



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

---

TESIS DE DOCTORADO

**“Caracterización de los factores involucrados en  
la regulación del sistema FAS-I de  
micobacterias”**

Presentada por Lic. Matías Ezequiel Cabruja

Rosario, Santa Fe, Argentina

- 2018 -

# **Caracterización de los factores involucrados en la regulación del sistema FAS-I de micobacterias**

Licenciado en Biotecnología Matías Ezequiel Cabruja

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 Actinomicetes del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR), dependiente de CONICET y de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de abril de 2013 y el 3 de agosto de 2018, bajo la dirección de la Dra. Gabriela Gago y codirección del Dr. Hugo Gramajo.

Director Dra. Gabriela Gago .....

Codirector Dr. Hugo Gramajo.....

Dra. Fabiana Bigi .....

Dra. Andrea Elizabeth Villarino Rufener .....

Dra. Silvia Altabe .....

Defendida .....

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis doctoral fueron dados a conocer en las siguientes publicaciones y presentaciones en reuniones científicas:

**Publicaciones:**

Cabruja, M., Mondino, S., Tsai, YT., Lara, J., Gramajo, H., Gago, G. (2017) "A conditional mutant of the fatty acid synthase unveils unexpected cross talks in mycobacterial lipid metabolism". *Open Biol.* 7(2): 160277.

Tsai, YT., Salzman, V., Cabruja, M., Gramajo, H., Gago, G. (2017) "Role of long-chain acyl-CoAs in the regulation of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria." *Open Biol.* 7(7): pii: 170087. doi: 10.1098/rsob.170087.

Cabruja, M., Lyonnet, BB., Millán, G., Gramajo, H., Gago, G. (2016) "Analysis of coenzyme A activated compounds in actinomycetes". *Appl Microbiol Biotechnol.* 100(16):7239-48.

Bazet Lyonnet, B., Diacovich, L., Cabruja, M., Bardou, F., Quémard, A., Gago, G, Gramajo, H. (2014) "Pleiotropic effect of AccD5 and AccE5 depletion in acyl-coenzyme A carboxylase activity and in lipid biosynthesis in mycobacteria". *PLoS One.* 9(6): e99853.

## **Reuniones científicas:**

Cabruja, M., Gramajo, H. and Gago, G. Comprehensive analytical method for the analysis of Coenzyme A activated compounds in actinomycetes. IV Congreso de Microbiología General (SAMIGE). Rosario, Argentina. Agosto 2013.

Gago, G., Bazet Lyonnet, B., Cabruja, M., Diacovich, L., Gramajo, H. *M. tuberculosis* Acyl CoA Carboxylase 5 complex: attractive target for drug discovery. Novel Therapeutic Approaches to Tuberculosis. Keystone, Colorado, USA. Enero 2014.

Cabruja, C., Gramajo, H., Gago, G. Phosphorylation of *Mycobacterium tuberculosis* FasR by PknB. VII Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis. Canela, Brasil. Setiembre 2014.

Cabruja, M., Gramajo, H., Gago, G. Novel regulation levels in mycolic acids biosynthesis in mycobacteria. L Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Rosario, Argentina. Noviembre 2014.

Gago, G., Bazet Lyonnet, B., Cabruja, M., Diacovich, L., Gramajo, H. *M. tuberculosis* Acyl CoA Carboxylase 5 complex: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. Gordon Research Conference Tuberculosis Drug Discovery y Development: Challenges, Advances and Future Prospects in the Fight Against Tuberculosis. Girona, España. Julio 2015.

Tsai, Y; Mondino, S; Cabruja, M; Lara, J; Gramajo, H; Gago, G. Construction and analysis of a FAS-I conditional mutant in *Mycobacterium smegmatis*. LI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Mar del Plata, Argentina. Noviembre 2015.

Cabruja, M., Mondino, S., Sala, C., Cole, S., Gramajo, H., Gago, G. Análisis lipidómicos de *Mycobacterium tuberculosis* mutante en el regulador de la biosíntesis de ácidos grasos FasR. VIII Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis. Rosario, Argentina. Setiembre 2016.

Tsai, YT., Cabruja, M., Salzman, V., Gago, G., Gramajo, H. Rol fisiológico de MabR en la regulación de la biosíntesis de ácidos micólicos en *Mycobacterium smegmatis*. VIII Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis. Rosario, Argentina. Setiembre 2016.

Mondino, S., Sala, C., Cabruja, M., Lara, J., Diacovich, L., Larrieux, N., Cole, S., Buschiazzo, A., Gramajo, H. and Gago, G. Transcriptional regulation of fatty acid metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*: identification and validation of new drug targets. Gordon research Conference: Tuberculosis Drug Discovery y Development. Renaissance Tuscany Il Ciocco, Lucca, Italia. Junio 2017

Cabruja, M., Gramajo, H. and Gago, G. Characterization of the factors involved in the regulation of FAS-I system in mycobacteria. Reunión Conjunta Sociedades de Biociencias de Argentina- LIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Buenos Aires, Argentina. Noviembre 2017.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores Gabriela Gago y Hugo Gramajo no solo por darme la oportunidad de trabajar con ellos sino por la libertad que me dieron en todo momento. Siempre estuvieron dispuestos a aceptar una propuesta nueva, a escuchar pacientemente mil consultas sobre cuestiones del laboratorio y de la vida. Tuve la suerte de encontrar un grupo con un excelente nivel científico y humano. Un grupo que demuestra que se puede hacer ciencia de calidad en este país y generar a su vez un ambiente donde da gusto trabajar. De este grupo forman también parte Tato, Anita y Lautaro, siempre dispuestos a dar un consejo y compartir una juntada fuera del laboratorio.

Las otras personas que hicieron que trabajar en esta tesis sea un placer son los becarios y tesinistas con quienes compartí el laboratorio. Desde los más viejos, Laura, Simón, el Ber, Santi, Meli. Los más pequeños, Timi, el Recur y Bombi. Y lo que hoy aún están, Agos, la madre del laboratorio, el Papa, la Julia, Tuti, Barbi, Delfi, Hermanito, Estefi y las nuevas pequeñas, Vir y Mica. Es una lista larga ya de por sí, y si tuviese que mencionar la cantidad de mates, cervezas, gastadas y, sobre todo, buenos momentos, me haría falta una tesis más. Ya con una es suficiente.

A mi familia, que a pesar de devolverle muy poco siempre me dieron todo.

Finalmente, a Jose, que hace que cada día sea más lindo que el anterior. Ella es la que al final del día tiene que soportarme, no le tocó fácil...

# INDICE

<b>1. RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Micobacterias</b>	<b>3</b>
<b>2.2 <i>M. smegmatis</i> como modelo de estudio</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Tuberculosis y la necesidad de nuevas drogas</b>	<b>4</b>
<b>2.4 Morfología, estructura y composición de la envoltura celular de las micobacterias</b>	<b>7</b>
2.4.1 Membrana plasmática	10
2.4.2 Pared celular	10
2.4.3 Ácidos micólicos	11
2.4.4 Micomembrana externa	12
2.4.5 La cápsula	14
<b>2.5 Lípidos de reserva</b>	<b>14</b>
<b>2.6 Biosíntesis de FA en bacterias</b>	<b>15</b>
<b>2.7 Aspectos generales de la biosíntesis de FA y MA en las micobacterias</b>	<b>17</b>
2.7.1 Características de los sistemas FAS-I y FAS-II micobacterianos	17
2.7.2 Biosíntesis de FA y MA en micobacterias	18
<b>2.8 Regulación transcripcional de los sistemas FAS-I y FAS-II en micobacterias</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Cepas bacterianas y plásmidos</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano</b>	<b>25</b>
<b>3.3 Análisis de acil-CoAs</b>	<b>26</b>
3.3.1 Preparación de estándares	26
3.3.2 Cultivos bacterianos	27
3.3.3 Extracción	27
3.3.4 Cromatografía líquida	28
3.3.5 Espectrometría de masas	29
3.3.6 Análisis de datos	29
<b>3.4 Análisis de lípidos</b>	<b>30</b>

3.4.1 Análisis de lípidos por cromatografía líquida acoplada a MS (LC-MS)	30
3.4.1.2 Extracción	30
3.4.1.2 Cromatografía líquida	31
3.4.1.3 Espectrometría de masas	32
3.4.1.4 Análisis de datos	32
3.4.1 Análisis de lípidos por cromatografía en capa delgada (TLC)	33
<b>3.5 Análisis de proteínas</b>	<b>34</b>
3.5.1 Extracción	34
3.5.2 Cuantificación de proteínas y SDS-PAGE	35
3.5.3 Preparación de muestras para análisis proteómico	36
3.5.4 Digestión en solución, cromatografía líquida y espectrometría de masas	36
3.5.5 Análisis de datos	37
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>39</b>
<b>4.1 CAPÍTULO I Desarrollo de un método de determinación de acil-CoAs en actinomicetos</b>	<b>40</b>
4.1.1 Introducción	41
4.1.2 Objetivos	42
4.1.3 Resultados	43
4.1.3.1 Desarrollo de un método de IP-RP-HPLC/ESI-HRMS para la determinación de un amplio rango de acil-CoAs	43
4.1.3.2 Análisis de acil-CoAs en actinomicetos	46
4.1.3.3 Determinación de carboxi-acil-CoAs	50
4.1.3.4 Efecto de inhibidores de FAS y de la suplementación de FA en la composición del perfil de acil-CoAs en <i>M. smegmatis</i>	53
4.1.4 Discusión	55
<b>4.2 CAPÍTULO II Análisis lipidómicos en micobacterias</b>	<b>60</b>
4.2.1 Introducción	61
4.2.2 Objetivos	64
4.2.3 Resultados	64
4.2.3.1 Desarrollo de un método semi-cuantitativo para el análisis del perfil de lípidos totales	64
4.2.3.2 Perfil lipídico de <i>M. smegmatis</i> y <i>M. tuberculosis</i>	75
4.2.4 Discusión	79
<b>4.3 CAPÍTULO III Estudio de <i>M. smegmatis</i> mutante condicional en el sistema FAS-I</b>	<b>82</b>
4.3.1 Introducción	83
4.3.2 Objetivos	89
4.3.3 Resultados	89
4.3.3.1 Efecto de la depleción del sistema FAS-I en la composición de los acil-CoAs en <i>M. smegmatis</i> .	89
4.3.3.2 Cambios en la composición lipídica global producidos por la depleción del sistema FAS-I en <i>M. smegmatis</i> .	93
4.3.3.2 Movilización de TAG en condiciones de depleción parcial del sistema FAS-I en <i>M. smegmatis</i> .	103

4.3.3.3 Cambios en el perfil de expresión proteica en condiciones de represión de la expresión del operón fas-acpS en <i>M. smegmatis</i> .	105
4.3.4 Discusión	112
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>120</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>121</b>

## ABREVIATURAS

[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	Ion aducto de amonio
[M-H] <sup>-</sup>	Ion monodeprotonado
ADC	Albumina-dextrosa-catalasa
ADS	Albumina-dextrosa-salino
AG	Arabinogalactano
Am	Apramicina
BSA	Albumina sérica bovina
Cer	Cerulenina
CID	Disociación inducida por colisión
CL	Cardiolipina
CoA	Coenzima A
DAG	Diacilglicerol
DAT	Diacil-trehalosa
DDA	Adquisición dependiente de datos
DO <sub>600</sub>	Densidad óptica (Absorbancia a 600 nm)
ESI	Ionización por electrospray
ETH	Etionamida
FA	Ácidos grasos
FAS	Sintasa de ácidos grasos
FDR	Porcentaje de falsos positivos
GC-MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas
GMM	Glucosa monomicolato
GPL	Glicopeptidolípidos
GroMM	Glicerol monomicolato
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
HRMS	Espectrometría de masa de alta resolución
INH	Isoniacida

IP-RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta performance en fase reversa con acoplamiento de iones
LAM	Lipoarabinomanano
LB	Luria-Bertani
LC	Cromatografía líquida
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tandem
LM	Lipomanano
LOS	Lipooligosacáridos
m/z	Relación masa/carga
MAG	Monoacilglicerol
mAG	Micolil arabinogalactano
MDR-TB	Tuberculosis multirresistente
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tandem
p/v	Peso en volumen
PA	Ácido fosfatídico
PAT	Poliacil-trehalosa
PDIM	Tiocerol dimicocerosato
PE	Fosfatidiletanolamina
PeG	Peptidoglicano
PG	Fosfatidilglicerol
PGL	Glicolípidos fenólicos
PI	Fosfatidilinositol
PIM2	Fosfatidilinositol dimanósidos
PIMs	Fosfatidilinositol manósidos
PL	Fosfolípidos
PM	Membrana plasmática
QC	Muestras control

Qq-TOF	Quadrupolo-Tiempo de vuelo
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SGL	Sulfoglicolípidos
SMN	Medio mínimo suplementado
Str	Estreptomina
TAGs	Triacilglicéridos
TB	Tuberculosis
TBS	Tris búfer salino
TDM	Trehalosa dimicolato
TEA	Trietilamina
THL	Tetrahidrolipstatina
TLC	Cromatografía en capa delgada
TMM	Trehalosa monomicolato
Tris	N-tris-(hidroximetil) aminometano
UV	Ultra violeta
v/v	Volumen en volumen
XIC	Cromatograma de ion extraído

## 1. RESUMEN

La tuberculosis continúa siendo una de las enfermedades infecciosas que provoca la mayor cantidad de muerte entre los adultos. *Mycobacterium tuberculosis* es el agente etiológico de la tuberculosis y el éxito de este patógeno se debe en gran medida a su notable capacidad para sobrevivir en el huésped infectado, donde puede persistir durante varias décadas; siendo su inusual pared celular un factor clave en esta supervivencia. Los ácidos micólicos (MA) son los componentes mayoritarios de su envoltura celular y los responsables de muchas de las características de esta bacteria, como ser, su patogenicidad y su alta resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados en la clínica. La biosíntesis de los MA involucra dos sintasas de ácidos grasos (FAS) diferentes, denominadas FAS-I y FAS-II. A pesar de la relevancia de la coexistencia de los dos sistemas (FAS-I y FAS-II) en micobacterias, tanto por su rol en la síntesis de los MA y ácidos grasos (FA) de membrana y lípidos de reserva, como por ser el blanco de poderosas drogas antituberculosas, es muy poco lo que se sabe acerca de cómo se regula el funcionamiento de estas dos rutas biosintéticas.

Es por esto que se en esta tesis se desarrollaron dos métodos utilizando LC-MS para analizar por un lado el perfil de acil-CoAs, metabolitos intermediarios en la síntesis de lípidos, y por otro un estudio detallado de los lípidos totales en micobacterias. Estas herramientas permitieron al laboratorio analizar en profundidad distintas mutantes en el sistema lipídico en micobacterias. Además, utilizando a *M. smegmatis* como modelo de estudio, se construyó en el laboratorio una mutante condicional en el gen *fas* para poder reducir los niveles de esta enzima y estudiar así la interacción entre los dos sistemas FAS. Al observarse que, a pesar de la expresión del sistema FAS-I encontrarse reducida, la producción de MA en la mutante condicional no se encontraba inhibida, decidimos analizar en profundidad el metabolismo lipídico en estas condiciones utilizando las herramientas desarrolladas. De esta manera, junto con un análisis de proteómica de cuantitativa de la mutante condicional, se pudo determinar los efectos de la depleción parcial del sistema FAS-I en el metabolismo lipídico general en *M.*

*smegmatis* y de esta manera inferir como ambos sistemas FAS se encuentran co-regulados. Estos resultados ayudarán a entender la regulación involucrada en el mantenimiento de la homeostasis lipídica en micobacterias, la cual creemos que proveerá nuevas herramientas para desarrollar nuevos agentes antimicobacterianos.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Micobacterias

El género *Mycobacterium* contiene más de 120 especies reconocidas hasta el momento, muchas de ellas descritas en los últimos años, incluyendo principalmente organismos patógenos de humanos y animales (1). Dentro del taxón *Actinomycetes*, la familia *Mycobacteriaceae* forma un grupo monofilético con las familias *Corynebacteriaceae* y *Nocardiaceae*, el cual contiene a todos los organismos productores de MA, siendo el género *Mycobacterium* el más extensamente estudiado por su implicancia médica (2). Filogenéticamente, los miembros de este grupo pertenecen al dominio *Bacteria*, con alto contenido en G+C en su ADN, desde 53 % para algunas especies de *Corynebacterium* hasta 70 % para especies de *Nocardia*. Las micobacterias presentan un contenido de G+C cercano al 65 %. Desde el punto de vista de los requerimientos atmosféricos algunas micobacterias son actinomicetos aerobios y otros microaerófilos. Las micobacterias, a su vez, son bacilos rectos o ligeramente curvos de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud y se caracterizan por ser ácido-alcohol resistentes debido a su compleja pared celular rica en lípidos. 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  $\sim 24$  h), como *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium bovis* están asociadas a enfermedades en humanos o animales. Como contrapartida, la mayoría de las especies de crecimiento rápido (tiempo de duplicación de  $\sim 3$  h), tal como *Mycobacterium smegmatis*, no son patógenas. Estas últimas, comúnmente saprófitas de vida libre, pueden llegar a comportarse como patógenos oportunistas, especialmente en huéspedes inmunocomprometidos (3).

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

El estudio genético de *M. tuberculosis* se vio 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* (4–7) y *Streptomyces lividans* (8) 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 otras micobacterias como modelo de estudio llevaría a un entendimiento más acertado de la biología de este patógeno (9).

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 (10), la cual presenta diferencias en la composición de su pared como la ausencia de lipooligosacáridos y glicopeptidolípidos (GPL) polares (11). 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.

## 2.3 Tuberculosis y la necesidad de nuevas drogas

Las micobacterias son agentes de enfermedades infecciosas que han acompañado al hombre a lo largo de su historia. La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por especies del género *Mycobacterium*. El agente etiológico más representativo de esta enfermedad es *M. tuberculosis*, identificada por primera vez como una especie patógena por Robert Koch en 1882, de allí su denominación como bacilo de Koch (12). Poco tiempo después que Robert Koch descubriera a *M. tuberculosis* fueron identificadas otras micobacterias, constituyendo el grupo de las micobacterias atípicas. El hallazgo de estas últimas estuvo vinculado por años a la colonización transitoria o contaminación de muestras clínicas, pero es a partir de 1950 que se les ha asignado un rol en determinadas patologías; por ejemplo, el complejo *Mycobacterium avium*, el cual causa una enfermedad pulmonar muy diseminada en pacientes inmunocomprometidos.

Desde un punto de vista histórico evolutivo, existen evidencias de TB desde el neolítico, pero es a partir de la revolución industrial donde la enfermedad adquiere carácter endémico, debido a una mayor aglomeración de la población en las urbes, lo cual facilitó su diseminación. Desde 1945, con el descubrimiento de las drogas antituberculosas, la utilización del examen radiológico de tórax y la implementación de programas estrictos de control de diagnóstico y tratamiento, se logró una disminución de la incidencia de TB, lo que hizo pensar a principios de la década de 1980 en una posible erradicación de la enfermedad para el año 2010. Pero a partir de 1985, la TB comienza a emerger en los países desarrollados en tasas que no se veían desde hacía 20 años (13). Los factores postulados para explicar esta reemergencia de la enfermedad son varios:

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

*M. tuberculosis* forma un complejo junto con otras especies, caracterizado por la alta conservación de sus genomas (14). El complejo *M. tuberculosis* comprende varias especies: *M. tuberculosis*, el agente causal de la mayoría de los casos de TB humana; *Mycobacterium africanum*, responsable de la TB humana en el África sub-Sahariana; *Mycobacterium microti*, el agente causal de la TB en el ratón de campo; *M. bovis*, capaz de infectar una amplia variedad de especies de mamíferos incluyendo humanos; y *Mycobacterium canettii*, una variante raramente encontrada pero capaz de infectar humanos (15). Otras especies patógenas son *Mycobacterium leprae*, agente causal de lepra, una enfermedad granulomatosa crónica de la piel y nervios periféricos (16,17) y *Mycobacterium ulcerans*, que provoca la aparición de úlceras en la piel conocidas como úlceras de Buruli (18,19).

La TB es predominantemente una enfermedad pulmonar, representando el 70 % de los casos; sin embargo *M. tuberculosis* puede diseminarse a otros órganos, incluyendo los nódulos linfáticos, huesos y meninges, provocando una enfermedad extra pulmonar (TB miliar o extra pulmonar) en 10-42 % de los pacientes, dependiendo de la edad, estado inmune y grupo étnico (20,21). El contagio ocurre por vía aérea cuando un individuo enfermo de TB pulmonar expelle bacterias a través de la tos, el estornudo o la salivación. Si bien basta con que una persona inhale unos pocos bacilos para quedar infectada, en general, una baja proporción de los individuos infectados desarrollan la forma activa de la enfermedad. La mayoría de los individuos son asintomáticos y mantienen la infección en una forma latente. Los informes estadísticos estiman que entre el 5-15 % de éstos desarrollará la forma activa de la TB durante el transcurso de su vida, fenómeno denominado reactivación o TB postprimaria. Este riesgo de reactivación es mucho mayor para las personas cuyo sistema inmune está deprimido, como ocurre en casos de personas infectadas con el VIH, desnutrición, diabetes mellitus o abuso de drogas, alcohol o tabaco (22).

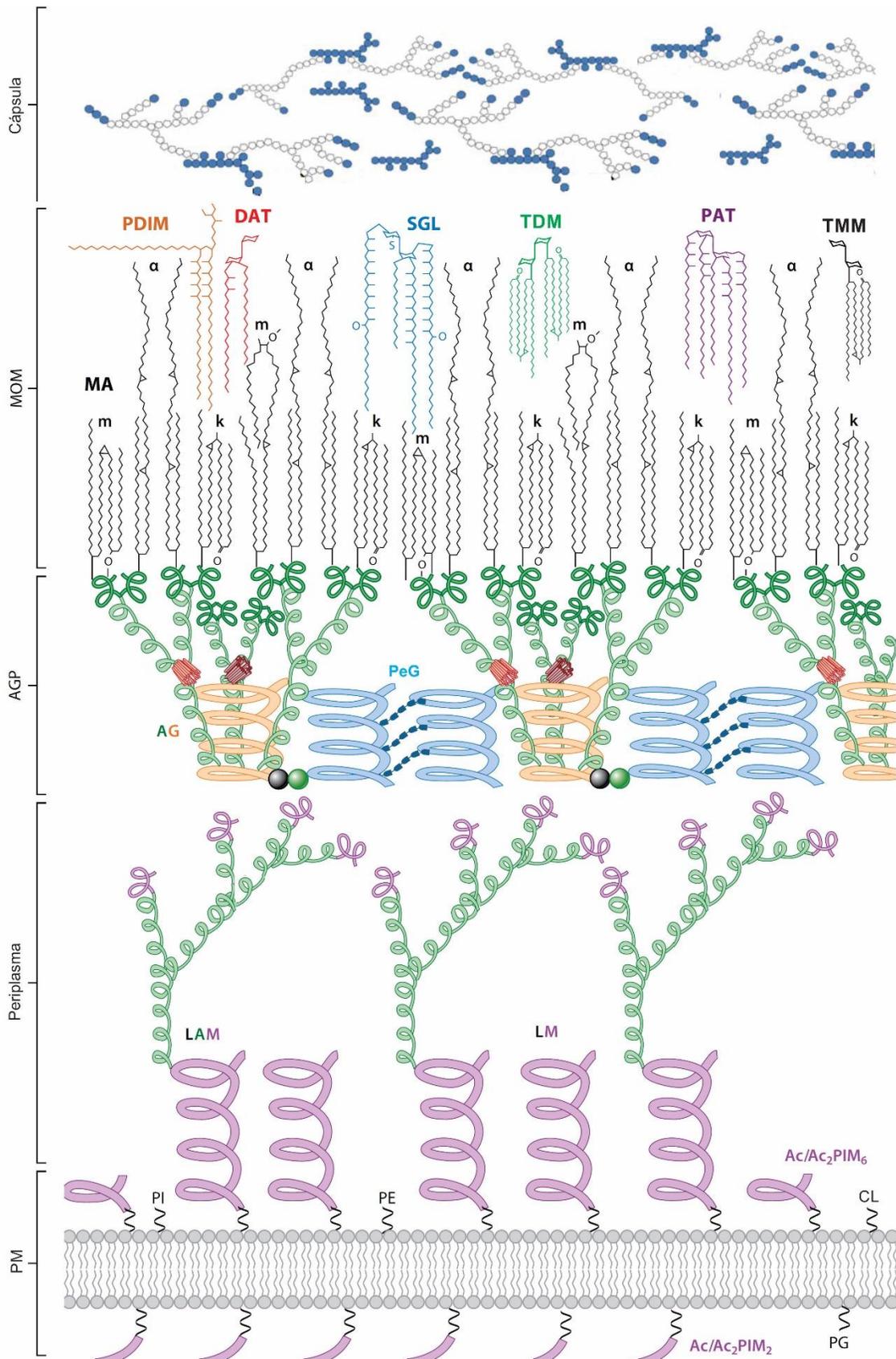
El impacto de la TB a nivel mundial sigue siendo extremadamente elevado. Para resaltar la relevancia de esta enfermedad, basta con mencionar algunos datos. Según la OMS en su reporte global sobre la TB del 2018, esta sigue siendo la 9ª causa de muerte en el mundo y la primera en aquellas causadas por un único agente infeccioso. Se estima que en el 2017 se produjeron 1,3 millones de muertes por TB y otras 10 millones de

personas contrajeron la enfermedad. En la República Argentina, en ese mismo año, se notificaron alrededor de 12000 casos y 640 muertes por TB. La pobreza, la marginalidad y el hacinamiento que experimenta gran parte de la población del país constituyen un obstáculo en la lucha contra esta enfermedad, al igual que la imposibilidad de implementar los llamados tratamientos directamente observados o DOTS, que garantizan el cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes. La TB resistente a las drogas existentes es una amenaza continua. En 2017 hubo 558 000 nuevos casos de TB resistente a rifampicina, la droga más eficiente de primera línea, de los cuales un 82% eran además resistentes a múltiples drogas (MDR-TB). La importancia de la aparición de estas resistencias se observa en la eficacia del tratamiento disponible hasta el momento, cayendo de 83 % de éxito para la TB sensible, a 54 % para MDR-TB (23). Por todo esto, es necesario el desarrollo de nuevas drogas que sean efectivas contra estas cepas y que puedan reducir los tiempos y la complejidad de las terapias actuales. Es entonces imprescindible la ampliación del escaso conocimiento actual que se tiene de aspectos claves del metabolismo de *M. tuberculosis* que puedan tener efecto tanto para la viabilidad como para la patogenicidad del mismo.

#### 2.4 Morfología, estructura y composición de la envoltura celular de las micobacterias

La morfología característica de estas bacterias suele ser bacilar y ligeramente curvada. Como todas las células procariotas, las micobacterias poseen un citoplasma, la membrana celular y un espacio periplásmico que lo separa de una gruesa y compleja pared celular. La envoltura celular del género *Mycobacterium* (Figura 1), está compuesta por la membrana plasmática (PM), el espacio periplásmico, la pared celular, la micomembrana externa y la cápsula. Los lípidos que componen la misma representan aproximadamente un 40 % del peso seco de la bacteria. La organización y estructura particular de estos lípidos les confieren impermeabilidad a algunos antibióticos, así como también propiedades de tinción únicas. Posicionándose en la interfaz entre la membrana y el huésped, la membrana externa juega un rol importante en la

patogénesis al dirigir las interacciones entre estos. Varios componentes de la envoltura de *M. tuberculosis* (glicerofosfolípidos, fosfatidilinositol manósidos, MA, entre otros) son producidos por todas las especies de micobacterias y son esenciales para su crecimiento. La biosíntesis de estos compuestos son el blanco de drogas antituberculosas como la isoniacida (INH) y la etionamida (ETH) así como de muchas otras drogas en etapa de desarrollo. Otros lípidos como las poliaciltrealosas (PAT) o tiocerol dimicocerosato (PDIM) no son esenciales para el crecimiento, pero son exclusivos de micobacterias patogénicas y están involucrados en la patogénesis. A continuación se describirán las particularidades de los distintos componentes de la envoltura celular de las micobacterias (24).



**Figura 1. Representación esquemática de la compleja envoltura celular de *M. tuberculosis*.** La membrana plasmática (PM) está compuesta por fosfatidiletanolamina (PE), cardiolipinas (CL), fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilinositol (PI). Este último forma parte de los acil-fosfatidilinositol manósidos (Ac/Ac<sub>2</sub>PIM<sub>2</sub> y Ac/Ac<sub>2</sub>PIM<sub>6</sub>) y los lipomananos (LM) y lipoarabinomananos (LAM) del espacio periplásmico. La pared celular propiamente dicha está formada por peptidoglicano (PeG) el cual a su vez posee unidas cadenas de arabinogalactano (AG). El AG es la molécula que une el PG con la monocapa de MA. La capa exterior, contigua a la monocapa de MA unidos al AG, está compuesta por múltiples lípidos complejos y juntas forman la micomembrana externa (MOM). Entre estos lípidos encontramos PDIM, sulfoglicolípidos (SGL), diacil y poliacyl trehalosas (DAT y PAT) y trehalosas monomicolato y dimicolato (TMM y TDM). Por último, la cápsula, está compuesta mayoritariamente de proteínas y polisacáridos. Figura adaptada de Jankute M. 2015 y *col* (25).

#### 2.4.1 Membrana plasmática

La PM de las micobacterias aparece en cortes ultra finos como una membrana biológica trilaminar clásica, es decir, dos capas electrodensas separadas por una capa transparente. Está compuesta de fosfolípidos (PL) derivados del ácido fosfatídico (PA), como por ejemplo fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL; o difosfatidilglicerol), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilinositol (PI) y sus manósidos (PIMs). Los PIMs son exclusivos de actinomicetes, siendo componentes principales de la PM de las micobacterias, donde actúan como lípidos basales de anclaje para lipoarabinomanano (LAM) y lipomanano (LM). Forman así una bicapa asimétrica con los PIM con 6 o más manósidos en la cara exterior, dándole a esta cara un grosor extra que se observa por microscopía electrónica. Se ha reportado que la PM posee además pequeñas cantidades de TMM (26,27).

#### 2.4.2 Pared celular

El principal componente estructural de la pared celular de las micobacterias es el complejo micolil-arabinogalactano (mAG) / peptidoglicano, una macromolécula compuesta por tres elementos unidos covalentemente: peptidoglicano (PeG), arabinogalactano (AG) y MA, y que define la forma de las micobacterias.

El PeG micobacteriano es similar al encontrado en la mayoría de las bacterias, presentando dos diferencias. Por un lado, el ácido N-acetil murámico se encuentra

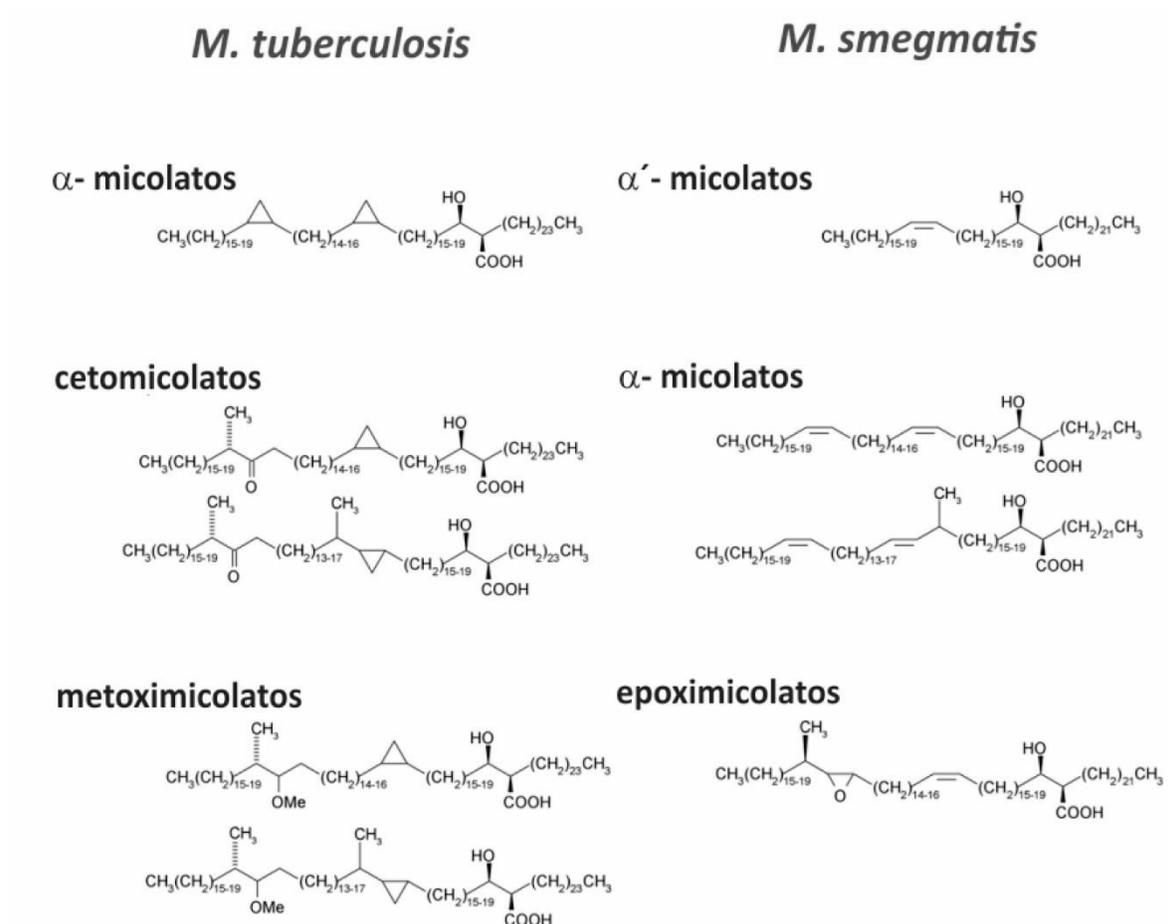
oxidado a ácido N-glicolil murámico y los entrecruzamientos en las cadenas laterales peptídicas ocurren entre dos residuos de ácido diaminopimérico, así como también entre un residuo de éste y D-alanina. Se cree que esta modificación aumenta la resistencia del PeG al proveer sitios para la formación de puentes de hidrógeno y además podría disminuir su susceptibilidad a la lisozima.

Unido al PeG, 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-galactofurano, 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 MA en grupos de cuatro (25,28,29).

### 2.4.3 Ácidos micólicos

Los MA son moléculas esenciales en las micobacterias debido a su rol clave como elementos estructurales de la micomembrana externa. Éstos son ácidos grasos (FA)  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxilados muy largos, formados por una cadena carbonada principal, conocida como ácido meromicólico, y una cadena lateral  $\alpha$ . Las micobacterias presentan los MA (C<sub>70</sub>-C<sub>90</sub>) y las cadenas laterales  $\alpha$  más largas (C<sub>22</sub>-C<sub>26</sub>) que se conocen en la naturaleza después del género *Segniliparus* (30). Cada especie tiene una composición característica y esta distinción se ha empleado para la identificación y clasificación de las distintas especies de *Mycobacterium* (31). En la Figura 2 se muestra un esquema de los MA encontrados en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.

Los MA existen en forma libre en la envoltura celular, así como sustituyentes esterificados al AG y en una variedad de glicolípidos, incluyendo trehalosa mono y dimicolato (TMM y TDM), glicerol monomicolato (GroMM) y glucosa monomicolato (GMM). Los MA cumplen un rol fundamental en la baja permeabilidad de la membrana, la formación de biofilm, y la patogenicidad de la bacteria durante la replicación activa y en los estadios de persistencia (24).

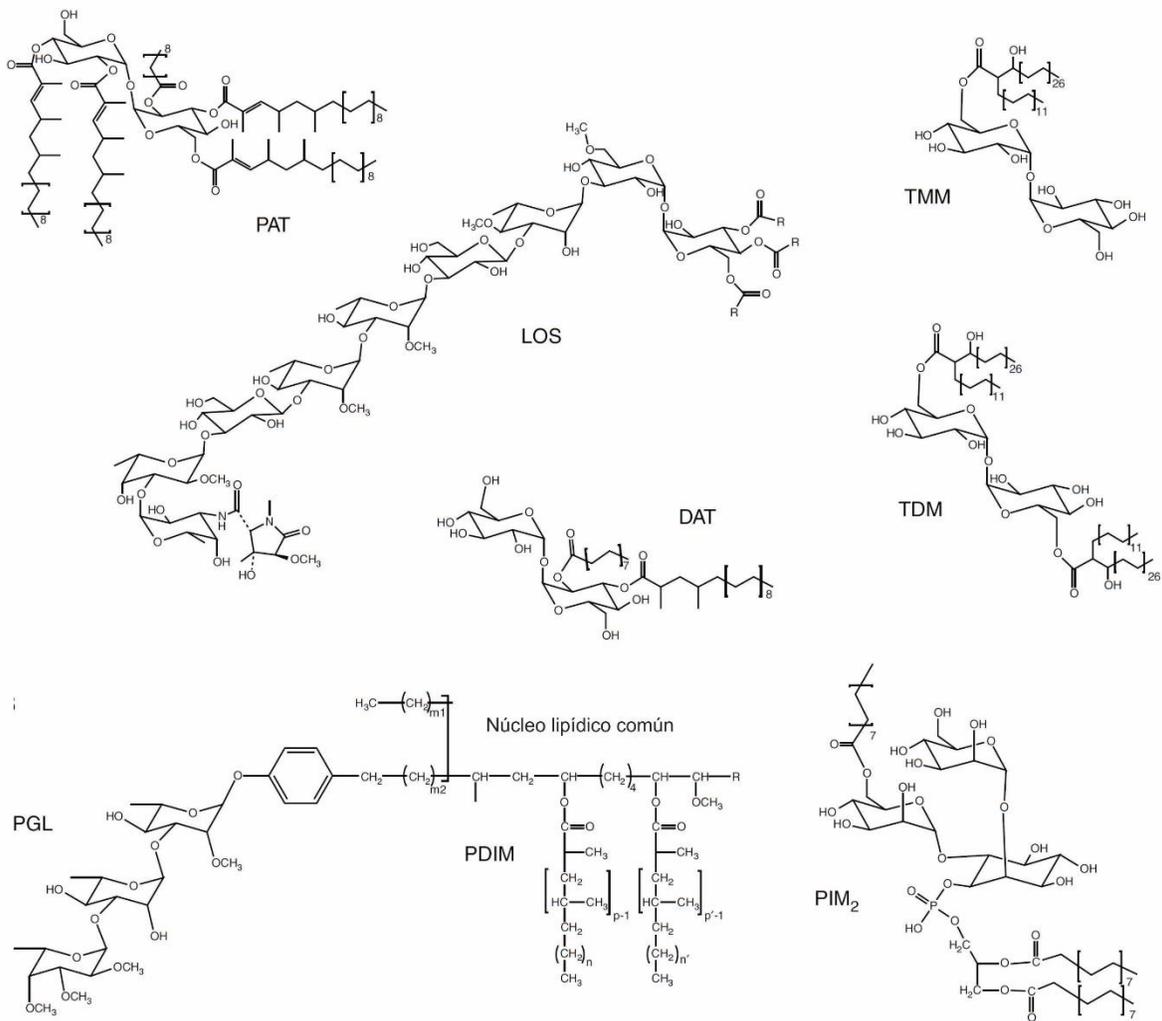


**Figura 2. Estructura de los principales MA identificados en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*.** Los MA son FA  $\alpha$ -alquil  $\beta$ -hidroxilados formados por una cadena larga carbonada (ácido meromicólico) y una cadena lateral  $\alpha$  más corta. Adaptado de Brown y col (32).

#### 2.4.4 Micomembrana externa

La micomembrana externa es una bicapa asimétrica altamente impermeable que le confiere a las micobacterias su resistencia intrínseca a muchos agentes terapéuticos. Su cara interna está formada por MA unidos al AG como se dijo previamente. Su cara externa, a diferencia de la interna, está formada por lípidos extraíbles, debido a que no están unidos covalentemente a la pared celular. Estos incluyen glicerofosfolípidos (PE,

PI, CL y PG), PIM, LM y LAM, los cuales pueden interactuar con el huésped. Además, la cara externa de la micromembrana posee lípidos complejos como los micolatos de trehalosa (TMM y TDM) y, en el caso de *M. tuberculosis*, PDIM, sulfoglicolípidos (SGL), DAT y PAT, glicolípidos fenólicos (PGL) y lipooligosacáridos (LOS). En el caso de *M. smegmatis* esta estructura presenta además GPL. A diferencia de los TMM y TDM, componentes esenciales de la envoltura de todas las micobacterias, los SGL, DAT, PAT y PDIM están más restringidos en su distribución. Estos últimos, aunque no son esenciales, están involucrados en la patogenicidad. Por último, a los DAT y PAT se los ha relacionado con la retención del material de la cápsula en la superficie de *M. tuberculosis* (24,26).



