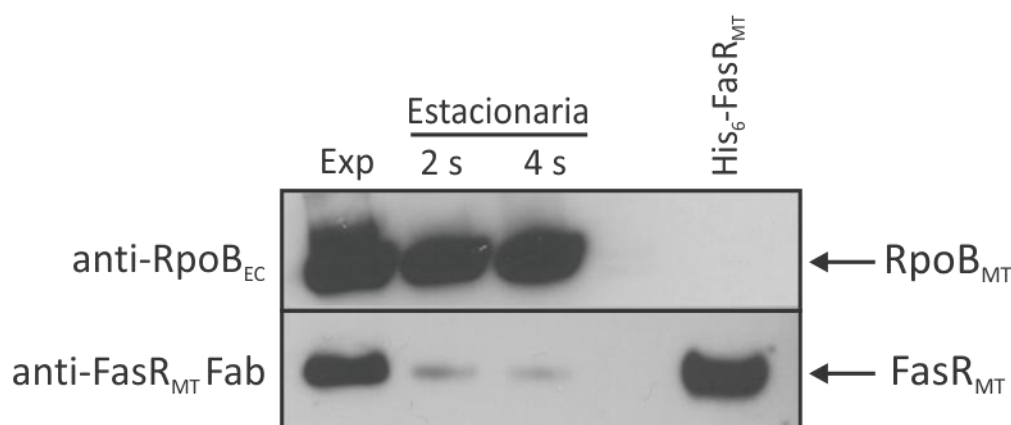
#### 3.4.2.1 Expresión de FasR en *M. tuberculosis* en cultivos *in vitro*

A diferencia de *M. smegmatis*, una micobacteria saprófita de crecimiento rápido, *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular que alterna entre una fase crecimiento exponencial con un tiempo de duplicación de ~24 h y un estado latente con baja actividad metabólica intracelular, capaz de persistir durante décadas dentro del huésped. En función de estas diferencias de crecimiento, como primer objetivo nos propusimos determinar los niveles de FasR a lo largo de la curva de crecimiento de *M. tuberculosis* en cultivos *in vitro*. Para ello crecimos la cepa *M. tuberculosis* H37Rv en medio 7H9-ADC y tomamos muestras en fase exponencial ( $DO_{600} \sim 0.4$ ) y fase estacionaria temprana y tardía de crecimiento (dos y cuatro semanas respectivamente). A partir de las células recolectadas se prepararon extractos proteicos libres de células y se analizaron por western blot sembrando en cada calle la misma cantidad de proteínas totales. La detección se realizó utilizando anticuerpos monoclonales contra FasR<sub>MT</sub>, los cuales consisten únicamente del fragmento de unión al antígeno (anti-FasR<sub>MT</sub> Fab). Como control de carga, se utilizaron anticuerpos monoclonales comerciales de ratón contra la subunidad  $\beta$  de la ARN polimerasa de *E. coli*, capaces de reconocer eficientemente la ARN polimerasa micobacteriana (anti-RpoB<sub>EC</sub> NeoClone Biotechnology International). Como se observa en la figura 39, FasR<sub>MT</sub> se sintetiza principalmente durante la fase exponencial de crecimiento de *M. tuberculosis*, disminuyendo considerablemente sus niveles intracelulares en fase estacionaria. Este resultado está de acuerdo con el rol de FasR en la vía de biosíntesis de ácidos grasos y lípidos estructurales, los cuales resultan de extrema importancia durante el crecimiento y división bacteriana.

#### 3.4.2.2 Construcción de una cepa de *M. tuberculosis* mutante condicional en *fasR* utilizando el sistema TetR/Pip OFF

Durante el desarrollo del capítulo 3 confirmamos la esencialidad postulada para *fasR* de *M. tuberculosis* [172], en *M. smegmatis*. A continuación, nos propusimos analizar la esencialidad de *fasR* en *M. tuberculosis* H37Rv mediante la construcción de

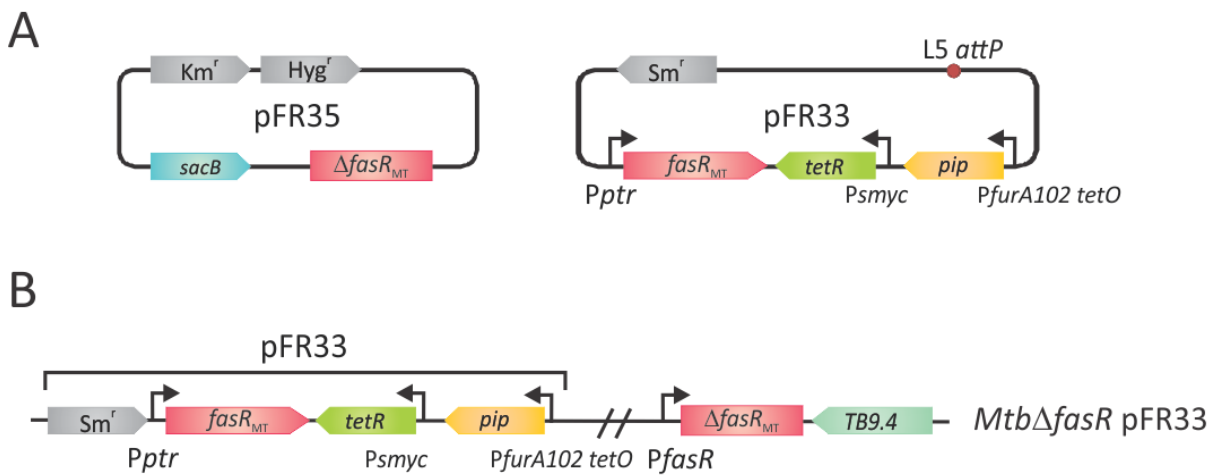
una cepa mutante condicional en este gen, que nos permita controlar eficientemente la expresión de la copia *fasR* complementante. Para ello utilizamos un método alternativo sugerido por la Dra. Claudia Sala, basado también en el sistema TetR/Pip OFF. Este consiste en la delección de la copia cromosómica de *fasR<sub>MT</sub>* mediante un doble evento de recombinación, y la complementación con un plásmido integrativo que contiene este gen bajo control del *Pptr*, junto al sistema necesario para regular su expresión (Fig. 40).



**Figura 39. FasR se sintetiza diferencialmente a lo largo del crecimiento *in vitro* de *M. tuberculosis* H37Rv.** Análisis por western blot de extractos proteicos de una cepa de *M. tuberculosis* H37Rv crecida en medio 7H9-ADC. La detección se realizó con anticuerpos monoclonales anti-FasR<sub>MT</sub> constituidos únicamente por el fragmento Fab de unión al antígeno (panel inferior). Como control de carga se detectaron los niveles de la ARN polimerasa micobacteriana RpoB<sub>MT</sub> utilizando anticuerpos monoclonales comerciales contra la subunidad β de la ARN polimerasa de *E. coli*, anti-RpoB<sub>EC</sub> (panel superior). Como control positivo, se sembraron 17 ng de la proteína purificada His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub>. Exp, fase exponencial (DO<sub>600</sub>~0.4); 2s, fase estacionaria temprana (2 semanas); 4s, fase estacionaria tardía (4 semanas).

Para el primer evento de recombinación, el vector suicida pFR35, derivado del pJG1100 [138] que contiene únicamente las regiones flanqueantes del gen *fasR<sub>MT</sub>*, se utilizó para transformar una cepa de *M. tuberculosis* H37Rv por electroporación y las colonias transformantes resistentes a kanamicina (Km) e Hyg fueron analizadas por PCR de colonia para seleccionar aquellas que presenten un primer evento de recombinación. En estas condiciones, donde el plásmido pFR35 no puede replicar, se espera que las colonias resistentes a ambos antibióticos se originen por integración del mismo en el genoma, mediada por un evento de recombinación homóloga. Se seleccionó una colonia que presentaba un evento de recombinación legítimo en la

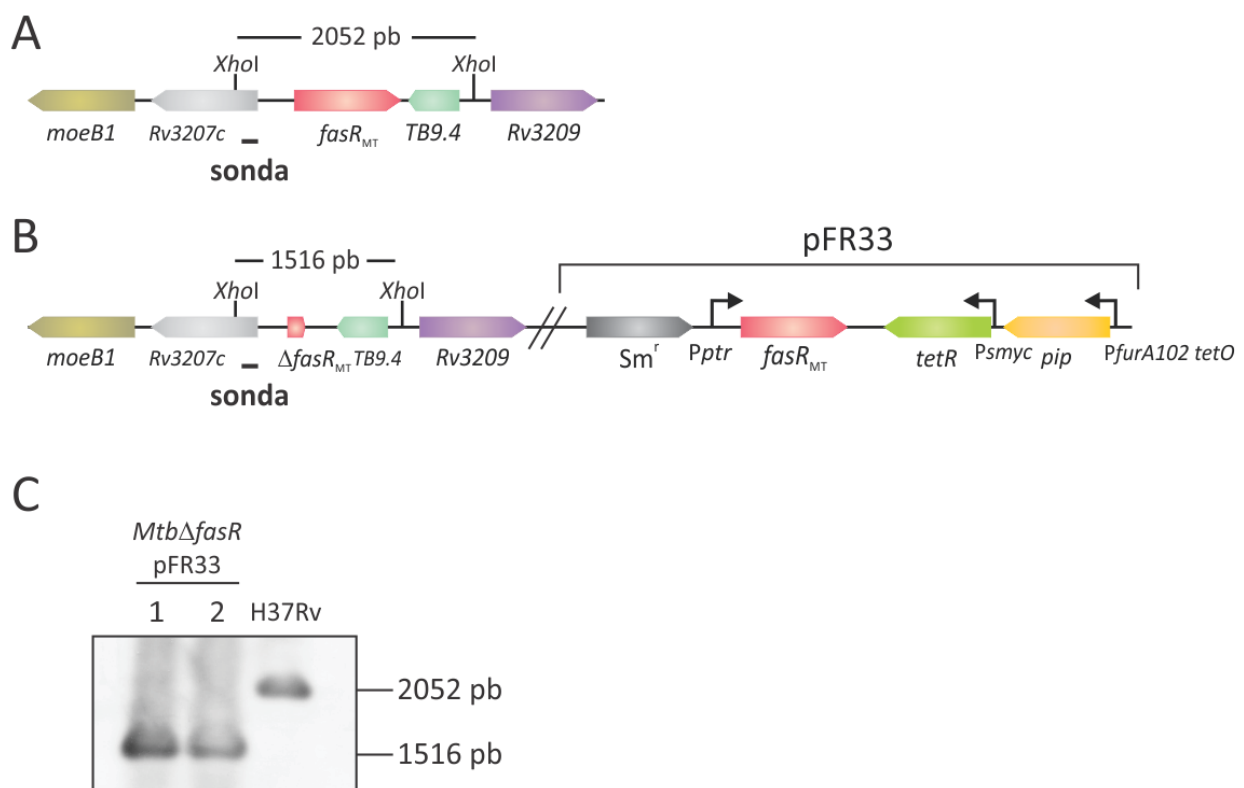
copia cromosomal de *fasR<sub>MT</sub>* (*Mtb* SCO), y se transformó con el vector pFR33 (vector integrativo con *fasR<sub>MT</sub>* bajo control del *Pptr* y el sistema TetR/Pip OFF necesario para regular su expresión). Esta cepa debe ser transformada simultáneamente con el plásmido pGA80, derivado del pMV261 [131] que provee la integrasa (codificada por el gen *int*) necesaria para la inserción sitio específica del pFR33 en el sitio *attB* cromosomal del micobacteriófago L5 [137]. Esta co-transformación es necesaria dado que el gen *int* ha sido removido del pFR33 de manera de hacerlo estable una vez insertado en el sitio *attB*.



**Figura 40A y B: Obtención de una cepa de *M. tuberculosis* mutante condicional en *fasR* mediante el sistema TetR/Pip OFF. A.** Plásmidos empleados: pFR35, plásmido necesario para la delección de la copia genómica de *fasR<sub>MT</sub>* por un doble evento de recombinación; pFR33, plásmido complementante. *Sm<sup>r</sup>*, resistencia a estreptomicina; *Km<sup>r</sup>*, resistencia a kanamicina; *Hyg<sup>r</sup>*, resistencia a higromicina; *L5 attP*, sitio *att* del micobacteriófago L5; *sacB*, marcador de contraselección que confiere sensibilidad a Sacarosa en micobacterias. **B.** Organización genética de la cepa mutante condicional *MtbΔfasR pFR33* resultante.

Por otro lado, el plásmido pGA80 no contiene ningún origen de replicación y en consecuencia se pierde durante la división celular. La cepa transformante *Km<sup>r</sup> Hyg<sup>r</sup> Sm<sup>r</sup>* (*Mtb* SCO pFR33) se creció a 37 °C y se plaqueó en medio 7H10-OADC-Sm, en presencia de Sacarosa. En este caso, se espera que el segundo evento de recombinación de lugar al reemplazo alélico de la copia cromosomal del gen *fasR<sub>MT</sub>* por aquella truncada ( $\Delta$ *fasR<sub>MT</sub>*), perdiéndose en el proceso casi la totalidad del vector pFR35. Dado que el mismo presenta una copia del gen *sacB*, que confiere sensibilidad

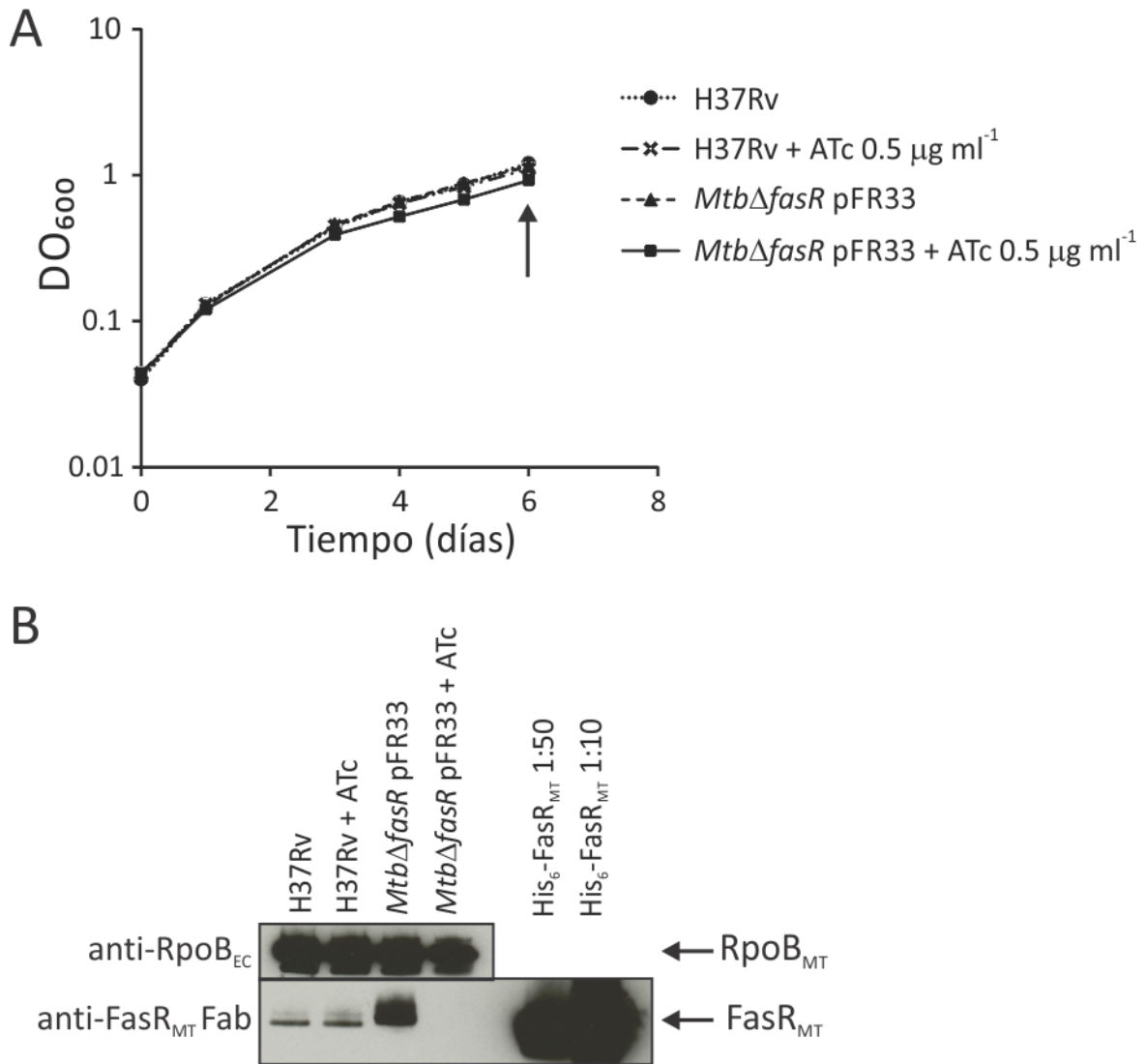
a Sacarosa, las cepas que hayan cursado una recombinación homóloga y perdido consecuentemente el plásmido, podrán crecer en medios suplementados con Sacarosa. Las colonias recuperadas se analizaron por PCR de colonia, indicando que el segundo evento de recombinación había ocurrido satisfactoriamente, obteniéndose la cepa *Mtb*Δ*fasR* pFR33. Mediante southern blot utilizando ADN genómico extraído a partir de una de estas colonias, confirmamos la correcta delección de la copia cromosomal de *fasR*<sub>MT</sub> (Fig. 41).