**Figura 3. Lípidos complejos extraíbles presentes en la envoltura de las micobacterias.** TMM y TDM, fosfatidilinositol dimanósido (PIM<sub>2</sub>) (*M. tuberculosis* y *M. smegmatis*). PDIM, PGL, SGL, DAT y PAT y LOS (*M. tuberculosis*).

#### 2.4.5 La cápsula

Todas las micobacterias estudiadas hasta el momento poseen estructuras tipo cápsulas tanto *in vitro* como durante la infección de un huésped. En especies patogénicas, esta consiste principalmente de polisacáridos y proteínas generalmente con mínima cantidad de lípidos, mientras que en micobacterias no patogénicas se encuentra mayoritariamente compuesta de proteínas. En *M. tuberculosis* fueron identificados el D-glucano, D-arabino-D-manano and D-manano como los polisacáridos de la cápsula. Los triacilglicéridos (TAG), si bien son considerados lípidos de reserva intracelulares, fueron también encontrados en la cápsula de micobacterias. Al estar la cápsula en la interfaz entre la bacteria y las células del huésped, se cree que sus constituyentes están involucrados en pasos cruciales de la patogenicidad. En este sentido, por ejemplo, algunos glicanos están involucrados en la adhesión y penetración del bacilo a las células del huésped (26,33–35).

#### 2.5 Lípidos de reserva

Los TAG son triésteres de glicerol con FA apolares e insolubles en agua. Estas moléculas son generalmente utilizadas como fuente de carbono y energía debido a que se oxidan menos y poseen un mayor valor calorífico que los carbohidratos y las proteínas, por lo que generan significativamente más energía durante su oxidación.

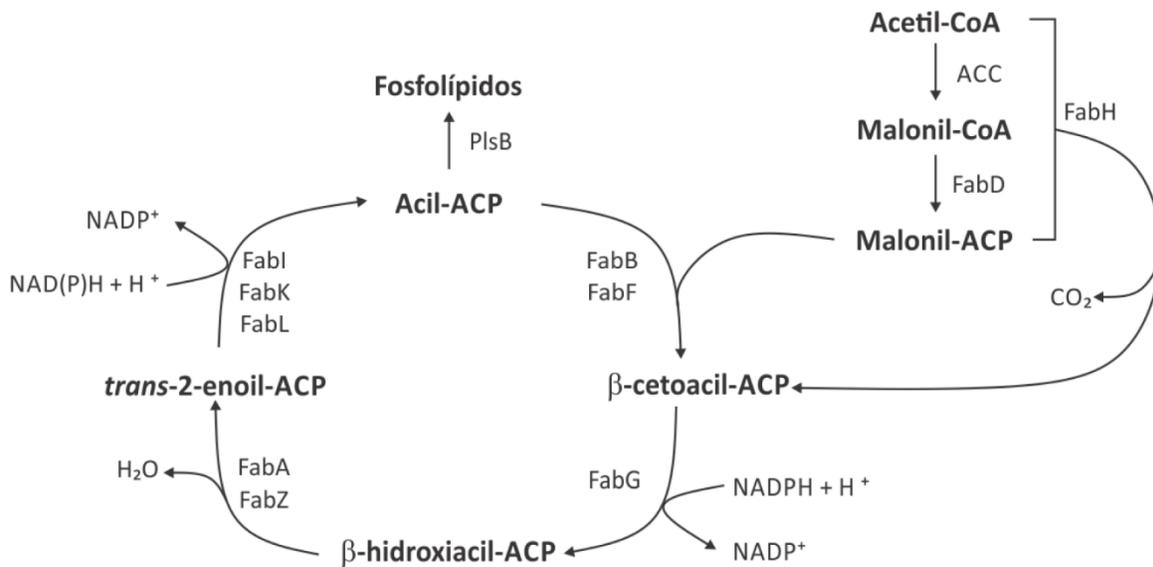
La presencia de TAG como compuestos de reserva está ampliamente distribuida entre los eucariotas, mientras que raramente se encuentran en bacterias. Sin embargo, la acumulación de TAG parece estar ampliamente distribuida entre los actinomicetes, entre los que se encuentran las micobacterias. En ellas los TAG se acumulan formando

cuerpos lipídicos intracelulares y representan el lípido apolar más abundante cuando son crecidas con glicerol como fuente principal de carbono. Se cree que estos no sólo actúan como reserva de energía para la supervivencia en el largo plazo en *M. tuberculosis* durante fase de persistencia de la infección, sino también como una forma en la que la bacteria se detoxifica de FA libres (24,36).

## 2.6 Biosíntesis de FA en bacterias

La biosíntesis de FA 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 FAS, el mecanismo de reacción de la síntesis *de novo* de FA es esencialmente el mismo en todos los sistemas biológicos. En bacterias, las enzimas involucradas y los pasos metabólicos han sido caracterizados utilizando *E. coli* como modelo de estudio.

El primer paso de esta ruta biosintética consiste en la carboxilación de acetil-CoA mediada por la acetil-CoA carboxilasa (ACC), para dar malonil-CoA. El residuo malonato es luego 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 FA de mayor longitud, son catalizados por otra  $\beta$ -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), dando como producto acil-ACPs saturados, que serán los sustratos de una nueva ronda de elongación (37) (Figura 4).



**Figura 4. Biosíntesis de FA 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 col (38).

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 las distintas actividades catalíticas de la secuencia de reacción como dominios funcionales discretos en una única cadena polipeptídica. Estas enzimas se encuentran típicamente en el citoplasma de organismos eucariotas y excepcionalmente en el subgrupo productor de MA de los actinomicetes (39). 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 FA *de novo* (40). Los únicos organismos procariotas que utilizan el sistema FAS de tipo I y no de tipo II para la síntesis de FA *de novo* son aquellos productores de MA de la rama de los *Actinomycetales*, dentro de los cuales se encuentran las micobacterias (41).

## 2.7 Aspectos generales de la biosíntesis de FA y MA en las micobacterias

### 2.7.1 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 MA. 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 MA, PL de membrana y en micobacterias patógenas, son sustratos para la síntesis de FA multimetil ramificados (constituyentes de PDIM, PAT entre otros). Si bien la organización estructural de esta proteína micobacteriana 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. Se ha sugerido además que puede funcionar como elongasa, catalizando la elongación de palmitoil-CoA (42). 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*) (43). 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 (39).

Experimentos bioquímicos han demostrado que la síntesis mediada por FAS-I tiene un comportamiento bimodal *in vitro*, produciendo dos clases de acil-CoAs: C<sub>16-18</sub>-CoAs y C<sub>24-26</sub>-CoAs. En presencia de polisacáridos micobacterianos estas enzimas aumentarían la producción de C<sub>16-18</sub>-CoA, y la velocidad de síntesis de FA en general. Esto se debería a la capacidad de los azúcares de formar un complejo selectivo con estos FA, 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 (44–46). Por otro lado, si bien se ha sugerido que el sistema FAS-I funcionaría *in vitro* como sintasa *de novo* y elongasa; en las micobacterias patógenas, las cuales posiblemente deriven la mayoría de sus FA del huésped, el mismo

actuaría principalmente como elongasa convirtiendo los FA del huésped en productos C<sub>24-26</sub>. Existe evidencia de que extractos de *M. leprae*, *M. avium* y *M. microti* no sólo poseen una mayor actividad FA elongasa que FA sintasa *de novo*, sino que esta última se ve reprimida cuando se crece en un medio que contiene lípidos (39,42).

Las micobacterias contienen también un sistema disociado FAS-II, dependiente de ACP. Éste se diferencia únicamente de las sintasas de tipo II encontradas en otras bacterias, en su incapacidad de realizar la síntesis *de novo* de FA. 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 MA.

### 2.7.2 Biosíntesis de FA y MA en micobacterias

La biosíntesis de FA y MA ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, tanto por la relevancia de los lípidos en la patogénesis de *M. tuberculosis* (Figura 5) como debido a que las enzimas de esta vía son blanco de las más efectivas drogas contra la TB. 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 PL de membrana. Por otro lado, FAS-I es capaz de continuar con la elongación del C<sub>16</sub>- y C<sub>18</sub>-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 (C<sub>24</sub> en el caso de *M. smegmatis*), y posteriormente activado para convertirse en la cadena  $\alpha$ -alquilo del MA (47).



la tercera cuenta con tres genes, *hadA*, *hadB*, *hadC* (41). En la Tabla 1 se encuentran listados los genes y enzimas de los sistemas FAS en micobacterias.

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

<b>Operón putativo</b>	<b>Proteína</b>	<b>Actividad enzimática</b>
<b><u>Operón <i>fas-acpS</i></u></b>	Fas	Sintasa de ácidos grasos
<i>fas-acpS</i>	AcpS	Fosfopantoteiniltransferasa
	FabD	Malonil-CoA:ACP transacetilasa
<b><u>Operón <i>fasII</i></u></b>	AcpM	Proteína transportadora de acilos
<i>fabD-acpM-kasA-kasB</i>	KasA	$\beta$ -cetoacil-ACP sintasa A
	KasB	$\beta$ -cetoacil-ACP sintasa B
<b><i>mabA-inhA</i></b>	MabA	$\beta$ -cetoacil-ACP reductasa
	InhA	Enoil-ACP reductasa
<b><i>hadA-hadB-hadC</i></b>	HadA/B	Hidroxiacil-ACP deshidratasa
	HadB/C	Hidroxiacil-ACP deshidratasa

El primer gen del operón *fasII* codifica para la malonil-CoA:ACP transacetilasa FabD 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 meromicólico. Esta proteína es convertida a su forma activa holo-AcpM por la 4'-fosfopanteteinil transferasa (PptT), la cual cataliza la transferencia de un grupo 4-fosfopanteteína de la coenzima A (CoA) a la apo-AcpM (43).

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. Las dos enzimas tienen distinta especificidad de sustrato, KasA estaría implicada en la elongación inicial de los meromicolatos, mientras que KasB los extendería luego hasta su longitud final (49). Así, *kasA* es esencial en micobacterias

y las cepas mutantes en *kasB* presentan cambios en la longitud y composición de MA (50,51).

Las reductasas del sistema FAS-II están codificadas por los genes *mabA* e *inhA*. Ambas, a diferencia de otras reductasas, presentan preferencias por sustratos de cadena larga, consistente con sus roles en la biosíntesis de MA. El gen *inhA*, que codifica para la enoil-ACP reductasa, fue identificado como blanco de acción de INH y ETH en *M. tuberculosis* (52).

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 (53).

La última etapa en la vía de síntesis de los MA 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) (54). 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 (55). Finalmente, ambos sustratos activados son condensados por la enzima Pks13 dando lugar al precursor del MA, el  $\beta$ -cetomicolato. Este es liberado de la enzima unido a una molécula de trehalosa, para finalmente ser reducido por CmrA y producir el MA final unido a trehalosa (TMM) (47). 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 (56,57). La TMM es la molécula transportadora de MA, la cual cumple la función de transportar los MA a través de la PM y ser dador de los mismos al complejo Ag85 para unirlos al AG o formar TDM (47).

## 2.8 Regulación transcripcional de los sistemas FAS-I y FAS-II en micobacterias

La biosíntesis de FA es esencial para el crecimiento bacteriano, siendo un componente fundamental de la red metabólica celular ya que proporciona los precursores esenciales (acil-CoAs) para la formación de la membrana y la pared celular. Dado que la biosíntesis de FA es energéticamente costosa, los organismos han desarrollado mecanismos homeostáticos para mantener la concentración de lípidos finamente regulada (58). Aunque se ha avanzado mucho en los últimos años, la mayor parte de los modelos de regulación de la síntesis de FA han sido propuestos para los organismos modelos *E. coli* y *B. subtilis* (59,60). Estos mecanismos de regulación involucran tanto un control bioquímico de las enzimas claves (respuesta rápida) así como también la regulación de la transcripción de los genes involucrados.

A pesar de la extensa literatura disponible acerca de la biosíntesis, estructura y función biológica de los principales componentes de la pared celular de las micobacterias, se sabe muy poco sobre los mecanismos que permiten a estos microorganismos modular y adaptar la composición de su pared celular en respuesta a los cambios ambientales. Por lo tanto, el estudio de los procesos que regulan la biosíntesis y composición de su pared celular es un paso crucial hacia la comprensión de la fisiología y la fisiopatología en el caso de las especies patógenas, así como también de las interacciones entre las micobacterias y su entorno en general.

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

Una búsqueda bioinformática sobre el genoma de numerosas especies del género *Mycobacterium* nos llevó a identificar un regulador putativo, codificado por el gen *Rv2242* en *M. tuberculosis*, ubicado corriente arriba del operón *fasII*. En una publicación

de nuestro laboratorio se ha reportado la identificación y caracterización bioquímica y funcional de este nuevo regulador transcripcional de *M. tuberculosis*, denominado MabR (Mycolic acid biosynthesis Regulator) (61). La función biológica de este regulador fue estudiada en *M. smegmatis* y se encontró que actúa como activador del operón *fasII* modulando de esta manera la biosíntesis de MA (62). Además, alterando los niveles de expresión de MabR observamos que no sólo se ve afectada la producción de MA, sino que también se altera la expresión del gen *fas* (que codifica para el sistema FAS-I) y por lo tanto la biosíntesis de FA. Estos resultados proporcionaron la primera evidencia de la existencia de una regulación coordinada entre los dos sistemas FAS presentes en micobacterias.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha caracterizado un factor transcripcional de *M. tuberculosis* denominado FasR (Fatty acid synthase Regulator). Este regulador es capaz de reconocer específicamente la región promotora del operón *fas-*acpS**. Se determinó que esta proteína dimérica es un activador transcripcional esencial de la síntesis de FA en *M. smegmatis* y que regula la expresión de los genes del operón *fas-*acpS** (63).

Además, a partir de una mutante por delección de *fasR* en *M. tuberculosis*, hemos demostrado que la ausencia de FasR genera una cepa notablemente afectada en su virulencia (estudios aún no publicados). Experimentos *in vitro* sugieren además que las actividades regulatorias tanto de MabR como de FasR estarían moduladas por acil-CoAs de cadena larga, productos del sistema FAS-I y que a su vez son sustratos del sistema FAS-II. La unión de MabR a la región promotora del operón *fasII* se ve favorecida por la presencia de acil-CoAs de cadena larga (C<sub>18</sub>-C<sub>24</sub>) mientras que estas mismas moléculas inhiben la unión de FasR a la región operadora del operón *fas-*acpS** (62,63).

Los resultados obtenidos con estos reguladores, llevaron a plantearnos la hipótesis de que los sistemas FAS-I y FAS-II deben estar estrictamente co-regulados a nivel transcripcional con el fin de mantener la homeostasis en la síntesis de lípidos en micobacterias, y que la interrupción o perturbación de esta coordinación resultaría en un organismo severamente comprometido en su viabilidad y/o virulencia. Por lo tanto, el estudio de la regulación de esta homeostasis lipídica podría aportar nuevos

conocimientos hacia la búsqueda de nuevos blancos para el desarrollo de agentes antimicrobianos con mecanismos de acción novedosos.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Se utilizó la cepa *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, cepa mutante de *M. smegmatis* mc26 y *M. tuberculosis* H37Rv, cepa salvaje, virulenta de *M. tuberculosis*. Además, para el desarrollo del método de análisis de los ésteres de CoA, se utilizó *M. bovis* BCG, *Corynebacterium glutamicum* y *Streptomyces coelicolor* M145. Todas las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se listan en las Tabla 2 y Tabla 3 respectivamente.

**Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo de tesis.**

Cepa	Descripción	Referencia
<i>M. smegmatis</i> mc2155	Cepa de <i>Mycobacterium smegmatis</i> de alta eficiencia de transformación, mutante <i>ept</i> de <i>M. smegmatis</i> mc26. ATCC 700084	(10)
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Cepa salvaje, virulenta de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . ATCC 27294	(64)
WT-pFRA42B	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 conteniendo pFRA42B, (Str <sup>r</sup> )	(65)
<i>fas</i> cKD	<i>M. smegmatis</i> mutante condicional en el gen <i>fas</i> conteniendo el plásmido pFR18 integrado en el locus <i>fas</i> y pFRA42B (Am <sup>r</sup> , Str <sup>r</sup> )	(65)
<i>M. bovis</i> BCG TMC 1019	Cepa de <i>Mycobacterium bovis</i> atenuada (Bacilo Calmette-Guérin). ATCC 35737	(66)

<i>C. glutamicum</i>	Cepa de <i>Corynebacterium glutamicum</i> de alta eficiencia de transformación. ATCC 13032	(67)
<i>Streptomyces coelicolor</i> M145	Cepa de <i>Streptomyces coelicolor</i> mutante <i>SCP1, SCP2</i> . ATCC BAA-471	(68)

Am<sup>r</sup> resistencia a apramicina.

Str<sup>r</sup>, resistencia a estreptomicina.

**Tabla 3. Plásmidos utilizados en el presente trabajo de tesis.**

Plásmido	Descripción	Referencia
pFRA42B	Derivado del pFRA40; <i>Psmyc-tetR</i> (→); <i>PfurA102</i> <i>tetO<sub>pip</sub></i> (→); <i>Pp<sub>tr</sub>-lacZ</i> ; <i>int</i> ; Str <sup>r</sup>	(69)

Str<sup>r</sup>, resistencia a estreptomicina.

### 3.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento bacteriano

Para el crecimiento de *M. smegmatis* en cultivo líquido se utilizó medio Middlebrook 7H9 suplementado con 0.2 % glicerol y 0.03 % Tyloxapol (Sigma). *M. tuberculosis* H37Rv se creció en medio Middlebrook 7H9 suplementado con 0.2 % glicerol y 10 % Middlebrook ADC (albúmina-dextrosa-catalasa). *M. bovis* BCG se creció en medio Middlebrook 7H9 suplementado con 0.2 % glicerol, 0.03 % Tyloxapol y 10 % ADS (albúmina-dextrosa-salina). En el caso de *Corynebacterium glutamicum* y *Streptomyces coelicolor* M145 se utilizó Luria Bertani (LB)(70) suplementado con 2 % de glucosa y medio SMN (Medio mínimo suplementado) respectivamente. Para el crecimiento en medio sólido se utilizó LB suplementado con 2 % de agar. Las cepas bacterianas se inocularon desde medio sólido en un volumen de medio de cultivo líquido que en ningún caso superó la quinta parte del recipiente. Se incubaron a 37 °C con agitación

constante (180 rpm). Cuando este inóculo inicial llegó a saturación (3-7 días para *M. smegmatis*, 15 días para *M. tuberculosis*) los cultivos fueron diluidos 1:100 en medio fresco o fueron recolectados por centrifugación. Cuando fue necesario, el medio fue suplementado con 20 µg/mL estreptomicina (Str) (12.5 µg/mL en medio sólido), 50 µg/mL apramicina (Am).

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 de 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.

ADS: 20 g glucosa, 8.1 g NaCl, 50 g albúmina sérica bovina y 950 mL de H<sub>2</sub>O.

LB: 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.

SMN: 10 g glucosa, 2 g casaminoácidos, 5 g PEG 6,000, 0.1 g antiespumante, 0.06 g bifosfato de sodio, 0.06 g fosfato dipotásico, 0.6 g sulfato de magnesio hepta-hidratado, 1 mL elementos traza, 5.7 g bufer TES (pH 7.2) y H<sub>2</sub>O csp. 1 L.

La solución de elementos traza contiene: 0,1 g/L de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O y NaCl.

### 3.3 Análisis de acil-CoAs

#### 3.3.1 Preparación de estándares

Las soluciones stock de los acil-CoAs fueron preparadas a una concentración final de 5 mM en ácido acético 10 mM y conservadas a -80 °C. Los estándares internos

utilizados fueron preparados diluyendo las soluciones stock con ácido acético 10 mM. Las mezclas de estándares para calibración conteniendo 5 acil-CoAs de diferente largo de cadena fueron preparadas mezclando iguales cantidades de cada compuesto (C<sub>2</sub>-CoA, C<sub>16</sub>-CoA, C<sub>17</sub>-CoA, C<sub>20</sub>-CoA y C<sub>26</sub>-CoA). La concentración exacta de cada acil-CoA estándar fue determinada por absorción UV a 230/260 nm (71).

### 3.3.2 Cultivos bacterianos

Para los ensayos de determinación de los perfiles normales de acil-CoAs, los cultivos líquidos de *M. smegmatis* y *M. bovis* BCG se crecieron a 37 °C y 180 rpm hasta una densidad óptica medida a 600 nm (DO<sub>600</sub>) ~1. A su vez, los cultivos líquidos de *C. glutamicum* y *S. coelicolor* se crecieron a 30 °C y 180 rpm, hasta DO<sub>600</sub> ~6 y por 26 hs respectivamente. Cultivos de *M. smegmatis* fueron tratados con cerulenina (Cer) e INH en fase exponencial media (DO<sub>600</sub> ~1) a concentraciones finales de 7.5 µg/mL y 100 µg/mL respectivamente. Las células fueron colectadas luego de 1 hora de tratamiento. Para los ensayos de suplementación, se agregó FA C<sub>17</sub> 0.01 % en fase exponencial media (DO<sub>600</sub> ~1) y las células fueron colectadas luego de 1.5 hs de incubación.

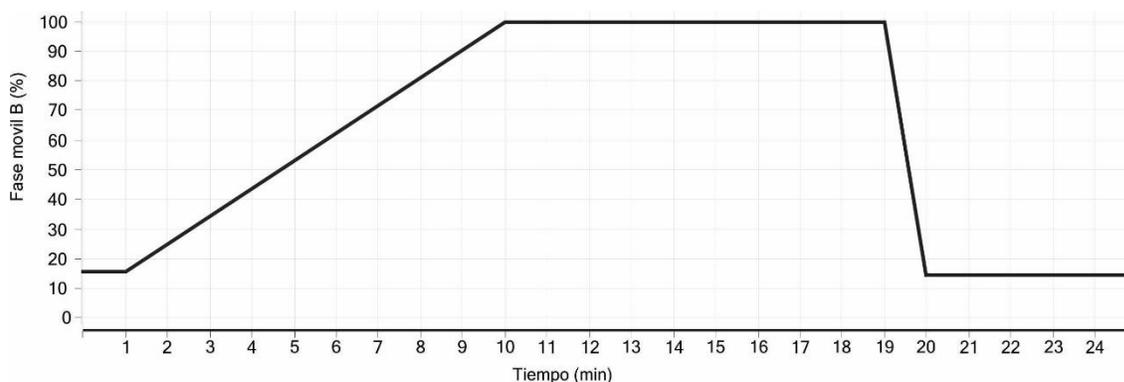
### 3.3.3 Extracción

La fracción conteniendo los acil-CoAs fue obtenida a través de una modificación del protocolo descrito por Sun y col. (72). Todas las soluciones se utilizaron a 4 °C salvo la solución de sulfato de amonio que se mantuvo a temperatura ambiente. Se colectaron células correspondientes a una biomasa de 50 mL de DO<sub>600</sub>~1 por centrifugación 15 min a 5,800 x g a temperatura ambiente. Estas fueron resuspendidas en 500 µL de búfer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (100 mM, pH 4.9) preparado fresco y a partir de este momento las muestras se mantuvieron siempre en hielo. Se agregó a cada muestra 500 µL de 2-propanol, 1 µL de trietilamina (TEA) y 0.625 nmol de <sup>13</sup>C<sub>2:0</sub>-CoA y <sup>13</sup>C<sub>16:0</sub>-CoA, estos últimos como estándares internos. Las células fueron lisadas usando un sonicador (Bioruptor™ UCD-200 Diagenode Inc. Sparta, NJ 07871 – USA) por 10 min (30 s ON/30 s ON, potencia Alta,

4 °C) y luego se agregó 1 mL de acetonitrilo y 60 µL de una solución saturada de sulfato de amonio. Las muestras fueron inmediatamente vortexeadas durante 2 min. Finalmente, se centrifugaron a 25,500 x g por 20 min a 4 °C y el sobrenadante se colectó y secó en frío por corriente de N<sub>2</sub>. El extracto seco fue resuspendido en 200 µL de 2-propanol/ ácido acético 1 mM (4:1) y centrifugado 25,500 x g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un vial de vidrio y guardado a -80 °C hasta ser analizado.

### 3.3.4 Cromatografía líquida

La separación de los distintos largos de cadena de acil-CoA fue realizado por cromatografía líquida de alta performance en fase reversa con acoplamiento de iones (IP-RP-HPLC) en un equipo Agilent 1200 SL (Agilent Corporation, Santa Clara, CA, United States) y utilizando una columna Hypersil GOLD C<sub>18</sub> (2.1 mm x 150mm x 3 µm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) a 30 °C. La velocidad de flujo fue de 0.2 mL/min en modo gradiente binario con el siguiente programa de elusión (Figura 6): la columna fue equilibrada con fase móvil A [H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (95:5, v/v), conteniendo 0.05 % (v/v) TEA] 85 % y fase móvil B [H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN (10:90, v/v), conteniendo 0.05 % (v/v) TEA] 15 %. Se inyectó 10 µL de muestra y mantuvieron las condiciones de elusión por 1 min, seguido de un gradiente de 9 min hasta alcanzar 100 % de fase móvil B. Luego la columna fue lavada por 9 min con 100 % de fase móvil B, seguido de un gradiente de 1 min hasta 85 % de A y 15 % de B. Estas condiciones se mantienen por 5 min previo a la inyección de la siguiente muestra.



**Figura 6. Programa de elución utilizado en el análisis de acil-CoAs.** Porcentaje fase móvil B vs tiempo.

### 3.3.5 Espectrometría de masas

El análisis por espectrometría de masas (MS) se realizó utilizando un equipo Qq-TOF (Cuadrupolo-Tiempo de vuelo) Bruker micrOTOF-QII (Bruker Corporation, Billerica, MA, United States) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) (Bruker Corporation, Billerica, MA, United States). Los parámetros del ESI fueron optimizados para la detección de acil-CoAs de la siguiente manera: Presión de nebulización 1 bar, flujo de gas de desolvatación (N<sub>2</sub>) 4 L/min, temperatura del gas 200 °C, voltaje del capilar 2,800 V, compensación de la placa final -500 V. El escaneo de masas se fijó entre relación masa carga (m/z) 50 m/z a 3,000 m/z. Los parámetros del espectrómetro de masas se establecieron de manera que todos los iones de los acil-CoAs fueran detectados en su forma monodeprotonada ([M-H]<sup>-</sup>) en modo negativo. Las energías de colisión para experimentos de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) fueron establecidas en 26 eV y 40 eV para acil-CoAs de cadena corta y larga respectivamente.

### 3.3.6 Análisis de datos

El análisis de los datos se llevó a cabo de la siguiente manera: los picos de los cromatogramas de iones extraídos correspondientes a los estándares internos y los

acil-CoA endógenos fueron integrados usando el programa Bruker Daltonics's Compass™ DataAnalysis (Bruker Corporation, Billerica, MA, United States) y las áreas de los mismos copiados en hojas de cálculo. Para estimar la cantidad del analito endógeno, un estándar apropiado fue elegido de acuerdo a la similitud en el largo de las cadenas aciladas ( $^{13}\text{C}_{2:0}\text{-CoA}$  o  $^{13}\text{C}_{16:0}\text{-CoA}$ ). Se realizaron curvas de calibración por diluciones seriadas para distintos estándares de acil-CoA para determinar la correlación entre las áreas cromatográficas y las cantidades del analito. El error máximo permitido en las m/z se fijó en  $\pm 0.02$  m/z. Todas las muestras se analizaron por triplicado y se reportó el promedio y la desviación estándar de los mismos.

### 3.4 Análisis de lípidos

#### 3.4.1 Análisis de lípidos por cromatografía líquida acoplada a MS (LC-MS)

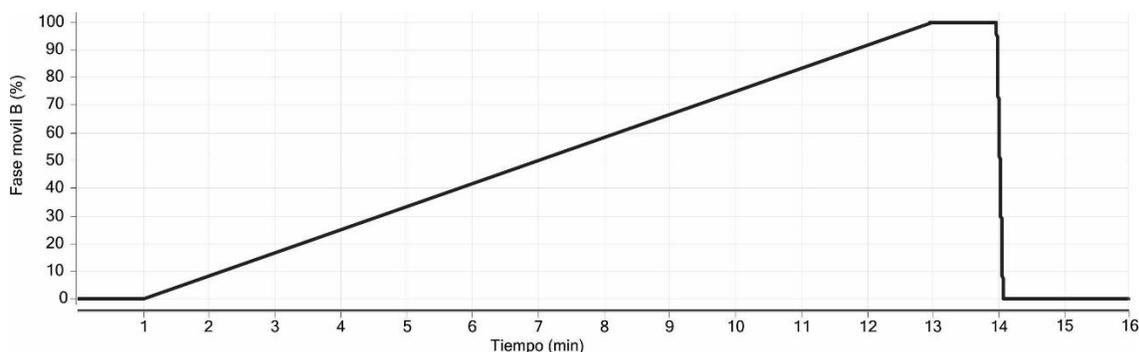
##### 3.4.1.2 Extracción

La extracción de lípidos totales para su análisis por LC-MS se realizó de la siguiente manera: se partió de 50 mL a  $\text{DO}_{600} \sim 1$  de cultivos celulares a analizar. Estos fueron centrifugados 15 min a  $5,800 \times g$  a temperatura ambiente, los pellets lavados con acetato de amonio 50 mM pH 7.8 y transferidos a tubos de vidrio de 10 mL conteniendo 5 mL de  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (2:1 v/v). Las muestras fueron incubadas 16 horas con agitación a  $4^\circ\text{C}$ . Luego de centrifugar 15 min a  $2,000 \times g$  el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y el pellet sometido a una nueva extracción con 5 mL de  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (1:2 v/v) durante 2 horas a  $4^\circ\text{C}$  con agitación. La segunda extracción fue centrifugada, el sobrenadante juntado con el de la primera extracción y secados por venteo con  $\text{N}_2$  a  $4^\circ\text{C}$ . Los lípidos fueron resuspendidos en 3 mL de  $\text{CHCl}_3$  y lavados con 3 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . El lavado se realizó vortereando las muestras 10 s para mezclar ambas fases y centrifugando 5 min a  $2,000 \times g$  para volver a separar las mismas, la fase orgánica se pasó a un tubo nuevo pesado previamente en balanza analítica. El tubo conteniendo ahora los lípidos se secó por venteo con  $\text{N}_2$  a  $4^\circ\text{C}$  hasta pesada constante y se determinó así la cantidad de lípidos extraídos en cada muestra (en mg). Finalmente, se

resuspendieron en  $\text{CHCl}_3$  a una concentración final de 1 mg/mL y se centrifugaron 5 min a 3,000 x g para descartar cualquier contaminante sólido. Del sobrenadante se separó un mg, se secó, resuspendió en 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{CHCl}_3$  y se transfirieron a un vial de vidrio, el cual se mantuvo a 4 °C hasta ser analizado.

### 3.4.1.2 Cromatografía líquida

Los extractos lipídicos fueron separados utilizando un equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) Agilent serie 1200 (Agilent Corporation, Santa Clara, CA, United States) y utilizando una columna Reprospher (Dr Maish) 100 C<sub>8</sub>-DE (50mm, 2 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) a 45 °C. La velocidad de flujo fue de 0.3 mL/min en modo gradiente binario con el programa de elusión que se muestra en la Figura 7, la columna fue equilibrada con 100 % fase móvil A [ $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (99:1, v/v), conteniendo 5 mM  $\text{AcNH}_4$ ]. Se inyectaron 2  $\mu\text{L}$  de muestra conteniendo 13  $\mu\text{g}$  de lípidos totales en  $\text{CHCl}_3$  y se mantuvieron las condiciones de elusión por 1 min, seguido de un gradiente de 12 min hasta alcanzar 100 % de fase móvil B [isopropanol:hexano: $\text{H}_2\text{O}$  (79:20:1, v/v), conteniendo 5 mM  $\text{AcNH}_4$ ]. Se mantuvo 100 % de B durante 1 min y luego se realizó un gradiente de 1 min hasta 100 % de A y se equilibró la columna durante 2 min previo a la inyección de la siguiente muestra.



**Figura 7. Programa de elusión utilizado en el análisis de lípidos totales.** Porcentaje fase móvil B vs tiempo.

### 3.4.1.3 Espectrometría de masas

El análisis por MS se realizó utilizando un equipo Qq-TOF Agilent serie 6550A (Agilent Corporation, Santa Clara, CA, United States) con una fuente ESI Dual AJS (Agilent Corporation, Santa Clara, CA, United States). Los parámetros del ESI fueron optimizados para la detección de lípidos totales de la siguiente manera: Presión de nebulización 2.4 bar, flujo de gas de desolvatación ( $N_2$ ) 14 L/min, temperatura del gas 200 °C, voltaje del capilar 3,500 V, compensación de la placa final -500 V. Se analizaron las muestras en modo MS/MS automático (DDA, adquisición dependiente de los datos) en modo positivo y negativo, realizando ciclo de un espectro completo seguido de 15 espectros de MS/MS seleccionando los iones más abundantes detectados en el primer espectro. Los espectros completos se realizaron entre 115 y 3,000 m/z a 4 espectros/s. Los espectros de MS/MS se realizaron a una velocidad de 20 espectros/s utilizando disociación inducida por colisión (CID) con una energía fija de 50 eV. Se programó una exclusión en la selección de iones precursores para fragmentar de 0.15 min luego de 3 espectros de MS/MS. La calibración se realizó por infusión continua del calibrante permitiendo un error de masas menor a 5 ppm durante toda la corrida. Los parámetros del espectrómetro de masas se establecieron de manera que pudieran detectarse tanto los lípidos de bajo y alto peso, siendo los iones detectados en modo negativo  $[M-H]^-$  y en modo positivo como aductos de amonio  $[[M+NH_4]^+]$ . Para los análisis comparativos la columna fue equilibrada con 4 inyecciones sólo con solvente antes de inyectar las de muestras junto con los QCs (muestras control, 1 cada 8 inyecciones) para controlar las condiciones del experimento. Para cada condición se realizó un triplicado biológico y se aleatorizó el orden de inyección. Los QCs se prepararon mezclando alícuotas de todas las muestras analizadas.

### 3.4.1.4 Análisis de datos

El análisis de los datos se llevó a cabo de la siguiente manera: en primer lugar se realizó la identificación de los iones detectados en ambos modos utilizando la base de

datos *MycoMass* (73), etiquetando como posibles candidatos aquellos picos cuyo m/z medido coincidían con un error máximo de 10 ppm con los m/z teóricos reportados para una determinada molécula. Para validar la identificación del compuesto, además de tener la masa exacta correcta, los iones candidatos debían tener coherencia cromatográfica en sus tiempos de elusión y presentar fragmentos característicos de la familia de compuestos correspondiente en el análisis por MS/MS (ver “Desarrollo de un método semi-cuantitativo para el análisis del perfil de lípidos totales” en la sección Resultados). Luego, con esta información, se armó una base de datos propia con las m/z y RT de cada compuesto y se utilizó el programa MZmine 2.0 (74) para extraer las áreas de los cromatogramas de ion extraído (XIC) de cada uno de los compuestos en cada una de las muestras y poder trabajarlas en una hoja de cálculo. La cuantificación relativa de cada compuesto o familia en cada muestra se realizó dividiendo el área de la misma sobre la suma de las áreas de todos los compuestos identificados en su mismo modo de ionización. Todas las muestras se analizaron por triplicado y se reportó el promedio y la desviación estándar de los mismos.

Para cargar los datos de LC-MS en el programa libre MZmine2.0 se debe primero transformar el formato de los datos crudos (.d, Agilent) en un formato de datos abierto como el mzXML (75). Para la transformación de los formatos de los archivos se utilizó el programa ProteoWizard (76,77). Todos los programas utilizados son libres y de código abierto.

El análisis estadístico se realizó mediante pruebas de Student (*t-test*) con una probabilidad asociada menor a 0.05 ( $p > 0.05$ ), utilizando el software Graph Pad Prism 7 y las abundancias relativas como valores de entrada.

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

La biosíntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos se analizó por incorporación de  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetato. Se marcaron 5 ml de cada cultivo durante 1 h con  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetato (50.5 mCi/mmol; Perkin Elmer) a una concentración de  $1\ \mu\text{Ci/mL}$ . Los metil ésteres de ácidos

grasos (FAMES) y ácidos micólicos (MAMES) se extrajeron siguiendo el protocolo reportado previamente (78). 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 x g, 10 min), y la fase orgánica inferior se lavó con 2 mL de H<sub>2</sub>O 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. La extracción se sometió a TLC utilizando una placa de silica gel (5735 silica gel 60 F254; Merck) normalizando la siembra por DO<sub>600</sub>. 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 toda la noche y se escanearon y digitalizaron con un escáner Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).

Para analizar la acumulación de TAG se realizó una extracción con CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub> (2:1 v/v) partiendo del mismo número de células. Luego de la extracción los lípidos fueron secados y analizados por TLC utilizando una placa de silica gel (5735 silica gel 60 F254; Merck). Las placas se corrieron en una mezcla de hexano/dietileter/ácido acético (75:25:1, v/v). El revelado de la placa se realizó rociándola con solución de cobre fosfórico e incubando a 100°C.

## 3.5 Análisis de proteínas

### 3.5.1 Extracción

Para la purificación de proteínas de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* se utilizó un protocolo adaptado del utilizado por Chopra y col (79): se colectó una cantidad de células equivalentes a 3.5 mL de un cultivo de DO<sub>600</sub> ~1 en la condición a estudiar. Las mismas se centrifugaron 10' a 5,800 x g, se descartó el sobrenadante y se lavaron una vez con TBS (Tris búfer salino; Tris-HCl 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) + Tyloxapol 0.02

% y una vez con TBS. Las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de Tris-HCl 50 mM pH 8, 10 % de glicerol y se rompieron usando un sonicador (Bioruptor™ UCD-200 Diagenode Inc. Sparta, NJ 07871 – USA) por 10 min (30 s ON/30 s ON, potencia Alta, 4 °C). A estas células rotas se le agregó urea a una concentración final de 2 M a partir de una solución 10 M para favorecer la extracción de proteínas de membrana. Finalmente, se separaron los restos celulares del extracto crudo conteniendo las proteínas por medio de una centrifugación de 25,500 g por 30 min a 4 °C.

### 3.5.2 Cuantificación de proteínas y SDS-PAGE

La concentración de proteínas en los extractos crudos fue determinada mediante el ensayo del ácido bicinónico (80) 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 albúmina sérica bovina (BSA) comercial (Promega). Los extractos proteicos se analizaron para determinar su integridad mediante SDS-PAGE, utilizando la celda Mini-gel PROTEAN IV (BioRad) y el sistema discontinuo de Laemmli (81). 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: lisozima (14.4 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), 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).

### 3.5.3 Preparación de muestras para análisis proteómico

En primer lugar, las muestras fueron reducidas mediante el agregado de DTT (Ditiotreitol, Sigma) a una concentración final de 10 mM e incubación 45 min a 56 °C. Luego, las muestras se alquilaron agregando iodoacetamida (Sigma) preparada en el día a una concentración final de 20 mM e incubando 40 min a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, las muestras fueron precipitadas mediante el agregado de 1/9 del volumen de la muestra de TCA 100 % (Sigma) alcanzando una concentración final de 11 % (v/v). Se dejaron reposar a -20 °C entre 2 y 16 horas y se centrifugan a 25,500 g por 10 min a 4 °C. El pellet se lavó 3 veces con acetona fría, resuspendiendo y centrifugando cada vez (25,500 g por 10 min a 4 °C), se descartó el sobrenadante y se dejó el tubo abierto a temperatura ambiente 5 min para secar. Las muestras entonces pueden guardarse a 4 °C o ser transportadas a TA en caso de ser necesario.

### 3.5.4 Digestión en solución, cromatografía líquida y espectrometría de masas

La digestión de las proteínas, la separación cromatográfica de los péptidos y el análisis por MS de los mismos hasta la obtención de los datos crudos fue realizada por el servicio del Centro de Estudios Químicos y Biológico por Espectrometría de Masas (CEQUIBIEM, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires). Brevemente: las muestras fueron digeridas con Tripsina en búfer bicarbonato de amonio (relación Tripsina/proteína de 1/100) 16 horas a 37 °C. La reacción se detuvo mediante el agregado de TFA (Ácido trifluoro acético) hasta  $\text{pH} \leq 4$  y desalados utilizando Zip-Tip C18.

Los péptidos fueron luego separados utilizando un nanoLC EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific) con una columna de fase reversa Easy-Spray Column PepMap RSLC (C18, 2  $\mu\text{m}$ , 100A, 75  $\mu\text{m}$  x 500 mm; Thermo Scientific) a 35 °C. La velocidad de flujo fue de 250 nL/min en modo gradiente binario con el siguiente programa de elusión: la

columna fue equilibrada con 99 % fase móvil A [H<sub>2</sub>O, conteniendo 0.1 % de ácido fórmico] y 1 % de fase móvil B [Acetonitrilo, conteniendo 0.1 % de ácido fórmico]. Se inyectaron 2 µL de muestra y se realizó un gradiente de 130 min hasta alcanzar 23 % de fase móvil B, 60 min hasta un 42 % y 35 min para llegar a 80 % de fase móvil B. Estas condiciones se mantuvieron por 10 min.