**Figura 41A-C. Análisis de una cepa de *M. tuberculosis* mutante condicional en *fasR* obtenida mediante el sistema TetR/Pip OFF.** Organización genética y mapa de restricción parcial de la región cromosómica de *fasR*<sub>MT</sub> en **A**. la cepa salvaje *M. tuberculosis* H37Rv y **B**. la cepa *Mtb*Δ*fasR* pFR33 delecionada en la copia cromosómica del gen *fasR*<sub>MT</sub>, y complementada con el plásmido pFR33. **C**. Southern blot de las distintas cepas de *M. tuberculosis*. El ADN cromosomal se digirió con *XhoI* y se analizó por hibridación con una sonda marcada correspondiente a la región 5' del gen *Rv3207c* (indicada con una barra negra). Calles: 1 y 2, clones derivados de la cepa *Mtb*Δ*fasR* pFR33 recuperada; H37Rv, cepa salvaje de *M. tuberculosis*.

### 3.4.2.3 Caracterización de la cepa *MtbΔfasR* pFR33

Para analizar la esencialidad de *fasR* en *M. tuberculosis*, analizamos la viabilidad de la cepa *MtbΔfasR* pFR33 en presencia de ATc. Para ello crecimos la mutante condicional *MtbΔfasR* pFR33 y la cepa salvaje *M. tuberculosis* H37Rv (control) en medio 7H9-ADC, en presencia y ausencia de ATc  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Al tercer día de incubación, los cultivos se diluyeron hasta  $\text{DO}_{600} \sim 0.05$  en medio fresco con y sin ATc  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  (primera dilución) y se incubaron nuevamente a  $37^\circ\text{C}$ . Este procedimiento se repitió dos veces más de manera sucesiva (segunda y tercera dilución respectivamente). Si bien se ha observado que en algunas cepas mutantes de *M. tuberculosis*, obtenidas utilizando este sistema, se ha necesitado de pasos previos de preincubación con ATc para observar una diferencia en el fenotipo de las células, el crecimiento de la mutante condicional *MtbΔfasR* pFR33 en presencia de ATc no presenta diferencias respecto al crecimiento de la misma cepa en ausencia del inhibidor ni de la cepa salvaje *M. tuberculosis* H37Rv utilizada como control (Fig. 42A). Al sexto día de incubación de los cultivos resultantes de la tercera dilución, se tomaron muestras de cada uno de ellos y se determinaron los niveles intracelulares de FasR<sub>MT</sub> utilizando anticuerpos monoclonales anti-FasR<sub>MT</sub> Fab y sembrando la misma cantidad de proteínas totales por calle. Como se observa en la figura 42B, FasR<sub>MT</sub> deja de sintetizarse tras el agregado de ATc al medio de cultivo. Por el contrario, el agregado del inhibidor no altera la síntesis del regulador en la cepa salvaje. Estos resultados confirman que *fasR* no sería un gen esencial para el crecimiento *in vitro* de *M. tuberculosis*.



**Figura 4A y B. *fasR*<sub>MT</sub> no es un gen esencial para el crecimiento *in vitro* de *M. tuberculosis*.** **A.** Curva de crecimiento de la cepa *Mtb*Δ*fasR* pFR33 en medio 7H9-ADC con y sin ATc 0.5 µg ml<sup>-1</sup>. Al tercer día de incubación los cultivos se diluyeron hasta DO<sub>600</sub>~0.05 en medio fresco con y sin ATc, repitiéndose este procedimiento tres veces de manera sucesiva. Las curvas mostradas corresponden al cultivo resultante de la tercera dilución. Como control se creció de igual manera la cepa salvaje *M. tuberculosis* H37Rv en medio 7H9-ADC con y sin ATc. **B.** Al sexto día de incubación (indicado con una flecha en el punto A) se tomaron muestras de cada uno de los cultivos para analizar los niveles intracelulares de FasR<sub>MT</sub> por western blot. La detección se realizó con anticuerpos anti-FasR<sub>MT</sub> Fab monoclonales (panel inferior). Como control de carga se detectaron los niveles de la ARN polimerasa micobacteriana RpoB<sub>MT</sub> utilizando anticuerpos monoclonales comerciales anti-RpoB<sub>EC</sub> (panel superior). Como control positivo, se sembraron dos diluciones de la proteína purificada His<sub>6</sub>-FasR<sub>MT</sub> (1:50 y 1:10).

### 3.4.3 Discusión

Si bien *M. smegmatis* es una especie altamente utilizada como modelo de estudio de la función de genes micobacterianos, la misma presenta diferencias metabólicas que pueden en algunos casos, influir durante la extrapolación de las conclusiones obtenidas a cepas patógenas como *M. tuberculosis*. En consecuencia, la confirmación experimental de la esencialidad de determinados genes en *M. tuberculosis* resulta indispensable en la lucha contra la TB y en el desarrollo de nuevos antimicobacterianos que inhiban el funcionamiento de las proteínas que estos genes codifican, suprimiendo en consecuencia el crecimiento de la micobacteria.

Los resultados obtenidos en capítulos anteriores respecto a la esencialidad de *fasR* en *M. smegmatis*, el rol fisiológico de este regulador en el metabolismo lipídico de las micobacterias y la predicción de su esencialidad en *M. tuberculosis* [172], postulaban a FasR como un posible blanco para el desarrollo de nuevos antimicobacterianos. En consecuencia, y debido a que los estudios de mutagénesis de alta densidad y posterior secuenciación son predictivos, y pueden dar falsos positivos, decidimos analizar la esencialidad de *fasR* en *M. tuberculosis* utilizando un método de recombinación homóloga en dos etapas, sugerido por la Dra. Claudia Sala (Fig. 40). La cepa *MtbΔfasR* pFR33 resultante presenta una delección en la copia cromosómica de *fasR<sub>MT</sub>*, y una copia complementante de *fasR<sub>MT</sub>* bajo control del *Pptr*, junto al sistema TetR/Pip OFF necesario para su regulación integrado en el genoma (Fig. 41). Al analizar el crecimiento *in vitro* de esta mutante condicional en presencia de ATc, no observamos diferencias respecto a su crecimiento en ausencia del inhibidor. Dado que la síntesis de FasR<sub>MT</sub> se encuentra reprimida en presencia de ATc, estos resultados sugieren que *fasR* no es un gen esencial para el crecimiento *in vitro* de *M. tuberculosis* (Fig. 42).