Los espectros fueron adquiridos utilizando un espectrómetro Q-exactive (Thermo Scientific) y una fuente ESI, modelo EASY-SPRAY (Thermo Scientific) a un voltaje de 3.5 kV. El análisis se realizó en modo DDA en polaridad positiva, con una celda HCD (Disociación por alta colisión) para MS/MS, con una resolución de 70,000 para MS completo y 17,500 para MS/MS. El ciclo utilizado de MS/MS automático fue de 1 MS completo cada 20 MS/MS con un rango de exclusión dinámico en la selección de iones. En todos los casos, cada condición se analizó por triplicado biológico.

### 3.5.5 Análisis de datos

Una vez entregados los datos crudos, archivos Thermo “.raw”, por parte del servicio del CEQUIBIEM, estos fueron analizados utilizando el programa “PatternLab for Proteomics” (82). En primer lugar, se generó una secuencia “señuelo-objetivo” a partir de la secuencia del proteoma completo en formato FASTA incluyendo además contaminantes comunes. Los proteomas (*M. smegmatis* cepa ATCC 700084 / mc(2)155; ID: AUP000000757; 6,601 proteínas y *M. tuberculosis* cepa ATCC 25618 / H37Rv; ID UP000001584; 3,993 proteínas (64)) fueron descargados de la base de datos de acceso libre UniProt (83). Luego se realizó la inferencia de péptidos a partir de espectros de masa con los siguientes parámetros:

- Tolerancia al ion precursor: 40 ppm
- Enzima: Tripsina no seguida de Prolina
- Especificidad de la enzima: Semiespecífica
- Número de sitios de cortes salteados: 2
- Rango de m/z: 550-5500

- Iones: B, Y y NL
- Modificaciones: Carbamida metilaciones de cisteínas (fija), Oxidación de metioninas (variable) y fosforilación de Ser Thr y Tyr (variable).

Estos resultados fueron filtrados para obtener un nivel de falsos positivos (FDR) a nivel de espectro de 3 %, de péptido de 2 % y un FDR a nivel de proteína de 1 %. Para cuantificar las proteínas se utilizó el modo XIC y se utilizó la herramienta que permite tomar las áreas de los péptidos de las muestras en las cuales no fueron identificados (problema de heterogeneidad en la selección de iones en MS/MS para identificar péptidos) usando las masas y tiempos de retención de las réplicas como referencia con una tolerancia cromatográfica de 30 seg. Finalmente, se determinaron las proteínas expresadas diferencialmente en dos condiciones o sólo expresadas en una de ellas utilizando los módulos “T-fold” y “Diagrama de Venn proporcional al área” del PatternLab for Proteomics respectivamente. El análisis usando “T-fold” se realizó sin normalización (normalización NSAF (84)), un mínimo de 2 réplicas por clase y un BH (Benjamini-Hochberg) valor q de 0.05. En el caso del diagrama de Venn proporcional al área se utilizó como opción de filtro una probabilidad de 0.05.

# 4. RESULTADOS

## 4.1 CAPÍTULO I

Desarrollo de un método de determinación de  
acil-CoAs en actinomicetos

#### 4.1.1 Introducción

La CoA y los tioésteres de CoA son moléculas esenciales involucradas en el metabolismo aminoacídico, lipídico y de carbohidratos. Además de participar en numerosas rutas metabólicas como sustratos e intermediarios (85), la CoA y algunos de sus tioésteres derivados, como el acetyl-CoA, pueden también regular directamente la actividad de proteínas por mecanismos alostéricos o afectando las reacciones de acetilación de proteínas (86). Se ha demostrado también que los tioésteres de CoA tienen la habilidad de regular la expresión génica mediante la modulación de la afinidad de factores de transcripción por sus DNA blanco (61,62,87,88).

Nuestro grupo de investigación se dedica al estudio del metabolismo lipídico y la producción de policétidos en diferentes actinomicetos, especialmente en los géneros *Mycobacterium*, *Streptomyces* y *Corynebacterium*. Estos organismos han sido extensamente estudiados debido a su gran impacto en la humanidad, tanto como patógenos extremadamente peligrosos o como fuentes de metabolitos bio-activos. Entre los patógenos podemos mencionar, como ya se ha expuesto, el caso de *M. tuberculosis* y *M. leprae* o el caso de *C. diphtheriae* o bacilo de Klebs-Löffler, causante de la difteria (89). Entre los organismos útiles para el ser humano, podemos incluir los del género *Streptomyces*, conocidos por su habilidad para producir una importante variedad de metabolitos secundarios usados en salud humana (agentes anticancerígenos, inmunosupresores y antibióticos entre otros) (90), y *C. glutamicum* capaz de producir y secretar grandes cantidades de L-aminoácidos usados principalmente en la industria alimenticia y ganadera (91). Así, el metabolismo lipídico en actinomicetos no sólo es relevante para la generación de PL de membrana, sino también para la producción de metabolitos secundarios con propiedades farmacéuticas, para la generación de compuestos de reserva (TAG) con posibles aplicaciones biotecnológicas y para la síntesis de lípidos complejos, cruciales en la permeabilidad y patogenicidad de especies infecciosas (41). En este sentido, las FAS y sintasas de policétidos utilizan un amplio rango de tioésteres de acil-CoA como sustrato. Por lo tanto, el desarrollo de un método analítico selectivo, sensible y rápido para

detectar y cuantificar tioésteres de CoA en actinomicetos tendría un impacto significativo en la investigación bio-médica y de ingeniería metabólica, permitiendo mejorar el desarrollo de nuevas cepas, análisis de flujo rápidos y precisos, y monitorear la respuesta celular a cambios en el ambiente.

Los primeros métodos desarrollados para medir acil-CoAs incluyen ensayos enzimáticos, cromatografía en papel y capa delgada y HPLC (92–95). Sin embargo, todos estos métodos tienen muy baja sensibilidad. Más recientemente, la sensibilidad de los ensayos se mejoró mediante derivatización y análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) o análisis fluorométricos (96,97). Finalmente, para aprovechar la selectividad de la MS en la discriminación de los derivados de CoA evitando el paso de derivatización requerido para GC-MS, que resulta tanto laborioso como propenso a errores, se desarrollaron métodos utilizando LC-MS, especialmente espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (98–100).

Nuestro trabajo se centra particularmente en el estudio de la regulación de la biosíntesis de lípidos en micobacterias, por lo que necesitábamos un método de amplio rango para poder cuantificar todos los acil-CoAs de micobacterias. Debido a esto, nos propusimos desarrollar un método para cuantificar el espectro intracelular completo de acil-CoAs reportados hasta el momento en micobacterias, desde el precursor de los FA acetil-CoA (C<sub>2</sub>-CoA) hasta el precursor de la cadena alfa de los MA hexacosanoil-CoA (C<sub>26</sub>-CoA).

#### 4.1.2 Objetivos

Nuestro objetivo en esta primera parte del trabajo fue diseñar un protocolo experimental basado en LC-MS para cuantificar tioésteres de CoA de actinomicetos. Los objetivos particulares para esta parte fueron:

- Poner a punto una extracción específica para derivados de CoA en células de tres géneros de actinomicetos: *Mycobacterium*, *Corynebacterium* y *Streptomyces*.

- Diseñar y optimizar un método de separación por cromatografía y detección por MS de los distintos acil-CoAs.
- Establecer un sistema de estándares internos que nos permitan cuantificar un amplio rango de acil-CoAs.
- Emplear el ensayo determinando el perfil de acil-CoAs de distintos modelos de actinomicetos y validarlo en distintas condiciones de cultivo.

#### 4.1.3 Resultados

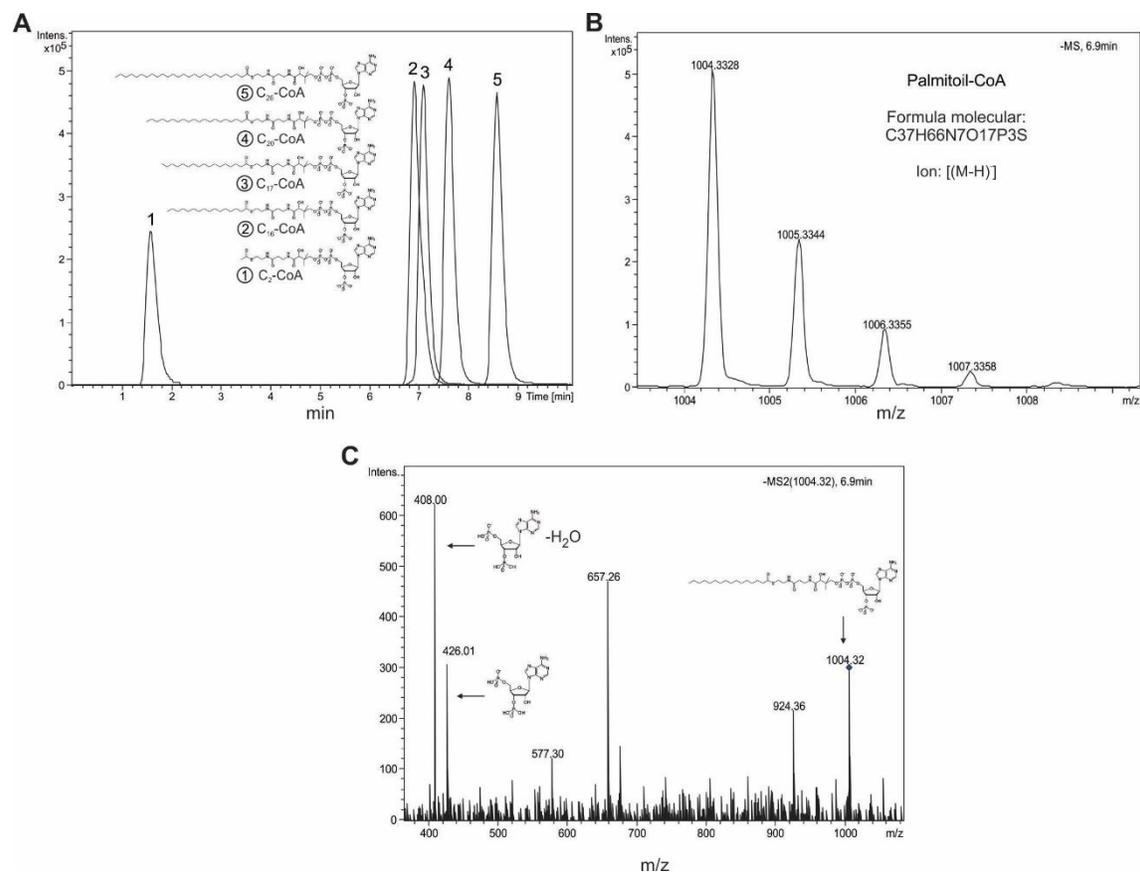
##### 4.1.3.1 Desarrollo de un método de IP-RP-HPLC/ESI-HRMS para la determinación de un amplio rango de acil-CoAs

Para desarrollar un método de detección de un amplio rango de acil-CoAs, lo primero que hicimos fue poner a punto la separación cromatográfica y detección por MS de este tipo de compuestos utilizando una mezcla de 5 estándares comerciales: C<sub>2</sub>-CoA, C<sub>16:0</sub>-CoA, C<sub>17:0</sub>-CoA, C<sub>20:0</sub>-CoA y C<sub>26:0</sub>-CoA. Para la optimización cromatográfica se tomó como referencia el método reportado por Haynes *y col.* (101) y se diseñó una cromatografía en fase reversa con una columna C18. Se probaron diferentes perfiles de elusión hasta conseguir poder eluir desde el C<sub>2</sub>-CoA hasta el C<sub>26</sub>-CoA (el analito más hidrofílico y el más hidrofóbico) en un tiempo de 10 min con un ciclo total de 25 min incluyendo lavado y estabilización del sistema (Figura 6). Esto se consiguió con un nivel de separación de los picos aceptable para su detección por MS, pudiendo evitar así el efecto de apantallamiento iónico a nivel de la fuente de ionización. En cromatografía, para mejorar la resolución y la integración de picos en la cuantificación es importante que los picos tengan una forma simétrica o Gaussiana evitando que se formen picos con cola o coleo, lo cual sucede cuando hay más de un mecanismo de retención en una separación. El coleo ocurre a menudo con las cromatografías en fase reversa que poseen fases estacionarias basadas en sílica, ya que la misma posee no sólo grupos C18 interactuando con la porción hidrofóbica de la molécula sino también silanoles libres interactuando con la parte hidrofílica, en nuestro caso los acilos y la CoA

respectivamente (102). Por consiguiente, para evitar el coleo, fue necesario agregar tanto a la muestra como a los solventes TEA, la cual compite con la CoA en la interacción con los silanoles libres saturándolos y exponiendo una superficie hidrofóbica. De esta manera se obtiene un sistema con un mecanismo de retención más homogéneo y picos más simétricos (72). El método desarrollado entonces es una cromatografía en fase reversa con acoplamiento de iones (IP-RP-HPLC).

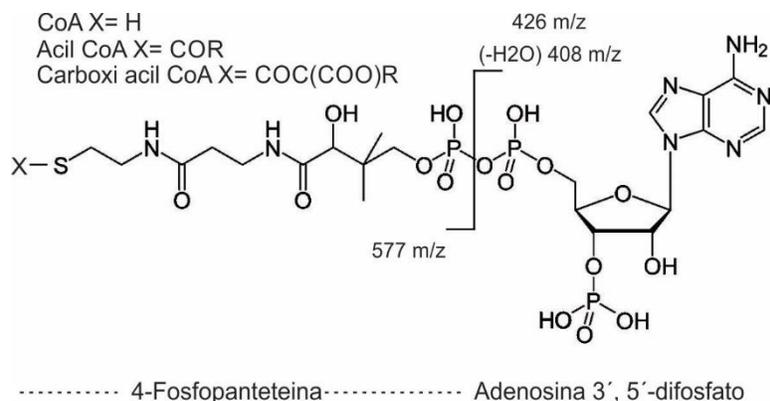
Luego se optimizó la ionización y detección de los acil-CoAs por ESI acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS) con analizador tipo Qq-TOF. Los parámetros tanto de ionización como de MS fueron ajustados realizando una infusión directa de la mezcla de estándares comerciales, de manera de poder analizar el espectro completo de acil-CoAs. Se utilizó el modo negativo de ionización y los iones observados corresponden al  $[M-H]^-$ . La TEA agregada, además de mejorar la separación cromatográfica, en este caso favorece la ionización en modo negativo al actuar como dador de electrones y promover la deprotonación de la molécula de acil-CoA (72).

En la Figura 8A se puede observar el cromatograma correspondiente a la mezcla de estándares y en la Figura 8B el espectro de masas del palmitoil-CoA ( $C_{16}$ -CoA). Esta última muestra el patrón de isótopos del analito, que permite la validación de la fórmula molecular. Para confirmar la identidad de los iones observados, los mismos fueron fragmentados por MS/MS, observándose en todos los casos la presencia de los iones  $m/z = -408$  y  $m/z = -426$ , característicos de los derivados de CoA (101)(Figura 8C).

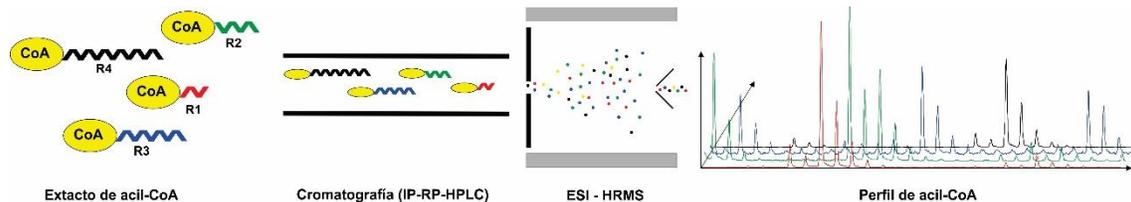


**Figura 8. Análisis por IP-RP-HPLC-ESI-HRMS de cinco estándares de acil-CoAs.** A. Separación cromatográfica de los estándares: (1)  $C_2$ -CoA, (2)  $C_{16}$ -CoA, (3)  $C_{17}$ -CoA, (4)  $C_{20}$ -CoA and (5)  $C_{26}$ -CoA. B. Patrón de isótopos del ion  $C_{16}$ -CoA  $[(M-H)]^-$  observado por HRMS. C. Productos de fragmentación del  $C_{16}$ -CoA obtenidos por MS/MS. Se muestra la estructura del ion parental (palmitoil-CoA; m/z: 1004.32) y los fragmentos característicos de los derivados de CoA (m/z: 408 y 426).

La estructura de la molécula de CoA se presenta en la Figura 9, en la misma se indican también los sitios de fragmentación y las m/z de los iones resultantes. De esta forma la masa exacta, el patrón de isótopos y la presencia de los iones característicos durante la fragmentación permiten identificar inequívocamente estos iones. El esquema del método analítico se muestra en la Figura 10.



**Figura 9. Estructura y patrón de fragmentación de los ésteres derivados de la CoA.** R simboliza una cadena carbonada.



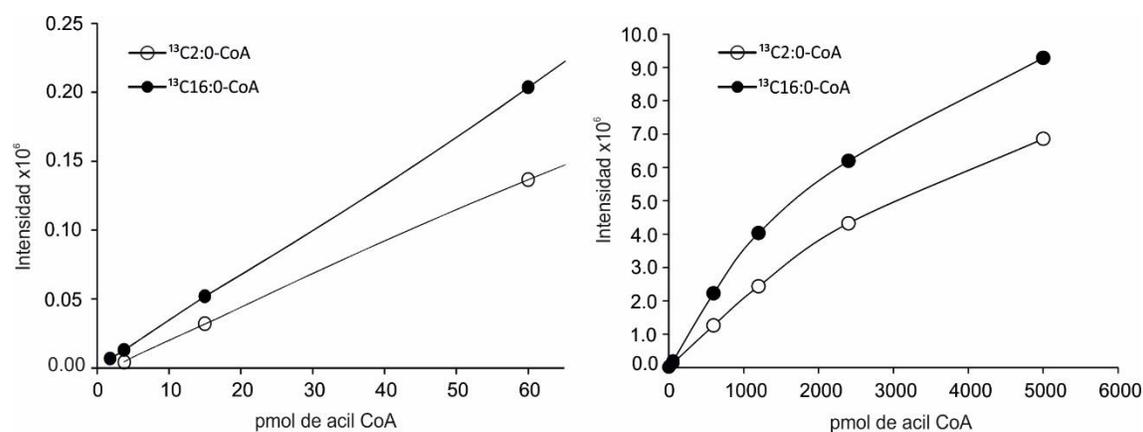
**Figura 10. Esquema del método de análisis acil-CoAs por IP-RP-HPLC-ESI-HRMS.**

#### 4.1.3.2 Análisis de acil-CoAs en actinomicetos

Luego de haber puesto a punto la detección de los estándares comerciales, al no haber un método descrito de extracción de acil-CoAs en actinomicetos se probaron varias alternativas hasta quedarnos con una modificación del método descrito por Sun *et al.* (72). Fue necesario principalmente optimizar las condiciones de ruptura celular y la extracción con solventes. Brevemente, los pellets celulares correspondientes a un cultivo de 50 mL de  $DO_{600} \sim 1$  fueron resuspendidos en búfer fosfato/2-propanol suplementado con TEA. Las células fueron rotas por sonicación y al extracto resultante se le agregó acetonitrilo y sulfato de amonio previo a centrifugar para separar los restos celulares. Finalmente, al sobrenadante se lo secó con  $N_2$  y disolvió en 2-propanol/ácido acético para analizar por LC-MS.

El manejo de los cultivos se realizó a temperatura ambiente hasta luego de centrifugarlos intentando minimizar los efectos de cambio de temperatura en el perfil de acil-CoAs. Estas son moléculas precursoras o intermediarios por lo que sus concentraciones dentro de las células pueden variar rápidamente durante la extracción y cambiar el perfil analizado (103).

Por otro lado, para normalizar y cuantificar los acil-CoAs endógenos, estándares internos de referencia fueron agregados previos a la disrupción de las células para compensar las variaciones y errores durante la preparación de las muestras. Se utilizaron dos acil-CoAs marcados con isótopos estables:  $^{13}\text{C}$ -acetil-CoA, para la cuantificación de acil-CoAs de cadena corta (hasta 4 carbonos), y  $^{13}\text{C}$ -palmitoil-CoA, para la cuantificación de acil-CoAs de cadena media y larga (de 8 a 26 carbonos). Estos estándares fueron seleccionados específicamente para cuantificar los acil-CoAs en función de su similitud en la longitud de la cadena, ya que se observó que la sensibilidad del sistema varía levemente en relación con el largo de la cadena acilada (Figura 11).



**Figura 11. Intensidad de las señales en función a la concentración del  $^{13}\text{C}$ -acetil-CoA y  $^{13}\text{C}$ -palmitoil-CoA utilizando IP-RP-HPLC-ESI-HRMS. La linealidad del método es de 1.8 a 1200 pmol para  $^{13}\text{C}_{16:0}\text{-CoA}$  y de 3.75 a 2400 pmol para  $^{13}\text{C}_{2:0}\text{-CoA}$ .**

Para estimar el rendimiento del método de extracción de tioésteres de CoA establecido, los estándares internos fueron agregados en dos etapas del proceso: previo a romper las células y al final de la extracción. Los resultados en la Tabla 4 muestran

que ambos estándares,  $^{13}\text{C}$ -acetil-CoA y  $^{13}\text{C}$ -plamitoil-CoA, mostraron un rendimiento de extracción cercano al 100 %. El rendimiento se calculó como el porcentaje de la señal del estándar interno agregado previo a la rotura de las células respecto del obtenido luego de la extracción en una muestra de *M. smegmatis*. A su vez pudimos observar que había una pérdida de la señal por efecto de matriz en ambos casos de un ~86 % (Tabla 4). Esta estimación se calculó entre la señal de cada estándar en una muestra extraída de *M. smegmatis* y la misma cantidad de estándar en solución de inyección (2-propanol/ácido acético 1 mM (4:1)).

**Tabla 4. Rendimiento de la extracción de acil-CoA comparada con inyección directa de estándar.**

<b>Estándar</b>	<b>Rendimiento (%)</b>	<b>Perdida de señal por matriz (%)</b>
$^{13}\text{C}_2\text{-CoA}$	92.03	86.48
$^{13}\text{C}_{16}\text{-CoA}$	100	86.91

Para determinar el rango dinámico del método, los diferentes acil-CoAs comerciales usados como estándar fueron preparados por diluciones seriadas en solución de inyección. La linealidad del método calculada para acil-CoAs de cadenas mayores a 8 átomos de carbono fue entre 1.8 pmol y 1.2 nmol. Para acil-CoAs de cadenas cortas (de 2 a 4 carbonos) el método mostró un corrimiento en el rango dinámico a 3.6 pmol - 2.4 nmol (Figura 11). Cuando un acil-CoA se encontraba en cantidades mayores al rango dinámico del método, el mismo se medía diluyendo la muestra.

Finalmente, se estudió la estabilidad de la muestra preparada antes de inyectar en el LC-MS, inyectando múltiples veces una mezcla de estándares de acil-CoA mantenida a 4°C durante un intervalo de 20 horas. Se observó que a partir de la primera hora existía una disminución en la señal y la misma no era igual para los acil-CoAs de distinto largo de cadena. Debido a esto se decidió mantener las muestras a -80°C hasta su inyección.

Una vez que se estableció el método tanto de extracción como de determinación y cuantificación, se determinó el perfil completo de acil-CoAs de células de *M. smegmatis* de un cultivo de fase exponencial. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Niveles intracelulares de acil-CoAs en diferentes actinomicetos.**

Acil-CoA	Determinación de acil-CoAs endógenos [pmol]			
	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. bovis</i> BCG	<i>C. glutamicum</i>	<i>S. coelicolor</i>
C <sub>2</sub> (Acetil)	3,842 ± 323	1,137 ± 74	5,649 ± 800	21,418 ± 25
C <sub>3</sub> (Propionil)	462 ± 23	25 ± 0.2	n/d	186 ± 1
Carboxi C <sub>2</sub> (Malonil)	283 ± 26	27 ± 3	n/d	154 ± 31
C <sub>8:0</sub>	3.4 ± 0.6	7 ± 1	6.4 ± 0.6	n/d
C <sub>10:0</sub>	4.8 ± 1	24 ± 3	42 ± 6	n/d
C <sub>12:0</sub>	4.5 ± 0.3	67 ± 7	5 ± 0.4	9.6 ± 1
C <sub>13:0</sub>	2.75 ± 0.04	59 ± 6	n/d	13.4 ± 1
C <sub>14:0</sub>	6.8 ± 0.4	144 ± 30	11.8 ± 3.4	34.4 ± 0.6
C <sub>15:0</sub>	1.67 ± 0.02	140 ± 17	n/d	33.8 ± 0.4
C <sub>16:0</sub>	97 ± 4	330 ± 43	42 ± 1.8	23.4 ± 0.6
C <sub>16:1</sub>	34 ± 1	17 ± 1	6.6 ± 2	3 ± 0.4
C <sub>17:0</sub>	35 ± 4	92 ± 5	n/d	n/d
C <sub>18:0</sub>	224 ± 46	87 ± 19	5 ± 0.4	n/d
C <sub>18:1</sub>	88 ± 9	25 ± 0.2	28.6 ± 3.6	n/d
C <sub>20:0</sub>	66 ± 4	61 ± 2	n/d	n/d
C <sub>22:0</sub>	49 ± 0.4	34 ± 8	n/d	n/d
C <sub>24:0</sub>	95 ± 4	83 ± 9	n/d	n/d
C <sub>26:0</sub>	n/d	29.2 ± 3.6	n/d	n/d
Carboxi C <sub>16:0</sub>	n/d	n/d	10 ± 0.4	n/d
Carboxi C <sub>24:0</sub>	3.3 ± 0.5	n/d	n/d	n/d

Carboxi C <sub>26:0</sub>	n/d	2.8 ± 0.4	n/d	n/d
---------------------------	-----	-----------	-----	-----

n/d: No detectado

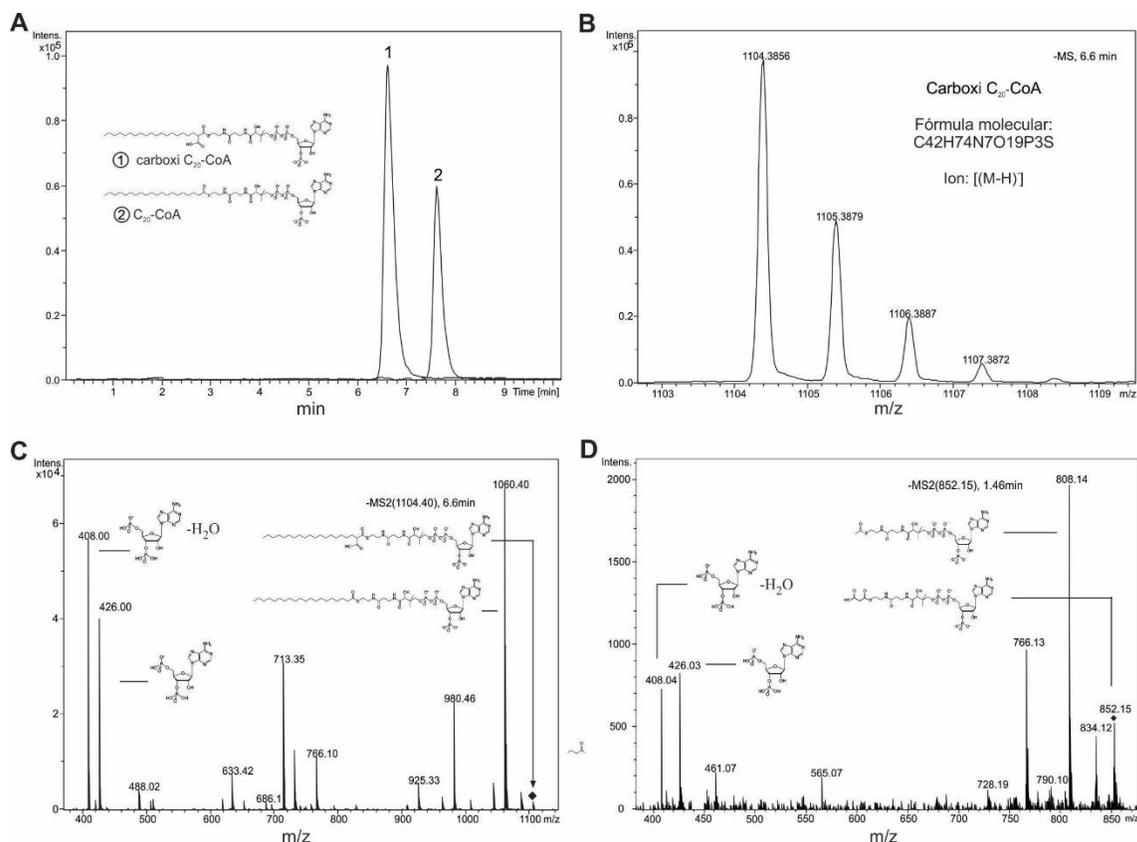
En el análisis, los acil-CoAs de cadena corta detectados incluyen acetil-CoA, propionil-CoA y malonil-CoA, metabolitos fundamentales en la biosíntesis de lípidos. En el caso de los acil-CoAs de cadena media o larga, las especies encontradas con mayor abundancia son palmitoil-CoA (C<sub>16:0</sub>), estearoil-CoA (C<sub>18:0</sub>), oleoil-CoA (C<sub>18:1</sub>) y lignoceril-CoA (C<sub>24:0</sub>).

Luego analizamos si el método desarrollado para *M. smegmatis* era apropiado también para el análisis de acil-CoAs de otros actinomicetos relacionados: *C. glutamicum*, *S. coelicolor* y *M. bovis BCG*. Se pudo observar que los acil-CoA con cadenas aciladas mayores o iguales a C<sub>20</sub> constituyen el ~5 % del total en el género *Mycobacterium* mientras que no se detectan en *S. coelicolor* y *C. glutamicum*. Este resultado coincide con el comportamiento bimodal descrito para el sistema FAS-I de micobacterias (44,104). El perfil de acil-CoAs obtenido en *S. coelicolor* y *C. glutamicum* reflejan la composición lipídica descrita para sus membranas. La mayor parte de los FA de *S. coelicolor* son sintetizados a partir de unidades precursoras de cadena ramificada como el isobutiril, isovaleril y ante-isovaleril, para dar lugar a FA de cadena par e impar con una ramificación metilo en el extremo  $\omega$ -terminal (105,106). Así, los acil-CoAs mayoritarios fueron miristoil-CoA (C<sub>14</sub>), pentadecanoil-CoA (C<sub>15</sub>) y palmitoil-CoA (C<sub>16</sub>). En cambio, las corinebacterias sólo utilizan acetil-CoA como precursores y las enzimas FAS-I de tipo eucariotas presentes en estas bacterias sintetizan palmitoil-CoA (C<sub>16:0</sub>), estearoil-CoA (C<sub>18:0</sub>) y oleoil-CoA (C<sub>18:1</sub>), los cuales fueron las principales moléculas encontradas en células de *C. glutamicum* (Tabla 5).

#### 4.1.3.3 Determinación de carboxi-acil-CoAs

Nuestro siguiente objetivo fue determinar si el método desarrollado era capaz de detectar 2-carboxi-acil-CoAs de cadena larga, intermediarios activados que pasarán a ser parte de la cadena lateral de los MA en *Mycobacterium* y *Corynebacterium*. Para esto

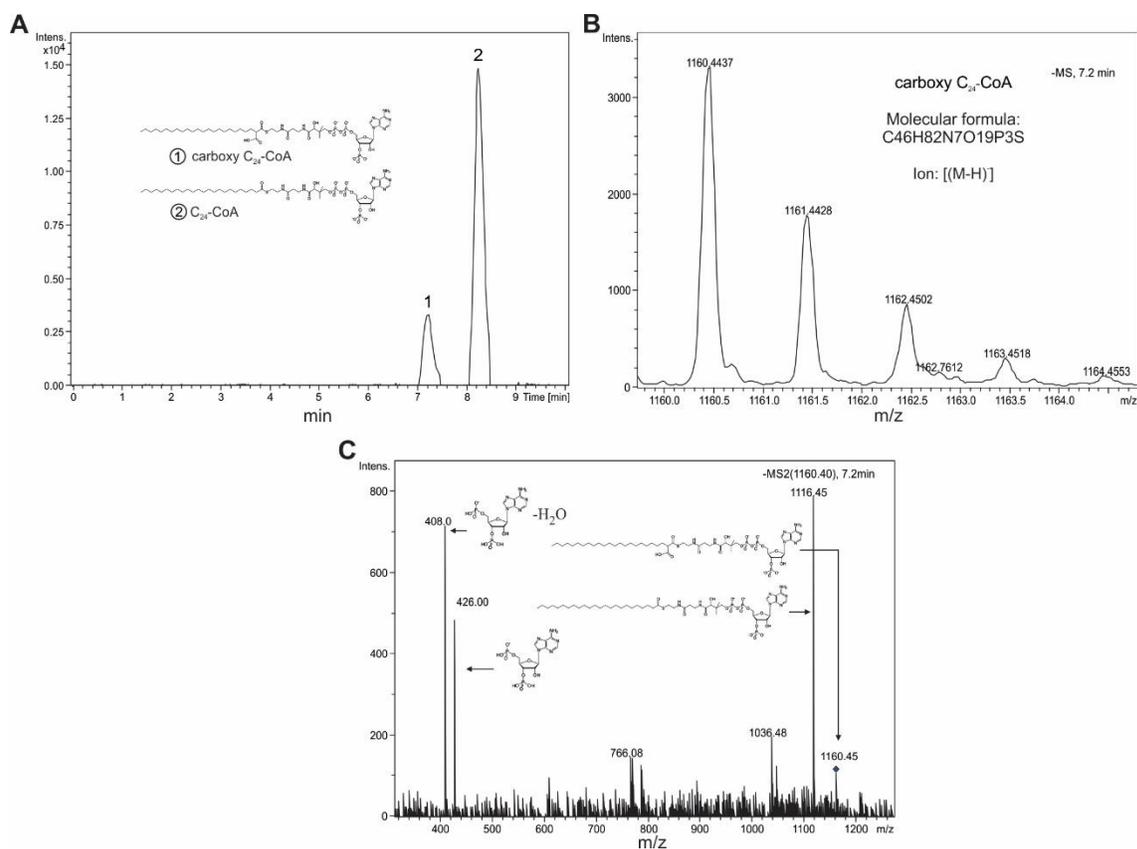
se utilizó un 2-carboxi-acil-CoA sintetizado *in vitro* a partir del estándar C<sub>20</sub>-CoA, mediante la reacción del complejo de carboxilasa de acil-CoA de cadena larga de *M. tuberculosis* (55). El producto de esta reacción, el carboxi-C<sub>20</sub>-CoA, fue analizado mediante LC-MS y MS/MS. Se observaron los iones [M-H]<sup>-</sup> correspondientes tanto al carboxi-C<sub>20</sub>-CoA como a su precursor C<sub>20</sub>-CoA, m/z 1104.40 y m/z 1060.40 respectivamente. El tiempo de retención del carboxi-C<sub>20</sub>-CoA es aproximadamente 1 minuto menor que el C<sub>20</sub>-CoA, lo cual coincide con la mayor polaridad dada por el grupo carboxilo. Al analizar el carboxi-C<sub>20</sub>-CoA por MS/MS, se observa la aparición del ion m/z 1060.40, lo que indica que la fragmentación estaría produciendo una descarboxilación inducida por colisión generando nuevamente el ion correspondiente al C<sub>20</sub>-CoA (Figura 12). En el espectro de MS/MS se observan también los iones m/z 408 y m/z 426 característicos de los derivados de CoA. Esta descarboxilación por colisión se observó también en las muestras analizadas en la fragmentación del malonil-CoA, un carboxi-acil-CoA, endógeno (Figura 12). En el mismo se observa no sólo la liberación del acetil-CoA, el cual es su producto de descarboxilación, sino un intenso ion correspondiente a la CoA. Este fenómeno fue previamente reportado en la fragmentación de péptidos conteniendo ácido carboxiglutámico, un AA carboxilado (107).



**Figura 12. Análisis de los estándares  $C_{20}$ -CoA y carboxi- $C_{20}$ -CoA.** A. Separación cromatográfica de los estándares:  $C_{20}$ -CoA (1) y carboxi- $C_{20}$ -CoA (2). B. Patrón de isótopos del ion carboxi- $C_{20}$ -CoA  $[(M-H)]^-$  observado por HRMS. C-D. Productos de fragmentación obtenidos por MS/MS del carboxi- $C_{20}$ -CoA y del malonil-CoA respectivamente. En ambos se muestra la estructura del ion parental (carboxi- $C_{20}$ -CoA, m/z: 1104.40; malonil-CoA, m/z 852.15), el producto descarboxilado ( $C_{20}$ -CoA, m/z: 1060.40; acetil-CoA, 808.14) y los fragmentos característicos de los derivados de CoA (m/z: 408 y 426).

Una vez corroborada la posibilidad de estudiar este tipo de moléculas, analizamos la presencia de los carboxi-acil-CoAs de cadena larga en las muestras biológicas. Para esto, buscamos en cada cromatograma el ion  $[M-H]^-$  que correspondería al 2-carboxi-acil-CoA de cadena larga según el largo de la cadena alfa reportado para cada bacteria analizada. Encontramos el ion m/z 1160.44, que corresponde al carboxi- $C_{24}$ -CoA en *M. smegmatis* (m/z teórico 1160.452, Figura 13), el ion m/z 1188.47 correspondiente al carboxi- $C_{26}$ -CoA en *M. bovis* BCG (m/z teórico 1188.483) y el ion m/z 1048.33 correspondiente al carboxi- $C_{16}$ -CoA en *C. glutamicum* (m/z teórico 1048.327, Tabla 5). Todos los iones encontrados tuvieron un error en su masa calculada menor a 10 ppm. Los tres iones fueron analizados por MS/MS y en todos los casos la fragmentación de

los mismos dio lugar, además de a los iones  $m/z$  408 y  $m/z$  426 característicos de los derivados de CoA, al ion correspondiente al acil-CoA resultante de la pérdida de una molécula de dióxido de carbono o descarboxilación ( $\text{CO}_2$ ). En la Figura 13 se muestra el análisis por MS/MS del carboxi- $\text{C}_{24}$ -CoA.



**Figura 13. Análisis del carboxi- $\text{C}_{24}$ -CoA en *M. smegmatis*.** A. Separación cromatográfica de los acil-CoAs endógenos: carboxi- $\text{C}_{24}$ -CoA (1) y  $\text{C}_{24}$ -CoA (2). B. Patrón de isótopos del ion carboxi- $\text{C}_{24}$ -CoA  $[(\text{M}-\text{H})^-]$  observado por HRMS. C. Productos de fragmentación del carboxi- $\text{C}_{24}$ -CoA obtenidos por MS-M). Se muestra la estructura del ion parental (carboxi- $\text{C}_{24}$ -CoA;  $m/z$ : 1160.45), el producto descarboxilado ( $\text{C}_{24}$ -CoA;  $m/z$ : 1116.45) y los fragmentos característicos de los derivados de CoA ( $m/z$ : 408 y 426).

#### 4.1.3.4 Efecto de inhibidores de FAS y de la suplementación de FA en la composición del perfil de acil-CoAs en *M. smegmatis*

Las micobacterias tienen la habilidad de usar eficientemente FA como fuente de carbono y energía a través del ciclo de  $\beta$ -oxidación. Esta característica es particularmente relevante para el patógeno *M. tuberculosis*, el cual usa un amplio rango de lípidos del hospedador durante la infección (108). Para estudiar cómo cambia la composición de los acil-CoAs endógenos en respuesta a diferentes estímulos ambientales, analizamos el perfil de acil-CoAs de *M. smegmatis* crecida en medio 7H9 suplementado con ácido heptadecanoico ( $C_{17}$ ). La activación de los FA por tioesterificación a la CoA es un proceso fundamental ubicuo a todos los organismos, desde arqueas al ser humano (109). Una vez internalizados, los FA son inmediatamente convertidos a acil-CoAs por una acil-CoA sintetasa y luego utilizados ya sea para la biosíntesis de PL y TAG o degradados a través del ciclo de  $\beta$ -oxidación. La ruta de  $\beta$ -oxidación funciona de manera cíclica, cada ciclo resulta en un acortamiento del acil-CoA entrante en dos átomos de carbono para dar como producto acetil-CoA. En nuestro análisis, suplementamos el medio de cultivo con FA  $C_{17}$  y analizamos el efecto en el conjunto de acil-CoAs intracelular (Tabla 6). Pudimos observar que los niveles de heptadecanoil-CoA y pentadecanoil-CoA (el producto de la primera ronda de  $\beta$ -oxidación) se incrementaban  $\sim 1.5$  y  $\sim 5$  veces respectivamente luego de una hora de tratamiento. Pudimos detectar además derivados de CoA intermediarios de la  $\beta$ -oxidación del heptadecanoil-CoA. En la tabla 6 se muestra la presencia del  $C_{17}$ - $\beta$ -hidroxil-CoA, el intermediario ( $C_{17}$ -OH) producido por la hidratación del enoil-CoA por la enzima enoil-CoA hidratasa, en las células tratadas con ácido heptadecanoico pero no en las células control.