La diferencia aquí reportada en la esencialidad de un gen involucrado en el metabolismo de ácidos grasos/micólicos entre micobacterias patógenas y no patógenas se ha demostrado por primera vez para *accD6*, último gen del operón *fasII* que codifica para la subunidad β de la acil-CoA carboxilasa 6 (ACCasa 6), la cual genera malonil-CoA utilizado como sustrato por ambos sistemas FAS [74]. En este caso, se ha reportado que *accD6* es esencial en *M. tuberculosis*, pero existen controversias

respecto a su esencialidad en *M. smegmatis* [74, 84]. Diferencias similares entre especies de micobacterias de crecimiento lento y rápido han sido reportadas previamente entre los genes responsables de regular la biosíntesis de la envoltura celular. En este sentido, Amin y colaboradores demostraron la esencialidad del gen *embA* (que codifica para una arabinosiltransferasa), en *M. tuberculosis* pero no en *M. smegmatis* [186]. Por otro lado, el estudio de la esencialidad del gen *alr* que codifica para una D-alanina racemasa ha arrojado resultados ambiguos en *M. smegmatis* [187-189]. El último reporte presentado por Wei y colaboradores determinó que la disminución de los niveles intracelulares de Alr por proteólisis controlada no afectaba el crecimiento de *M. smegmatis*, sugiriendo que Alr no es una enzima crítica en este microorganismo [189]. Sin embargo, Awasthy y colaboradores demostraron un año después que la actividad de esta proteína es esencial para la viabilidad de *M. tuberculosis*, validando a Alr como un posible blanco de drogas [190].

*M. tuberculosis* es una especie patógena capaz de infectar, sobrevivir y replicarse dentro de las células del huésped, pudiendo permanecer en un estado latente por décadas. Para adaptarse a las condiciones adversas de crecimiento que allí encuentra, *M. tuberculosis* modifica su metabolismo y en consecuencia, determinados genes que no resultan esenciales para el crecimiento *in vitro* del patógeno, sí lo son frente a la exposición de la bacteria a determinados estreses que simulan el ambiente intracelular al cual se enfrentaría. Para citar algunos ejemplos, se sabe que la disponibilidad de hierro durante el proceso infectivo es un factor crítico que influye en la magnitud y la progresión de la enfermedad. *M. tuberculosis* posee dos proteínas involucradas en el almacenamiento de hierro, BfrA y BfrB. Si bien la mutante doble en estos genes no presenta diferencias en su crecimiento respecto a la cepa salvaje, se ha evidenciado que la misma tiene un crecimiento significativamente reducido en condiciones de privación de hierro, es vulnerable al estrés oxidativo y exhibe un crecimiento atenuado en macrófagos humanos [191]. Por otro lado, la privación de oxígeno dispara en *M. tuberculosis* una respuesta adaptativa que deriva en la adopción de un estado dormante no replicativo capaz de persistir por largos períodos de tiempo dentro del huésped, siendo DosR un regulador clave de esta respuesta [192]. Se ha demostrado que la alteración de los niveles de *dosR* en una cepa salvaje de *M. tuberculosis*, a pesar de no perturbar la viabilidad de las cepas en condiciones



aeróbicas, resulta crítico para la adaptación de las mismas a condiciones de hipoxia [193]. A su vez, durante el crecimiento intracelular y la infección crónica, *M. tuberculosis* utilizaría los lípidos del huésped como fuente de carbono, siendo el colesterol uno de los posibles nutrientes esenciales [194, 195]. El locus *igr* es necesario para el crecimiento del patógeno en macrófagos y ratones [196], y si bien su mutación no afecta el crecimiento de *M. tuberculosis* en presencia de diversas fuentes de carbono, resulta en un profundo defecto de su crecimiento en presencia de colesterol [197]. En consecuencia, y teniendo en cuenta todo lo antes detallado, resulta necesario analizar la capacidad infectiva de la mutante condicional *MtbΔfasR* pFR33 y su viabilidad en distintas condiciones de estrés. Los resultados obtenidos nos permitirán definir si FasR tiene un rol importante en la infección y supervivencia de *M. tuberculosis in vivo*, posiblemente revalidando esta proteína como posible blanco para el desarrollo de nuevos antimicobacterianos.

#### 4. Conclusiones

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

Se identificó una proteína de *M. tuberculosis* (Rv3208) perteneciente a la familia TetR de reguladores transcripcionales, la cual codifica para una proteína de unión al ADN a la que llamamos FasR por sus siglas en inglés Fatty acid synthesis Regulator. Se reveló la existencia de proteínas hipotéticas que poseen más del 40% de identidad con FasR<sub>MT</sub>, todas ellas presentes exclusivamente en actinomicetes, observándose los mayores porcentajes de identidad (por encima del 51%) en las proteínas presentes en los actinomicetes productores de ácidos micólicos. Esta evidencia sumada a la sintenia conservada que presentan estos genes, sugirió que las mismas son proteínas ortólogas que podrían tener el mismo rol fisiológico.

FasR es una proteína dimérica que se une específicamente a la región promotora del operón *fas-acpS* de micobacterias (*Pfas*) para regular la expresión de sus genes. El correcto reconocimiento y unión de FasR a *Pfas* requiere de la presencia de una secuencia consenso altamente conservada TAC[TG][CG][GAC][CTG][GC][A/C]GTA en micobacterias, ubicada 200-300 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción de *fas*.

FasR es un activador de la expresión de los genes del operón *fas-acpS*, cuya unión a la región promotora *Pfas* se encuentra modulada por ésteres de ácidos grasos de cadena carbonada  $\geq C_{16}$ , productos del sistema FAS-I. Estos ligandos son sensados por FasR<sub>MT</sub> para liberarse del promotor *Pfas* y de esta manera detener su función activadora. Este modelo de regulación de la función de FasR constituye un clásico ejemplo de regulación por producto.

Se construyó una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en *fasR* y se confirmó la esencialidad postulada para *fasR* de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis*. El análisis de esta mutante condicional nos permitió corroborar *in vivo* el rol activador de FasR, dado que una disminución de los niveles intracelulares del regulador se tradujo en una represión de la expresión de los genes del operón *fas-acpS* y una reducción concomitante en la síntesis de ácidos grasos/micólicos. La alteración en los niveles de

expresión de *kasA* (tercer gen del operón *fasII*) frente a la disminución en los niveles de FasR y la inhibición de la síntesis de ácidos grasos sugirieron una influencia del regulador sobre los niveles de expresión y síntesis de alguna de las proteínas del sistema FAS-II, dando mayor indicio de una regulación coordinada a nivel transcripcional entre ambas sintetas de ácidos grasos (FAS-I y FAS-II).

Se construyó una cepa de *M. smegmatis* mutante condicional en el operón *fas-acpS*. El análisis de esta mutante demostró que a pesar de estar involucrados en la misma vía metabólica, los efectos fisiológicos resultantes de mutar el gen *fasR* o el operón *fas-acpS* varían entre sí, dando indicio de la compleja red de regulación encargada de mantener la homeostasis lipídica en las micobacterias.

Se construyó una cepa de *M. tuberculosis* mutante condicional en *fasR*. El análisis de esta mutante indicó que *fasR* no es un gen esencial para el crecimiento *in vitro* de *M. tuberculosis*.

## 5. Referencias bibliográficas

- [1] Koch, R. (1882) The etiology of tuberculosis. *Berl. Klin.Wochenschr.* 15, 221-230.
- [2] Harisinghani, M.G., McCloud, T.C., Shepard, J.A., Ko, J.P., Shroff, M.M. and Mueller, P.R. (2000) Tuberculosis from head to toe. *Radiographics* 20, 449-470; quiz 528-449, 532.
- [3] O'Garra, A., Redford, P.S., McNab, F.W., Bloom, C.I., Wilkinson, R.J. and Berry, M.P. (2013) The immune response in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 475-527.
- [4] WHO (2013) Global tuberculosis report 2013- Geneva, Switzerland.
- [5] WHO (2013) Tuberculosis Fact Sheet. Geneva, Switzerland.
- [6] Reichman, L. (1979) Tuberculin skin testing. The state of the art. *Chest* 76, 764-770.
- [7] Chopra, K. (1996) Multi drug resistant tuberculosis. *Indian J. Pediatr.* 63, 159-162.
- [8] Velayati, A.A., Masjedi, M.R., Farnia, P., Tabarsi, P., Ghanavi, J., Ziazarifi, A.H. and Hoffner, S.E. (2009) Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran. *Chest* 136, 420-425.
- [9] Migliori, G.B., De Iaco, G., Besozzi, G., Centis, R. and Cirillo, D.M. (2007) First tuberculosis cases in Italy resistant to all tested drugs. *Euro Surveill* 12, E070517 070511.
- [10] Udwadia, Z.F., Amale, R.A., Ajbani, K.K. and Rodrigues, C. Totally drug-resistant tuberculosis in India. *Clin. Infect. Dis.* 54, 579-581.
- [11] Chao, M.C. and Rubin, E.J. (2010) Letting sleeping dogs lie: does dormancy play a role in tuberculosis? *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 293-311.
- [12] Brennan, P.J. and Nikaido, H. (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 29-63.
- [13] Deoghare, S. (2013) Bedaquiline: a new drug approved for treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Indian. J. Pharmacol.* 45, 536-537.
- [14] Tortoli, E. (2006) The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48, 159-178.
- [15] Embley, T.M. and Stackebrandt, E. (1994) The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 257-289.
- [16] Falkinham, J.O., 3rd (1996) Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 177-215.

- [17] 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. U. S. A. 94, 9869-9874.
- [18] Cole, S.T. (2002) Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology 148, 2919-2928.
- [19] 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.
- [20] Sizaire, V., Nackers, F., Comte, E. and Portaels, F. (2006) *Mycobacterium ulcerans* infection: control, diagnosis, and treatment. Lancet Infect. Dis. 6, 288-296.
- [21] Clark-Curtiss, J.E., Jacobs, W.R., Docherty, M.A., Ritchie, L.R. and Curtiss, R., 3rd (1985) Molecular analysis of DNA and construction of genomic libraries of *Mycobacterium leprae*. J. Bacteriol. 161, 1093-1102.
- [22] Young, R.A., Bloom, B.R., Grosskinsky, C.M., Ivanyi, J., Thomas, D. and Davis, R.W. (1985) Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82, 2583-2587.
- [23] Jacobs, W.R., Docherty, M.A., Curtiss, R., 3rd and Clark-Curtiss, J.E. (1986) Expression of *Mycobacterium leprae* genes from a *Streptococcus mutans* promoter in *Escherichia coli* K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 83, 1926-1930.
- [24] Kieser, T., Moss, M.T., Dale, J.W. and Hopwood, D.A. (1986) Cloning and expression of *Mycobacterium bovis* BCG DNA in *Streptomyces lividans*. J. Bacteriol. 168, 72-80.
- [25] Shiloh, M.U. and Champion, P.A. (2010) To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? Curr. Opin. Microbiol. 13, 86-92.
- [26] Snapper, S.B., Melton, R.E., Mustafa, S., Kieser, T. and Jacobs, W.R., Jr. (1990) Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. Mol. Microbiol. 4, 1911-1919.
- [27] Etienne, G., Laval, F., Villeneuve, C., Dinadayala, P., Abouwarda, A., Zerbib, D., Galamba, A. and Daffe, M. (2005) The cell envelope structure and properties of

*Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155: is there a clue for the unique transformability of the strain? *Microbiology* 151, 2075-2086.

[28] Prouty, M.G., Correa, N.E., Barker, L.P., Jagadeeswaran, P. and Klose, K.E. (2003) Zebrafish-*Mycobacterium marinum* model for mycobacterial pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 225, 177-182.

[29] Swaim, L.E., Connolly, L.E., Volkman, H.E., Humbert, O., Born, D.E. and Ramakrishnan, L. (2006) *Mycobacterium marinum* infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptive immunity. *Infect. Immun.* 74, 6108-6117.

[30] Trias, J., Jarlier, V. and Benz, R. (1992) Porins in the cell wall of mycobacteria. *Science* 258, 1479-1481.

[31] Daffe, M. and Draper, P. (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol* 39, 131-203.

[32] Guenin-Mace, L., Simeone, R. and Demangel, C. (2009) Lipids of pathogenic Mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. *Transbound. Emerg. Dis.* 56, 255-268.

[33] Neyrolles, O. and Guilhot, C. (2011) Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. *Tuberculosis (Edinb)* 91, 187-195.

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

[35] Larsen, M.H., Vilcheze, C., Kremer, L., Besra, G.S., Parsons, L., Salfinger, M., Heifets, L., Hazbon, M.H., Alland, D., Sacchettini, J.C. and Jacobs, W.R., Jr. (2002) Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis BCG* and *M. tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 46, 453-466.

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

[37] Kremer, L., Douglas, J.D., Baulard, A.R., Morehouse, C., Guy, M.R., Alland, D., Dover, L.G., Lakey, J.H., Jacobs, W.R., Jr., Brennan, P.J., Minnikin, D.E. and Besra, G.S.

- (2000) Thiolactomycin and related analogues as novel anti-mycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Biol. Chem. 275, 16857-16864.
- [38] Zhang, Y. (2005) The magic bullets and tuberculosis drug targets. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45, 529-564.
- [39] Kilburn, J.O. and Takayama, K. (1981) Effects of ethambutol on accumulation and secretion of trehalose mycolates and free mycolic acid in *Mycobacterium smegmatis*. Antimicrob. Agents Chemother. 20, 401-404.
- [40] Daffe, M. and Reyrat, J.M. (2008) The Mycobacterial Cell Envelope, 422 pp. ASM Press.
- [41] Ghuysen, J.M. (1968) Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. Bacteriol. Rev. 32, 425-464.
- [42] McNeil, M., Daffe, M. and Brennan, P.J. (1991) Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. J. Biol. Chem. 266, 13217-13223.
- [43] Barry, C.E., 3rd, Lee, R.E., Mdluli, K., Sampson, A.E., Schroeder, B.G., Slayden, R.A. and Yuan, Y. (1998) Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. Prog. Lipid Res. 37, 143-179.
- [44] Barry, C.E., 3rd and Mdluli, K. (1996) Drug sensitivity and environmental adaptation of mycobacterial cell wall components. Trends Microbiol. 4, 275-281.
- [45] Dubnau, E., Chan, J., Raynaud, C., Mohan, V.P., Laneelle, M.A., Yu, K., Quemard, A., Smith, I. and Daffe, M. (2000) Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Mol. Microbiol. 36, 630-637.
- [46] Glickman, M.S., Cox, J.S. and Jacobs, W.R., Jr. (2000) A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol. Cell 5, 717-727.
- [47] Glickman, M.S. and Jacobs, W.R., Jr. (2001) Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. Cell 104, 477-485.
- [48] 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., Jr. (2007) Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 104, 5157-5162.

- [49] Bhatt, A., Molle, V., Besra, G.S., Jacobs, W.R., Jr. 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.
- [50] Minnikin, D.E. (1982) Lipids: complex lipids, their chemistry, biosynthesis and roles. In: *The biology of the mycobacteria* (Ratledge, C. and Stanford, J., Eds.), Vol. 1, pp. 95-184. Academic Press, London.
- [51] Kremer, L. and Besra, G.S. (2005) A waxy tale, by *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus* (Cole, S.T., Eisenach, K.D., McMurray, D.N. and Jr, W.R.J., Eds.), Vol. pp. 287-305. American Society for Microbiology, Washington DC, USA.
- [52] Hunter, R.L., Olsen, M.R., Jagannath, C. and Actor, J.K. (2006) Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitary tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 36, 371-386.
- [53] Brown, A.K., Taylor, R.C., Bhatt, A., Futterer, K. and Besra, G.S. (2009) Platensimycin activity against mycobacterial beta-ketoacyl-ACP synthases. *PLoS One* 4, e6306.
- [54] Rock, C.O. and Jackowski, S. (2002) Forty years of bacterial fatty acid synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 1155-1166.
- [55] Cronan, J.E. and Rock, C.O. (1996) Biosynthesis of membrane lipids. In *Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F. (ed.). Washington, DC: American Society for Microbiology Press 612-636.
- [56] Marrakchi, H., Zhang, Y.M. and Rock, C.O. (2002) Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 1050-1055.
- [57] Schweizer, E. and Hofmann, J. (2004) Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 501-517.
- [58] Rock, C.O. and Cronan, J.E. (1996) *Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1302, 1-16.