Finalmente, determinamos el perfil completo de acil-CoAs de células de *M. smegmatis* tratadas con diferentes antibióticos que interfieren con la biosíntesis de lípidos. Un cultivo de *M. smegmatis* fue tratado durante una hora con Cer, un antibiótico que impide la síntesis de FA por la inhibición de la reacción de condensación tanto del sistema FAS-II ( $\beta$ -cetoacil-ACP sintasas) en bacterias, como del sistema FAS-I en mamíferos y micobacterias (110,111). El análisis de estas células reveló grandes diferencias en los niveles de acil-CoAs respecto de las células control (Tabla 6). Como era de esperarse, el tratamiento con Cer produjo una drástica reducción de los acil-CoAs de cadena media y larga, con el incremento asociado de malonil-CoA, la unidad elongadora. Analizamos también el perfil de acil-CoAs de un cultivo de *M. smegmatis* en presencia INH, un inhibidor específico de la biosíntesis de MA, utilizada como una droga de primera línea en el tratamiento contra la tuberculosis. La INH es una pro-droga que requiere activación una vez dentro de la célula de las micobacterias. Luego de su activación por KatG, la INH reacciona con NAD(H) para formar un aducto que inhibe InhA, la enoil reductasa del sistema FAS-II de micobacterias, el cual está involucrado en la biosíntesis de MA (112). El sistema FAS-II es el responsable de la elongación de los FA provistos por el sistema FAS-I, por lo que la disrupción de la biosíntesis de MA por INH afectaría la composición de FA de cadena larga, precursores requeridos para la misma. Existe evidencia que la INH no afecta directamente al sistema FAS-I y que la inactivación de InhA produce la acumulación del FA  $C_{24}$  (113). En nuestro análisis

podimos observar, tal como se muestra en la tabla 6, que los niveles de acil-CoA de cadena media en *M. smegmatis* se encuentran significativamente aumentados luego de una hora de tratamiento con INH e inesperadamente los niveles de los acil-CoAs de cadena muy larga (C<sub>24</sub>) se encuentran disminuidos.

**Tabla 6. Niveles intracelulares de acil-CoAs en *M. smegmatis*.**

Acil-CoA	Determinación de acil-CoAs endógenos			
	[picomol]			
	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. smegmatis</i> FA C <sub>17</sub>	<i>M. smegmatis</i> Cer	<i>M. smegmatis</i> INH
C <sub>2</sub> (Acetil)	3,842 ± 323	3,025 ± 287	1,584 ± 453	8,189 ± 444
C <sub>3</sub> (Propionil)	462 ± 23	535 ± 4	275 ± 23	387 ± 16
Carboxi C <sub>2</sub> (Malonil)	283 ± 26	203 ± 36	647 ± 45	237 ± 37
C <sub>13:0</sub>	2.75 ± 0.04	3.4 ± 0.3	n/d	12 ± 1.6
C <sub>14:0</sub>	6.8 ± 0.4	9.7 ± 0.4	2 ± 0.5	38 ± 4.5
C <sub>15:0</sub>	1.67 ± 0.02	6.85 ± 0.01	n/d	7 ± 0.2
C <sub>16:0</sub>	97 ± 4	126 ± 8	7 ± 1.5	213 ± 8
C <sub>16:1</sub>	34 ± 1	31 ± 3	6 ± 1	165 ± 22
C <sub>17:0</sub>	35 ± 4	56 ± 1	5 ± 1	55 ± 4
C <sub>17:OH</sub>	n/d	3.7 ± 0.3	n/d	n/d
C <sub>18:0</sub>	224 ± 46	187 ± 23	12 ± 2	323 ± 32
C <sub>18:1</sub>	88 ± 9	74 ± 13	9 ± 1	311 ± 30
C <sub>20:0</sub>	66 ± 4	59 ± 9	2.4 ± 0.4	30 ± 5
C <sub>22:0</sub>	49 ± 0.4	38 ± 4	n/d	20 ± 6
C <sub>24:0</sub>	95 ± 4	96 ± 15	n/d	46 ± 8
Carboxi C <sub>24:0</sub>	3.3 ± 0.5	3.7 ± 0.4	n/d	2.1 ± 0.5

n/d: No detectado

#### 4.1.4 Discusión

En actinomicetos, el metabolismo lipídico no sólo se relaciona con la síntesis de PL de membrana sino también con la producción de compuestos policétidos con propiedades farmacéuticas, con la generación de compuestos de reserva (TAG) con potencial aplicación tecnológica y con la biosíntesis de lípidos complejos, estos últimos esenciales para la permeabilidad de la pared celular y patogenicidad en algunas especies patogénicas. Debido a esto, una caracterización detallada de los principales metabolitos intermediarios del metabolismo lipídico, los acil-CoAs, provee una herramienta importante para empezar a descifrar rutas metabólicas poco entendidas que pueden tener un gran impacto en la biología, biotecnología y patogenicidad asociada a este grupo de bacterias.

En esta parte de la tesis se desarrolló un método de IP-RP-HPLC/ESI-HRMS para identificar y cuantificar un amplio rango de acil-CoAs de manera confiable en diferentes actinomicetos. Por IP-RP-HPLC se separan acil-CoAs de cadenas aciladas de entre 2 y 26 carbonos los cuales son luego analizados por ESI-HRMS donde cada acil-CoA es determinado por su masa exacta y patrón isotópico del ion principal [(M-H)-]. Una vez obtenida la masa exacta y el patrón isotópico es posible inferir la composición elemental, lo cual sumado a una coherencia cromatográfica comparada con los estándares comerciales y la corroboración de su patrón de fragmentación posterior por MS/MS, posibilita la determinación de todo el conjunto de acil-CoAs presentes en una muestra. El método requiere una preparación de muestra simple donde los tioésteres de CoA permanecen estables por varios meses al guardarlos a -80 °C. Además, y a diferencia de los métodos que usan MS/MS para la identificación de analitos previamente conocidos y seleccionados para su determinación, este método permite la identificación de todos los derivados de CoA presentes en una muestra sin selección previa. Esto permite re-analizar los datos crudos en cualquier momento y determinar la presencia de analitos nuevos o inesperados que no hayan sido reportados previamente sin la necesidad de preparar la muestra o realizar nuevamente su análisis como es el caso de la mayoría de los métodos publicados. La utilidad del método no dirigido y la posibilidad de re-analizar los datos, se hizo evidente en este trabajo en el estudio de la  $\beta$ -oxidación de FA exógenos y la determinación de los carboxi-acil-CoAs. Los intermediarios de la  $\beta$ -oxidación en *M. smegmatis* y los distintos acil-CoAs

carboxilados en las distintas especies fueron encontrados analizando datos de experimentos previos sin necesidad de preparar o correr muestras nuevamente.

La envoltura celular compleja que rodea a la mayoría de los actinomicetos, y la variación en la polaridad y solubilidad de los acil-CoAs con un amplio rango de largos de cadena acilada y diferentes números de insaturaciones, presentó un desafío a la hora de diseñar la extracción. Tuvimos entonces que optimizar un protocolo de ruptura celular y desarrollar un sistema de solventes apropiado que asegure una extracción completa y disminuya la posibilidad de obtener sesgo por el largo de la cadena carbonada en el proceso de purificación.

El método desarrollado permitió el análisis, en una sola corrida, del perfil completo de acil-CoAs de *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG, *C. glutamicum* y *S. coelicolor*. Esta es una clara mejora respecto a otros métodos analíticos que no analizan el espectro completo de acil-CoAs presente en estas muestras (72,100). Los perfiles de acil-CoAs obtenidos concuerdan con la composición de FA reportada para los diferentes organismos analizados en esta tesis (114,115) y además confirman la actividad bimodal reportada para la FAS-I de micobacterias, la cual se conoce que sintetiza y libera tanto acil-CoAs de cadena larga (C<sub>14-18</sub>-CoA) como de cadena muy larga (C<sub>24-26</sub>-CoA) (104,116). Los resultados mostrados en la Tabla 5 revelan grandes diferencias en los niveles de acil-CoAs y su distribución entre los tres géneros de bacterias y las subespecies analizadas. Acil-CoAs de cadena muy larga fueron sólo encontrados en células del género *Mycobacterium* pero con diferencias entre ambas especies analizadas. Como se esperaba en base a las propiedades reportadas de las enzimas FAS-I de *M. smegmatis* y *M. bovis* BCG (116), el C<sub>26</sub>-CoA sólo fue detectado en *M. bovis* BCG mientras que en *M. smegmatis* sólo se encontró hasta C<sub>24</sub>-CoA. Por otro lado, la enzima FAS-I de *Corynebacterium* sólo sintetiza acil-CoAs de cadena larga (hasta 18 carbonos). El palmitoil-CoA (C<sub>16:0</sub>), estearoil-CoA (C<sub>18:0</sub>) y oleoil-CoA (C<sub>18:1</sub>) fueron los principales acil-CoAs encontrados en esta bacteria (Tabla 5).

Nuestro laboratorio está estudiando el metabolismo lipídico en micobacterias y actinomicetos relacionados. Grandes esfuerzos se han invertido en el estudio de la estructura y biosíntesis de los FA únicos encontrados en los lípidos complejos que conforman la envoltura celular de *M. tuberculosis* (29). Esto se debe principalmente, a

que las enzimas involucradas en su metabolismo son potenciales blancos selectivos para el desarrollo de drogas antimicobacterianas o para su uso en procesos biotecnológicos (117,118). Sin embargo, todavía hay algunos aspectos de la biosíntesis de FA en micobacterias que necesitan ser esclarecidos para entender completamente los procesos regulatorios complejos involucrados en el mantenimiento de homeostasis lipídica en estos microorganismos.

Así, la posibilidad de determinar el perfil completo de acil-CoAs (de C<sub>2</sub> a C<sub>26</sub>) en micobacterias en un único experimento, provee una herramienta importante para el análisis de los efectos de nuevos antibióticos dirigidos hacia la biosíntesis de lípidos o su regulación, así como para el análisis de diferentes cepas mutantes que poseen dañado o alterado su metabolismo lipídico.

Los MA son  $\alpha$ -alquil  $\beta$ -hidroxi-ácidos grasos de cadena muy larga. Siendo el componente mayoritario y más específico de la envoltura celular micobacteriana, los MA han probado ser esenciales para la supervivencia de *Mycobacterium* (47). En el contexto alarmante de la emergencia de cepas clínicas de tuberculosis multi-resistente, extremadamente resistente y totalmente resistente, entender la biosíntesis de estas moléculas críticas es importante debido a que puede allanar el camino para el desarrollo de nuevos agentes antimicobacterianos. Las cadenas  $\alpha$  de estos MA son específicas de cada especie y varían su largo de acuerdo a cada organismo. Así, las corinebacterias tienen la cadena  $\alpha$  más corta de todas las bacterias que contienen MA, 16 carbonos, mientras que *M. smegmatis* presenta una cadena  $\alpha$  de 24 carbonos, y las distintas especies que componen el Complejo-*M. tuberculosis* tiene principalmente 26 carbonos en la cadena  $\alpha$  (47).

En este sentido, el método desarrollado no sólo permite la identificación y cuantificación de acil-CoAs de cadena larga sino también la de sus formas activadas (2-carboxi-acil-CoAs), las cuales son finalmente convertidas en las cadenas  $\alpha$  de los diferentes MA de estos organismos (Tabla 5).

Finalmente, este método analítico fue también utilizado para estudiar los cambios intracelulares de acil-CoAs que ocurren durante la degradación de FA o como resultado de la inhibición de la síntesis de los mismos por el agregado de los antibióticos Cer e INH. Como se mencionó anteriormente, la FAS-I de micobacterias presenta un

comportamiento bimodal, liberando acil-CoAs de cadena larga (C<sub>16-18</sub>-CoA) así como de cadena extremadamente larga (C<sub>24</sub>-CoA) en *M. smegmatis* (104,116). El descubrimiento de niveles reducidos de C<sub>24</sub>-CoA en células tratadas con INH fue inesperado debido a que previamente había sido reportado la acumulación del FA C<sub>24</sub> luego del mismo tratamiento(113). Sin embargo, a diferencia del trabajo de Vilchèze, nosotros medimos el C<sub>24</sub>-CoA y no el FA C<sub>24</sub> total luego de una hidrólisis completa de la muestra. Por lo tanto, podría estar sucediendo que debido a la toxicidad del C<sub>24</sub>-CoA, al empezarse a acumular, rápidamente se incorpore a lípidos de reserva (TAG) para adoptar formas menos nocivas y así observar como resultado final una disminución del mismo y un aumento del contenido total de FA C<sub>24</sub> de la célula.

Luego de haber sido publicado el desarrollo del método (119) y el mismo haber sido utilizado en otros trabajos del grupo (65,120) nos planteamos como perspectiva una actualización del mismo en el análisis por MS. Si bien el método actual permite una determinación fiable de los analitos, que fue corroborado numerosas veces por análisis de fragmentación adicionales, sería deseable que dicha corroboración se realice en la misma corrida, de manera automática para todos los compuestos. Planteamos entonces la posibilidad de utilizar el modo MS/MS automático o DDA, el cual permitiría tener en los datos crudos espectros de fragmentación de prácticamente todos los analitos ionizados encontrados en una muestra y que se encuentra disponible en todos los equipos Qq-TOF. De esta manera, se añadiría una evidencia más de la identidad de la molécula, la cual puede ser muy útil a la hora de la identificación de derivados de CoAs que no hayan sido previamente reportados en un determinado organismo.

La relevancia de los acil-CoA, no sólo como intermediarios de la síntesis de FA, lípidos complejos y policétidos, sino también como moléculas señal involucradas en regulación transcripcional, modificación de proteínas y otros metabolismos celulares, subraya la importancia de tener un método simple, robusto y confiable para identificar y cuantificar el perfil completo de derivados de CoA. El método desarrollado en este trabajo cumple con todos estos criterios y debería poder ser ampliamente aplicado en un conjunto diverso de estudios metabólicos.

## 4.2 CAPÍTULO II

### Análisis lipidómicos en micobacterias

#### 4.2.1 Introducción

Los lípidos son moléculas ubicuas en todos los organismos, diversos estructuralmente y con numerosas funciones biológicas. Estos no sólo sirven como precursores en la formación de membranas y como fuente de energía, sino que también están involucrados en procesos biológicos tales como señalización e interacción célula-célula, entre otros. La determinación clásica de lípidos es a través de la cromatografía de capa delgada (TLC). Este es un método económico y sencillo, pero muy limitado a la hora de resolver diferencias entre lípidos de una misma clase que poseen, por ejemplo, distintas insaturaciones o largos de cadena carbonada. La MS en cambio, y en particular utilizando ionización por ESI, es la principal tecnología que posibilita analizar estas moléculas a nivel individual (121). Así, los avances tecnológicos en MS, como el aumento en la resolución, precisión, velocidad de escaneo y mayor reproducibilidad, sumado al hecho que los lípidos estén asociados a enfermedades como la diabetes, obesidad, arteriosclerosis o Alzheimer, ha propiciado la aparición de la lipidómica como disciplina (121-124). Ésta es parte de una tendencia relativamente novedosa en la ciencia, que utiliza técnicas de estudio de biomoléculas globales no-dirigidas, y se conocen como disciplinas ómicas: genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica. La genómica fue la precursora de este tipo de disciplinas y el concepto de análisis no-sesgados atrajo la atención sobre el campo de las ómicas. El potencial de estas disciplinas es realmente enorme debido al impacto que tienen en el descubrimiento y desarrollo de drogas, búsqueda de biomarcadores y el estudio de sistemas biológicos (125-128). El objetivo de la lipidómica, a veces considerado como parte de la metabolómica, es la determinación exhaustiva de los lípidos presentes en una célula, tejido o fluido biológico y la detección de la respuesta lipídica asociada a diversos estímulos, desde una enfermedad o un tratamiento farmacológico a una condición de crecimiento o una mutación en un microorganismo.

A diferencia de los metabolismos centrales estudiados en la metabolómica convencional, los lípidos son en su mayoría metabolitos secundarios que muestran una variación significativa entre distintos organismos. Lipidomas de organismos patógenos,

distintos de los organismos modelos tradicionales como el ser humano o *E. coli*, están empezando a ser estudiados sistemáticamente. Estos incluyen *Candida albicans*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma*, *Leishmania donovani* y *Mycobacterium tuberculosis* (129). El grado de solapamiento de los perfiles lipídicos entre organismos modelo y organismos de importancia clínica puede ser sorprendentemente bajo. Por lo tanto, para realizar estudios globales de lípidos en estas especies, es necesario crear bases de datos de lípidos de patógenos de forma individual.

Los miembros del género *Mycobacterium* producen uno de los lipidomas más complejos y singulares. Se estima que el 8 % del genoma de las micobacterias codifica alrededor de 250 enzimas asociadas a la biosíntesis de su repertorio lipídico, a diferencia de las 50 enzimas involucradas en la síntesis de lípidos en *E. coli* (130). Estas enzimas producen lípidos apolares, glicolípidos, lipoproteínas y lipoglicanos, que pueden llegar a componer el 40 % del peso seco de la bacteria (24). Siendo la TB una enfermedad ampliamente distribuida, y al poseer los lípidos micobacterianos numerosas propiedades inmunológicas y de virulencia, se han realizado esfuerzos sistemáticos para establecer el lipidoma global de *M. tuberculosis* y otras micobacterias asociadas (34,73,131,132). La base de datos *MycoMass* es uno de los resultados de estos esfuerzos. La misma contiene 5000 especies teóricas de lípidos clasificados en 58 familias lipídicas, de las cuales 40 familias no se encuentran en las bases de datos de los organismos modelos tradicionales. A excepción de algunos glicerofosfolípidos encontrados en la membrana interna de las micobacterias, la mayoría de las estructuras lipídicas producidas por estos organismos sólo se encuentran dentro del género *Mycobacterium* y actinomicetos relacionados. Esto demuestra la necesidad de catalogar y organizar los lípidos de organismos con significancia clínica.

Idealmente, los perfiles lipidómicos por MS determinan de manera cuantitativa y reproducible todos los lípidos de cualquier muestra biológica, sin sesgo o necesidad de optimizar para una especie en particular. Esta metodología no-dirigida, se diferencia de las técnicas dirigidas (*targeted*), en que estas últimas se enfocan sólo en el análisis de uno o un conjunto limitado de lípidos predeterminados, para los cuales se optimiza desde la preparación de la muestra hasta la separación y detección. La lipidómica no dirigida en cambio, es un enfoque integral que posibilita la cuantificación de cientos de

especies de manera simultánea permitiendo así revelar diferencias lipídicas en muestras sin ningún conocimiento previo.

Uno de los desafíos analíticos en este tipo de enfoques no dirigidos es la diversidad y complejidad en la composición lipídica de la muestra, tanto en términos estructurales como de concentración. Este problema se incrementa en el caso de las micobacterias debido a su extrema complejidad lipídica. En este sentido, HPLC acoplada al sistema de MS facilita la separación de múltiples clases lipídicas previo al análisis por MS. De esta manera, se simplifica la complejidad de la muestra en la entrada del analizador y se disminuye la supresión iónica a nivel de la ionización. A su vez, la separación cromatográfica, ya sea de fase reversa o fase normal, brinda información cualitativa sobre la hidrofobicidad relativa de los analitos a través del tiempo de retención.

El uso de HRMS brinda información sobre la masa exacta de cada ion, lo que permite inferir la fórmula molecular y la posible identidad del compuesto utilizando bases de datos. Finalmente, la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) provee información estructural única para ayudar no sólo a identificar familias de lípidos de manera precisa sino también a discriminar compuestos isoméricos, ya sean lípidos de distintas familias o lípidos de la misma familia con distintos sustituyentes. Estas especies isoméricas muchas veces co-eluyen (133), y por lo tanto son indistinguibles sólo por su masa exacta y tiempo de retención. De esta manera, los instrumentos que posibilitan hacer LC-HRMS/MS, como el FT-ICR, Qq-TOF y Orbitrap, predominan en la literatura relacionada a la lipidómica (134–136).

Otros métodos de análisis de lípidos por MS son los que utilizan instrumentos triple cuádruplo. Estos han probado ser valiosos para la detección de clases específicas de lípidos a través de técnicas dirigidas (*targeted*) tales como escaneo de iones precursores (*precursor ion scanning-PIS*) y de pérdidas neutras (*neutral loss scanning-NIS*) (137). Por otro lado, existen también métodos que solamente se valen de la MS y no utilizan separación por cromatografía líquida (LC) para la determinación de lípidos. Este enfoque se denomina lipidómica tipo escopeta (*shotgun*), y utiliza una separación de los compuestos en la fuente ESI para ampliar la cobertura (138). Se han reportado resultados realmente impresionantes con esta técnica pero inevitablemente por ahora

los espectrómetros pueden lidiar sólo con cierta complejidad, tienen un rango dinámico *in-spectrum* limitado y son sensibles a la supresión iónica (139).

#### 4.2.2 Objetivos

En esta parte del trabajo nuestro objetivo fue desarrollar un método semi-cuantitativo para el análisis de lípidos totales en micobacterias. Los objetivos particulares fueron:

- Poner a punto una extracción que nos permita obtener la mayor diversidad de lípidos con la mayor eficiencia en este tipo de muestras.
- Lograr una separación de las distintas familias de lípidos por cromatografía y optimizar su detección por MS.
- Establecer un protocolo informático semi-automatizado que permita el manejo de la gran cantidad de datos a analizar.
- Validar el método determinando las abundancias relativas de los distintos lípidos en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*.

#### 4.2.3 Resultados

##### 4.2.3.1 Desarrollo de un método semi-cuantitativo para el análisis del perfil de lípidos totales

Como se dijo previamente, los miembros del género *Mycobacterium* producen uno de los lipidomas más complejos y singulares. La baja polaridad de los MA y los lípidos complejos de las micobacterias contrastan con la alta polaridad relativa de los PL que predominan en las células de mamíferos. Esto llevó a que, en la optimización de un método de análisis lipidómico por LC-MS para micobacterias, para la extracción hayamos tenido que utilizar solventes de alta hidrofobicidad comparado con los

métodos previamente optimizados para PL. Así, para realizar las primeras pruebas comenzamos eligiendo el método de Folch (Cloroformo/metanol 2:1)(140) sobre el método de Bligh y Dyer (Metanol/cloroformo/agua 2:1:0.8)(141) ya que este último utiliza una mezcla menos hidrofóbica. Además, se ha reportado previamente que para muestras con alto contenido lipídico (mayor al 2 %) el método de Bligh y Dyer no logra extraer la totalidad de los lípidos (142). Luego ensayamos un método modificado que contiene ambas extracciones, similar al descrito por Stadthagen *y col* (143). Brevemente, se realizó una extracción Folch durante toda una noche en frío, luego se volvió a extraer utilizando metanol/cloroformo 2:1 y finalmente se sumaron las fases orgánicas y se lavaron con cloroformo/agua 1:1. Comparando ambas extracciones pudimos observar que con esta última se extraía una mayor cantidad de PL polares, PE en particular, que en la extracción Folch original. Decidimos entonces utilizar esta extracción modificada en los ensayos posteriores. La normalización de las muestras se realizó pesando los lípidos extraídos en tubos previamente tarados. Así, todas las muestras fueron disueltas en cloroformo a la misma concentración final y la misma cantidad de lípidos fue inyectada en el sistema de LC.

Otro de los desafíos que se nos presentaron fue el diseño de la separación cromatográfica. Decidimos realizar una cromatografía en fase reversa ya que la misma es compatible con la MS y teníamos disponibles columnas C18 y C8. Al igual que en la etapa de extracción, el carácter hidrofóbico de muchas de las moléculas de las micobacterias (TAG, PDIMs, MAs) hizo que tengamos que utilizar solventes muy hidrofóbicos para poder eluir estos compuestos de la columna de fase reversa. Los solventes apolares no son compatibles con LC-MS ya que no favorecen la ionización de los analitos en el ESI e impiden su detección en el espectrómetro. Necesitamos entonces buscar un equilibrio entre eluyentes que permitieran realizar la cromatografía y solventes más polares que permitieran la detección de los compuestos por MS. Fue importante en este punto asegurarse la elusión completa de todos los lípidos para evitar contaminaciones entre las inyecciones sucesivas. Comenzamos utilizando una columna C8, de 300 Å de ancho de poro promedio y 150 mm de largo (Zorbax 300 SB-C8; 2.1 mm x 150 mm x 5 µm), con el siguiente perfil de elusión: 60 % fase móvil A [H<sub>2</sub>O, conteniendo 5 mM AcNH<sub>4</sub>] y 40 % de fase móvil B [Metanol/isopropanol, conteniendo

5 mM AcNH<sub>4</sub>] 1 min; gradiente de 14 min hasta 100 % de fase móvil B; 100 % de fase móvil B durante 10 min. Los primeros resultados se obtuvieron utilizando este sistema, pero resultaba en una cromatografía muy extendida con un ciclo total de 32 min. Finalmente, para acortar tiempos se cambió a una columna más corta, de 50 mm, y se empleó un ciclo cromatográfico total de 16 min (Figura 7). Se utilizaron como solventes de corrida CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (99:1, v/v, Fase móvil A) e isopropanol:hexano:H<sub>2</sub>O (79:20:1, v/v, Fase móvil B).

La detección de los lípidos luego de la separación cromatográfica se realizó mediante ionización por ESI acoplado a un espectrómetro Qq-TOF. Los parámetros del sistema debieron ajustarse para que puedan detectarse tanto los MA y lípidos complejos de alto peso molecular como también los lípidos más pequeños. Las moléculas de masas más altas y alta hidrofobicidad requieren altas energías de ionización y menores flujos de gas contra corriente en la interfaz del ESI comparado con los métodos previamente optimizados para PL (73). Cada muestra fue analizada en ambos modos de ionización: positivo para moléculas neutras (diacilglicerol o DAG, TAG, PDIM y lípidos complejos compuestos por MA) y negativo para moléculas con grupos acídicos ionizables (PLs, FAs, MAs y SGLs). Para poder observar las moléculas neutras fue necesario agregar a los solventes AcNH<sub>4</sub> y propiciar la formación del aducto [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>. El resto de los iones se detectó, en modo negativo, como [M-H]<sup>-</sup>. Finalmente, se utilizó un modo de colección de datos denominado DDA. Esto permite hacer MS/MS automáticamente a los iones de mayor intensidad en un espectro. De esta manera, se obtuvieron los espectros de MS/MS de la mayoría de los lípidos, sumando así evidencia estructural para su identificación. La fragmentación se realizó por CID.

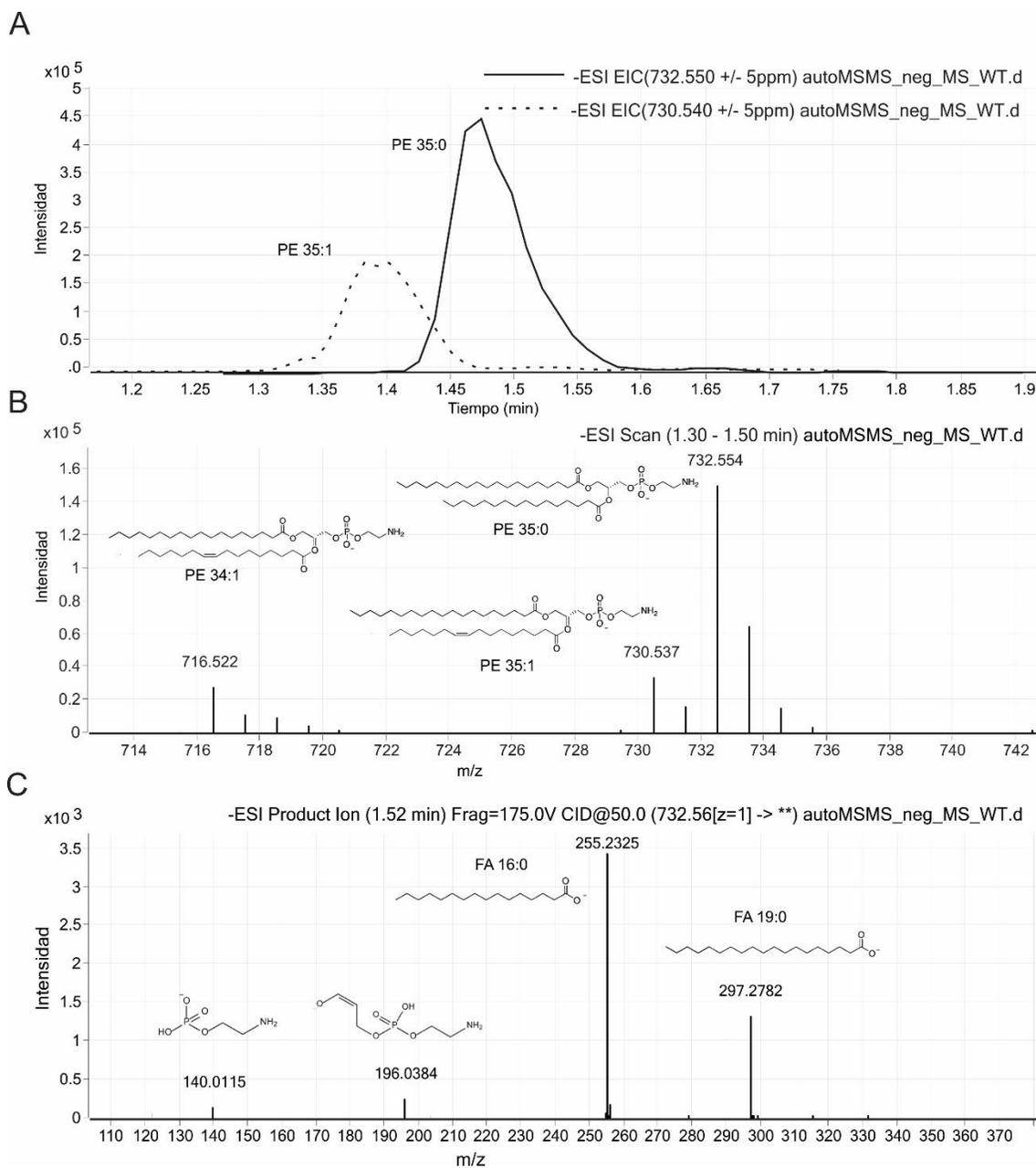
El siguiente paso fue la determinación de las especies de lípidos que podían ser identificadas y cuantificadas en ensayos comparativos. Para esto, en primer lugar se buscaron en los espectros obtenidos los iones de los lípidos reportados para cada una de las especies analizadas utilizando la base de datos *MycoMass* (73). Una vez obtenida la lista de m/z tentativa, la misma fue filtrada de la siguiente manera:

- Se mantuvieron sólo los iones monocargados y monoisotópicos.
- Se compararon los patrones isotópicos, dejando sólo aquellos cuyo perfil correspondía con la fórmula molecular del lípido correspondiente.

- Se comprobó que hubiera coherencia cromatográfica respecto a la hidrofobicidad entre las distintas clases y dentro de la misma clase. Por ejemplo, los iones que se asignan a DAG deben eluir antes que los TAG, o los lisoPL antes que sus respectivos PL. Dentro de una misma clase, los de mayor largo de cadena o mayor grado de saturación deben ser los más retenidos (Figura 14A).

Finalmente, se corroboró la identidad de cada una de las especies con la información estructural aportada por los espectros de MS/MS. La fragmentación brinda información sobre el esqueleto carbonado, los FA sustituyentes y la clase de lípido, ya que se producen pérdidas neutras o iones fragmentos característicos de cada familia por la ruptura de los enlaces entre el esqueleto carbonado y los sustituyentes (133,144). Fue necesario probar distintas energías de colisión, en el modo MS/MS automático, para que las distintas familias de lípidos liberen los fragmentos característicos que permitan identificarlas.

En la Figura 14B se pueden observar los iones correspondientes a tres especies de PE y sus patrones isotópicos. En la Figura 14C se observa el espectro de masa en tándem para el ion  $m/z = 732.56$ , correspondiente a la PE 35:0. En este mismo se pueden observar tanto los FA sustituyentes, el  $C_{16:0}$  ( $m/z = 255.23$ ) y el  $C_{19:0}$  ( $m/z = 297.27$ ), como los fragmentos característicos de la cabeza polar de la PE que corroboran la identidad del compuesto ( $m/z = 140.01$  y  $196.03$ )(144,145). Podemos afirmar entonces en este caso, que el ion  $m/z = 732.56$  corresponde a la PE (16:0/19:0) sin especificar la posición de cada uno de los FA sustituyentes.



**Figura 14. Identificación de PE (16:0/19:0) por MS y MS/MS.** A. Cromatograma de ion extraído (EIC) de los iones  $m/z = 732.55$  y  $730.34$  correspondientes a la PE 35:0 y PE 35:1 respectivamente. B. Espectros de MS de la región del cromatograma donde eluyen PE 34:1, PE 35:1 y PE 35:0 con sus correspondientes estructuras. C. Espectro de MS/MS del PE 35:0 (16:0/19:0). Se observan los fragmentos y estructuras de los FA sustituyentes ( $m/z = 255.23$  y  $297.28$ ) e iones característicos para las PE ( $m/z = 140.01$  y  $196.03$ ).

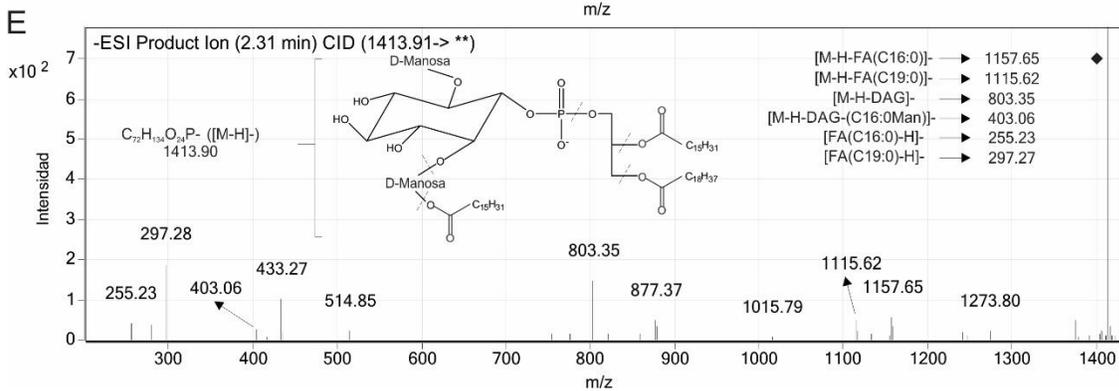
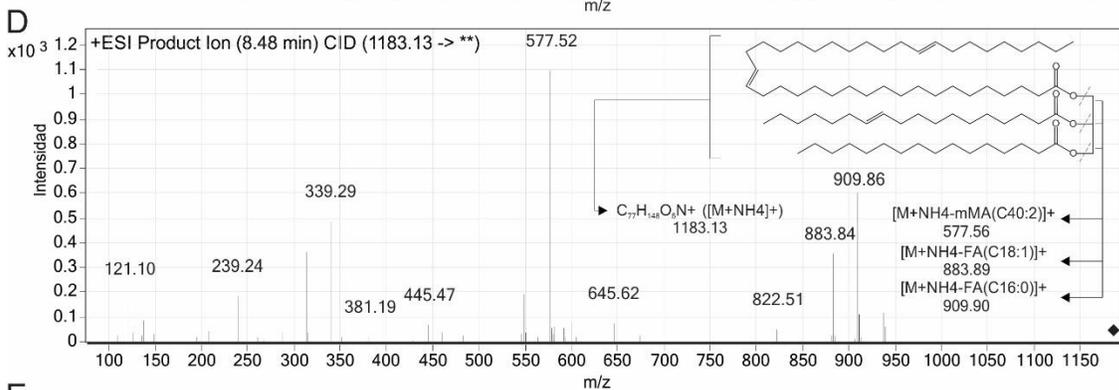
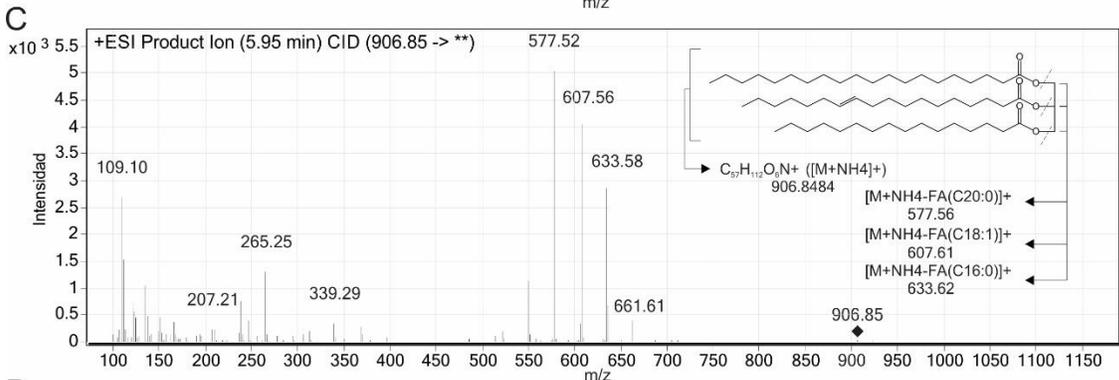
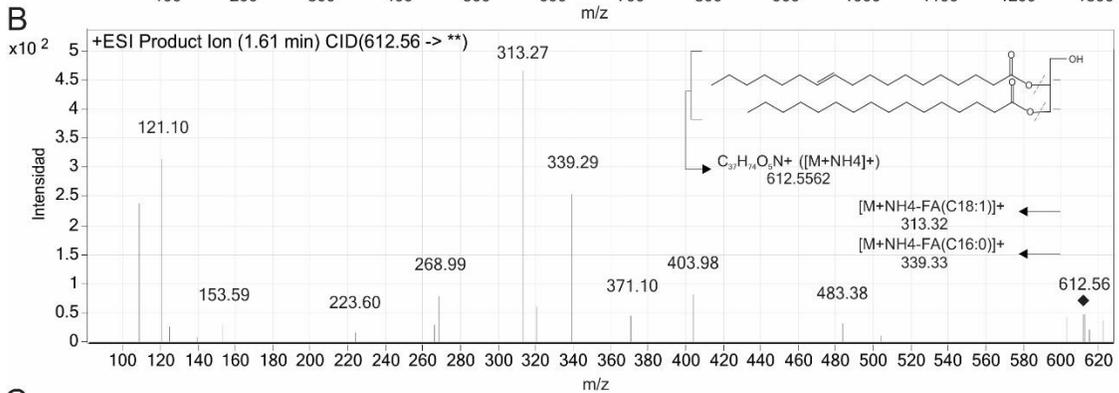
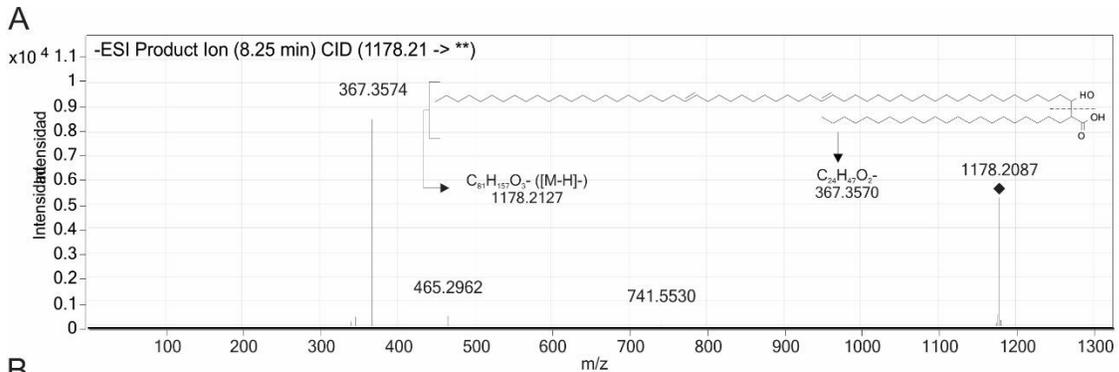
En el caso de los MA,  $\alpha$ -alquil  $\beta$ -hidroxi ácidos grasos de cadena muy larga y los principales lípidos en micobacterias, su identificación por MS/MS es más sencilla. Estas moléculas liberan su cadena  $\alpha$  al fragmentarlas por CID permitiendo, además de su identificación, la caracterización de los mismos según el producto de FAS-I utilizado en su síntesis (146). Más aún, en un espectro de MS/MS suele observarse un ion que libera varias cadenas alfa (20, 22 y 24 carbonos en *M. smegmatis* o 24 y 26 carbonos en *M. tuberculosis*). Esto sucede porque en realidad el ion seleccionado para fragmentar corresponde a una serie de isómeros de MA cuya cadena alfa sumado a la meromericólica suman el mismo número de carbonos. De esta manera, uno puede inferir los productos de FAS-I que están siendo condensados para formar MA y su distribución relativa en una determinada condición. En la Figura 15A se puede observar el espectro obtenido de la fragmentación del MA  $\alpha$  de 81 átomos de carbono ( $m/z = 1178.20$ ) de *M. smegmatis*, del cual se libera una cadena  $\alpha$  de 24 carbonos ( $m/z = 367.35$ ).