- [59] Fernandes, N.D. and Kolattukudy, P.E. (1996) Cloning, sequencing and characterization of a fatty acid synthase-encoding gene from *Mycobacterium tuberculosis var. bovis* BCG. *Gene* 170, 95-99.
- [60] 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.
- [61] Wood, W.I., Peterson, D.O. and Bloch, K. (1978) Subunit structure of *Mycobacterium smegmatis* fatty acid synthetase. Evidence for identical multifunctional polypeptide chains. *J. Biol. Chem.* 253, 2650-2656.
- [62] 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.
- [63] Bloch, K. and Vance, D. (1977) Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 263-298.
- [64] Wheeler, P.R., Bulmer, K. and Ratledge, C. (1990) Enzymes for biosynthesis *de novo* and elongation of fatty acids in mycobacteria grown in host cells: is *Mycobacterium leprae* competent in fatty acid biosynthesis? *J. Gen. Microbiol.* 136, 211-217.
- [65] Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C.E., III, 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.
- [66] Papaioannou, N., Cheon, H.S., Lian, Y. and Kishi, Y. (2007) Product-regulation mechanisms for fatty acid biosynthesis catalyzed by *Mycobacterium smegmatis* FAS I. *Chem. Biochem.* 8, 1775-1780.
- [67] Zimhony, O., Vilcheze, C. and Jacobs, W.R., Jr. (2004) Characterization of *Mycobacterium smegmatis* expressing the *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I (*fas1*) gene. *J. Bacteriol.* 186, 4051-4055.

- [68] Kolattukudy, P.E., Fernandes, N.D., Azad, A.K., Fitzmaurice, A.M. and Sirakova, T.D. (1997) Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 24, 263-270.
- [69] Portevin, D., Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., Grimaldi, C., Chami, M., Daffe, 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. U.S.A* 101, 314-319.
- [70] Choi, K.H., Kremer, L., Besra, G.S. and Rock, C.O. (2000) Identification and substrate specificity of beta -ketoacyl (acyl carrier protein) synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 275, 28201-28207.
- [71] Scarsdale, J.N., Kazanina, G., He, X., Reynolds, K.A. and Wright, H.T. (2001) Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. *J. Biol. Chem.* 276, 20516-20522.
- [72] Brown, A.K., Sridharan, S., Kremer, L., Lindenberg, S., Dover, L.G., Sacchettini, J.C. and Besra, G.S. (2005) Probing the mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III mtFabH: factors influencing catalysis and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 280, 32539-32547.
- [73] Sacco, E., Covarrubias, A.S., O'Hare, H.M., Carroll, P., Eynard, N., Jones, T.A., Parish, T., Daffe, M., Backbro, K. and Quemard, A. (2007) The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14628-14633.
- [74] 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.
- [75] Kremer, L., Nampoothiri, K.M., Lesjean, S., Dover, L.G., Graham, S., Betts, J., Brennan, P.J., Minnikin, D.E., Loch, C. and Besra, G.S. (2001) Biochemical characterization of acyl carrier protein (AcpM) and malonyl-CoA:AcpM transacylase (mtFabD), two major components of *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II. *J. Biol. Chem.* 276, 27967-27974.

- [76] Chalut, C., Botella, L., de Sousa-D'Auria, C., Houssin, C. and Guilhot, C. (2006) The nonredundant roles of two 4'-phosphopantetheinyl transferases in vital processes of *Mycobacteria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8511-8516.
- [77] Schaeffer, M.L., Agnihotri, G., Kallender, H., Brennan, P.J. and Lonsdale, J.T. (2001) Expression, purification, and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* acyl carrier protein, AcpM. *Biochim. Biophys. Acta* 1532, 67-78.
- [78] 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, 47029-47037.
- [79] Kremer, L., Dover, L.G., Carrere, 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.
- [80] Slayden, R.A. and Barry, C.E., 3rd (2002) The role of KasA and KasB in the biosynthesis of meromycolic acids and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb.)* 82, 149-160.
- [81] Sridharan, S., Wang, L., Brown, A.K., Dover, L.G., Kremer, L., Besra, G.S. and Sacchettini, J.C. (2007) X-ray crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl acyl carrier protein synthase II (mtKasB). *J. Mol. Biol.* 366, 469-480.
- [82] Gao, L.Y., Laval, F., Lawson, E.H., Groger, R.K., Woodruff, A., Morisaki, J.H., Cox, J.S., Daffe, M. and Brown, E.J. (2003) Requirement for *kasB* in *Mycobacterium* mycolic acid biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. *Mol. Microbiol.* 49, 1547-1563.
- [83] Bhatt, A., Kremer, L., Dai, A.Z., Sacchettini, J.C. and Jacobs, W.R., Jr. (2005) Conditional depletion of KasA, a key enzyme of mycolic acid biosynthesis, leads to mycobacterial cell lysis. *J. Bacteriol.* 187, 7596-7606.
- [84] Kurth, D.G., Gago, G.M., de, I.I., Bazet, L.B., Lin, T.W., Morbidoni, H.R., Tsai, S.C. and Gramajo, H. (2009) Accase 6 is the essential acetyl-CoA carboxylase involved in fatty acid and mycolic acid biosynthesis in mycobacteria. *Microbiology* 155, 2664-2675.
- [85] Marrakchi, H., Ducasse, S., Labesse, G., Montrozier, H., Margeat, E., Emorine, L., Charpentier, X., Daffe, M. and Quemard, A. (2002) MabA (FabG1), a *Mycobacterium*

*tuberculosis* protein involved in the long-chain fatty acid elongation system FAS-II. *Microbiology* 148, 951-960.

[86] Quemard, A., Sacchettini, J.C., Dessen, A., Vilcheze, C., Bittman, R., Jacobs, W.R., Jr. and Blanchard, J.S. (1995) Enzymatic characterization of the target for isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 34, 8235-8241.

[87] Betts, J.C., McLaren, A., Lennon, M.G., Kelly, F.M., Lukey, P.T., Blakemore, S.J. and Duncan, K. (2003) Signature gene expression profiles discriminate between isoniazid-, thiolactomycin-, and triclosan-treated *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2903-2913.

[88] Trivedi, O.A., Arora, P., Sridharan, V., Tickoo, R., Mohanty, D. and Gokhale, R.S. (2004) Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature* 428, 441-445.

[89] Portevin, D., Sousa-D'Auria, C., Montrozier, H., Houssin, C., Stella, A., Laneelle, M.A., Bardou, F., Guilhot, C. and Daffe, M. (2005) The acyl-AMP ligase FadD32 and AccD4-containing acyl-CoA carboxylase are required for the synthesis of mycolic acids and essential for mycobacterial growth: identification of the carboxylation product and determination of the acyl-CoA carboxylase components. *J. Biol. Chem.* 280, 8862-8874.

[90] Gande, R., Gibson, K.J., Brown, A.K., Krumbach, K., Dover, L.G., Sahm, H., Shioyama, S., Oikawa, T., Besra, G.S. and Eggeling, L. (2004) Acyl-CoA carboxylases (*accD2* and *accD3*), together with a unique polyketide synthase (*Cg-pks*), are key to mycolic acid biosynthesis in *Corynebacterianae* such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 279, 44847-44857.

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

[92] Veyron-Churlet, R., Guerrini, O., Mourey, L., Daffe, M. and Zerbib, D. (2004) Protein-protein interactions within the Fatty Acid Synthase-II system of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for mycobacterial viability. *Mol. Microbiol.* 54, 1161-1172.

[93] Veyron-Churlet, R., Bigot, S., Guerrini, O., Verdoux, S., Malaga, W., Daffe, M. and Zerbib, D. (2005) The biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*

relies on multiple specialized elongation complexes interconnected by specific protein-protein interactions. *J. Mol. Biol.* 353, 847-858.

[94] Cantaloube, S., Veyron-Churlet, R., Haddache, N., Daffe, M. and Zerbib, D. (2011) The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II dehydratases and methyltransferases define the specificity of the mycolic acid elongation complexes. *PLoS One* 6, e29564.

[95] Zhang, Y.M. and Rock, C.O. (2009) Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *J. Lipid. Res.* 50 Suppl, S115-119.

[96] Cronan, J.E., Jr. and Subrahmanyam, S. (1998) FadR, transcriptional co-ordination of metabolic expediency. *Mol. Microbiol.* 29, 937-943.

[97] Henry, M.F. and Cronan, J.E., Jr. (1992) A new mechanism of transcriptional regulation: release of an activator triggered by small molecule binding. *Cell* 70, 671-679.

[98] Campbell, J.W. and Cronan, J.E., Jr. (2001) *Escherichia coli* FadR positively regulates transcription of the *fabB* fatty acid biosynthetic gene. *J. Bacteriol.* 183, 5982-5990.

[99] 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.

[100] 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.

[101] 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.

[102] Miller, D.J., Zhang, Y.M., 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.

[103] 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.

[104] Schujman, G.E., Guerin, M., Buschiazzi, 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, 4074-4083.

- [105] 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.
- [106] Lu, Y.J. and Rock, C.O. (2006) Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 59, 551-566.
- [107] 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.
- [108] 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.
- [109] 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.
- [110] 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.
- [111] Silbert, D.F. and Vagelos, P.R. (1967) Fatty acid mutant of *E. coli* lacking a beta-hydroxydecanoyl thioester dehydrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 58, 1579-1586.
- [112] Cronan, J.E., Jr., 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.
- [113] 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.
- [114] Zhu, K., Choi, K.H., Schweizer, H.P., Rock, C.O. and Zhang, Y.M. (2006) Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 60, 260-273.
- [115] 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.

- [116] Davis, M.S. and Cronan, J.E., Jr. (2001) Inhibition of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase by acyl-acyl carrier protein. *J. Bacteriol.* 183, 1499-1503.
- [117] Molle, V. and Kremer, L. (2010) Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol. Microbiol.* 75, 1064-1077.
- [118] Molle, V., Gulten, G., Vilcheze, C., Veyron-Churlet, R., Zanella-Cleon, I., Sacchettini, J.C., Jacobs, W.R., Jr. and Kremer, L. (2010) Phosphorylation of InhA inhibits mycolic acid biosynthesis and growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 78, 1591-1605.
- [119] Slama, N., Leiba, J., Eynard, N., Daffe, M., Kremer, L., Quemard, A. and Molle, V. (2011) Negative regulation by Ser/Thr phosphorylation of HadAB and HadBC dehydratases from *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412, 401-406.
- [120] Molle, V., Brown, A.K., Besra, G.S., Cozzone, A.J. and Kremer, L. (2006) The condensing activities of the *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase are differentially regulated by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 281, 30094-30103.
- [121] Veyron-Churlet, R., Molle, V., Taylor, R.C., Brown, A.K., Besra, G.S., Zanella-Cleon, I., Futterer, K. and Kremer, L. (2009) The *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III activity is inhibited by phosphorylation on a single threonine residue. *J. Biol. Chem.* 284, 6414-6424.
- [122] Veyron-Churlet, R., Zanella-Cleon, I., Cohen-Gonsaud, M., Molle, V. and Kremer, L. (2010) Phosphorylation of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase MabA regulates mycolic acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 285, 12714-12725.
- [123] Wilson, M., DeRisi, J., Kristensen, H.H., Imboden, P., Rane, S., 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.
- [124] Boshoff, H.I., Myers, T.G., Copp, B.R., McNeil, M.R., Wilson, M.A. and Barry, C.E., 3rd (2004) The transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* to inhibitors of metabolism: novel insights into drug mechanisms of action. *J. Biol. Chem.* 279, 40174-40184.

- [125] 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.
- [126] Fu, L.M. (2006) Exploring drug action on *Mycobacterium tuberculosis* using affymetrix oligonucleotide genechips. *Tuberculosis (Edinb)* 86, 134-143.
- [127] Sassetti, C.M., Boyd, D.H. and Rubin, E.J. (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 48, 77-84.
- [128] Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- [129] Sambrook, J., E.F.Fritsch and T.Maniatis (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed, pp. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- [130] 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.
- [131] Stover, C.K., de la Cruz, V.F., Fuerst, T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Bennett, L.T., Bansal, G.P., Young, J.F., Lee, M.H., Hatfull, G.F. and et al. (1991) New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 351, 456-460.
- [132] Triccas, J.A., Parish, T., Britton, W.J. and Gicquel, B. (1998) An inducible expression system permitting the efficient purification of a recombinant antigen from *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 167, 151-156.
- [133] Blondelet-Rouault, M.H., Weiser, J., Lebrihi, A., Branny, P. and Pernodet, J.L. (1997) Antibiotic resistance gene cassettes derived from the omega interposon for use in *E. coli* and *Streptomyces*. *Gene* 190, 315-317.
- [134] Pelicic, V., Jackson, M., Reyrat, J.M., Jacobs, W.R., Jr., Gicquel, B. and Guilhot, C. (1997) Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94, 10955-10960.
- [135] Boldrin, F., Casonato, S., Dainese, E., Sala, C., Dhar, N., Palu, G., Riccardi, G., Cole, S.T. and Manganelli, R. (2010) Development of a repressible mycobacterial promoter system based on two transcriptional repressors. *Nucleic Acids Res.* 38, e134.
- [136] Consaul, S.A. and Pavelka, M.S., Jr. (2004) Use of a novel allele of the *Escherichia coli aacC4* aminoglycoside resistance gene as a genetic marker in mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 234, 297-301.



- [137] Lee, M.H., Pascopella, L., Jacobs, W.R., Jr. and Hatfull, G.F. (1991) Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guerin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 3111-3115.
- [138] Kirksey, M.A., Tischler, A.D., Simeone, R., Hisert, K.B., Uplekar, S., Guilhot, C. and McKinney, J.D. (2011) Spontaneous phthiocerol dimycocerosate-deficient variants of *Mycobacterium tuberculosis* are susceptible to gamma interferon-mediated immunity. Infect. Immun. 79, 2829-2838.
- [139] Dussurget, O., Timm, J., Gomez, M., Gold, B., Yu, S., Sabol, S.Z., Holmes, R.K., Jacobs, W.R., Jr. and Smith, I. (1999) Transcriptional control of the iron-responsive *fxbA* gene by the mycobacterial regulator IdeR. J. Bacteriol. 181, 3402-3408.
- [140] Hatfull, G.F. and W. R. Jacobs, J. (2000) Molecular Genetics of Mycobacteria, 363 pp. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- [141] Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23, 2947-2948.
- [142] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725-2729.
- [143] Parish, T., Mahenthiralingam, E., Draper, P., Davis, E.O. and Colston, M.J. (1997) Regulation of the inducible acetamidase gene of *Mycobacterium smegmatis*. Microbiology 143 ( Pt 7), 2267-2276.
- [144] Jourlin-Castelli, C., Mani, N., Nakano, M.M. and Sonenshein, A.L. (2000) CcpC, a novel regulator of the LysR family required for glucose repression of the *citB* gene in *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. 295, 865-878.
- [145] Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.
- [146] 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.

- [147] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.
- [148] Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.
- [149] Kremer, L., Guerardel, Y., Gurcha, S.S., Loch, C. and Besra, G.S. (2002) Temperature-induced changes in the cell-wall components of *Mycobacterium thermoresistibile*. *Microbiology* 148, 3145-3154.
- [150] Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, 466 pp. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- [151] Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
- [152] Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W. and Hinrichs, W. (2000) Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat. Struct. Biol.* 7, 215-219.
- [153] Ramos, J.L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R. and Tobes, R. (2005) The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 326-356.
- [154] Bailey, T.L., Boden, M., Buske, F.A., Frith, M., Grant, C.E., Clementi, L., Ren, J., Li, W.W. and Noble, W.S. (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* 37, W202-208.
- [155] Bailey, T.L. and Elkan, C. (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 2, 28-36.
- [156] Bailey, T.L. and Gribskov, M. (1998) Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics* 14, 48-54.
- [157] Cole, S.T., Eglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honore, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R.M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S.,

Murphy, L., Oliver, K., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J.R. and Barrell, B.G. (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409, 1007-1011.

[158] 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.

[159] McKinney, J.D., Honer zu Bentrup, K., Munoz-Elias, E.J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W.T., Swenson, D., Sacchettini, J.C., Jacobs, W.R., Jr. and Russell, D.G. (2000) Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406, 735-738.

[160] Schnappinger, D., Ehrt, S., Voskuil, M.I., Liu, Y., Mangan, J.A., Monahan, I.M., Dolganov, G., Efron, B., Butcher, P.D., Nathan, C. and Schoolnik, G.K. (2003) Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. *J. Exp. Med.* 198, 693-704.