En cuanto a los lípidos neutros, en la Figura 15B y C se muestran los espectros de MS/MS del DAG 34:1 y del TAG 54:1 respectivamente. En general, cuando los iones  $[M+NH_4]^+$  de los DAG son activados por CID, se produce una pérdida neutra del grupo acilo y amonio, dando como producto el fragmento correspondiente al ion monoacilglicerol (MAG). Lo mismo sucede en la fragmentación de los TAG, dando como resultado el fragmento correspondiente al ion DAG (147,148). De esta manera, en las muestras analizadas se pudo determinar no sólo la identidad sino los sustituyentes de estos lípidos. En el caso del DAG 34:1, se observan los iones  $m/z = 313.27$  y  $339.29$  correspondientes a las pérdidas neutras de los FA  $C_{18:1}$  y  $C_{16:0}$ . Así, el DAG 34:1 corresponde a la especie DAG (18:1/16:0). De la misma manera, el TAG 54:1 liberó los iones  $m/z = 577.72$ ,  $607.56$  y  $633.58$  por lo que se trata del TAG (20:0/18:1/16:0). En este último caso puede observarse la pérdida de un segundo acilo dando como resultado el MAG 18:1 ( $m/z = 339.29$ ). Las diferencias de intensidad de las mismas se deben a que a mayor largo de cadena la ruptura tiende a estar más favorecida ( $313.27 > 339.29$  y  $577.72 > 607.56 > 633.58$ ).

Otro de los lípidos neutros que se identificó es el mmDAG. Este compuesto de reserva es característico de las micobacterias y está constituido por un DAG en el cual el hidroxilo libre del glicerol está esterificado con una molécula de ácido meromericólico.

Al tener una estructura similar a los TAG, los mmDAG siguen las mismas reglas de fragmentación por CID (149). En la Figura 15D, se muestra la fragmentación del mmDAG 74:3. En esta se observan los iones  $m/z = 906.86$ ,  $883.84$  y  $577.52$  correspondientes a las pérdidas neutras de los FA 16:0 y 18:1; y el ácido meromicólico 40:2 respectivamente. Cabe destacar que por este tipo de ensayo no se puede saber si el ácido meromicólico posee efectivamente dos dobles enlaces, esto uno lo infiere por la masa exacta, pero puede tratarse también de dos ciclopropanos dando como resultado la misma cantidad de carbonos e hidrógenos. Asumimos en este caso que se tratan de dobles enlaces ya que la muestra analizada proviene de *M. smegmatis*, cuyos MA  $\alpha$  poseen dobles enlaces en su estructura, y no de *M. tuberculosis*, que poseen ciclopropanos (47). Tanto en este caso como en la fragmentación del TAG 54:1 se pueden observar los productos de la doble pérdida neutra  $m/z = 313.27$  y  $339.29$  correspondientes a los MAG 16:0 y 18:1.

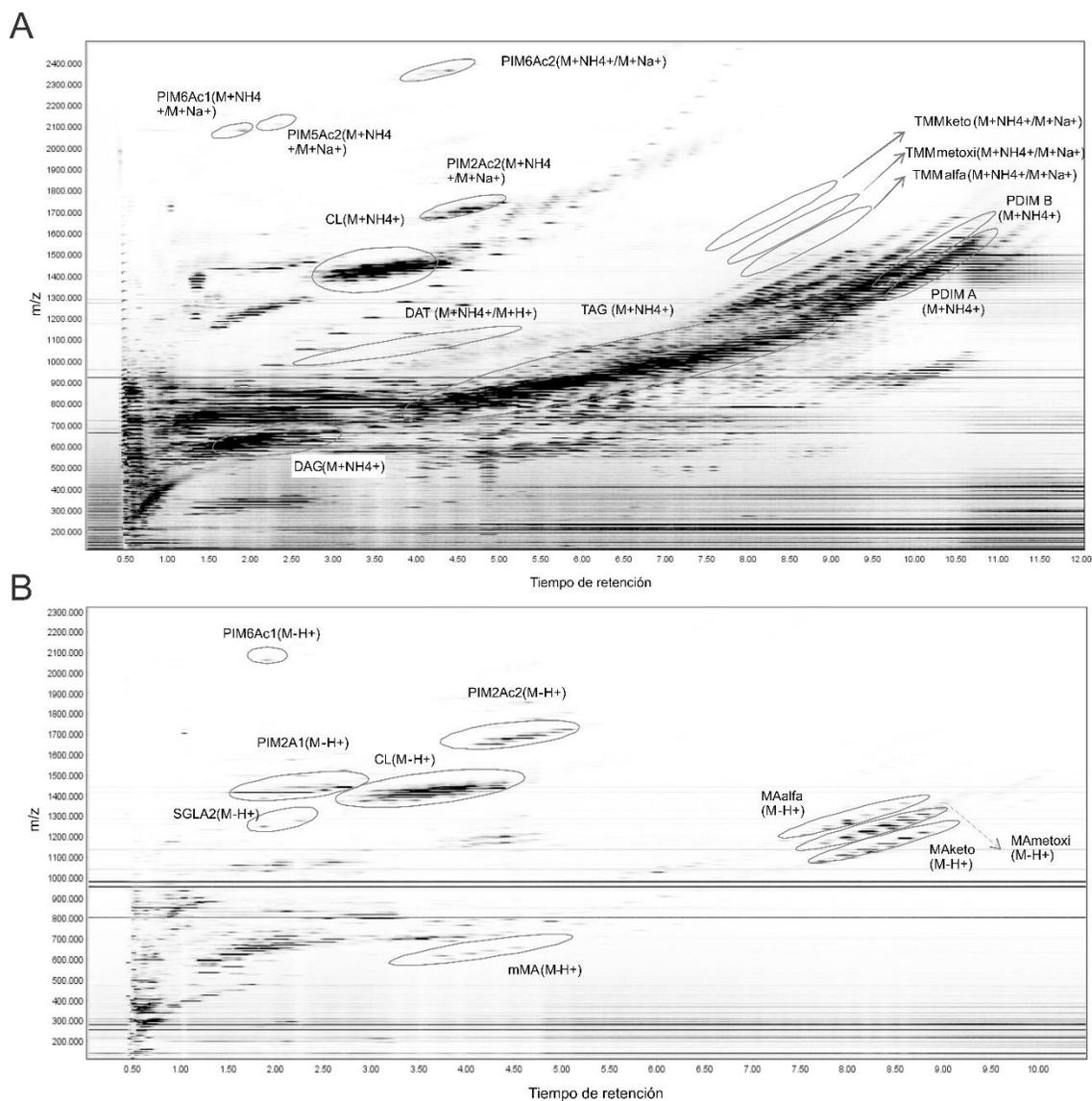
Finalmente, identificamos también una familia de PL esenciales para las micobacterias, los PIMs (150). En este caso elegimos para fragmentar la especie más abundante en *M. smegmatis*, el Ac<sub>1</sub>PIM<sub>2</sub> 51:0 cuyo ion [M-H]<sup>-</sup> posee una relación  $m/z$  de 1413.90. El espectro de MS/MS de este ion fue descrito previamente por Hsu *et al* (151). En la Figura 15E se puede observar el ion parental y los fragmentos que determinan la identidad de la familia y los sustituyentes. Los iones 255.23 y 297.27 corresponden a los FA C<sub>16:0</sub> y C<sub>19:0</sub> liberados y los iones 1157.65 y 1115.62 a la pérdida neutra de los mismos. El ion 803.35 corresponde a la pérdida neutra de un DAG (35:0) confirmando que los sustituyentes del glicerol son los FA C<sub>16:0</sub> y C<sub>19:0</sub>. Se observa por último el ion 403.06 que corresponde a la pérdida del palmitoil-manósido (400 Da) del ion  $m/z = 803.35$  anterior, confirmando que el C<sub>16</sub> es el FA unido a la manosa. Se puede confirmar entonces, con la evidencia mostrada, que la molécula correspondiente al ion  $m/z = 1413.90$  es el Ac(16:0)PIM<sub>2</sub>(16:0/19:0) (151).



**Figura 15. Espectros de fragmentación de distintos lípidos en micobacterias.** A. Espectro de MS/MS del MA  $\alpha$  de 81 carbonos, se observa la liberación de la cadena  $\alpha$  de 24 carbonos. B. Espectro de MS/MS del DAG 34:1. Los FA sustituyentes son: 16:0 y 18:1. C. Espectro de MS/MS del TAG 54:1. Los FA sustituyentes son: 20:0, 16:0 y 18:1. D. Espectro de MS/MS del mmDAG 74:3. Los sustituyentes son: los FA 16:0 y 18:1; y el ácido meromicólico 40:2. E. Espectro de MS/MS del AcPIM<sub>2</sub> 51:0. Los sustituyentes en el diacilglicerol son los FA 16:0 y 19:0; y en la manosa el FA 16:0. El rombo negro señala el ion seleccionado para fragmentar.

Una vez identificados los lípidos a analizar y previo a la cuantificación, se analizó la cantidad de muestra a inyectar para no saturar el sistema. Para esto se inyectaron distintos volúmenes de un extracto lipídico de *M. tuberculosis* y de *M. smegmatis* de concentración 1 mg/mL. Luego, se analizó la señal obtenida para las distintas clases de lípidos con distintas cantidades de extracto y se eligió aquella en la cual ninguna de éstas saturaba. Generalmente, los compuestos muy apolares como los TAG, PDIM e incluso las CL pueden ionizarse como dímeros ([2M-H]<sup>-</sup> o [2M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>) cuando entran al ESI en alta concentración. Esto, entre otros fenómenos, puede hacer que la respuesta por MS a la concentración del analito deje de ser lineal a concentraciones elevadas.

Finalmente, se generaron de manera manual tablas conteniendo los m/z de los iones (monoisotópicos) y tiempo de retención cromatográfico de todos los lípidos a cuantificar en ambos modos y ambas especies. Estas tablas fueron usadas para integrar de manera automática la señal correspondiente a cada lípido detectado utilizando el software libre MZmine2 (74). Así, en *M. smegmatis* se analizaron 679 especies de lípidos distintas (333 en modo positivo; 346 en modo negativo) y en *M. tuberculosis* 755 especies (410 en modo positivo; 341 en modo negativo) en cada experimento. Los datos pueden ser visualizados en mapas 2D (Figura 16) para observar diferencias entre distintas condiciones a simple vista o exportados a hojas de cálculo para realizar una cuantificación relativa.



**Figura 16.** Mapa 2D de *M. tuberculosis* en modo positivo (A) y en modo negativo (B). Se detallan algunos de los lípidos identificados.

Existen dos formas de cuantificar un analito en una muestra: cuantificación absoluta o cuantificación relativa (o semi-cuantificación). La primera apunta a lograr determinar la concentración o cantidad de un determinado analito en una muestra y requiere de curvas de calibración o el uso de estándares internos para lograrlo. Este es el caso del método desarrollado para cuantificar acil-CoAs en el Capítulo 1. En un experimento de lipidómica, donde queremos analizar la mayor cantidad de lípidos posibles, para

cuantificar de manera absoluta se deberían usar al menos un estándar por cada clase de lípido. Esto se debe a que cada familia de lípidos posee una sensibilidad distinta a la ionización, la cual también varía entre las especies de una misma familia en relación a los distintos largos de cadena (152). Los estándares a utilizar deben a su vez estar marcados con isótopos estables ( $^{13}\text{C}$ ) o tener un número de carbonos en las cadenas sustituyentes que no se encuentren en las muestras para poder diferenciar el estándar comercial del analito endógeno. En nuestro caso, el uso de estándares internos no fue posible, tanto por el costo como por la disponibilidad de todos los estándares que habría que usar debido a la complejidad de las muestras.

Otra forma de cuantificar es la cuantificación relativa o semi-cuantificación (73,153,154). En este caso, se asigna a cada analito una abundancia relativa al total de analitos analizados. Esta relativización puede ser, por ejemplo, de una especie dentro del total de especies encontradas para una familia de lípidos o de una familia dentro del total de familias detectadas en un modo de ionización. Esta estrategia es muy utilizada también en la proteómica tipo *shotgun* por MS (155) mostrándose los resultados como proteínas que aumentan o disminuyen su abundancia en gráficos tipo volcán. En esta estrategia el valor de entrada es el área del pico cromatográfico de ion extraído.

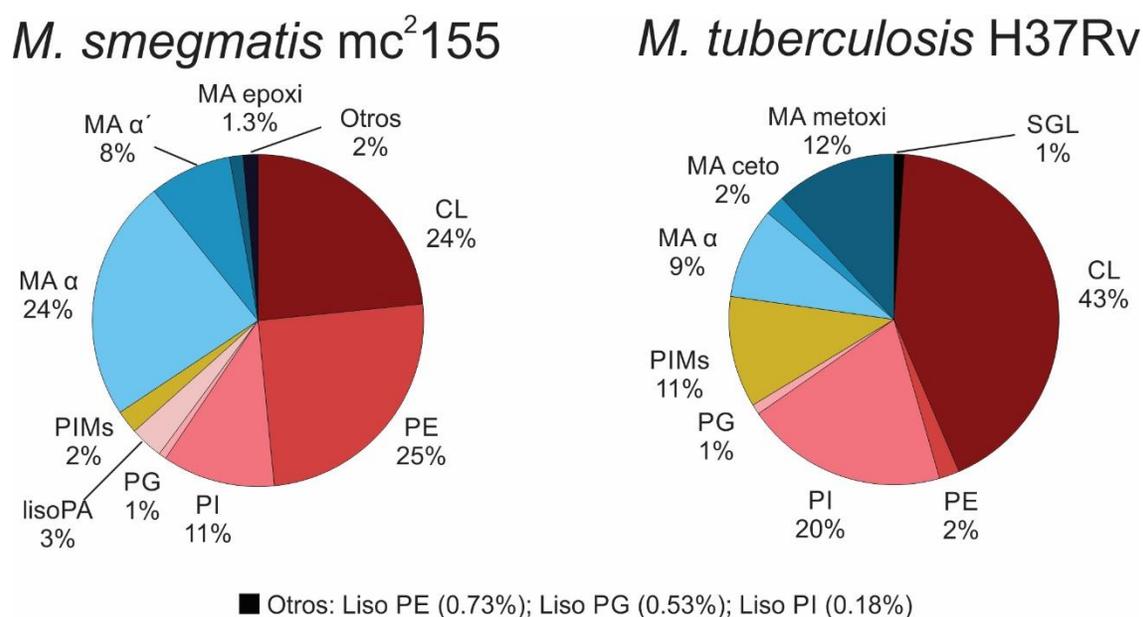
Es importante destacar que, en este tipo de cuantificación, la abundancia relativa obtenida para los distintos compuestos está influenciada por la sensibilidad del sistema de detección para los mismos. En MS las señales obtenidas dependen de la ionizabilidad de los distintos lípidos, por lo que aquellos que ionicen más fácilmente aparecerán sobrerrepresentados en el perfil. Esto quiere decir que no se puede establecer las abundancias relativas dentro de una muestra, pero si realizar comparaciones entre dos condiciones y determinar que especies aumentaron o disminuyeron su proporción respecto del total (73).

La idea de los experimentos de lipidómica que se pretenden desarrollar en esta tesis es poder determinar cómo varía el perfil de lípidos totales entre dos condiciones. Para esto utilizamos entonces una estrategia de cuantificación relativa y la comparación se realiza entre los perfiles de lípidos en cada condición. Para determinar si un cambio en el nivel de una familia de lípidos se modificó de manera significativa entre dos condiciones se realizó una prueba estadística de Student (*t-test*) y una probabilidad

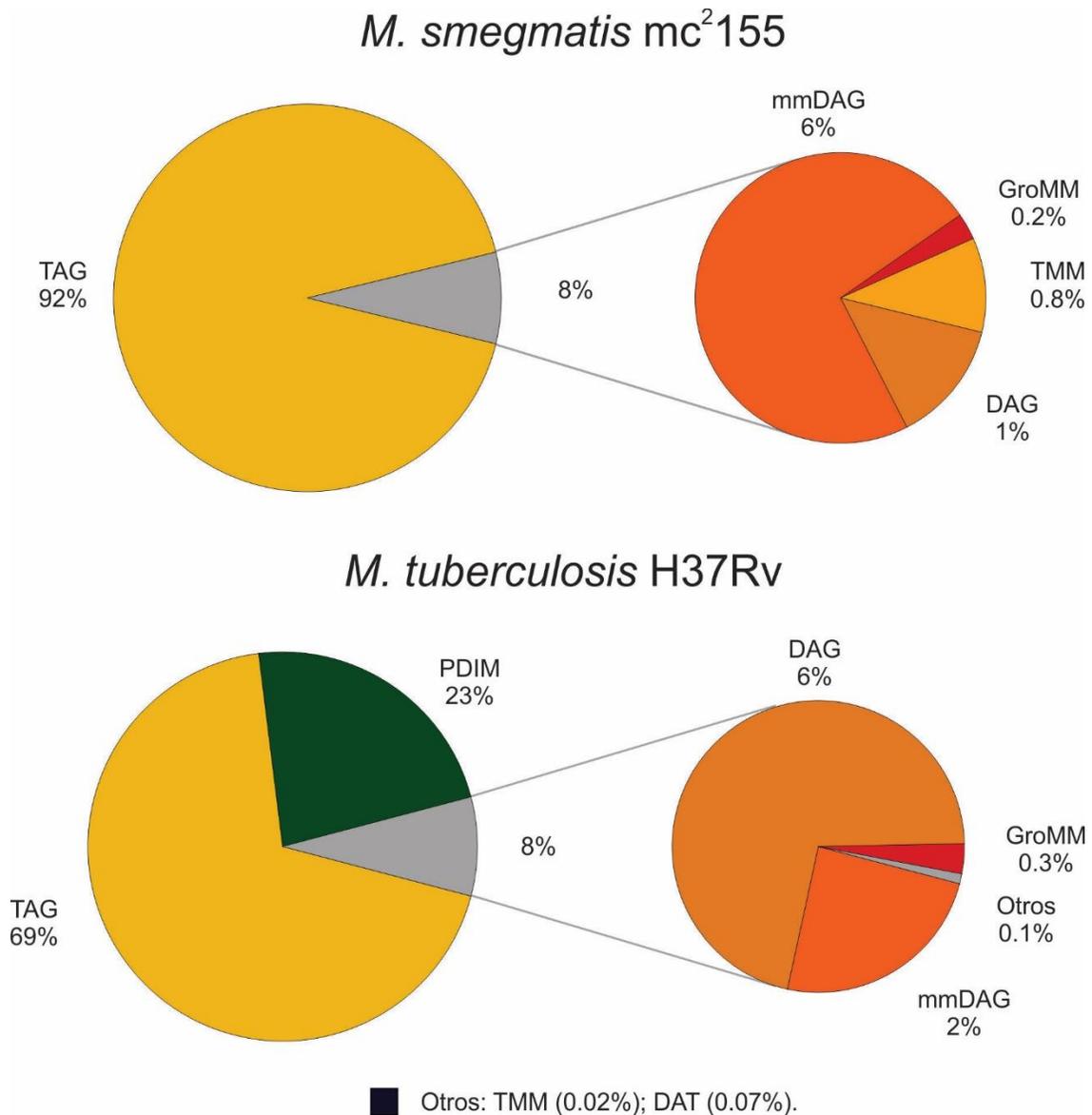
asociada menor a 0.05 ( $p > 0.05$ ), utilizando como valores de entrada las abundancias relativas. Debido a esto cada condición debió analizarse con 3 réplicas biológicas.

#### 4.2.3.2 Perfil lipídico de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*

Una vez puesta a punto la metodología a utilizar y corroborada la identidad de algunos de los compuestos detectados, para probar la fiabilidad del sistema se determinó el perfil total de lípidos de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *M. tuberculosis* H37Rv detectado por LC-MS. El perfil se separó en dos conjuntos para su cuantificación relativa, los lípidos detectados en modo negativo (Figura 17) y aquellos detectados en modo positivo (Figura 18).



**Figura 17. Perfil de lípidos de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *M. tuberculosis* H37Rv determinado por LC-MS en modo negativo.**



**Figura 18.** Perfil de lípidos de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *M. tuberculosis* H37Rv determinado por LC-MS en modo positivo.

Estos perfiles, si bien no reflejan la abundancia absoluta ya que la sensibilidad a la ionización particular de cada familia y cada especie modifican estos resultados, se correlacionan con los porcentajes reportados previamente. A pesar que la proporción entre los PL varía de acuerdo a las condiciones de crecimiento (156), un estudio determinó por TLC que la composición de PL en *M. tuberculosis* H37Rv es PI 67 %, PE 8 % y CL 25 % (157). Por otro lado, en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 se determinó también por

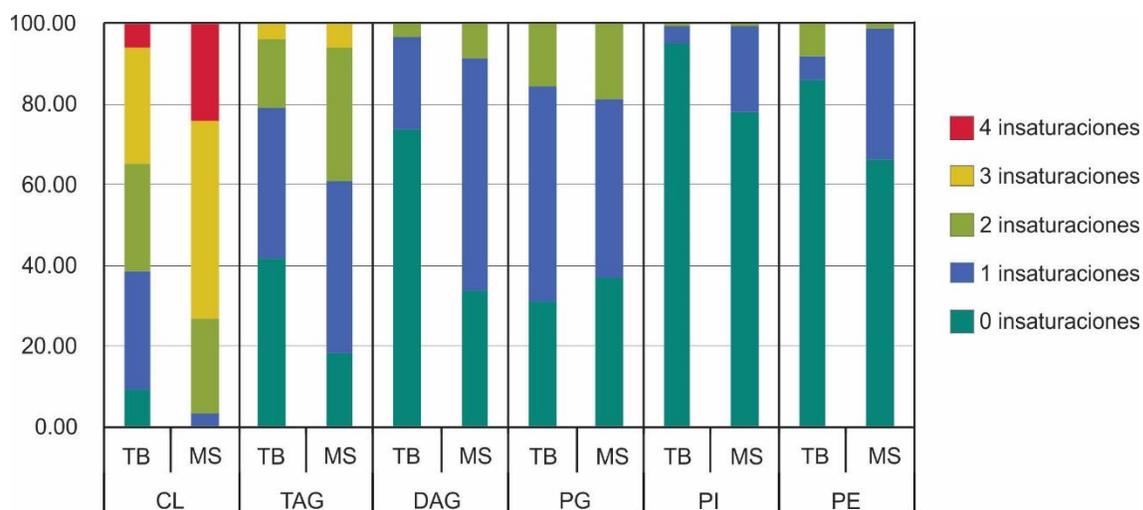
TLC que la composición de PL es: PI/PIM 37 %, PE 32 % y CL 28 % (156,158). Estos reportes, al igual que nuestros resultados, muestran una pobre participación de PE en las membranas de *M. tuberculosis*, al contrario de lo que sucede en *M. smegmatis*. Por otro lado, *M. tuberculosis* presenta además un mayor contenido de PI en comparación con *M. smegmatis* (Figura 17). Entre las diferencias podemos encontrar además, las diferentes clases de MA en estas especies (47) y la presencia de PDIM y SGL sólo en *M. tuberculosis* (24) (Figura 17 y Figura 18).

Además del perfil de lípidos totales por familia, podemos calcular dentro de una misma familia el largo promedio de las cadenas sustituyentes y su nivel de insaturación. El primero se determina calculando el promedio del número de átomos de carbono ponderando la abundancia relativa encontrada de cada una de las especies dentro de una familia de lípidos. Por otro lado, el nivel de insaturación permite evaluar qué porcentaje de lípidos dentro de una familia poseen una o más insaturaciones o están completamente saturados. Estos análisis permiten observar cambios sutiles dentro de una clase de lípidos entre dos condiciones aun cuando los niveles de la misma no varían. En la Tabla 7 se muestran los valores promedio del largo de las cadena carbonada y en la Figura 19 los niveles de insaturación obtenidos para las distintas familias de lípidos en ambas especies de micobacterias.

**Tabla 7. Largos promedio de las cadenas carbonadas de lípidos de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *M. tuberculosis* H37Rv.**

Familia	Largo promedio de la cadena carbonada	
	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv
CL	67.65 ± 0.03	68.95 ± 0.05
PE	34.14 ± 0.06	34.33 ± 0.21
PI	34.66 ± 0.04	34.99 ± 0.04
PG	34.17 ± 0.06	34.30 ± 0.03
MA α	77.32 ± 0.18	78.52 ± 0.09
MA α'/ceto	62.39 ± 0.05	84.30 ± 0.08

MA epoxi/metoxi	78.23 ± 0.03	85.12 ± 0.05
TAG	55.71 ± 0.45	56.34 ± 0.33
DAG	34.39 ± 0.08	35.28 ± 0.06
mmDAG	77.73 ± 0.15	76.46 ± 0.12
GroMM α	77.54 ± 0.06	87.12 ± 0.08
TMM α	77.65 ± 0.04	80.89 ± 0.4
PDIM A	-	92.65 ± 0.03
PDIM B	-	92.21 ± 0.13
DAT	-	46.49 ± 0.93
SGL	-	148.84 +/- 0.72



**Figura 19. Nivel de insaturaciones en distintas familias de lípidos de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (MS) y *M. tuberculosis* H37Rv (TB).**

En la Tabla 7 podemos observar que en los PLs en general, DAG y TAG, lípidos sintetizados a partir de productos de FAS-I, no se observan grandes cambios en el largo de las cadenas aciladas sustituyentes. Los FA de *M. tuberculosis* parecen ser apenas más

largos que los de *M. smegmatis*. En cambio, los MAs y sus lípidos complejos derivados, GroMMs y TMMs, sintetizados principalmente a partir de los productos de FAS-II, son significativamente más largos en *M. tuberculosis* que en *M. smegmatis*. Cabe aclarar en este último caso que no sólo el largo es distinto entre ambas especies, lo cual se sabía previamente (47), sino que las clases de MA dadas por las modificaciones en su cadena meromíclica también son distintas. Llama la atención que siendo los MA de *M. tuberculosis* más largos que los de *M. smegmatis*, los largos promedios de los mmDAG sean muy similares en ambas especies. Uno esperaría que los ácidos meromíclicos, componente principal de los MA, unidos al DAG fuesen más largos también.

Finalmente, en la Figura 19 se puede observar una clara diferencia en el nivel de insaturación general en todas las especies analizadas. En *M. tuberculosis*, tanto los PL como los lípidos neutros poseen un menor número de insaturaciones promedio en sus acilos sustituyentes respecto a los mismos lípidos de *M. smegmatis*.

#### 4.2.4 Discusión

La complejidad en la composición y estructura de los lípidos de las micobacterias es probablemente la característica más sobresaliente de su género. Los lípidos de su envoltura son los responsables de su capacidad de infectar, de persistir en el huésped y de resistir a muchas drogas antituberculosas (159). En un contexto de aumento de la aparición de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes, creemos que es fundamental el estudio de la biosíntesis lipídica y su regulación para el descubrimiento de nuevos blancos de drogas contra este patógeno. Debido a esto, es crucial tener una herramienta que permita el análisis global de la composición de lípidos en este organismo.

En esta parte del trabajo hemos puesto a punto una metodología económica, que no requiere de estándares comerciales, y que depende de un sistema cromatográfico convencional y un espectrómetro de masas de alta resolución para realizar lipidómica comparativa. Con la misma fue posible describir el perfil lipídico de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* tanto en cuantificación relativa de las distintas clases de lípidos como en la descripción de sus niveles de insaturación y largo promedio de las cadenas

sustituyentes. Este método fue utilizado para analizar distintas mutantes en el laboratorio y elucidar diferencias que no pueden discriminarse por métodos más generales como la TLC.

Al comparar la hidrofobicidad en las distintas clases de lípidos de ambas especies de (Figura 19), se observó un mayor nivel de saturación general en los sustituyentes de los lípidos en *M. tuberculosis*. Esto le da, junto con el mayor largo de los MA (Tabla 7), una característica mucho más hidrofóbica a esta especie en comparación con la micobacteria no patógena *M. smegmatis*. La hidrofobicidad está ligada a la patogenicidad e infectividad de las distintas especies de micobacterias, así las especies con membranas más hidrofóbicas son más patogénicas (160). Esta característica de la membrana permitiría a estos patógenos su trasmisión a través de la formación de aerosoles y la adherencia a distintas superficies (161).

Como perspectivas, en el futuro nos planteamos la preparación de muestras totalmente en tubos plásticos ya que se observó que no genera contaminaciones que interfieran en las determinaciones. Esto permite, además de evitar inconvenientes durante la extracción, incrementar la eficiencia de la extracción al reducir el volumen de trabajo y, de esta manera, reducir la cantidad de muestra necesaria para realizar el ensayo.

Por otro lado, nos proponemos agregar un estándar externo a las muestras a analizar. Este sería muy útil a la hora de normalizar los datos en los casos en que la variación en la cantidad de lípidos por células sea significativa y perjudique la cuantificación relativa. En este caso se podrían relativizar las señales a este estándar, el cual sería proporcional a la cantidad de células. Un posible estándar comercial podría ser fosfatidilcolina, que tiene la ventaja de ionizar muy bien en ambos modos y no estar presente en las micobacterias. Un problema del uso de PC es que dependiendo de las cadenas sustituyentes puede tener la misma fórmula molecular que las PE produciendo iones de la misma  $m/z$  por HRMS. Si bien estas especies pueden separarse cromatográficamente y ser distinguidas por MS/MS, sería conveniente utilizar un estándar cuyos sustituyentes no se encuentren de manera endógena en las PE (Por ejemplo: PC 10:0/10:0).

En un futuro sería deseable poder analizar el perfil lipídico global de *M. tuberculosis* *in vivo* debido al rol fundamental que poseen los lípidos en la interacción huésped-hospedador. Sería interesante profundizar los conocimientos del rol de los lípidos de la envoltura en la modulación de la respuesta inmune o el uso de los lípidos de reserva del huésped en situación de dormancia (162).

## 4.3 CAPÍTULO III

Estudio de *M. smegmatis* mutante condicional  
en el sistema FAS-I

### 4.3.1 Introducción

Todos los organismos que producen FA lo hacen mediante la repetición cíclica de reacciones. El primer paso de la síntesis de los FA es la carboxilación de acetil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa (ACC), para formar la unidad elongadora común malonil-CoA. Ésta molécula es luego condensada y el grupo ceto reducido de manera iterativa hasta que la cadena del FA se complete para ser utilizada por la célula. En eucariotas, estas reacciones son catalizadas por una sintasa de ácidos grasos tipo I (FAS-I). Esta es una gran proteína multidominio, a la cual la cadena de FA naciente se encuentra unida covalentemente (163). Por el contrario, la mayoría de las bacterias contienen un sistema FAS tipo II (FAS-II) en el cual cada reacción es catalizada por una proteína discreta (37). Una excepción notable a esta regla son los procariotas miembros de la familia Corynebacterineae, los cuales poseen una FAS-I tipo eucariota (39). Más aun, el género *Mycobacterium* posee ambos sistemas funcionando en la célula, trabajando en conjunto para sintetizar los lípidos que necesita (41). En micobacterias, la biosíntesis de FA es iniciada por la enzima multidominio FAS-I, la cual cataliza la producción *de novo* de acil-CoAs de cadena media y larga, a partir de acetil-CoA utilizando malonil-CoA como unidad elongadora. Estos acil-CoAs son luego usados para la síntesis de PL de membrana o tomados por el sistema FAS-II para producir ácidos meromicólicos, precursores de los MA. En micobacterias, el sistema FAS-II es responsable de la elongación de estos acil-CoAs mediante reacciones de condensación iterativa con malonil-ACP, para sintetizar meromicolil-ACP, los cuales pueden llegar a tener hasta 60 carbonos en su cadena (164–166). Una característica notable de la FAS-I micobacteriana es su comportamiento bimodal demostrado *in vitro*. Además de producir acil-CoAs de cadena media, el sistema FAS-I libera C<sub>24:0</sub>-CoA en *M. smegmatis* (104,167) o C<sub>26:0</sub>-CoA en *M. tuberculosis* (168), los cuales son luego carboxilados por una carboxilasa de acil-CoAs de cadena larga (LCC) exclusiva para producir  $\alpha$ -carboxi-C<sub>24/26</sub>-CoA (55). Estos carboxi-acil-CoAs son luego condensados con meromicolil-AMP en una reacción catalizada por la policétido sintasa Pks13, para producir los MA (47). Para añadir un mayor nivel de complejidad, los acil-CoAs sintetizados por FAS-I no sólo

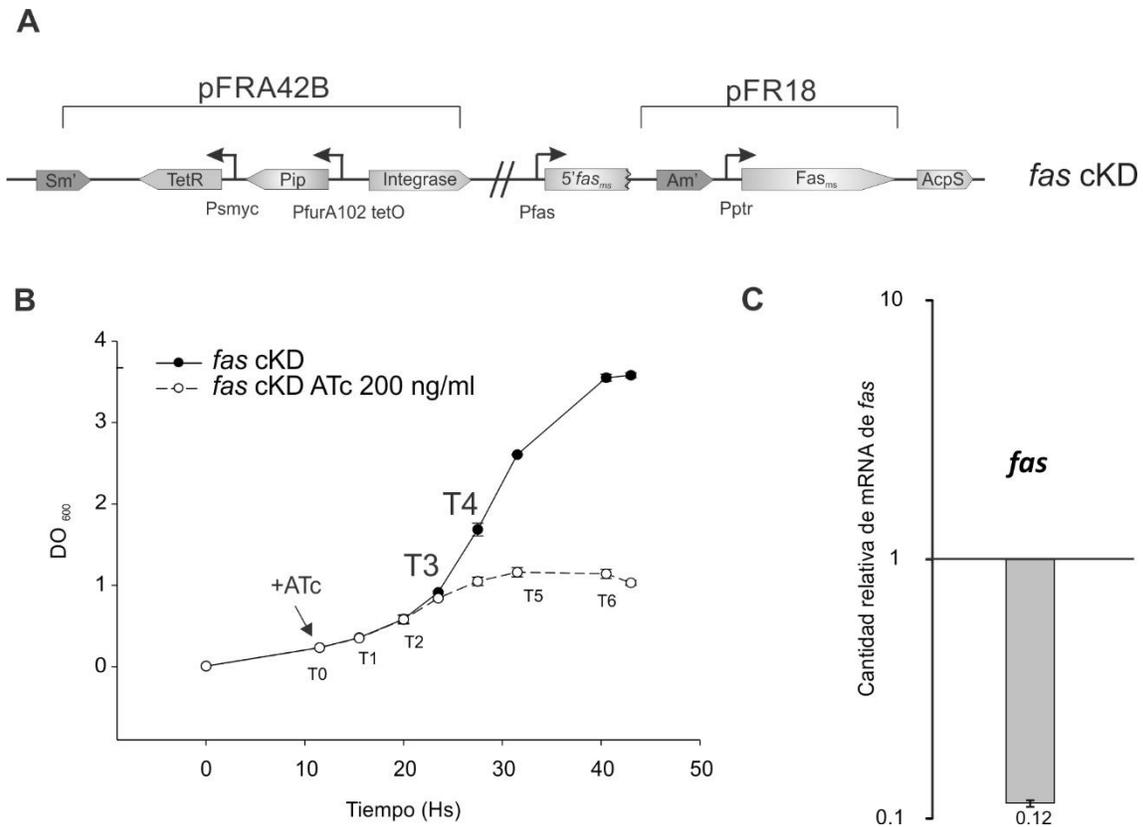
son incorporados en PL, lípidos de reserva como los TAG y en los MA, sino también son usados en *M. tuberculosis* como importantes precursores biosintéticos para producir policétidos asociados a la virulencia como PDIM, poli-acil trehalosas (PATs) y SGL (Figura 4) (47,169).

La hipótesis de trabajo en nuestro laboratorio es que *M. tuberculosis* emplea una compleja red de regulación para mantener la homeostasis lipídica que permite la adecuada interacción entre los sistemas FAS-I y FAS-II, las diferentes PKS y las rutas de biosíntesis de TAG. Si bien hemos avanzado en la caracterización de dos reguladores claves para esta red regulatoria, es importante avanzar en el estudio de los diferentes componentes y mecanismos moleculares que controlan la homeostasis del metabolismo lipídico, siendo éste uno de los metabolismos claves de *M. tuberculosis* y de íntima relación con su virulencia. Actualmente sólo se conoce de manera escasa y fragmentada el mecanismo involucrado en la regulación del metabolismo de FA y MA en respuesta a las condiciones ambientales. La evidencia reportada sugiere que modificaciones pos-traduccionales, particularmente fosforilaciones mediante quinasas de proteínas en Ser/Tre (STPK), llevan a cabo una regulación estricta de la actividad de las enzimas que sintetizan MA (170–173). Adicionalmente, algunos reguladores del metabolismo de MA han sido identificados, como FasR que controla la expresión de *fas* (88), y FadR y MabR que regulan la expresión del operón *fasII* (61,174). El hecho de que los reguladores FasR y MabR sean esenciales para la viabilidad de *M. smegmatis* indica que mantener un balance fino entre las actividades de los dos sistemas FAS es crucial para el metabolismo de las micobacterias.

Con el objetivo de estudiar el rol del sistema FAS-I en el metabolismo lipídico *in vivo* en micobacterias, previo al presente trabajo de tesis en el laboratorio se construyó una cepa mutante condicional en el operón *fas-acs*. Este operón codifica para la enzima multidominio FAS-I (*fas*) y la enzima encargada de fosfopantoteinarla (*acs*). La fosfopantoteinilación es una modificación que tanto FAS-I como la proteína transportadora de acilos, AcpM, requieren para ser activas. Esta consiste en la adición de un grupo fosfopantoteinilo a una serina conservada, al cual se unen de manera reversible y mediante un enlace tioéster los FA durante el proceso de síntesis. Se ha demostrado recientemente que AcpS se encarga de fosfopantoteinilar sólo a FAS-I,

mientras que PptT modifica al resto de las enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos, incluida AcpM (43).

La construcción de la cepa mutante se realizó mediante el reemplazo del promotor salvaje de *fas* por un promotor reprimible Pptr, utilizando una adaptación del método desarrollado por Boldrin *y col.* (69) (Figura 20A). Esta construcción se realizó en una cepa conteniendo el plásmido pFRA42B, sistema que permite la regulación TetR/Pip OFF (WT-pFRA42B) (65). En la mutante resultante, la expresión de *fas* es reprimida por la adición de anhidrotetraciclina (ATc) al medio de cultivo y, por lo tanto, se produce una depleción parcial de FAS-I. Cuando esta cepa es plaqueada en medio sólido conteniendo 200 ng/mL de ATc no se observa crecimiento. Esto sugiere que la represión por el sistema TetR/Pip OFF es suficiente para disminuir los niveles de la enzima por debajo de los compatibles con la viabilidad celular. De la misma manera, cuando se agrega ATc en medio líquido al inicio de la fase exponencial ( $DO_{600}$  0.2,  $T_0$ ) las células comienzan a crecer a una velocidad inferior comparada con la mutante sin ATc hasta finalmente dejar de dividirse a una  $DO_{600}$  aproximada de entre 0.8 y 1 (Figura 20B). El nivel relativo de mRNA del gen *fas* ante el agregado de ATc fue analizado mediante experimentos de RT-PCR cuantitativa, a las 12 hs del agregado de ATc, previo a que se observe arresto en el crecimiento ( $T_3$ ). Se muestra en la Figura 20C que ante el agregado de ATc los niveles de mRNA de *fas* en la mutante *fas* cKD disminuyen notablemente (90 % aproximadamente). En todos los casos se comprobó que el agregado de ATc no afectaba a la cepa parental WT-pFRA42B (65).