[161] Munoz-Elias, E.J. and McKinney, J.D. (2006) Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cell Microbiol.* 8, 10-22.

[162] Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C. and Walsh, C.T. (1996) A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* 3, 923-936.

[163] Walsh, C.T., Gehring, A.M., Weinreb, P.H., Quadri, L.E. and Flugel, R.S. (1997) Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 309-315.

[164] Quadri, L.E., Sello, J., Keating, T.A., Weinreb, P.H. and Walsh, C.T. (1998) Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem. Biol.* 5, 631-645.

[165] 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.

[166] Butala, M., Zgur-Bertok, D. and Busby, S.J. (2009) The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell Mol. Life Sci.* 66, 82-93.

- [167] Higo, A., Horinouchi, S. and Ohnishi, Y. (2011) Strict regulation of morphological differentiation and secondary metabolism by a positive feedback loop between two global regulators AdpA and BldA in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* 81, 1607-1622.
- [168] Greendyke, R., Rajagopalan, M., Parish, T. and Madiraju, M.V. (2002) Conditional expression of *Mycobacterium smegmatis dnaA*, an essential DNA replication gene. *Microbiology* 148, 3887-3900.
- [169] Dziadek, J., Rutherford, S.A., Madiraju, M.V., Atkinson, M.A. and Rajagopalan, M. (2003) Conditional expression of *Mycobacterium smegmatis ftsZ*, an essential cell division gene. *Microbiology* 149, 1593-1603.
- [170] Kendall, S.L., Withers, M., Soffair, C.N., Moreland, N.J., Gurcha, S., Sidders, B., Frita, R., Ten Bokum, A., Besra, G.S., Lott, J.S. and Stoker, N.G. (2007) A highly conserved transcriptional repressor controls a large regulon involved in lipid degradation in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 65, 684-699.
- [171] Henry, M.F. and Cronan, J.E., Jr. (1991) *Escherichia coli* transcription factor that both activates fatty acid synthesis and represses fatty acid degradation. *J. Mol. Biol.* 222, 843-849.
- [172] Griffin, J.E., Gawronski, J.D., Dejesus, M.A., Ioerger, T.R., Akerley, B.J. and Sasseti, C.M. (2011) High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog.* 7, e1002251.
- [173] Simons, R.W., Egan, P.A., Chute, H.T. and Nunn, W.D. (1980) Regulation of fatty acid degradation in *Escherichia coli*: isolation and characterization of strains bearing insertion and temperature-sensitive mutations in gene *fadR*. *J. Bacteriol.* 142, 621-632.
- [174] Folcher, M., Morris, R.P., Dale, G., Salah-Bey-Hocini, K., Viollier, P.H. and Thompson, C.J. (2001) A transcriptional regulator of a pristinamycin resistance gene in *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.* 276, 1479-1485.
- [175] Gomez, M., Doukhan, L., Nair, G. and Smith, I. (1998) *sigA* is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 29, 617-628.
- [176] Vilcheze, C., Morbidoni, H.R., Weisbrod, T.R., Iwamoto, H., Kuo, M., Sacchettini, J.C. and Jacobs, W.R., Jr. (2000) Inactivation of the *inhA*-encoded fatty acid synthase II

(FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. J. Bacteriol. 182, 4059-4067.

[177] 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.

[178] Daniel, J., Deb, C., Dubey, V.S., Sirakova, T.D., Abomoelak, B., Morbidoni, H.R. and Kolattukudy, P.E. (2004) Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. J. Bacteriol. 186, 5017-5030.

[179] Deb, C., Lee, C.M., Dubey, V.S., Daniel, J., Abomoelak, B., Sirakova, T.D., Pawar, S., Rogers, L. and Kolattukudy, P.E. (2009) A novel *in vitro* multiple-stress dormancy model for *Mycobacterium tuberculosis* generates a lipid-loaded, drug-tolerant, dormant pathogen. PLoS One 4, e6077.

[180] Minnikin, D.E., Kremer, L., Dover, L.G. and Besra, G.S. (2002) The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. Chem. Biol. 9, 545-553.

[181] Cox, J.S., Chen, B., McNeil, M. and Jacobs, W.R., Jr. (1999) Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Nature 402, 79-83.

[182] Rousseau, C., Winter, N., Pivert, E., Bordat, Y., Neyrolles, O., Ave, P., Huerre, M., Gicquel, B. and Jackson, M. (2004) Production of phthiocerol dimycocerosates protects *Mycobacterium tuberculosis* from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. Cell Microbiol. 6, 277-287.

[183] Yu, J., Tran, V., Li, M., Huang, X., Niu, C., Wang, D., Zhu, J., Wang, J., Gao, Q. and Liu, J. (2012) Both phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids are required for virulence of *Mycobacterium marinum*. Infect. Immun. 80, 1381-1389.

[184] Torrelles, J.B. and Schlesinger, L.S. (2010) Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. Tuberculosis (Edinb) 90, 84-93.

[185] Strohmeier, G.R. and Fenton, M.J. (1999) Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis. Microbes Infect. 1, 709-717.

- [186] Amin, A.G., Goude, R., Shi, L., Zhang, J., Chatterjee, D. and Parish, T. (2008) EmbA is an essential arabinosyltransferase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 154, 240-248.
- [187] Chacon, O., Feng, Z., Harris, N.B., Caceres, N.E., Adams, L.G. and Barletta, R.G. (2002) *Mycobacterium smegmatis* D-Alanine Racemase Mutants Are Not Dependent on D-Alanine for Growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 47-54.
- [188] Milligan, D.L., Tran, S.L., Strych, U., Cook, G.M. and Krause, K.L. (2007) The alanine racemase of *Mycobacterium smegmatis* is essential for growth in the absence of D-alanine. *J. Bacteriol.* 189, 8381-8386.
- [189] Wei, J.R., Krishnamoorthy, V., Murphy, K., Kim, J.H., Schnappinger, D., Alber, T., Sasseti, C.M., Rhee, K.Y. and Rubin, E.J. (2011) Depletion of antibiotic targets has widely varying effects on growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4176-4181.
- [190] Awasthy, D., Bharath, S., Subbulakshmi, V. and Sharma, U. (2012) Alanine racemase mutants of *Mycobacterium tuberculosis* require D-alanine for growth and are defective for survival in macrophages and mice. *Microbiology* 158, 319-327.
- [191] Reddy, P.V., Puri, R.V., Khera, A. and Tyagi, A.K. (2011) Iron storage proteins are essential for the survival and pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* in THP-1 macrophages and the guinea pig model of infection. *J. Bacteriol.* 194, 567-575.
- [192] Park, H.D., Guinn, K.M., Harrell, M.I., Liao, R., Voskuil, M.I., Tompa, M., Schoolnik, G.K. and Sherman, D.R. (2003) *Rv3133c/dosR* is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 48, 833-843.
- [193] Majumdar, S.D., Vashist, A., Dhingra, S., Gupta, R., Singh, A., Challu, V.K., Ramanathan, V.D., Kumar, P. and Tyagi, J.S. (2012) Appropriate DevR (DosR)-mediated signaling determines transcriptional response, hypoxic viability and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 7, e35847.
- [194] Griffin, J.E., Pandey, A.K., Gilmore, S.A., Mizrahi, V., McKinney, J.D., Bertozzi, C.R. and Sasseti, C.M. (2012) Cholesterol catabolism by *Mycobacterium tuberculosis* requires transcriptional and metabolic adaptations. *Chem. Biol.* 19, 218-227.
- [195] Brzostek, A., Pawelczyk, J., Rumijowska-Galewicz, A., Dziadek, B. and Dziadek, J. (2009) *Mycobacterium tuberculosis* is able to accumulate and utilize cholesterol. *J. Bacteriol.* 191, 6584-6591.

[196] Chang, J.C., Harik, N.S., Liao, R.P. and Sherman, D.R. (2007) Identification of Mycobacterial genes that alter growth and pathology in macrophages and in mice. *J. Infect. Dis.* 196, 788-795.

[197] Chang, J.C., Miner, M.D., Pandey, A.K., Gill, W.P., Harik, N.S., Sasseti, C.M. and Sherman, D.R. (2009) *igr* Genes and *Mycobacterium tuberculosis* cholesterol metabolism. *J. Bacteriol.* 191, 5232-5239.