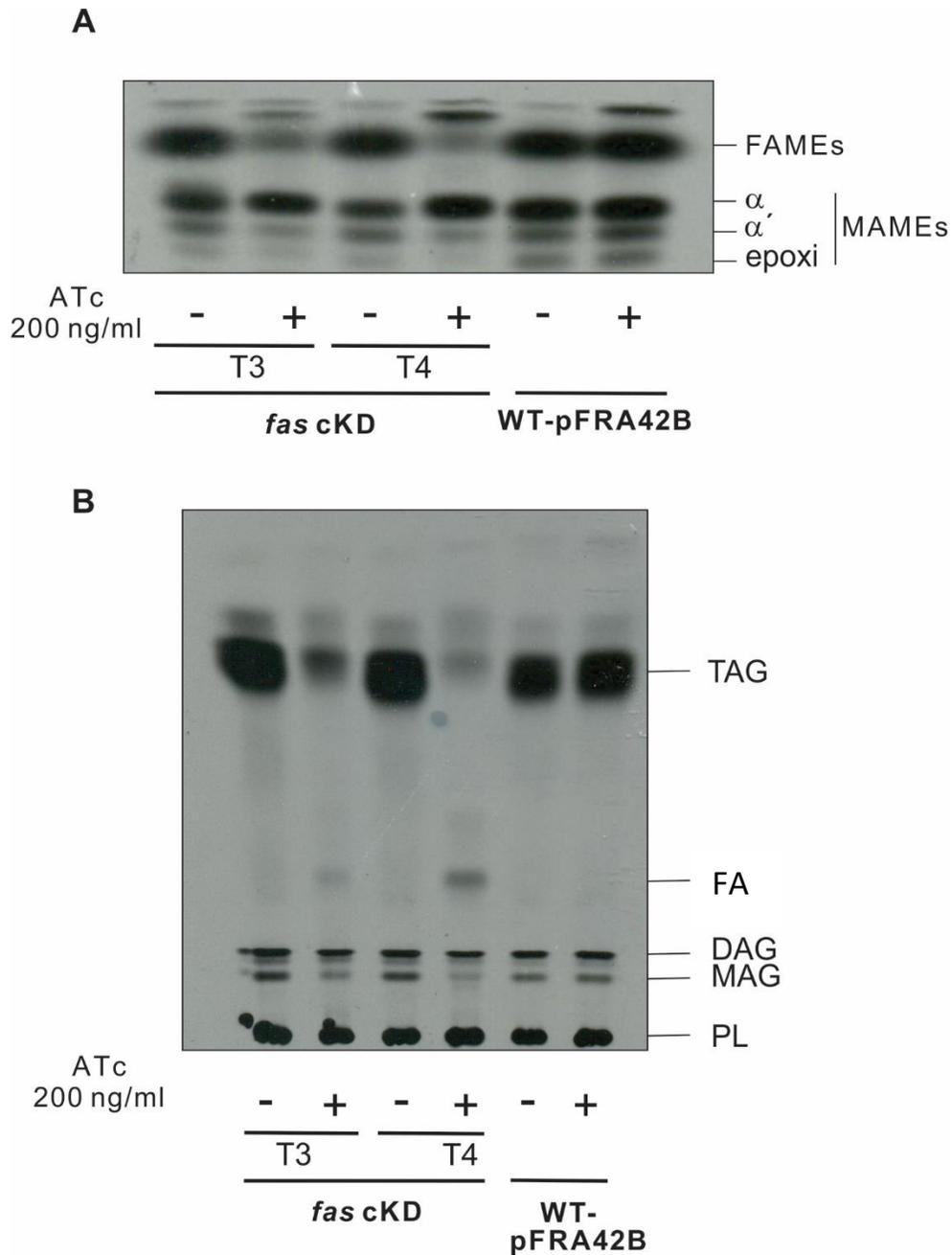


**Figura 20. Construcción de la mutante condicional *fas cKD* de *M. smegmatis*.** A. Representación esquemática de la organización genómica de *fas cKD*. B. Curva de crecimiento de la mutante en medio 7H9 seguido por medidas de DO<sub>600</sub>. Luego de 12 hs, el cultivo fue dividido en dos fracciones iguales y a una de ellas se la suplementó con ATc 200 ng/mL (indicado con una flecha). C. Cambio en la cantidad relativa de mRNA de *fas* medido por RT-PCR cuantitativa. El valor mostrado representa la relación entre el mRNA del gen *fas* de la mutante *fas cKD* crecida con y sin ATc 200 ng/mL y fue normalizado usando *sigA* como un transcripto invariable. Las muestras de mRNA fueron extraídas luego de 12 hs de haber agregado ATc (T3).

El análisis inicial de la mutante condicional, realizado antes del comienzo de este trabajo de tesis, arrojó ciertos resultados que motivaron el estudio que se desarrollará en el presente capítulo. Al analizarse la actividad de los sistemas FAS-I y FAS-II por incorporación de <sup>14</sup>C-malonil-CoA, en la mutante condicional se observó una disminución gradual de la actividad FAS-I al suplementar con ATc, pero sin embargo la actividad FAS-II no mostró disminución. Más aun, cuando se estudió la síntesis *de novo*

de FA y MA por incorporación de  $^{14}\text{C}$ -acetato, se observó que mientras los FA disminuían ante el agregado de ATc en la mutante *fas* cKD, los MA no presentaban disminución (65) (Figura 21). Se analizó de la misma manera la biosíntesis *de novo* de TAG, molécula de reserva de carbono cuyos precursores principales son los FA. Al igual que con los FA, se observó que la síntesis de TAG se encontraba también afectada al reprimir la expresión del gen *fas*.

Teniendo estos resultados como punto de partida, nos propusimos analizar más en profundidad el comportamiento del sistema de biosíntesis de lípidos en micobacterias en condiciones de depleción parcial de FAS-I. Para ello hicimos uso de, entre otros, los métodos desarrollados en este trabajo de tesis.



**Figura 21. Síntesis de FA y TAG en condiciones de depleción de FAS-I.** A. Biosíntesis *de novo* de FA y MA. Células de cultivos de *fas cKD* y WT-pFRA42B, crecidas en presencia y ausencia de ATc 200 ng/mL, fueron marcadas con  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetato a las 12 y 15 hs de tratamiento (T3 y T4) (Figura 20). Luego de una extracción orgánica, los metil ésteres de MA (MAMES) y FA (FAMES) fueron separados por TLC. Sistema de solventes: hexano:acetato de etilo (9:1 v/v). B. Biosíntesis *de novo* de TAG. Alícuotas conteniendo el mismo número de células de cultivos de *fas cKD* crecidas con y sin ATc fueron marcadas con  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -acetato en T3 y T4. Se extrajeron lípidos totales y fueron analizados por TLC. Sistema de solventes:

hexano/dietileter/ácido acético (75:25:1, v/v). Como control, se utilizó un cultivo de WT-pFRA42B tratado de la misma manera.

#### 4.3.2 Objetivos

Nuestro objetivo en esta parte del trabajo fue analizar en detalle el impacto de la reducción de la producción de FA *de novo* en la biosíntesis de MA y en la composición global de la envoltura celular. Los objetivos particulares para esta parte fueron:

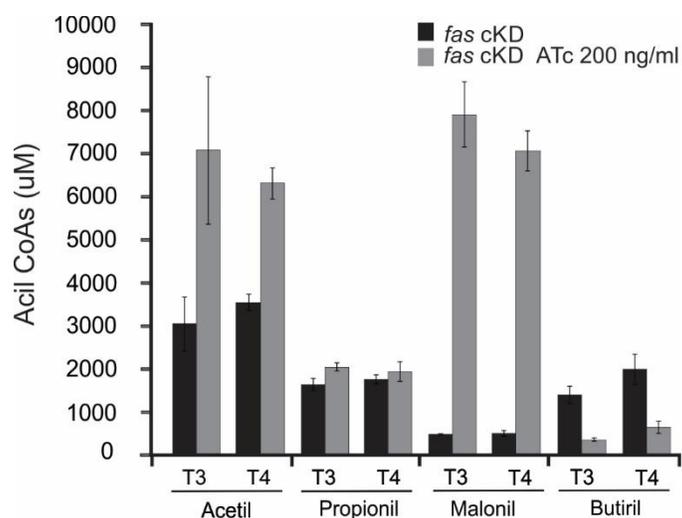
- Estudiar la composición de acil-CoAs en la cepa *fas* cKD en condiciones de disminución de la expresión del gen *fas* utilizando el método analítico desarrollado en la presente tesis.
- Estudiar el perfil de lípidos globales ante la reducción del sistema FAS-I en *M. smegmatis* por LC-MS/MS.
- Analizar el cambio en el patrón de expresión de proteínas en *fas* cKD ante la represión del gen *fas* por ensayos de proteómica tipo escopeta (*shotgun*) de manera de intentar comprender el comportamiento del sistema de biosíntesis de lípidos ante la reducción del sistema FAS-I.

#### 4.3.3 Resultados

##### 4.3.3.1 Efecto de la depleción del sistema FAS-I en la composición de los acil-CoAs en *M. smegmatis*.

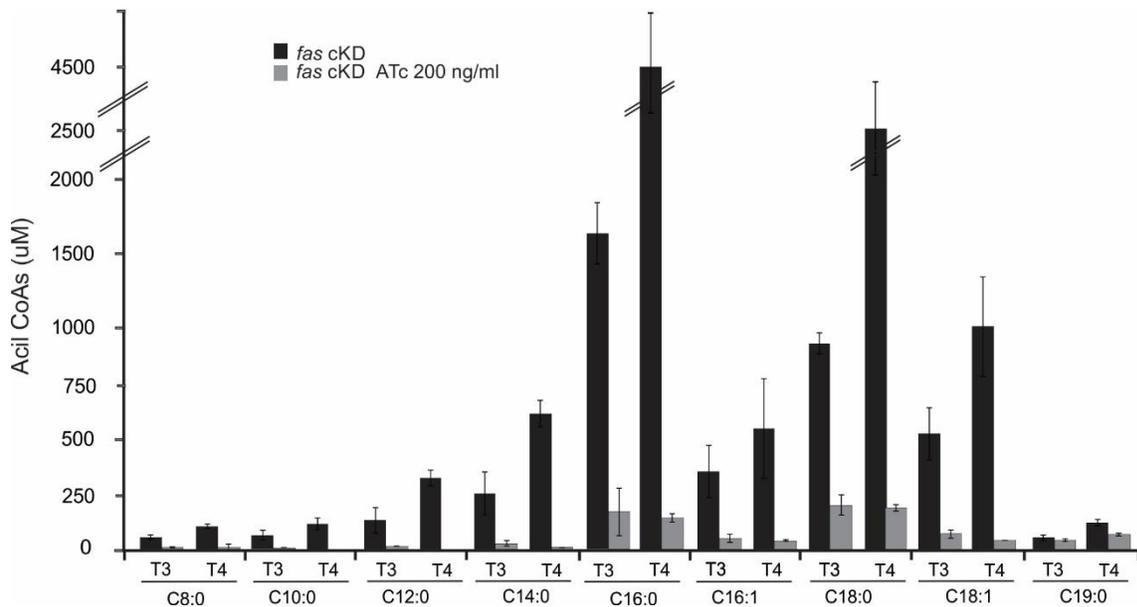
Como se expuso anteriormente, los acil-CoAs son moléculas cruciales en el metabolismo de todos los organismos, ya sea como intermediarios de biosíntesis o moléculas señal. Con el objetivo de analizar en profundidad las consecuencias de una menor expresión de FAS-I en el metabolismo lipídico, determinamos la composición de acil-CoAs en la cepa *fas* cKD en presencia y ausencia de ATc. Los acil-CoAs de células expuestas durante 12 o 15 hs a ATc fueron determinados utilizando el método de LC-

MS desarrollado en el capítulo 1 de esta tesis (119). Como se muestra en la Figura 22, se observa un incremento en el contenido de acetil-CoA y malonil-CoA, el iniciador de la síntesis y la unidad elongadora respectivamente, en las células crecidas en presencia de ATc respecto de las células sin ATc.



**Figura 22. Perfil de acil-CoAs de cadena corta en *fas cKD* crecida con y sin ATc a dos tiempos de tratamiento.** T3: 12 hs de tratamiento; T4: 15 hs de tratamiento. Los resultados provienen del promedio de tres experimentos independientes y las barras de error representan el desvío estándar.

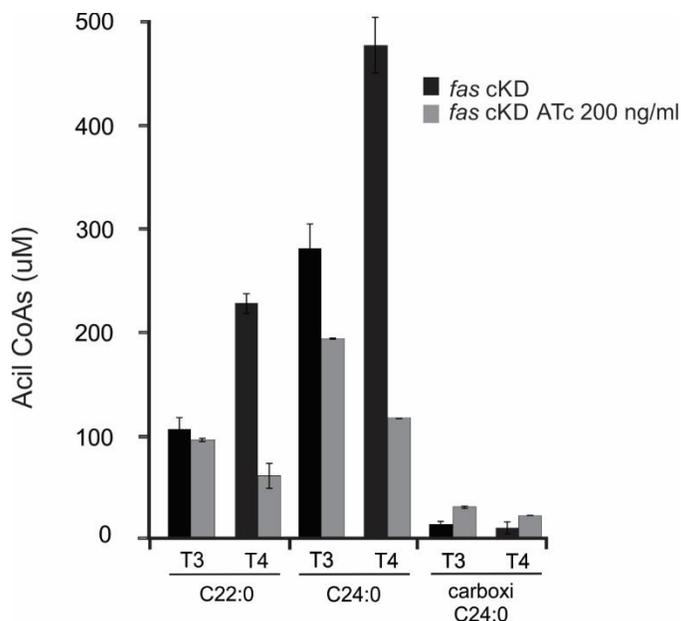
En la Figura 23 se muestra el efecto de la disminución de FAS-I en el repertorio de acil-CoAs de cadena media. En la misma se observa una fuerte depleción de los acil-CoAs entre 8 y 18 átomos de carbono. Esta diferencia es mucho menos significativa en el caso del acil-CoA de 19 carbonos.



**Figura 23. Perfil de acil-CoAs de cadena media en *fas cKD* crecida con y sin ATc a dos tiempos de tratamiento.** T3: 12 hs de tratamiento; T4: 15 hs de tratamiento. Los resultados provienen del promedio de tres experimentos independientes y las barras de error representan el desvío estándar.

En la Figura 24 se muestran los acil-CoAs de cadena larga de células de *fas cKD* crecidas en presencia y ausencia de ATc a 12 hs (T3) y 15 hs (T4) de tratamiento con ATc. En este caso se observa una menor disminución que la observada para los acil-CoAs de cadena media (Figura 23) en presencia de ATc 200 ng/mL. El C<sub>24:0</sub>-CoA, por ejemplo, disminuye en T3 sólo un 30 % y un 75 % aproximadamente en T4, mientras que la mayoría de los acil-CoAs de cadena media presentan una disminución de un 90 % en T3 y mayor al 95 % en T4. El C<sub>24:0</sub>-CoA es el precursor mayoritario de la cadena  $\alpha$  de los MA en *M. smegmatis*. Durante la síntesis de los MA el mismo debe ser carboxilado dando como producto el carboxi-C<sub>24:0</sub>-CoA, previo a la condensación con un ácido meromícólico. En condiciones de disminución de actividad FAS-I se observa, a diferencia del resto de los acil-CoAs, un aumento de la cantidad de carboxi-C<sub>24:0</sub>-CoA del 100 % aproximadamente en ambos tiempos (Figura 24). El aumento de este intermediario clave del metabolismo de MA confirma que los niveles de C<sub>24:0</sub>-CoA fueron menos afectados que aquellos derivados de CoA de cadena media. Como control

del efecto del agregado de ATc, se determinó el perfil de acil-CoAs en *M. smegmatis* WT-pFRA42B, cepa isogénica, en presencia y ausencia de ATc 200 ng/mL. No se observaron cambios significativos en la abundancia de acil-CoAs en todo el espectro, confirmando que los cambios observados previamente se deben a la disminución de la actividad FAS-I.



**Figura 24. Perfil de acil-CoAs de cadena larga en *fas cKD* crecida con y sin ATc a dos tiempos de tratamiento.** T3: 12 hs de tratamiento; T4: 15 hs de tratamiento. Los resultados provienen del promedio de tres experimentos independientes y las barras de error representan el desvío estándar.

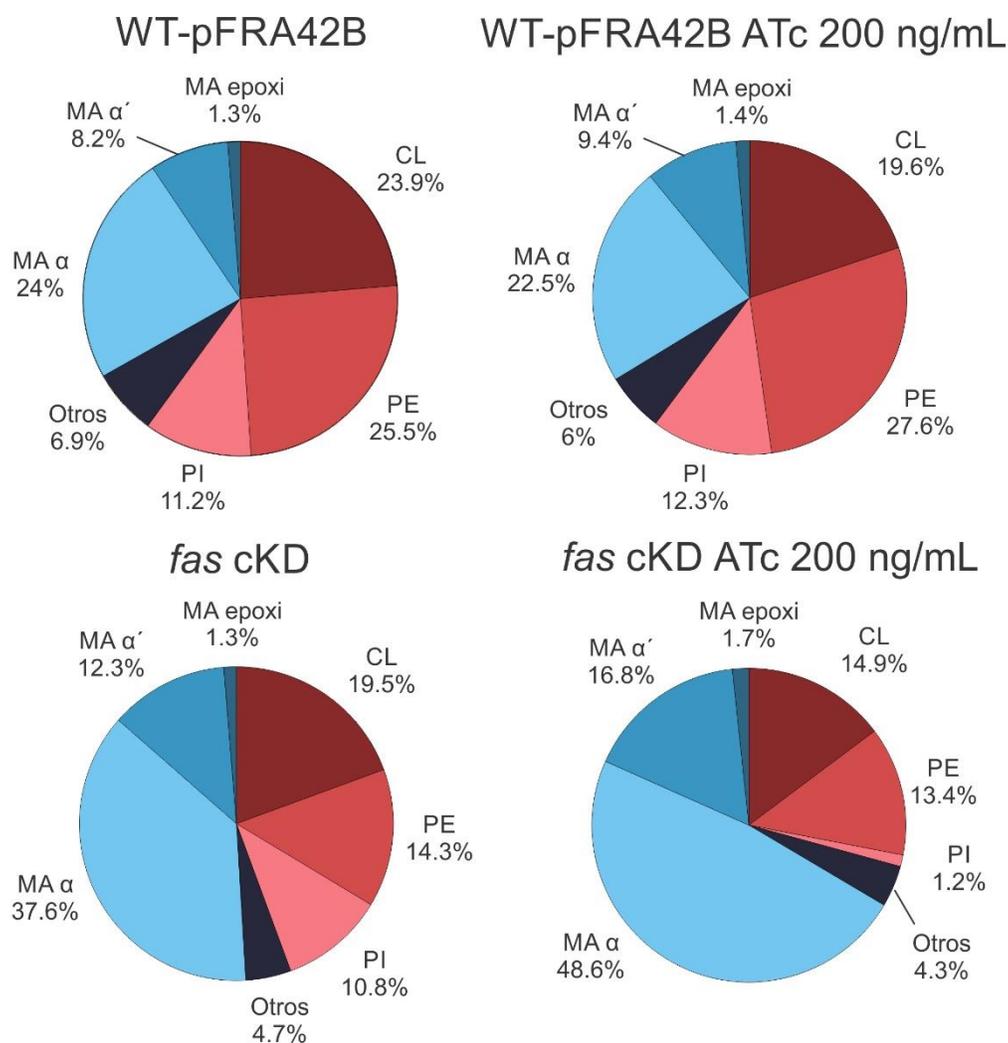
El método utilizado en esta parte del trabajo no distingue entre los acil-CoAs provenientes de la síntesis *de novo* y aquellos intermediarios de otras rutas metabólicas como por ejemplo la  $\beta$ -oxidación, por lo que uno no puede descartar que algunos cambios observados se deban a efectos sobre la degradación de los FA y no en la síntesis. Sin embargo, los resultados observados en la composición de acil-CoA son consistentes con la disminución de la actividad de FAS-I. En primer lugar, no sólo ambos sustratos del sistema (acetil-CoA y malonil-CoA) se acumulan al agregarse ATc al medio, sino que además disminuye el producto del primer ciclo de elongación (butiril-CoA) (Figura 22). Por otro lado, los principales productos del sistema, acil-CoAs de 16 y 18

átomos de carbono de cadena, son los que se encuentran más afectados con depleciones de 90 % aproximadamente (Figura 23). Por último, el C<sub>24:0</sub>-CoA es el acil-CoA que menos ve afectado su nivel, sobre todo a T3 donde sólo se observa una disminución de aproximadamente el 30 %. Más aún, el carboxy-C<sub>24:0</sub>-CoA es el único acil-CoA que aumenta en el sistema además de los sustratos (Figura 24).

#### 4.3.3.2 Cambios en la composición lipídica global producidos por la depleción del sistema FAS-I en *M. smegmatis*.

De la misma manera que se analizaron los acil-CoAs, se decidió analizar la composición global de la envoltura en condiciones de depleción parcial de FAS-I en *M. smegmatis*. Con este objetivo, se realizó entonces un análisis lipídico comparativo entre la mutante condicional y su cepa isogénica *M. smegmatis* salvaje en presencia y ausencia de ATc. Para esto se extrajeron lípidos totales de ambas cepas crecidas con y sin agregado de ATc 200 ng/mL a tiempo T3 (Figura 21) y se analizaron por LC-MS/MS utilizando el método desarrollado en el capítulo II de esta tesis.

La Figura 25 muestra los perfiles lipídicos en modo negativo para la mutante condicional *fas* cKD y la cepa WT-pFRA42B crecida con y sin ATc.



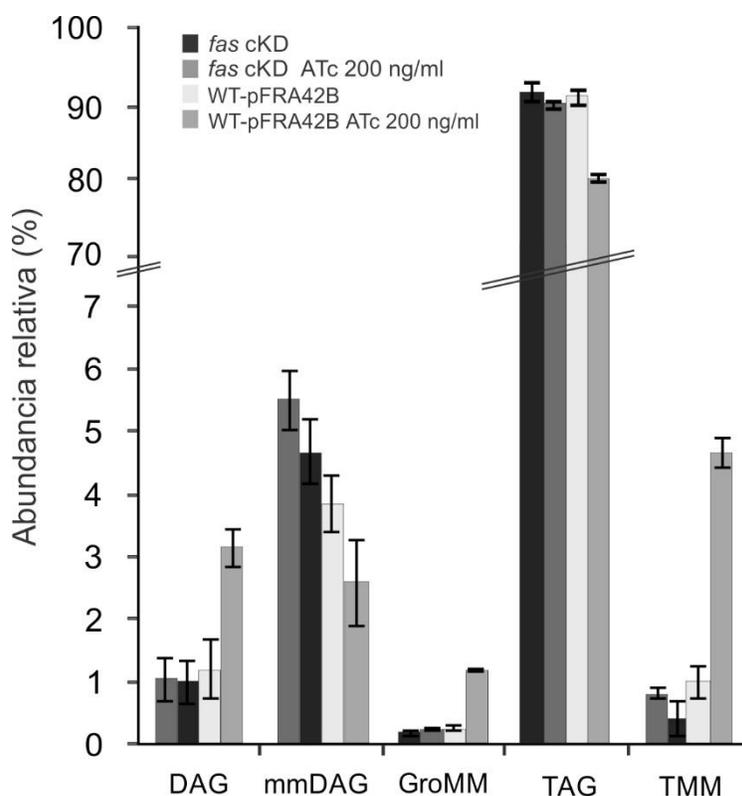
Fosfolípidos		Ácidos micólicos (MA)	
WT-pFRA42B	65%	WT-pFRA42B	35%
WT-pFRA42B ATc200ng/ml	67%	WT-pFRA42B ATc200ng/ml	33%
<i>fas</i> cKD	50%	<i>fas</i> cKD	50%
<i>fas</i> cKD ATc200ng/ml	32%	<i>fas</i> cKD ATc200ng/ml	68%

**Figura 25. Análisis por LC-MS en modo negativo de PL y MA presentes en la mutante *fas* cKD y la cepa isogénica WT-pFRA42B.** Los valores indicados representan la abundancia relativa de las señales de MS correspondientes a las diferentes clases de lípidos detectados en las muestras en modo negativo. Los resultados provienen del promedio de tres experimentos independientes y las barras de error representan el desvío estándar. Otros: PG, PA, lisoPE, lisoPI, lisoPG, lisoPA.

La diferencia más significativa que se observa en la mutante *fas* cKD en presencia de ATc 200 ng/mL, donde se depleta parcialmente FAS-I, es el aumento de la proporción de MA sobre los PL. En la cepa WT-pFRA42B esta relación es 65 % PL y 35 % MA aproximadamente con y sin ATc, mientras que en la mutante crecida con ATc la relación se invierte por completo (PL 32 % y MA 68 %; Figura 25). Esta proporción se modifica principalmente debido al aumento de la abundancia relativa de MA  $\alpha$ , en concordancia con lo observado previamente en la síntesis *de novo* de FA y MA para esta condición (Figura 21). Otro factor diferencial que modifica la relación entre PL y MA en la mutante crecida con ATc es la disminución de la abundancia de los PI. En esta condición los niveles de este PL disminuyen a 1.2 % de los lípidos detectados en este modo, sólo un 10 % de lo observado en el resto de las muestras. La cepa mutante condicional sin agregado de ATc se utiliza como un control de la condición de depleción parcial del gen *fas* en la cual no se reprime la expresión del mismo. En el perfil lipídico de esta muestra, si bien la relación entre MA y PL es significativamente menor que la mutante *fas* cKD con ATc, es mayor que el de la cepa WT-pFRA42B. Nosotros atribuimos esta diferencia a que esta mutante condicional *fas* cKD en ausencia de ATc expresa niveles levemente mayores y constitutivos del gen *fas* que la cepa salvaje.

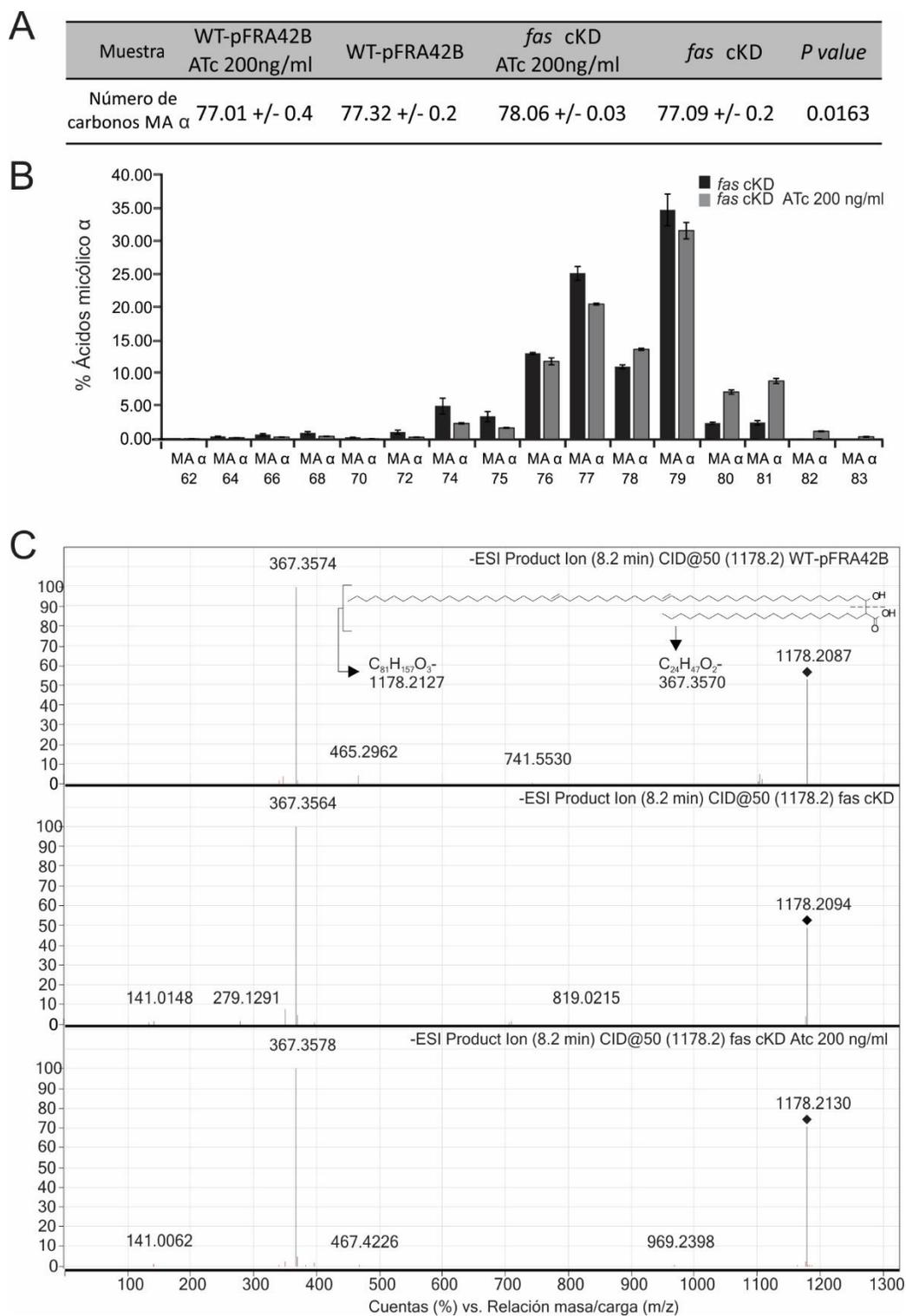
Se analizó además el perfil comparativo en modo positivo, que incluye TAG, DAG, mmDAG y lípidos derivados de MA. A diferencia del análisis en modo negativo, el análisis de la abundancia relativa de las distintas clases de lípidos en este modo no es sencillo debido a la gran disminución en la producción y contenido de TAG de la mutante crecida en presencia de ATc (Figura 21; (65)). Esto dificulta la relativización de las señales de MS al total de las señales analizadas en ese modo ya que los TAG representan aproximadamente un 90 % de las mismas en condiciones normales. Esto produce una sobrestimación de las otras familias cuando disminuyen en gran medida los TAG en una condición. Esta situación se puede observar en la Figura 26, en la cual una disminución importante en la cantidad de TAG en la mutante crecida en presencia de ATc se traduce en una leve disminución de la abundancia relativa de los mismos (de 90 % a 80 %) y un aumento desproporcionado en la abundancia relativa de los otros lípidos. A pesar de esta dificultad se puede concluir que los niveles de mmDAG

disminuyen en estas condiciones. Esto se debe a que pese a disminuir el componente mayoritario de los lípidos neutros, disminuye su abundancia relativa en condiciones de depleción de FAS-I. En el caso de los DAG, GroMM y TMM, todos siguen la misma tendencia, pero no se puede asegurar que estos aumenten en la mutante *fas* cKD en presencia de ATc o se mantengan constantes. Para esto uno debería, no sólo normalizar por masa total de lípidos, sino utilizar además un estándar interno proporcional al número de células procesadas. De esa forma uno podría normalizar al estándar y dilucidar el problema mencionado.



**Figura 26. Análisis por LC-MS en modo positivo de lípidos neutros presentes en la mutante *fas* cKD y la cepa isogénica WT-pFRA42B.** Los valores indicados representan la abundancia relativa de las señales de MS correspondientes a las diferentes clases de lípidos detectados en las muestras en modo positivo. Los resultados provienen del promedio de tres experimentos independientes y las barras de error representan el desvío estándar.

Se sabía previamente que la disminución en la actividad FAS-I, disminuía la síntesis *de novo* de los FA pero no la de los MA. Sin embargo, este ensayo de TLC no permite discernir pequeñas diferencias estructurales de estos MA. Además de ver el perfil general de las distintas familias de lípidos, se analizó también la composición de las especies dentro de cada familia. De esta manera se pudieron identificar efectos de la depleción parcial del sistema FAS-I sobre el largo de cadena promedio y el nivel de insaturación de las cadenas que componen los distintos lípidos analizados. Se determinó entonces que la mutante *fas* cKD crecida en presencia de ATc posee MA  $\alpha$  en promedio más largos. En la Figura 27A se puede observar la comparación de los promedios ponderados del número total de carbonos en MA  $\alpha$  libres entre las distintas condiciones. En la mutante condicional crecida en presencia de ATc, el largo de estos MA ( $78.08 \pm 0.03$  carbonos) es significativamente mayor que en el resto de las condiciones con un valor estadístico P (*P* value) de 0.0163. En la Figura 27B se muestra un histograma donde se observa gráficamente la distribución de las distintas especies de MA  $\alpha$  en la mutante crecida en presencia y ausencia de ATc 200 ng/mL. Ante estos resultados, nos preguntamos si la diferencia en el largo de estas moléculas, cuando disminuye la actividad FAS-I, se daba en la cadena  $\alpha$  o en la cadena meromericólica. Para esto se realizaron experimentos de MS/MS sobre estas moléculas en las distintas condiciones analizadas. Cuando los MA se someten a fragmentación por CID se rompen liberando como producto cargado la cadena  $\alpha$ . De esta manera, analizando la masa de la molécula entera y el fragmento de la cadena  $\alpha$  se puede determinar tamaño de la cadena meromericólica. Utilizando esta técnica se comprobó que las cadenas  $\alpha$  en estos MA eran del mismo largo en todas las condiciones y, por lo tanto, cuando se disminuye FAS-I el alargamiento se estaría dando en la cadena meromericólica. La liberación de las cadenas  $\alpha$  por CID en las distintas muestras, en este caso en el MA  $\alpha$  de 81 átomos de carbono (Figura 27B), se muestra en la Figura 27C.



**Figura 27. Análisis detallado de las especies moleculares de MA  $\alpha$ .** A. La tabla muestra el promedio ponderado del número total de carbonos por molécula dentro de la población de MA  $\alpha$  libres en las distintas muestras. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  desviación

estándar. El *P value* se calculó usando un ensayo estadístico *t* desapareado con corrección de Welch entre *fas cKD* and *fas cKD ATc 200 ng/mL*. B. El histograma muestra la distribución porcentual de los números de carbonos totales de las especies de MA  $\alpha$  libres en *fas cKD* crecido con y sin ATc 200 ng/mL. C. Espectros de masa en tándem del MA  $\alpha$  de 81 carbonos (1178.21 m/z) en WT-pFRA42B (arriba), *fas cKD* (medio) y *fas cKD ATc 200 ng/mL* (abajo), mostrando el fragmento de la cadena  $\alpha$  de 24 carbonos (367.35 m/z). En el recuadro se muestra la estructura del MA y el enlace donde se produce la fragmentación.

De la misma manera como se hizo con los MA  $\alpha$ , se analizó también el largo promedio del resto de los lípidos. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

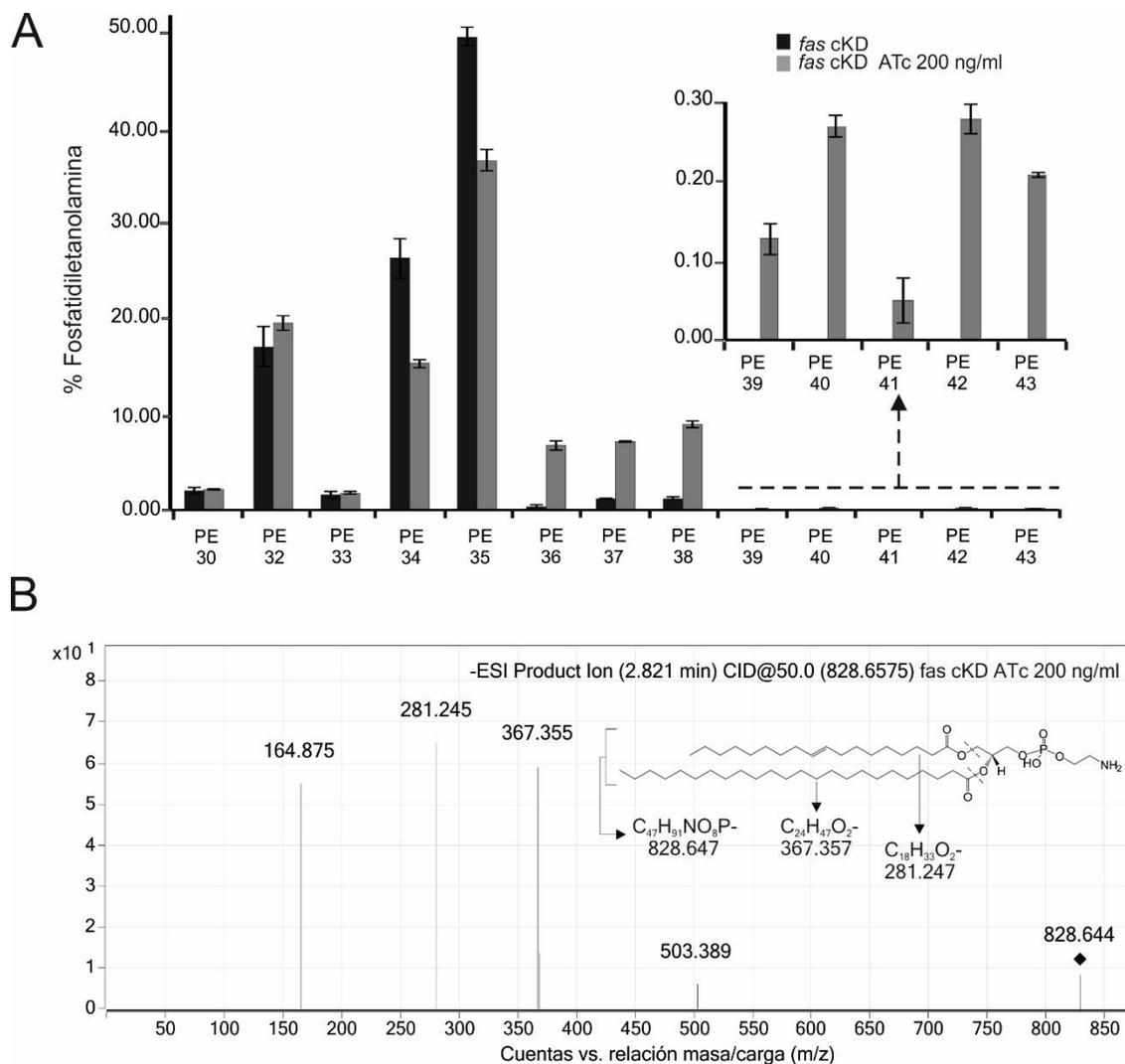
**Tabla 8. Largo promedio de las cadenas carbonadas de los lípidos de *M. smegmatis*.** Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar. El *P value* se calculó usando un ensayo estadístico *t* desapareado con corrección de Welch entre *fas cKD* and *fas cKD ATc 200 ng/mL*.

Lípido	WT-pFRA42B		<i>fas cKD</i>		<i>P value</i> <i>fas cKD</i> vs. <i>fas cKD</i>	Efecto
	-	ATc 200 ng/mL	-	ATc 200 ng/mL		
CL	67.65 +/- 0.03	67.73 +/- 0.14	67.91 +/- 0.04	68.35 +/- 0.02	< 0.0001	Más largos
PE	34.14 +/- 0.06	34.22 +/- 0.09	34.19 +/- 0.23	34.63 +/- 0.01	0.0034	Más largos
PG	34.17 +/- 0.06	34.29 +/- 0.11	34.21 +/- 0.05	34.25 +/- 0.07	0.2035	=
PI	34.66 +/- 0.01	34.7 +/- 0.06	34.83 +/- 0.02	34.76 +/- 0.04	0.0523	=
MA $\alpha$	77.32 +/- 0.18	77.01 +/- 0.4	77.09 +/- 0.17	78.06 +/- 0.03	0.0163	Más largos
MA $\alpha'$	62.39 +/- 0.05	62.22 +/- 0.16	62.99 +/- 0.12	63.74 +/- 0.08	0.0001	Más largos
MA epoxi	78.23 +/- 0.03	78.16 +/- 0.17	78.29 +/- 0.01	78.96 +/- 0.01	< 0.0001	Más largos

DAG	34.35 +/- 0.06	34.39 +/- 0.08	34.80 +/- 0.16	36.59 +/- 0.45	0.0117	Más largos
mmDAG	77.36 +/- 0.39	77.73 +/- 0.15	76.84 +/- 0.07	77.74 +/- 0.34	0.9769	=
GroMM	77.47 +/- 0.11	77.54 +/- 0.06	77.46 +/- 0.02	78.35 +/- 0.01	0.0019	Más largos
TAG	55.80 +/- 0.27	55.71 +/- 0.45	55.06 +/- 0.19	55.62 +/- 0.37	0.7968	=
TMM	77.54 +/- 0.19	77.65 +/- 0.04	77.54 +/- 0.04	78.59 +/- 0.04	< 0.0001	Más largos

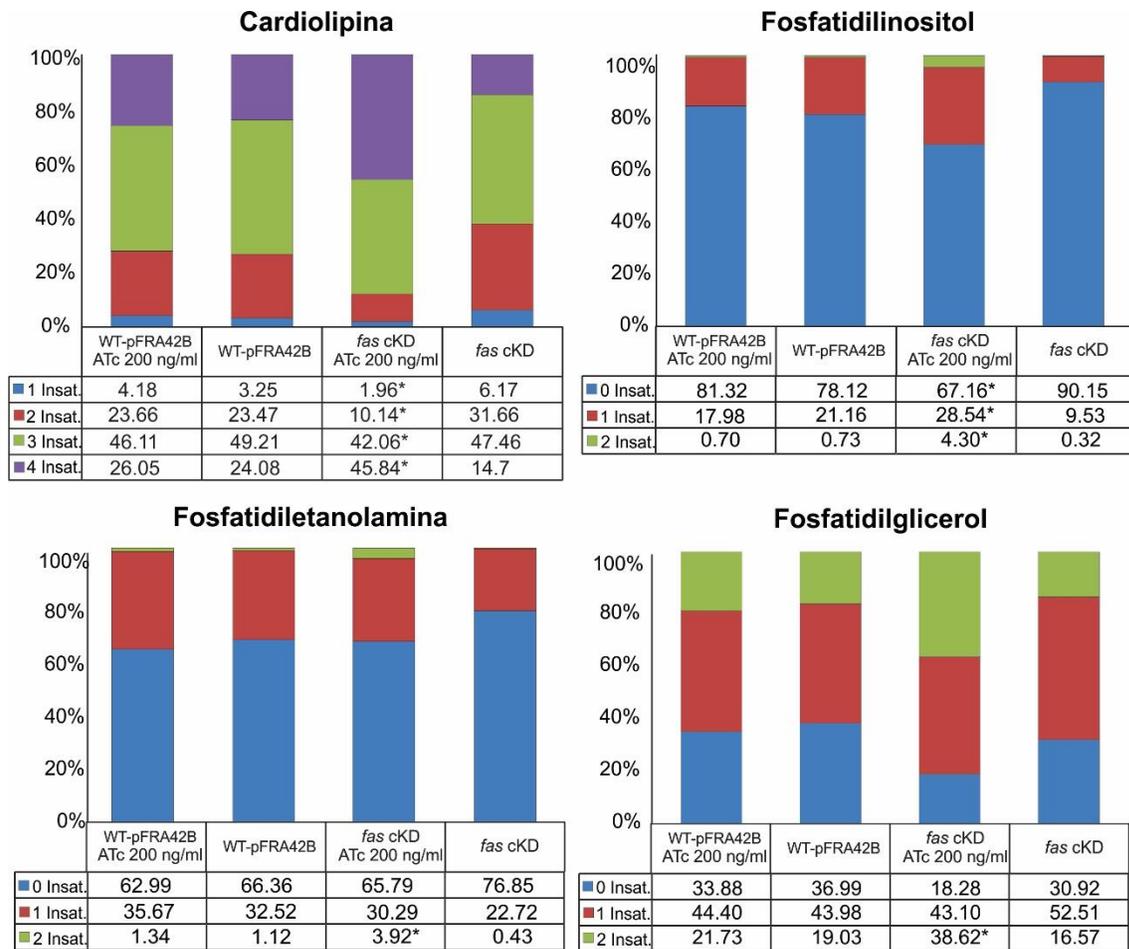
Lo primero que se puede observar es que todos los MA y lípidos que contienen MA (TMM, GroMM y micolilfosfolípidos (MycPL; (175))) resultaron ser más largos. Esto muestra una consistencia en el efecto de la disminución de la actividad FAS-I y el mayor largo de los productos de FAS-II. Otros lípidos que se ven afectados también son los PE, CL y DAG. Todos estos poseen cadenas carbonadas más largas y, en este caso, son sintetizadas por FAS-I.

Respecto del largo de las PE, además de observarse un aumento del largo promedio de la cadena carbonada, se encontraron especies que sólo eran detectadas cuando disminuía el sistema FAS-I. Se puede observar así en la Figura 28A, la presencia de las especies PE de 39 a 43 átomos de carbono de sustituyentes en la mutante condicional *fas* cKD crecida en presencia de ATc 200 ng/mL. Estas especies no fueron detectadas en la mutante crecida sin ATc ni en la cepa WT-pFRA42B crecida con o sin ATc. Analizamos entonces la composición de los sustituyentes de estas PE para ver que de que FA se trataban. En el espectro en la Figura 28B se observa el análisis MS/MS de la PE 42:1. En esta se muestra que los sustituyentes son los FA C<sub>24:0</sub> y C<sub>18:1</sub>.



**Figura 28. Análisis detallado de las especies moleculares de PE.** A. El histograma muestra la distribución de los números de carbonos totales de las especies de PE en *fas cKD* crecida con y sin ATc 200 ng/mL. B. Espectros de masa en tándem de la PE 42:1 (828.64 m/z) en *fas cKD* ATc 200 ng/mL. Se observa la liberación de los FA sustituyentes  $C_{18:1}$  (281.24 m/z) y  $C_{24:0}$  (367.35 m/z). En el recuadro se muestra la estructura del PL y los enlaces donde se produce la fragmentación.

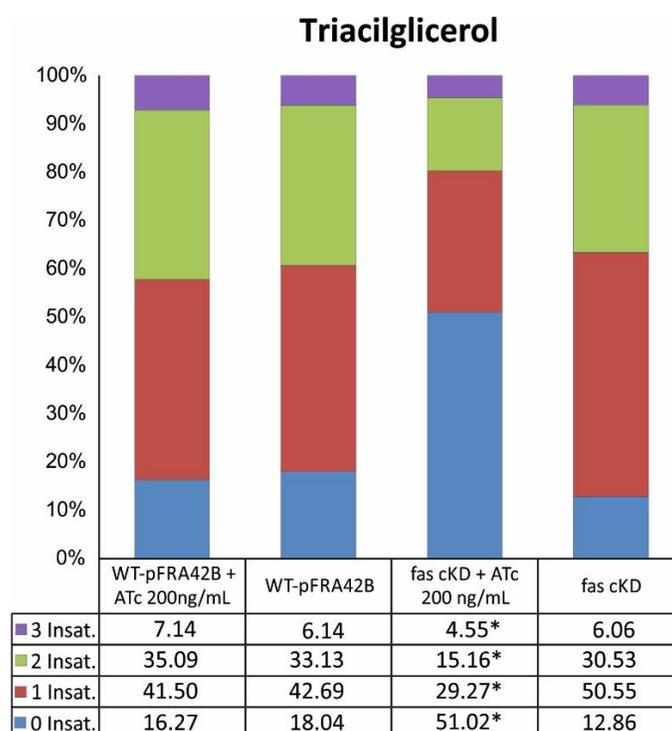
Para completar el análisis de los lípidos de *M. smegmatis* en condiciones de depleción parcial del sistema FAS-I, se determinaron los niveles de insaturación de los lípidos.



**Figura 29. Nivel de insaturación de los PL en condiciones de depleción parcial de FAS-I.** Los histogramas muestran el nivel de insaturaciones de los FA sustituyentes de CL, PE, PI y PG. El nivel de cada condición se calculó como el porcentaje de especies de PL con un determinado número de insaturaciones en todas las cadenas sustituyentes. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. El asterisco indica un  $P$  value < 0,05 entre *fas* cKD ATc 200 ng/mL y el resto de las condiciones. El  $P$  value se calculó usando un ensayo estadístico ANOVA con múltiples comparaciones de Tukey.

Tal como se muestra en la Figura 29, se observó un incremento general del nivel de insaturación de los PL en la mutante condicional en presencia de ATc en comparación con el resto de las condiciones analizadas. Este resultado contrasta con lo observado respecto a las insaturaciones en los TAG. A diferencia de lo determinado en PL, los TAG

se encuentran significativamente más saturados cuando disminuye la actividad FAS-I, tal como se muestra en la Figura 30.

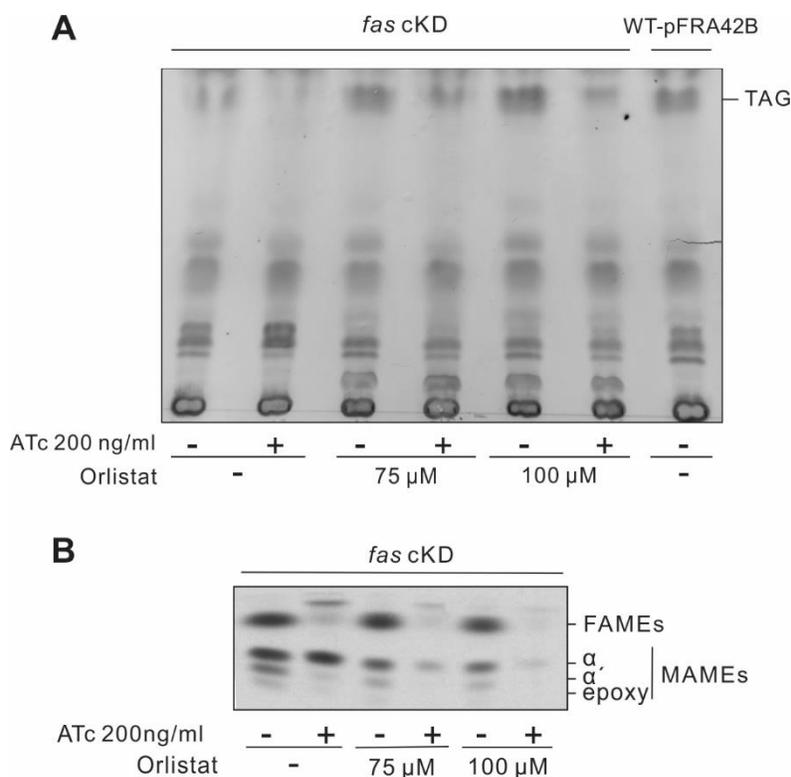


**Figura 30. Nivel de insaturación de los TAG en condiciones de depleción parcial de FAS-I.** El nivel de cada condición se calculó como el porcentaje de especies de TAG con 0, 1, 2 o 3 insaturaciones en todas las cadenas sustituyentes. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes. El asterisco indica un  $P$  value < 0,05 entre *fas cKD* ATc 200 ng/mL y el resto de las condiciones. El  $P$  value se calculó usando un ensayo estadístico ANOVA con múltiples comparaciones de Tukey.

#### 4.3.3.2 Movilización de TAG en condiciones de depleción parcial del sistema FAS-I en *M. smegmatis*.

Dado que tenemos una condición en la cual *M. smegmatis* disminuye en gran medida la síntesis de FA, pero no la síntesis de MA, quisimos estudiar de dónde estaría tomando el sistema FAS-II los FA para sintetizar los mMMA. En condiciones de disminución del

sistema FAS-I, si bien la síntesis de TAG se encuentra severamente afectada (Figura 21), estos no se llegan a depletar por completo. Por lo tanto, existía la posibilidad de que se estén movilizando los FA de estos lípidos de reserva para sintetizar MA. Con el objetivo de comprobar esta hipótesis, se realizó un experimento en el cual, además de reprimir la expresión del operón *fas-acpS*, se inhibió la hidrólisis de los TAG por medio del agregado de tetrahidrolipstatina (THL). Este es un inhibidor de lipasas conocido como “Orlistat”, y su uso en micobacterias ha sido previamente reportado (176–178). En la Figura 31A se puede observar el efecto de la adición de THL al medio de cultivo al mismo momento que el agregado de ATc. Podemos ver que ante el agregado de THL, la disminución de los TAG en condiciones de depleción parcial del sistema FAS-I (cultivos con ATc 200 ng/mL) es menor. Se puede comprobar entonces la inhibición de la movilización de los FA en estas condiciones. En la Figura 31B se observa que cuanto mayor es la inhibición de la movilización de los TAG, menor es la síntesis *de novo* de los MA.



**Figura 31. La inhibición de la movilización de los TAG limita la biosíntesis *de novo* de MA en el mutante condicional *fas* cKD.** A. Cultivos de *M. smegmatis fas* cKD fueron crecidos en presencia y ausencia de ATc 200 ng/mL, y en presencia y ausencia de Tetrahidroliptostatina 75 y 100  $\mu$ M. Se extrajeron lípidos totales de los cultivos en T3 y fueron analizados por TLC. B. Los metil ésteres de FA (FAMES) y de MA (MAMES) de las mismas muestras marcados con  $^{14}$ C fueron analizados por TLC. En ambos casos los volúmenes sembrados se normalizaron de acuerdo a las DO<sub>600</sub>.

#### 4.3.3.3 Cambios en el perfil de expresión proteica en condiciones de represión de la expresión del operón *fas-acpS* en *M. smegmatis*.

En vistas a los resultados obtenidos en el análisis, tanto de los acil-CoAs como de los lípidos en general en condiciones de depleción del sistema FAS-I, nos propusimos intentar entender cuáles eran los cambios a nivel proteico que generan este fenotipo. De esta manera, podríamos obtener información de cuáles son las rutas metabólicas que se están modificando para compensar la disminución de la actividad FAS-I y así

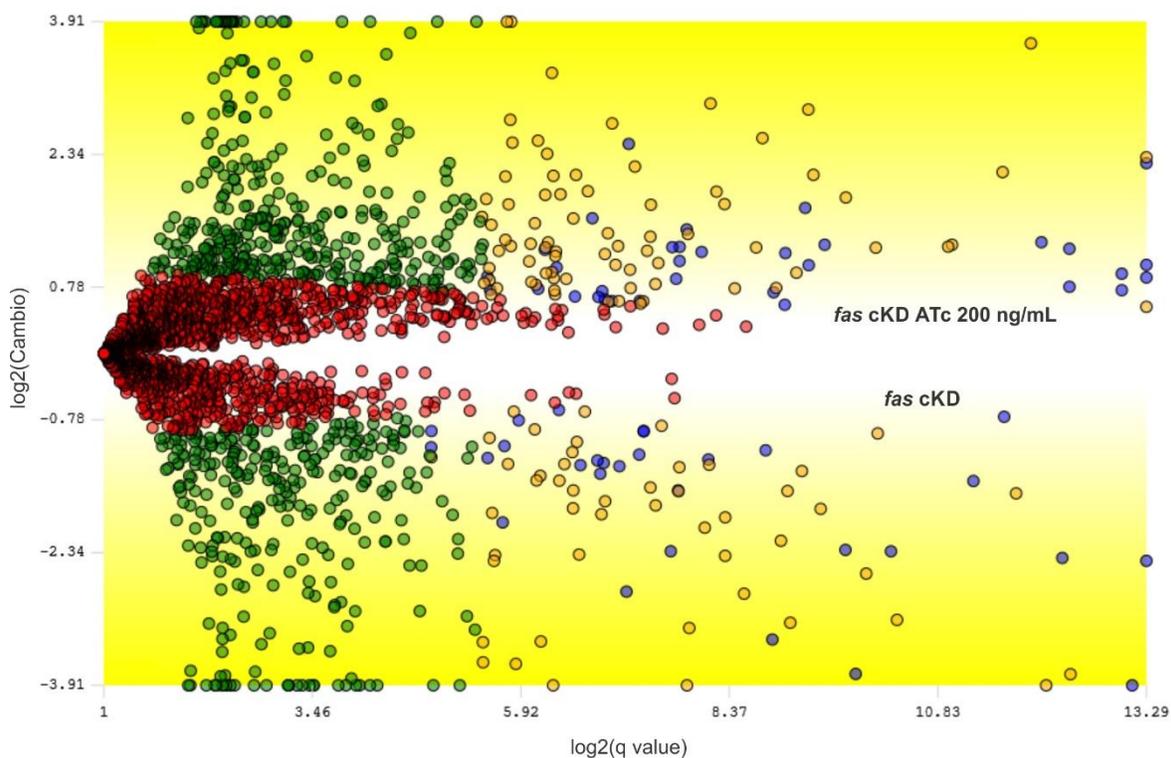
poder seguir estudiando los procesos regulatorios que mantienen la homeostasis lipídica. Con este objetivo, realizamos un perfil comparativo de la expresión proteica en general entre la mutante condicional *fas* cKD crecida en presencia y ausencia de ATc.

Para este ensayo decidimos utilizar la técnica denominada proteómica tipo escopeta (*shotgun*) y una cuantificación sin marca. Brevemente, el experimento consiste en digerir el extracto crudo con una proteasa específica, purificar y separar los péptidos por LC de fase reversa y finalmente cuantificarlos e identificarlos por MS y MS/MS respectivamente. Estos péptidos son luego asignados a las proteínas de las cuales provienen, y de esta manera se determinan los niveles de expresión relativos de las mismas en una condición. Al comparar estos niveles entre las distintas condiciones a estudiar, podemos identificar masivamente cuáles son las proteínas que aumentan o disminuyen su expresión. Cabe destacar que este método no contempla las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas y que podrían modular su actividad.

En la Figura 32 se muestran los resultados del experimento de proteómica en forma de gráfico volcán. Cada uno de los puntos representa una proteína detectada en ambas condiciones. El color de los puntos indica si la proteína cambia significativamente entre las dos condiciones o no en base a la relación de abundancia entre ambas (cambio) y a la significancia estadística del mismo. Para evaluar este último factor se realiza un test estadístico *t* con corrección Benjamini-Hochberg (*q-value*) y se predetermina que el FDR sea  $< 1\%$ . Los puntos rojos, son aquellos que no cambian lo suficiente (Relación *fas* cKD ATc / *fas* cKD menor a 0.5 o mayor a 2) y los verdes aquellos que cambian lo suficiente, pero con un *q-value* mayor al requerido. Los puntos naranjas y azules en cambio, son aquellas proteínas que superan ambos filtros y por lo tanto son tenidas en cuenta para analizar los cambios. Se usan dos colores debido a que, los naranjas, a diferencia de los azules, son proteínas detectadas en baja abundancia, por lo que se recomienda validar su expresión diferencial por otros métodos (179).

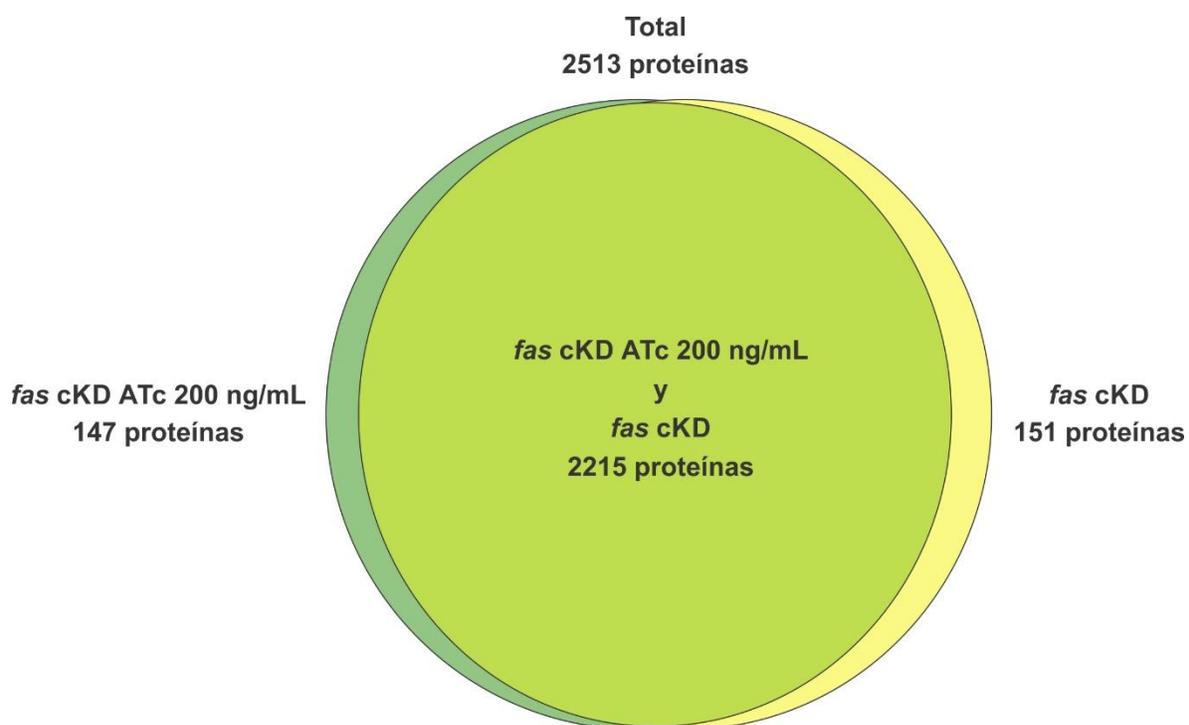
De esta forma, en el experimento se cuantificaron 2513 proteínas entre las dos condiciones de las 6602 que se estima que posee su proteoma (83). En la Figura 32 y en la Figura 33 se muestran los resultados de la comparación entre la mutante condicional *fas* cKD crecida en presencia y ausencia de ATc. Se encontraron 285 proteínas (15 %

de las cuantificadas) que se expresaron diferencialmente, de las cuales 62 proteínas (4 %) se catalogaron como “azules” y 223 (11 %) “naranjas” según la clasificación previamente mencionada (Figura 32).



**Figura 32.** Gráfico volcán que muestra la expresión diferencial de proteínas entre la mutante *fas cKD* crecida con ATc 200ng/mL y sin ATc. Se grafica el logaritmo del cambio en la abundancia de una proteína en una condición respecto de la otra vs. el logaritmo del *q value* que indica la significancia estadística de dicho cambio. Cada condición se analiza por triplicado y se analiza por un ensayo estadístico *t* ajustando el FDR con la corrección Benjamini-Hochberg.

Además de las proteínas cuantificadas en ambas condiciones, existen proteínas que sólo se detectaban de manera significativa en la mutante condicional *fas cKD* crecida con ATc (151 proteínas) o sin ATc (147 proteínas). Estas proteínas también forman parte de las que se consideraron que cambian su expresión ante la represión del operón *fas-acpS* (Figura 33).



**Figura 33. Diagrama de Venn de las proteínas identificadas en ambas condiciones o sólo en una de ellas.**

Una vez obtenidas las proteínas que modificaban su expresión en ambas comparaciones, se procedió a determinar las rutas metabólicas en las cuales participaban, para intentar entender de esta manera cómo se adapta o reacciona *M. smegmatis* a la disminución del sistema FAS-I. Las enzimas asociadas al metabolismo lipídico cuyos niveles de expresión fueron modificados en estas condiciones se listan en la tabla 9.

**Tabla 9. Enzimas asociadas al metabolismo lipídico que modifican su expresión ante la represión del operón *fas-acpS*.**

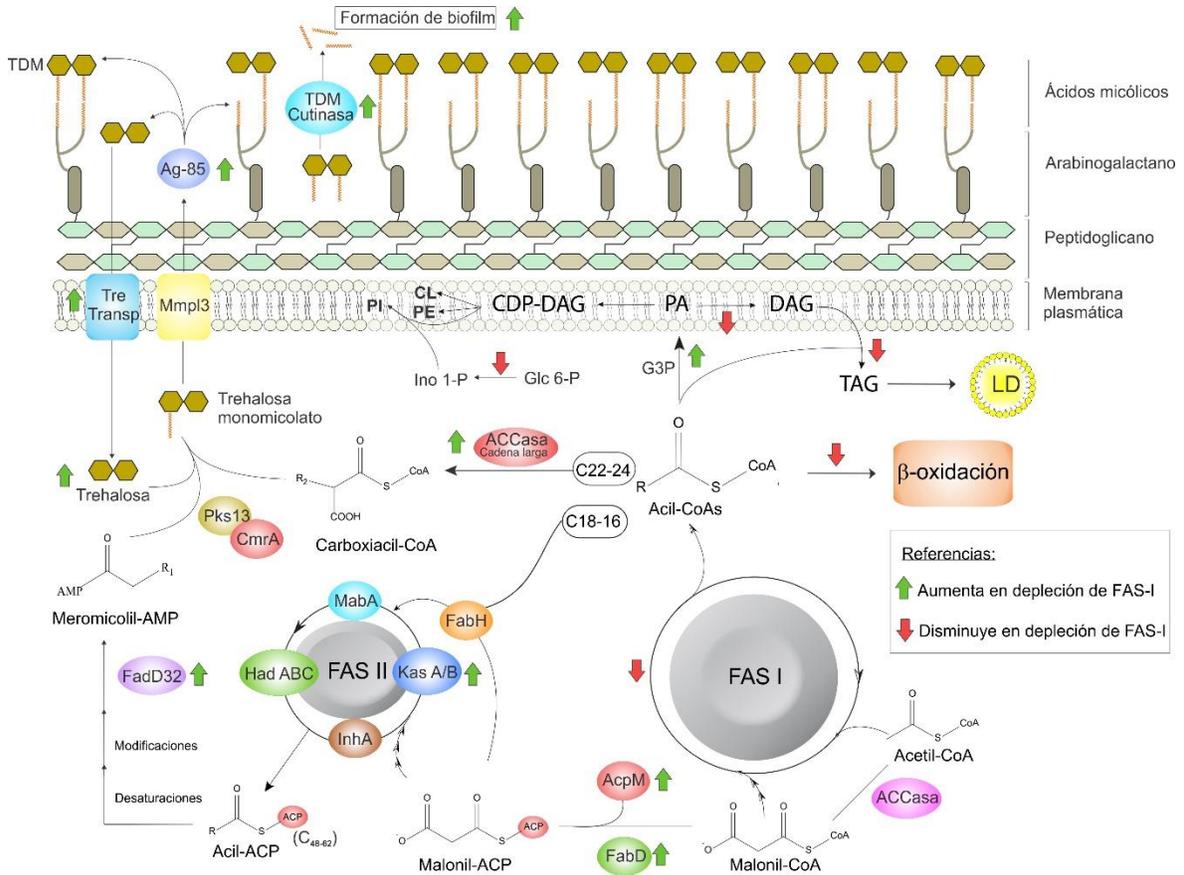
Ruta	Locus	Gen	Descripción	Cambio <i>fas</i> cKD ATc / <i>fas</i> cKD	<i>q-value</i>
FAS-I	MSMEG_4757	<i>fas</i>	Sintasa de FA tipo I	0,17 ↓	0,0128
FAS-II	MSMEG_4325	<i>fabD</i>	Malonil CoA-ACP transacilase	3,74 ↑	0,0004
	MSMEG_4326	<i>acpM</i>	ACP	2,04 ↑	0,0012
	MSMEG_4327	<i>kasA</i>	β-cetoacil-ACP sintasa A	1,91 ↑	0,0001
	MSMEG_4328	<i>kasB</i>	β-cetoacil-ACP sintasa B	2,59 ↑	0,002
	MSMEG_0948	<i>hadD</i>	hidratasa/deshidratasa (R)-especifica	2,11 ↑	0,0248
Acil-CoA sintetasas	MSMEG_6179	<i>acsA</i>	Acetil-CoA sintetasa	0,52 ↓	0,0005
	MSMEG_4254	<i>fadD15</i>	Acil-CoA de cadena larga sintetasa	1,8 ↑	0,0128
Carboxilasas	MSMEG_1807	<i>accA3</i>	Acil-CoA carboxilasa/Subunidad α	1,58 ↑	0,0051
	MSMEG_6391	<i>accD4</i>	Acil-CoA de cadena larga carboxilasa/Subunidad β	2,4 ↑	0,0022
	MSMEG_1813	<i>accD5</i>	Acil-CoA carboxilasa/Subunidad β	1,59 ↑	0,0079
Metabolismo MA	MSMEG_6393	<i>fadD32</i>	FA de cadena larga — AMP ligasa	1,61 ↑	0,024
	MSMEG_2078	<i>fbpB</i>	Complejo Ag-85 (Ag-85B)	1,67 ↑	0,009
	MSMEG_3580	<i>fbpC</i>	Complejo Ag-85 (Ag-85C)	3,41 ↑	0,0242
	MSMEG_6043	<i>otsB</i>	Trehalosa-6P fosfatasa	2,3 ↑	0,0286

Metabolismo trehalosa	MSMEG_5058	<i>sugC</i>	LpqY-SugA-SugB-SugC Sistema de transporte de trehalosa	1,98 <b>↑</b>	0,0045
Síntesis PL	MSMEG_4248	AGPAT	1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa / PA sintasa	10,61 <b>↑</b>	0,0026
	MSMEG_6904	<i>Ino1</i>	Inositol-3- fosfato sintasa	0,42 <b>↓</b>	0,0105
Síntesis TAG	MSMEG_0633	<i>Pap</i>	PA fosfatasa	Sólo ATc <b>↓</b>	
	MSMEG_4297	DGAT	DAG O-aciltransferasa	Sólo ATc <b>↓</b>	
Transporte de membrana y formación de biofilm	MSMEG_0241	<i>mmp11</i>	Exportador de MMDAG y WE	Sólo <b>↑</b> <i>fas</i> cKD	
	MSMEG_0382	<i>mmp14</i>	Exporte y biosíntesis de GPL	Sólo <b>↑</b> <i>fas</i> cKD	
	MSMEG_1529		Esterasa de serina específica de TDM	3,43 <b>↑</b>	0,0238
Metabolismo glicerol	MSMEG_6229	<i>glpK</i>	Glicerol kinasa	0,48 <b>↓</b>	0,0082
β-oxidación	MSMEG_2080	<i>fadE23</i>	Acil-CoA deshidrogenasa	0,15 <b>↓</b>	0,0007
	MSMEG_5494	<i>fadE12</i>	Acil-CoA deshidrogenasa	0,23 <b>↓</b>	0,0131
	MSMEG_5720	<i>fadB</i>	Enoil-CoA-hidratase/3- hidroxiacil-CoA deshidrogenasa	0,22 <b>↓</b>	0,0168
	MSMEG_1387	<i>fadE8</i>	Acil-CoA deshidrogenasa	0,44 <b>↓</b>	0,0147

Sólo ATc: Proteínas detectadas sólo en la condición *fas* cKD con ATc 200ng/mL.

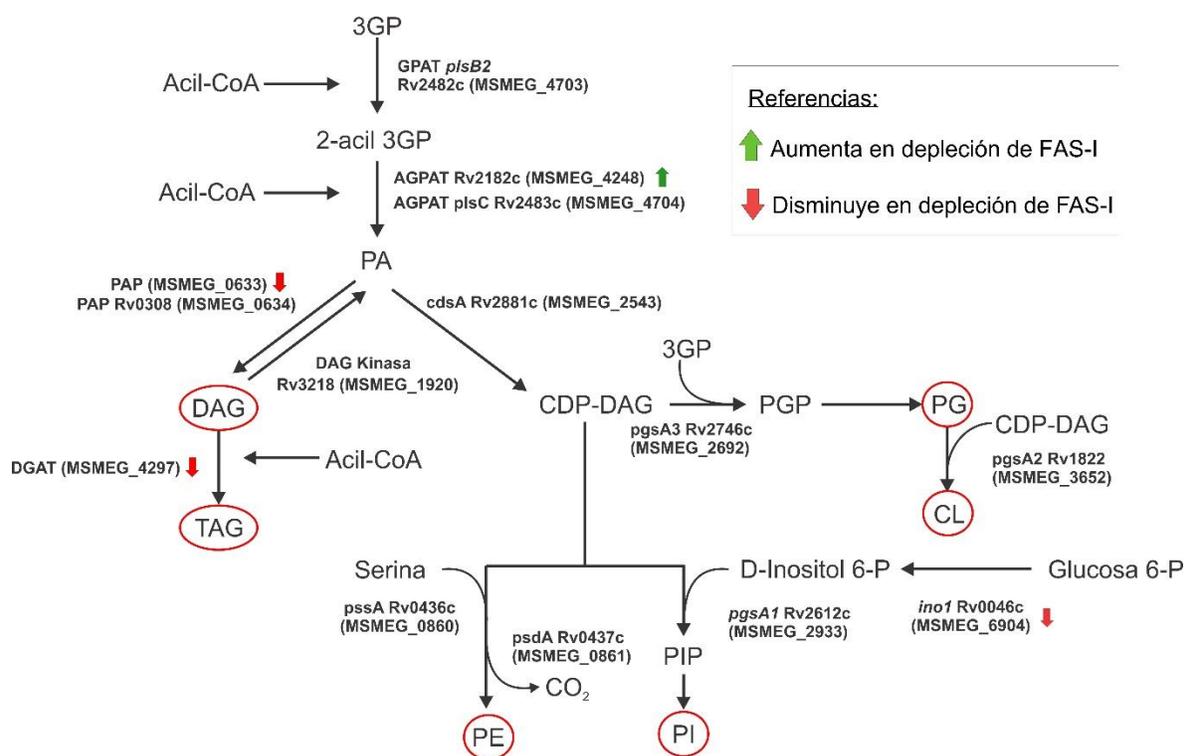
Sólo *fas* cKD: Proteínas detectadas sólo en la condición *fas* cKD.

En la Figura 34 se indican con flechas rojas o verdes las enzimas o los pasos biosintéticos del metabolismo lipídico cuyos niveles proteicos se encuentran alterados en condiciones de depleción del sistema FAS-I.



**Figura 34. Esquema de enzimas de la ruta de biosíntesis de lípidos que aumentan o disminuyen su abundancia en condiciones de depleción parcial de FAS-I en *M. smegmatis*.**

El cambio en el perfil de expresión de proteínas específico del metabolismo de PL de membrana y lípidos de reserva se esquematiza en la Figura 35.



**Figura 35. Esquema de la síntesis de TAG y PL en micobacterias.** Con flechas hacia arriba y hacia abajo se marcan las proteínas que aumentaron o disminuyeron su expresión en condiciones de depleción de FAS-I. GPAT: glicerol-3- fosfato acetiltransferasa, AGPAT: 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa, PAP: ácido fosfatídico fosfatasa, DGAT: diacilglicerol acetiltransferasa.

#### 4.3.4 Discusión

El mantenimiento de la homeostasis lipídica y la posibilidad de adaptarse a diferentes ambientes es esencial en todos los organismos. Sin embargo, en el caso de *M. tuberculosis*, esto adquiere una relevancia especial debido que es un patógeno con un complejo ciclo de vida, capaz de modular su metabolismo en respuestas a cambios ambientales dentro del huésped. Los lípidos complejos de su envoltura celular juegan un papel importante en la infección y el progreso de la enfermedad (180). Es por esto que entender la interacción entre FAS-I y las rutas metabólicas que dependen de los productos de FAS-I para sintetizar estos lípidos complejos de la envoltura en

micobacterias, es fundamental para comprender cómo estas bacterias mantienen su homeostasis lipídica.

Con el objetivo de estudiar la interacción entre FAS-I y las rutas de síntesis de PL de membrana, de los TAG de reserva y de los lípidos complejos, se construyó en el laboratorio una mutante condicional en el operón *fas-acpS* en el organismo modelo *M. smegmatis*. El análisis de esta mutante, denominada *fas* cKD, demostró que cuando se reprimía la expresión del sistema FAS-I disminuía la síntesis de FA como era esperado; sin embargo, no ocurría lo mismo con la síntesis de MA. Esto llamó la atención debido a que los primeros son sustratos del sistema FAS-II para sintetizar los MA según el modelo propuesto actualmente (47).

Así, en esta parte de la tesis, se analizó en detalle el efecto de la disminución del sistema FAS-I en *M. smegmatis*, con el objetivo de entender más en profundidad la interrelación de los distintos sistemas y rutas que hacen a la biosíntesis de la envoltura celular de éste microorganismo. De esta manera se determinó en primer lugar el perfil de acil-CoA, productos de FAS-I, en condiciones de depleción parcial de este sistema. Como era esperado, se pudo observar una acumulación en sus sustratos, acetil-CoA y malonil-CoA, y una fuerte reducción de los acil-CoAs de cadena media (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>). Sin embargo, el impacto de la reducción de FAS-I en los acil-CoAs de cadena larga (C<sub>19</sub>-C<sub>24</sub>) fue más moderado. Está establecido que FAS-I en *M. smegmatis* exhibe un comportamiento bimodal y que sus productos dominantes son los acil-CoAs C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> y C<sub>24</sub>. Sin embargo, también se ha demostrado que tanto la velocidad total de síntesis como la distribución de los productos de esta enzima es afectada por oligosacáridos endógenos o por la interacción de la FAS-I micobacteriana con otras enzimas que procesan FA como el sistema FAS-II (44,46,181,182). Así, la inesperada acumulación de acil-CoAs de cadena larga cuando se disminuye el sistema FAS-I, podría ser el resultado de un cambio bioquímico en su comportamiento bimodal en respuesta a la deficiencia de síntesis de FA *de novo*. Alternativamente, esta diferencia en la cantidad de acil-CoAs de cadena media y larga puede representar una degradación diferencial por el ciclo de la  $\beta$ -oxidación. Para intentar determinar de manera fehaciente si la modificación diferencial en los niveles de acil-CoAs se debe a un cambio en la síntesis y no a otros fenómenos se podría repetir el ensayo agregando acetato marcado con <sup>13</sup>C. De esta

manera, uno podría diferenciar las moléculas sintetizadas *de novo* luego del agregado de ATc y por consiguiente, depleción parcial del sistema FAS-I. En este caso, el isótopo estable del acetato agregado sería internalizado por las células como  $^{13}\text{C}$ -acetil-CoA y luego parte de éste sería empleado para sintetizar  $^{13}\text{C}$ -malonil-CoA por medio de las carboxilasas. Así, los acil-CoA sintetizados durante ese pulso de marca tendrían en sus cadenas aciladas  $^{13}\text{C}$ , ya sea por iniciación o por elongación con los precursores marcados. Finalmente, es interesante el escaso efecto de la disminución de actividad FAS-I sobre el  $\text{C}_{24}$ -CoA, e incluso el aumento de los niveles de carboxi- $\text{C}_{24}$ -CoA, siendo estos los precursores de la cadena  $\alpha$  de los MA. Esta observación es consistente con el hecho de no haberse observado una disminución en la síntesis *de novo* de los MA en condiciones de depleción parcial de la actividad FAS-I.

El análisis detallado de los lípidos totales por LC-MS/MS reveló que no sólo los MA aumentaban su abundancia en relación a los PL en condiciones de disminución de FAS-I, sino que además se observó un leve pero significativo aumento en el largo de las cadenas meromíclicas de todos los MA, ya sea se encuentren libres o asociados a otras moléculas (trehalosa y glicerol) (Tabla 8). Este tipo de perfil es el opuesto al encontrado en el perfil de lípidos de una mutante en el activador del operón *fasII* analizada en el laboratorio con esta misma técnica. En este caso, ante una disminución del sistema FAS-II, se determinó que los MA disminuían su abundancia en relación a los PL, los MA  $\alpha'$  aumentaban respecto de las otras especies y en todos los casos las cadenas de mMA disminuían su longitud (62). Esta observación, contraria a la observada en la mutante condicional *fas* cKD, indicaría que el cambio en el perfil de los MA observado es producido por el aumento de los niveles de las enzimas de FAS-II determinados en el ensayo de proteómica (Tabla 9). Otra posibilidad respecto del aumento en el largo de las cadenas de mMA, es que la disminución de los acil-CoAs de 16-18 carbonos, y no de  $\text{C}_{24}$ -CoA, generaría una deficiencia en los precursores iniciadores del sistema FAS-II. Esta deficiencia, sumado al aumento de los niveles de la unidad elongadora, malonil-CoA, podría aumentar en promedio el número de ciclos producidos por FAS-II y así sintetizar mMA más largos. Por otro lado, no sólo los MA sintetizados en condiciones de depleción parcial del gen *fas* son más largos, las cadenas aciladas sustituyentes de algunos PL también lo son (Tabla 8). De todas formas, es difícil especular la relación

entre la disminución de la actividad FAS-I y el mayor largo de cadena de los sustituyentes sintetizados por la misma FAS-I. Este aumento en las cadenas carbonadas, observado significativamente en las PE y CL, puede deberse en parte a la inclusión de cadenas de FA C<sub>24</sub> en su estructura (Figura 28), ya sea proveniente de la degradación de TAG como así también del C<sub>24</sub>-CoA disponible debido a su menor disminución respecto de otros acil-CoAs (Figura 24).

Al analizar el perfil de expresión diferencial de proteínas entre la mutante condicional crecida con y sin ATc, lo primero que llamó la atención fue que al reprimir la expresión del operón *fas-acpS* se observa una clara disminución de la proteína FAS-I, pero no de AcpS. Esto puede deberse a varias razones: la posibilidad de la existencia de un promotor independiente que se induzca en estas condiciones, regulaciones diferenciales a nivel post-transcripcional o bien a que la estabilidad del mRNA o la proteína AcpS sea mayor a la de FAS-I.

Previo al trabajo de la presente tesis, se había determinado que en condiciones de disminución de la actividad FAS I, disminuía la síntesis *de novo* de FA, pero no la de los MA. El estudio del perfil diferencial de expresión de proteínas reveló que existen numerosas adaptaciones que permiten, al menos en parte explicar este fenómeno.

En primer lugar, se puede observar en la tabla 9 cómo al disminuir los niveles de FAS-I, aumentaron los niveles de las enzimas pertenecientes al operón *fas-II* (MSMEG\_4325/4328): AcpM, FabD, KasA y KasB. Estas forman parte del sistema FAS-II, el cual es el responsable de la síntesis de los ácidos meromicólicos, uno de los sustratos necesarios para la síntesis de los MA. Estos ácidos meromicólicos, sintetizados unidos a AcpM, deben activarse a acil-AMP previo a su condensación. Esta reacción es llevada a cabo por FadD32, cuyos niveles también se encuentran aumentados en condiciones de depleción parcial del sistema FAS-I.

Por otro lado, se descubrió recientemente una enzima en *M. smegmatis* denominada HadD (MSMEG\_0948), la cual es esencial para la síntesis de MA  $\alpha$  y epoxi. Esta enzima también se encontró aumentada en condiciones de represión del operón *fas-acpS* (183).

El ensayo mostró que en las condiciones estudiadas se observaron mayores cantidades relativas de todas las subunidades que conforman el complejo de carboxilasa de cadena larga (AccA3, AccD4 y AccD5) con excepción de AccE5. Este

complejo es responsable de la activación de los acil-CoA de cadena larga, dando como resultado carboxi-acil-CoAs, sustratos de la Pks13 junto con los ácidos meromicólicos en la síntesis de los MA.

No sólo las enzimas de la síntesis de los precursores de los MA se vieron aumentadas, también se observaron incrementos en otras enzimas involucradas en su metabolismo. Los MA no se sintetizan libres sino unidos a una molécula de trehalosa previo a su translocación a través de la PM, por lo tanto, el metabolismo de este azúcar está íntimamente ligado a la producción de MA. En este sentido se observó que al reprimir el operón *fas-acpS*, dos enzimas del metabolismo de la trehalosa se vieron incrementados: OtsB, la cual participa en una de las vías de síntesis *de novo* de trehalosa (184); y SugC, parte del transportador ABC que utilizan las micobacterias para internalizar la trehalosa luego de liberar el MA en el espacio periplásmico (185,186).

Los MA, luego de ser sintetizados y transportados a través de la PM en forma de TMM, son finalmente sustratos del complejo Ag-85 para producir TDM o esterificar el MA al AG para formar la membrana interna de la mico-membrana (187). Tanto FbpB como FbpC, componentes del Ag-85, se encontraron aumentadas en las condiciones estudiadas. Por otro lado, el TDM sintetizado puede ser hidrolizado por una esterasa liberando los MA al medio cuando las micobacterias crecen en biofilm (188). Esta enzima, codificada por el gen MSMEG\_1529, también se encuentra aumentada en condiciones de represión del operón *fas-acpS*.

Podemos ver así que toda la ruta de síntesis y utilización de los MA, desde la síntesis de sus precursores hasta su ubicación final en la membrana y posterior liberación por hidrólisis, se encuentra aumentada en condiciones de depleción parcial del sistema FAS-I.

En la mutante condicional *fas* cKD crecida con ATc, además del metabolismo de los MA, se encuentra afectada la síntesis de lípidos de reserva y de lípidos de membrana. Una de las primeras enzimas de la ruta para producir estos compuestos es la 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa (AGPAT), la cual es responsable de la adición del segundo acilo al lisoPA para formar PA. El PA es el intermediario tanto de los PL como de los TAG según el modelo postulado. Esta molécula puede ser fosfataseada por la ácido fosfatídico fosfatasa (PAP) para dar DAG, el que a su vez puede ser acilada para la

síntesis de TAG, o también ser precursor de la CDP-DAG sintasa para generar CDP-DAG y ser destinado a la síntesis de PL (Figura 35). En condiciones de depleción parcial del sistema FAS-I se observó, por un lado, el aumento de la expresión de la AGPAT y por otro, la disminución de una PAP y una diacilglicerol aciltransferasa (DGAT). Esto indicaría una tendencia a aumentar la producción de PA y disminuir la síntesis de TAG, desviando los FA disponibles a la producción de PL. Sin embargo, el análisis lipídomico de la mutante *fas* cKD mostró que a pesar de que la célula parece destinar los PA a PL de membrana en vez de a lípidos de reserva, en general existe una merma de los mismos. Al observar los PL acumulados en condiciones de represión del gen *fas*, vemos que la disminución no es similar en todas las clases. Los PI caen casi 4 veces comparado con la mutante crecida sin ATc o con la cepa isogénica, mientras que el resto disminuye no más del 50 % (Figura 25). El PI, así como sus derivados PIM, LM y LAM, se han reportado como compuestos esenciales en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* (158). En línea con esta observación, se encontró que en condiciones de depleción parcial de FAS-I disminuyó de manera significativa la enzima Ino1, la cual es la responsable de la síntesis del inositol y por lo tanto del PI (150,189).

Cuando se analizó el largo de cadena de los sustituyentes de las diferentes clases de PL, sólo en la mutante en presencia de ATc se observó que las PE contenían el FA C<sub>24</sub>. La aparición del FA C<sub>24:0</sub> en un PL, aunque sea de manera minoritaria, es interesante ya que concuerda con el estado de la célula en el cual hay una drástica disminución de la cantidad disponible de acil-CoAs de cadena media en relación a los de cadena larga (Figura 23 y Figura 24). Si bien la síntesis de PL no ha sido estudiada en detalle en micobacterias, se postula que varias enzimas con actividad glicerol-3P-aciltransferasa o ácido fosfatídico-aciltransferasa actúan secuencialmente para sintetizar PA a partir de glicerol-3P y acil-CoAs. Este PA es el precursor de los PL y el que determina las sustituciones de los PL en el esquema propuesto (190). Teniendo en cuenta esta ruta, serían estas enzimas las que, siendo flexibles en la especificidad de sustrato, cargarían en la molécula de glicerol los acil-CoAs disponibles en la célula.

Otra característica del estudio de los sustituyentes de los PL en condiciones de depleción parcial de FAS-I, es el mayor número de insaturaciones de sus cadenas (Figura 29). Este fenómeno puede ocurrir con el objetivo de mitigar la rigidez de la PM

causada por el mayor largo de los FA sustituyentes de los PL (58). En el caso del pool de TAG analizados en estas condiciones, los cuales serían los remanentes luego de su utilización, se observó que poseen un nivel de insaturación promedio significativamente más bajo que en condiciones salvajes. En los análisis proteómicos no se ven diferencias en la expresión de proteínas que puedan explicar ambos fenotipos. Cabe mencionar nuevamente, que el fenotipo puede deberse a modificaciones post-traduccionales en las enzimas del metabolismo y no son detectadas en este análisis, y no a cambios en los niveles proteicos generales. Se puede especular que la diferencia en el nivel de insaturación entre los PL de membrana y los lípidos de reserva (TAG), pueda deberse a una utilización selectiva de los FA de los TAG más insaturados para sintetizar PL. Este hipotético caso podría ser la respuesta de *M. smegmatis* a este estrés al cual se la somete, dando como resultado PL más insaturados y TAG más saturados.

Como se mencionó anteriormente, los bajos niveles de FAS-I provocaron un desbalance en la composición relativa de los acil-CoAs en la célula. Los acil-CoAs no sólo son precursores de la biosíntesis de lípidos complejos, sino también importantes moléculas señal que son censadas por reguladores transcripcionales del metabolismo lipídico en varias especies (191–193). Los dos reguladores transcripcionales de micobacterias estudiados en nuestro laboratorio, FasR y MabR, censan los niveles de acil-CoA (61,88). FasR es un activador del operón *fas-acpS*, cuya afinidad por el ADN disminuye en presencia de acil-CoAs de cadena larga (88,194). En el caso de MabR, activador del operón *fasII*, la presencia de acil-CoAs de cadena larga promueve la unión del mismo al promotor *fasII* y así aumenta la transcripción del operón *fasII* (62). Teniendo en cuenta este contexto, proponemos que el aumento en la expresión de las proteínas del sistema FAS-II (Tabla 9) se debe a una distorsión del balance entre los acil-CoAs medios y largos a través de un mecanismo que puede estar mediado por MabR. Esta relación entre los acil-CoAs de cadena media (C<sub>14</sub>-C<sub>16</sub>) y cadena larga (C<sub>20</sub>-C<sub>24</sub>) (Figura 23 y Figura 24) está significativamente disminuida en las condiciones de depleción parcial del sistema FAS-I. De esta manera, el aumento de la expresión del sistema FAS-II podría estar siendo inducida por medio del regulador MabR, evidenciándose la inter-regulación entre ambos sistemas.

Por último, se estudió si los precursores necesarios para la síntesis de MA provenían de la hidrólisis de TAG en condiciones de disminución del sistema FAS-I. Para esto, además de reprimir la expresión del operón *fas*, se inhibieron las lipasas por medio del agregado de orlistat al medio de cultivo. En estas condiciones se observó una disminución en la síntesis de MA (Figura 31B). Los resultados muestran que la inhibición de la degradación de los TAG disminuye, al menos en parte, la síntesis *de novo* de MA en condiciones de depleción parcial del sistema FAS-I. Esto sugiere que los FA liberados de los TAG pueden compensar, hasta cierto punto, la reducción de la síntesis de FA *de novo* sobre la actividad del sistema FAS-II. Se sabe desde hace tiempo que bajo condiciones de hambre, las micobacterias dependen de la utilización de TAG como fuente de energía (195). En este sentido, Low y col. describieron que los TAG son utilizados durante la fase de re-crecimiento, de *M. bovis* BCG luego de una fase de dormancia por hipoxia. De manera similar a nuestro enfoque, la inhibición de la hidrólisis de los TAG utilizando orlistat impide re-crecimiento de la bacteria luego de la dormancia (177). Sin embargo, hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se demuestra experimentalmente que los TAG son un reservorio de FA como precursores para la biosíntesis de moléculas más complejas en bacterias.

Se ha reportado que *M. tuberculosis* utiliza determinados nutrientes derivados del huésped para persistir dentro de la célula del mismo. Existe evidencia que los FA y el colesterol son nutrientes importantes durante la infección *in vivo* o en macrófagos infectados (196). La construcción de una mutante condicional en el gen *fas* en *M. tuberculosis* ayudará a definir la esencialidad de la síntesis *de novo* de FA en la supervivencia de este patógeno durante la infección. Esto probaría de manera inequívoca si FAS-I es un buen blanco para el desarrollo de nuevas drogas. Más aun, una mutante condicional de FAS-I en *M. tuberculosis*, ayudaría a estudiar cómo responde la red de regulación que conecta las diferentes rutas biosintéticas de lípidos, algunos esenciales para la virulencia de este patógeno, a la deficiencia de síntesis *de novo* de FA.

## 5. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método de extracción, separación cromatográfica y cuantificación por espectrometría de masas de acil-CoAs y Carboxi-acil-CoAs en micobacterias y otros actinomicetos.
- Se determinaron los perfiles de acil-CoAs en *M. smegmatis*, *M. bovis*, *S. coelicolor* y *C. glutamicum*, los cuales coincidieron con el contenido de FA de los mismos según lo reportado por la bibliografía.
- Se analizaron los efectos en los niveles de acil-CoAs endógenos en *M. smegmatis* al reprimir la síntesis de FA y luego de suplementar el medio de cultivo con un ácido heptadecanoico.
- Se desarrolló un método de extracción, separación cromatográfica y cuantificación relativa por espectrometría de masas de los lípidos totales en micobacterias.
- Se determinaron los perfiles de lípidos totales de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* salvajes incluyendo los niveles de insaturación y largos promedio de cadena carbonada de cada clase de lípidos.
- Se analizaron los efectos de la disminución parcial del sistema FAS I en el perfil de acil-CoAs y lípidos en general en *M. smegmatis*.
- Se determinó que los lípidos de reserva (TAGs) son al menos una de las fuentes de FA para la síntesis de MA en condiciones de disminución parcial del sistema FAS I.
- Se realizó un estudio de proteómica cuantitativa en la mutante condicional *fas* cKD y determinaron posibles cambios en el nivel de ciertas proteínas que podrían explicar en parte los efectos observados en el metabolismo de lípidos.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Tortoli, E. (2006). The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 48, 159–178
2. Embley, T. M. y Stackebrandt, E. (1994). The Molecular Phylogeny and Systematics of the Actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 257–289
3. Guglielmetti, L., Mougari, F., Lopes, A., Raskine, L. y Cambau, E. (2015). Human infections due to nontuberculous mycobacteria: the infectious diseases and clinical microbiology specialists' point of view. *Future Microbiol.* 10, 1467–1483
4. Clark-Curtiss, J. E., Jacobs, W. R., Docherty, M. A., Ritchie, L. R. y Curtiss, R. (1985). Molecular analysis of DNA and construction of genomic libraries of *Mycobacterium leprae*. *J. Bacteriol.* 161, 1093–102
5. Young, R. A. y col. (1985). Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 2583–7
6. Monot, M. y col. (2009). Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat. Genet.* 41, 1282–1289
7. Jacobs, W. R., Docherty, M. A., Curtiss, R. y 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, 1926–30
8. Kieser, T., Moss, M. T., Dale, J. W. y Hopwood, D. A. (1986). Cloning and expression of *Mycobacterium bovis* BCG DNA in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 168, 72–80
9. Shiloh, M. U. y DiGiuseppe Champion, P. a. (2010). To catch a killer. What can mycobacterial models teach us about *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis? *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 86–92
10. Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Kieser, T. y Jacobs, W. R. (1990). Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 4, 1911–9
11. Etienne, G. y col. (2005). The cell envelope structure and properties of *Mycobacterium smegmatis* mc2155: Is there a clue for the unique transformability of the strain? *Microbiology* 151, 2075–2086
12. Kaufmann, S. H. E. (2003). A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis (Edinb).* 83, 86–90
13. Daniel, T. M. (2006). The history of tuberculosis. *Respir. Med.* 100, 1862–1870
14. Sreevatsan, S. y col. (1997). Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global

dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9869–74

15. Cole, S. T. (2002). Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 148, 2919–2928
16. Chaptini, C. y Marshman, G. (2015). Leprosy: a review on elimination, reducing the disease burden, and future research. *Lepr. Rev.* 86, 307–15
17. Scollard, D. M. y col. (2006). The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 338–81
18. Walsh, D. S., Portaels, F. y Meyers, W. M. (2011). Buruli Ulcer: Advances in Understanding *Mycobacterium ulcerans* Infection. *Dermatol. Clin.* 29, 1–8
19. Sizaire, V., Nackers, F., Comte, E. y Portaels, F. (2006). *Mycobacterium ulcerans* infection: control, diagnosis, and treatment. *Lancet Infect. Dis.* 6, 288–296
20. O’Garra, A. y col. (2013). The Immune Response in Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 475–527
21. Harisinghani, M. G. y col. (2000). Tuberculosis from Head to Toe. *RadioGraphics* 20, 449–470
22. Tiemersma, E. W., van der Werf, M. J., Borgdorff, M. W., Williams, B. G. y Nagelkerke, N. J. D. (2011). Natural history of tuberculosis: duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: a systematic review. *PLoS One* 6, e17601
23. World Health Organization. (2018). *Global tuberculosis report 2018*.
24. Jackson, M. (2014). The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4,
25. Jankute, M., Cox, J. A. G., Harrison, J. y Besra, G. S. (2015). Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 405–423
26. Chiaradia, L. y col. (2017). Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci. Rep.* 7, 12807
27. Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J. M. y Engelhardt, H. (2008). Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3963–3967
28. McNeil, M., Daffe, M. y Brennan, P. J. (1991). Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 266, 13217–23
29. Daffé, M., Reyrat, J.-M. y Avenir, G. (2008). *The Mycobacterial Cell Envelope*. American Society of Microbiology, Washington, DC 20036.  
doi:10.1128/9781555815783

30. Hong, S. y col. (2012). Ultralong C100 Mycolic Acids Support the Assignment of *Segniliparus* as a New Bacterial Genus. *PLoS One* 7, e39017
31. Barry, C. E. y col. (1998). Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. *Prog. Lipid Res.* 37, 143–179
32. Brown, A. K., Taylor, R. C., Bhatt, A., Fütterer, K. y Besra, G. S. (2009). Platensimycin Activity against Mycobacterial  $\beta$ -Ketoacyl-ACP Synthases. *PLoS One* 4, e6306
33. Daffé, M. y Etienne, G. (1999). The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber. Lung Dis.* 79, 153–169
34. Daffé, M., Crick, D. C. y Jackson, M. (2014). Genetics of Capsular Polysaccharides and Cell Envelope ( Glyco ) lipids. 1–46 doi:10.1128/microbiolspec.MGM2-0021-2013.f1
35. Ortalo-Magne, A. y col. (1995). Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology* 141, 1609–1620
36. H., A. y A., S. S. (2002). Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 367–376
37. Rock, C. O. y Jackowski, S. (2002). Forty Years of Bacterial Fatty Acid Synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 1155–1166
38. Marrakchi, H., Zhang, Y. M. y Rock, C. O. (2002). Mechanistic diversity and regulation of Type II fatty acid synthesis. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 1050–5
39. Schweizer, E. y 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
40. Rock, C. O. y 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
41. Gago, G., Diacovich, L., Arabolaza, A., Tsai, S.-C. y Gramajo, H. (2011). Fatty acid biosynthesis in actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 475–497
42. Wheeler, P. R., Bulmer, K. y 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
43. Zimhony, O. y col. (2015). AcpM, the Meromycolate Extension Acyl Carrier Protein of *Mycobacterium tuberculosis* , Is Activated by the 4'-Phosphopantetheinyl Transferase PptT, a Potential Target of the Multistep Mycolic Acid Biosynthesis. *Biochemistry* 54, 2360–2371
44. Banis, R. J., Peterson, D. O. y Bloch, K. (1977). *Mycobacterium smegmatis* fatty acid synthetase. Polysaccharide stimulation of the rate-limiting step. *J. Biol. Chem.* 252, 5740–4

45. Jackson, M. y Brennan, P. J. (2009). Polymethylated polysaccharides from *Mycobacterium* species revisited. *J. Biol. Chem.* 284, 1949–53
46. Papaioannou, N., Cheon, H.-S. S., Lian, Y. y Kishi, Y. (2007). Product-regulation mechanisms for fatty acid biosynthesis catalyzed by *Mycobacterium smegmatis* FAS I. *ChemBioChem* 8, 1775–1780
47. Marrakchi, H., Lanéelle, M.-A. A. y Daffé, M. (2014). Mycolic acids: Structures, biosynthesis, and beyond. *Chem. Biol.* 21, 67–85
48. Brown, A. K. y col. (2005). Probing the mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III mtFabH: factors influencing catalysis and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 280, 32539–47
49. Slayden, R. A. y Barry, C. E. (2002). The role of KasA and KasB in the biosynthesis of meromycolic acids and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 82, 149–60
50. Bhatt, A. y col. (2005). Conditional Depletion of KasA , a Key Enzyme of Mycolic Acid Biosynthesis , Leads to Mycobacterial Cell Lysis Conditional Depletion of KasA , a Key Enzyme of Mycolic Acid Biosynthesis , Leads to Mycobacterial Cell Lysis. 187, 7596–7606
51. Bhatt, A. y col. (2007). Deletion of kasB in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5157–62
52. Banerjee, A. y col. (1994). inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 263, 227–30
53. Sacco, E. y col. (2007). The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 14628–33
54. Léger, M. y col. (2009). The Dual Function of the *Mycobacterium tuberculosis* FadD32 Required for Mycolic Acid Biosynthesis. *Chem. Biol.* 16, 510–519
55. Bazet Lyonnet, B. y col. (2017). Functional reconstitution of the *Mycobacterium tuberculosis* long-chain acyl-CoA carboxylase from multiple acyl-CoA subunits. *FEBS J.* 284, 1110–1125
56. Portevin, D. y col. (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
57. Portevin, D. y col. (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

58. Zhang, Y.-M. y Rock, C. O. (2008). Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 222–233
59. Matsuoka, H., Hirooka, K. y Fujita, Y. (2007). Organization and function of the YsiA regulon of *Bacillus subtilis* involved in fatty acid degradation. *J. Biol. Chem.* 282, 5180–94
60. Cronan, J. E. y Subrahmanyam, S. (1998). FadR, transcriptional co-ordination of metabolic expediency. *Mol. Microbiol.* 29, 937–43
61. Salzman, V. y col. (2010). Transcriptional regulation of lipid homeostasis in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 78, 64–77
62. Tsai, Y. T., Salzman, V., Cabruja, M., Gago, G. y Gramajo, H. (2017). Role of long-chain acyl-CoAs in the regulation of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria. *Open Biol.* 7, 170087
63. Mondino, S. (2014). Regulación de la síntesis de ácidos grasos en micobacterias. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Rosario, Argentina
64. Cole, S. T. y col. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–44
65. Cabruja, M. y col. (2017). A conditional mutant of the fatty acid synthase unveils unexpected cross talks in mycobacterial lipid metabolism. *Open Biol.* 7, 160277
66. Keating, L. A. y col. (2005). The pyruvate requirement of some members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex is due to an inactive pyruvate kinase: implications for in vivo growth. *Mol. Microbiol.* 56, 163–174
67. Kinoshita, S., Nakayama, K. y Akita, S. (1958). Taxonomical Study of Glutamic Acid Accumulating Bacteria, *Micrococcus glutamicus* nov. sp. *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan* 22, 176–185
68. Kieser, T. y col. (2000). *Practical Streptomyces genetics*. John Innes Foundation, Norwich.
69. Boldrin, F. y col. (2010). Development of a repressible mycobacterial promoter system based on two transcriptional repressors. *Nucleic Acids Res.* 38, 1–11
70. Sambrook, J. y Fritsch, F. (1989). *Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
71. Durchschlag, H., Biedermann, G. y Eggerer, H. (1981). Large-scale purification and some properties of malate synthase from baker's yeast. *Eur. J. Biochem.* 114, 255–62
72. Sun, D., Cree, M. G. y Wolfe, R. R. (2006). Quantification of the concentration and <sup>13</sup>C tracer enrichment of long-chain fatty acyl-coenzyme A in muscle by liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 349, 87–95

73. Layre, E. y col. (2011). A Comparative Lipidomics Platform for Chemotaxonomic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biol.* 18, 1537–1549
74. Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A. y Oresic, M. (2010). MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics* 11, 395
75. Pedrioli, P. G. A. y col. (2004). A common open representation of mass spectrometry data and its application to proteomics research. *Nat. Biotechnol.* 22, 1459–1466
76. Kessner, D., Chambers, M., Burke, R., Agus, D. y Mallick, P. (2008). ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics* 24, 2534–2536
77. Chambers, M. C. y col. (2012). A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* 30, 918–920
78. Kremer, L. y col. (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
79. Chopra, T. y col. (2014). Quantitative Mass Spectrometry Reveals Plasticity of Metabolic Networks in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 3014–3028
80. Smith, P. K. y col. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85
81. LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685
82. Carvalho, P. C. y col. (2015). Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat. Protoc.* 11, 102–117
83. The UniProt Consortium. (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 45, D158–D169
84. Zybilov, B. y col. (2006). Statistical Analysis of Membrane Proteome Expression Changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.* 5, 2339–2347
85. Haynes, C. a. (2011). Analysis of mammalian fatty acyl-coenzyme A species by mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1811, 663–668
86. Shi, L. y Tu, B. P. (2015). Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33, 125–31
87. Black, P. N., Færgeman, N. J. y Dirusso, C. C. (2000). Long-Chain Acyl-CoA-Dependent Regulation of Gene Expression in Bacteria, Yeast and Mammals. *J. Nutr.*

130, 305S–309S

88. Mondino, S., Gago, G. y Gramajo, H. (2013). Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 89, 372–87
89. Jamal, S. B. y col. (2017). An integrative in-silico approach for therapeutic target identification in the human pathogen *Corynebacterium diphtheriae*. *PLoS One* 12, e0186401
90. Hopwood, D. A. (1989). Antibiotics: Opportunities for Genetic Manipulation. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 324, 549–562
91. Krämer, R. (1994). Systems and mechanisms of amino acid uptake and excretion in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 162, 1–13
92. Corkey, B. E. (1988). Analysis of acyl-coenzyme A esters in biological samples. *Methods Enzymol.* 166, 55–70
93. Bieber, L. L. (1992). Quantitation of CoASH and acyl-CoA. *Anal. Biochem.* 204, 228–30
94. Mandrup, S. y col. (1993). Effect of heterologous expression of acyl-CoA-binding protein on acyl-CoA level and composition in yeast. *Biochem. J.* 290 ( Pt 2, 369–74
95. Wadler, C. y Cronan, J. E. (2007). Dephospho-CoA kinase provides a rapid and sensitive radiochemical assay for coenzyme A and its thioesters. *Anal. Biochem.* 368, 17–23
96. Larson, T. R. y Graham, I. a. (2001). A novel technique for the sensitive quantification of acyl CoA esters from plant tissues. *Plant J.* 25, 115–125
97. Shimazu, M., Vetcher, L., Galazzo, J. L., Licari, P. y Santi, D. V. (2004). A sensitive and robust method for quantification of intracellular short-chain coenzyme A esters. *Anal. Biochem.* 328, 51–9
98. Magnes, C. y col. (2007). Validated Comprehensive Analytical Method for Quantification of Coenzyme-A Activated Compounds in Biological Tissues by Triple Quadrupol LC/MS/MS. *ZMF Day 80*, 5736–5742
99. Onorato, J. M. y col. (2010). Liquid-liquid extraction coupled with LC/MS/MS for monitoring of malonyl-CoA in rat brain tissue. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3137–3142
100. Zimmermann, M., Thormann, V., Sauer, U. y Zamboni, N. (2013). Nontargeted profiling of coenzyme A thioesters in biological samples by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 85, 8284–8290
101. Haynes, C. a y col. (2008). Quantitation of fatty acyl-coenzyme As in mammalian cells by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Lipid Res.* 49, 1113–1125
102. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. y Glajch, J. L. (1997). *Practical HPLC Method*

*Development*. John Wiley y Sons, Inc, Hoboken. doi:10.1002/9781118592014

103. Noga, M. J. y col. (2016). Mass-Spectrometry-Based Quantification of Protein-Bound Fatty Acid Synthesis Intermediates from *Escherichia coli*. *J. Proteome Res.* 15, 3617–3623
104. Peterson, D. O. y Bloch, K. (1977). *Mycobacterium smegmatis* fatty acid synthetase. Long chain transacylase chain length specificity. *J. Biol. Chem.* 252, 5735–9
105. Kaneda, T. (1991). Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* 55, 288–302
106. Wallace, K. K., Zhao, B., McArthur, H. A. y Reynolds, K. A. (1995). In vivo analysis of straight-chain and branched-chain fatty acid biosynthesis in three actinomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 131, 227–34
107. Kelleher, N. L. y col. (1999). Localization of labile posttranslational modifications by electron capture dissociation: The case of  $\gamma$ -carboxyglutamic acid. *Anal. Chem.* 71, 4250–4253
108. Russell, D. G. y col. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* wears what it eats. *Cell Host Microbe* 8, 68–76
109. Watkins, P. a. (2008). Very-long-chain acyl-CoA synthetases. *J. Biol. Chem.* 283, 1773–1777
110. Price, A. C. y col. (2001). Inhibition of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases by thiolactomycin and cerulenin. Structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* 276, 6551–9
111. Sun, Z. y col. (1999). Reduced pyrazinamidase activity and the natural resistance of *Mycobacterium kansasii* to the antituberculosis drug pyrazinamide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 537–42
112. Rozwarski, D. A., Grant, G. A., Barton, D. H., Jacobs, W. R. y Sacchettini, J. C. (1998). Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 279, 98–102
113. Vilchèze, C. y col. (2000). Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASI end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 182, 4059–67
114. Li, Y., Florova, G. y Reynolds, K. a. (2005). Alteration of the Fatty Acid Profile of *Streptomyces coelicolor* by Replacement of the Initiation Enzyme 3-Ketoacyl Acyl. doi:10.1128/JB.187.11.3795
115. Radmacher, E. y col. (2005). Two functional FAS-I type fatty acid synthases in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* 151, 2421–2427
116. Zimhony, O., Vilchèze, C. y Jacobs, W. R. (2004). Characterization of *Mycobacterium smegmatis* expressing the *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I (fas1)

- gene. *J. Bacteriol.* 186, 4051–4055
117. Zhang, Y. (2005). The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 529–564
  118. Menendez-Bravo, S., Comba, S., Sabatini, M., Arabolaza, A. y Gramajo, H. (2014). Expanding the chemical diversity of natural esters by engineering a polyketide-derived pathway into *Escherichia coli*. *Metab. Eng.* 24, 97–106
  119. Cabruja, M., Lyonnet, B. B., Millán, G., Gramajo, H. y Gago, G. (2016). Analysis of coenzyme A activated compounds in actinomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100,
  120. Bazet Lyonnet, B. y col. (2014). Pleiotropic effect of AccD5 and AccE5 depletion in acyl-coenzyme A carboxylase activity and in lipid biosynthesis in mycobacteria. *PLoS One* 9, e99853
  121. Hu, C. y col. (2009). Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery. *J. Chromatogr. B* 877, 2836–2846
  122. Yang, K. y Han, X. (2016). Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends Biochem. Sci.* 41, 954–969
  123. Wenk, M. R. (2010). Lipidomics: New tools and applications. *Cell* 143, 888–895
  124. Wolf, C. y Quinn, P. J. (2008). Lipidomics: Practical aspects and applications. *Prog. Lipid Res.* 47, 15–36
  125. Fernandis, A. Z. y Wenk, M. R. (2009). Lipid-based biomarkers for cancer. *J. Chromatogr. B* 877, 2830–2835
  126. Hanash, S. (2003). Disease proteomics. *Nature* 422, 226–232
  127. J. van der Greef, \*,†,‡,§ y col. (2007). The Art and Practice of Systems Biology in Medicine: Mapping Patterns of Relationships. doi:10.1021/PR0606530
  128. Sreekumar, A. y col. (2009). Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature* 457, 910–914
  129. Layre, E. y Moody, D. B. (2013). Lipidomic profiling of model organisms and the world's major pathogens. *Biochimie* 95, 109–115
  130. Médigue, C., Cole, S. T., Camus, J.-C. y Pryor, M. J. (2002). Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 148, 2967–2973
  131. Portevin, D. y col. (2014). Lipidomics and genomics of *Mycobacterium tuberculosis* reveal lineage-specific trends in mycolic acid biosynthesis. *Microbiologyopen* 3, 823–835
  132. Crick, P. J. y Guan, X. L. (2016). Lipid metabolism in mycobacteria—Insights using

- mass spectrometry-based lipidomics. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1861, 60–67
133. Koelmel, J. P. y col. (2017). LipidMatch: an automated workflow for rule-based lipid identification using untargeted high-resolution tandem mass spectrometry data. *BMC Bioinformatics* 18, 331
  134. Rainville, P. D., Stumpf, C. L., Shockcor, J. P., Plumb, R. S. y Nicholson, J. K. (2007). Novel Application of Reversed-Phase UPLC-oeTOF-MS for Lipid Analysis in Complex Biological Mixtures: A New Tool for Lipidomics. *J. Proteome Res.* 6, 552–558
  135. Pietiläinen, K. H. y col. (2007). Acquired Obesity Is Associated with Changes in the Serum Lipidomic Profile Independent of Genetic Effects – A Monozygotic Twin Study. *PLoS One* 2, e218
  136. Jain, M. y col. (2007). Lipidomics reveals control of *Mycobacterium tuberculosis* virulence lipids via metabolic coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5133–8
  137. Taguchi, R. y col. (2005). Focused lipidomics by tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 823, 26–36
  138. Ejsing, C. S. y col. (2009). Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2136–41
  139. Sandra, K., Pereira, a. D. S., Vanhoenacker, G., David, F. y Sandra, P. (2010). Comprehensive blood plasma lipidomics by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 4087–4099
  140. Folch, j., Lees, m. y Sloane Stanley, g. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509
  141. Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917
  142. Iverson, S. J., Lang, S. L. y Cooper, M. H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* 36, 1283–7
  143. Stadthagen, G. y col. (2005). p-hydroxybenzoic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 280, 40699–40706
  144. Hsu, F.-F. y Turk, J. (2009). Electrospray ionization with low-energy collisionally activated dissociation tandem mass spectrometry of glycerophospholipids: Mechanisms of fragmentation and structural characterization. *J. Chromatogr. B* 877, 2673–2695
  145. Ivanova, P. T., Milne, S. B., Byrne, M. O., Xiang, Y. y Brown, H. A. (2007). Glycerophospholipid Identification and Quantitation by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. in *Methods in enzymology* 432, 21–57

146. Shui, G. y col. (2012). Mycolic acids as diagnostic markers for tuberculosis case detection in humans and drug efficacy in mice. *EMBO Mol. Med.* 4, 27–37
147. Krank, J., Murphy, R. C., Barkley, R. M., Duchoslav, E. y McAnoy, A. (2007). Qualitative Analysis and Quantitative Assessment of Changes in Neutral Glycerol Lipid Molecular Species Within Cells. in *Methods in enzymology* 432, 1–20
148. Byrdwell, W. C. y Neff, W. E. (2002). Dual parallel electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (MS), MS/MS and MS/MS/MS for the analysis of triacylglycerols and triacylglycerol oxidation products. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 300–319
149. Purdy, G. E., Pacheco, S., Turk, J. y Hsu, F.-F. (2013). Characterization of mycobacterial triacylglycerols and monomeromycolyl diacylglycerols from *Mycobacterium smegmatis* biofilm by electrospray ionization multiple-stage and high-resolution mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 7415–7426
150. Haites, R. E., Morita, Y. S., McConville, M. J. y Billman-Jacobe, H. (2005). Function of Phosphatidylinositol in Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 280, 10981–10987
151. Hsu, F.-F., Turk, J., Owens, R. M., Rhoades, E. R. y Russell, D. G. (2007). Structural characterization of phosphatidyl-myo-inositol mannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus calmette gúerin by multiple-stage quadrupole ion-trap mass spectrometry with electrospray ionization. II. Monoacyl- and diacyl-PIMs. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18, 479–492
152. Cajka, T. y Fiehn, O. (2014). Comprehensive analysis of lipids in biological systems by liquid chromatography-mass spectrometry. *Trends Analyt. Chem.* 61, 192–206
153. Sartain, M. J., Dick, D. L., Rithner, C. D., Crick, D. C. y Belisle, J. T. (2011). Lipidomic analyses of *Mycobacterium tuberculosis* based on accurate mass measurements and the novel ‘Mtb LipidDB’. *J. Lipid Res.* 52, 861–872
154. Queiroz, A., Medina-Cleghorn, D., Marjanovic, O., Nomura, D. K. y Riley, L. W. (2015). Comparative metabolic profiling of *mce1* operon mutant vs wild-type *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Pathog. Dis.* 73, ftv066
155. Lindemann, C. y col. (2017). Strategies in relative and absolute quantitative mass spectrometry based proteomics. *Biol. Chem.* 398, 687–699
156. Crellin, P. K., Luo, C.-Y. y Morita, S. Y. (InTech, 2013). Metabolism of Plasma Membrane Lipids in Mycobacteria and Corynebacteria. in *Lipid Metabolism* doi:10.5772/52781
157. Khuller, G. K., Taneja, R., Kaur, S. y Verma, J. N. (1982). Lipid composition and virulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 60 (Pt 5), 541–7
158. Jackson, M., Crick, D. C. y Brennan, P. J. (2000). Phosphatidylinositol Is an Essential

Phospholipid of Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 275, 30092–30099

159. Daffé, M. y Draper, P. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* 39, 131–203
160. Jankute, M. y col. (2017). The role of hydrophobicity in tuberculosis evolution and pathogenicity. *Sci. Rep.* 7, 1315
161. Bartram, J., Cotruvo, J. A., Dufour, A., Rees, G. y Pedley, S. (2004). *Pathogenic Mycobacteria in Water A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management*. World Health Organization, Geneva.
162. Gago, G., Diacovich, L. y Gramajo, H. (2018). Lipid metabolism and its implication in mycobacteria–host interaction. *Curr. Opin. Microbiol.* 41, 36–42
163. Rangan, V. S. y Smith, S. (2002). Chapter 6 Fatty acid synthesis in eukaryotes. *New Compr. Biochem.* 36, 151–179
164. Schaeffer, M. L. y col. (2001). Purification and Biochemical Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -Ketoacyl-acyl Carrier Protein Synthases KasA and KasB. *J. Biol. Chem.* 276, 47029–47037
165. Kremer, L. y col. (2002). Temperature-induced changes in the cell-wall components of *Mycobacterium thermoresistibile*. *Microbiology* 148, 3145–3154
166. Jackson, M., McNeil, M. R. y Brennan, P. J. (2013). Progress in targeting cell envelope biogenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol.* 8, 855–875
167. Odriozola, J. M., Ramos, J. A. y Bloch, K. (1977). Fatty acid synthetase activity in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of the acyl carrier protein-dependent elongating system. *Biochim. Biophys. Acta* 488, 207–17
168. Kikuchi, S., Rainwater, D. L. y Kolattukudy, P. E. (1992). Purification and characterization of an unusually large fatty acid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* var. bovis BCG. *Arch. Biochem. Biophys.* 295, 318–26
169. Quadri, L. E. N. (2014). Biosynthesis of mycobacterial lipids by polyketide synthases and beyond. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49, 179–211
170. Molle, V. y Kremer, L. (2010). Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol. Microbiol.* 75, 1064–1077
171. Slama, N. y col. (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
172. Vilchèze, C. y col. (2014). Phosphorylation of KasB Regulates Virulence and Acid-Fastness in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 10, e1004115
173. Le, N.-H. y col. (2016). Ser/Thr Phosphorylation Regulates the Fatty Acyl-AMP Ligase Activity of FadD32, an Essential Enzyme in Mycolic Acid Biosynthesis. *J. Biol. Chem.*

291, 22793–22805

174. Biswas, R. K. y col. (2013). Identification and characterization of Rv0494: a fatty acid-responsive protein of the GntR/FadR family from *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 159, 913–923
175. Besra, G. S. y col. (1994). Identification of the apparent carrier in mycolic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12735–12739
176. Ravindran, M. S. y col. (2014). Targeting lipid esterases in mycobacteria grown under different physiological conditions using activity-based profiling with tetrahydrolipstatin (THL). *Mol. Cell. Proteomics* 13, 435–48
177. Kai, L. L. y col. (2009). Triacylglycerol utilization is required for regrowth of in vitro hypoxic nonreplicating *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J. Bacteriol.* 191, 5037–5043
178. Goins, C. M. y col. (2018). Characterization of Tetrahydrolipstatin and Stereoderivatives on the Inhibition of Essential *Mycobacterium tuberculosis* Lipid Esterases. *Biochemistry* acs.biochem.8b00152 doi:10.1021/acs.biochem.8b00152
179. Carvalho, P. C., Yates, J. R., Barbosa, V. C. y Barbosa, V. C. (2012). Improving the TFold test for differential shotgun proteomics. *Bioinformatics* 28, 1652–4
180. Bacon, J. y Marsh, P. D. (2007). Transcriptional responses of *Mycobacterium tuberculosis* exposed to adverse conditions in vitro. *Curr. Mol. Med.* 7, 277–86
181. Bloch, K. (1975). Fatty acid synthases from *Mycobacterium phlei*. *Methods Enzymol.* 35, 84–90
182. Boehringer, D., Ban, N. y Leibundgut, M. (2013). 7.5-Å Cryo-EM Structure of the Mycobacterial Fatty Acid Synthase. *J. Mol. Biol.* 425, 841–849
183. Lefebvre, C. y col. (2018). HadD, a novel fatty acid synthase type II protein, is essential for alpha- and epoxy-mycolic acid biosynthesis and mycobacterial fitness. *Sci. Rep.* 8, 6034
184. Woodruff, P. J. y col. (2004). Trehalose is required for growth of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biol. Chem.* 279, 28835–43
185. Quémard, A. (2016). New Insights into the Mycolate-Containing Compound Biosynthesis and Transport in Mycobacteria. *Trends Microbiol.* 24, 725–738
186. Kalscheuer, R. y col. (2010). Trehalose-recycling ABC transporter LpqY-SugA-SugB-SugC is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 21761–6
187. Goins, C. M., Dajnowicz, S., Smith, M. D., Parks, J. M. y Ronning, D. R. (2018). Mycolyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* in covalent complex with tetrahydrolipstatin provides insights into antigen 85 catalysis. *J. Biol. Chem.* 293,

3651–3662

188. Ojha, A. K., Trivelli, X., Guerardel, Y., Kremer, L. y Hatfull, G. F. (2010). Enzymatic hydrolysis of trehalose dimycolate releases free mycolic acids during mycobacterial growth in biofilms. *J. Biol. Chem.* 285, 17380–17389
189. Movahedzadeh, F. y col. (2004). The *Mycobacterium tuberculosis* *ino1* gene is essential for growth and virulence. *Mol. Microbiol.* 51, 1003–14
190. Law, J. D. y Daniel, J. (2017). The mycobacterial Rv1551 glycerol-3-phosphate acyltransferase enhances phospholipid biosynthesis in cell lysates of *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* 113, 269–275
191. Henry, M. F. y Cronan, J. E. (1992). A new mechanism of transcriptional regulation: release of an activator triggered by small molecule binding. *Cell* 70, 671–9
192. Cronan, J. E. y Jr. (1997). In vivo evidence that acyl coenzyme A regulates DNA binding by the *Escherichia coli* FadR global transcription factor. *J. Bacteriol.* 179, 1819–23
193. Zhang, Y.-M. y Rock, C. O. (2009). Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *J. Lipid Res.* 50, S115–S119
194. Lara, M. J. (2017). Caracterización molecular de los factores involucrados en la regulación de la biosíntesis de ácidos micólicos en *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Rosario, Argentina.
195. Munoz-Elias, E. J. y McKinney, J. D. (2006). Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cell. Microbiol.* 8, 10–22
196. Lovewell, R. R., Sasseti, C. M. y VanderVen, B. C. (2016). Chewing the fat: lipid metabolism and homeostasis during *M. tuberculosis* infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 29, 30–36