



Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Universidad Nacional de Rosario

Tesis de Doctorado

Síntesis de ácidos micólicos en micobacterias:
Identificación de productos génicos implicados en el
mecanismo de acción de drogas anti-tuberculosas y en el
mantenimiento de la barrera de impermeabilidad bacteriana

Presentada por Juan Manuel Belardinelli

Director: Héctor Ricardo Morbidoni

Rosario, Argentina
2012

Síntesis de ácidos micólicos en micobacterias:
Identificación de productos génicos implicados en el
mecanismo de acción de drogas anti-tuberculosas y
en el mantenimiento de la barrera de
impermeabilidad bacteriana

Juan Manuel Belardinelli

Licenciado en Biotecnología
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
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 la Cátedra de Microbiología, Virología y Parasitología dependiente de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, durante el período comprendido entre el mes de febrero de 2008 y marzo de 2012, bajo la dirección del Doctor Héctor Ricardo Morbidoni.

Agradecimientos

Al Dr. Héctor R. Morbidoni por dirigirme durante todos estos años, por sus consejos y por tantas discusiones que hemos tenido entre mates y otros brebajes. Gracias Doc!

A Jole, Marian, Vir y Emma por hacer más entretenidos los días en el lab.

Al director y miembros del IBR por facilitarnos y asistirnos en el uso de materiales y equipos.

A mis amigos, Pablo, Mauri, Tomás, Bola, Lucho y Martín por todas las charlas y demás actividades extra facultativas que hemos compartido.

A Vero y Luc, por tantas juntadas en Arenhas.

A mis viejos, grandes responsables de hacerme la persona que soy hoy. A mi familia, por desear siempre lo mejor para mi.

A Ana, por aguantarme durante todo este tiempo, por su apoyo constante y por todo su amor.

Parte de los resultados que se describen en este trabajo han sido dados a conocer en las siguientes reuniones científicas:

Belardinelli, J.M. y Morbidoni, H.R.

Efecto de las drogas Isoxil y Tiacetazona sobre la síntesis de lípidos en micobacterias.

IV Jornadas de Lípidos, Rosario, Argentina, 7 y 8 de agosto de 2008

Belardinelli, J.M. y Morbidoni, H.R.

Variation on a theme: Different targets for Isoxyl and Thiacezone depending on the mycobacterial species tested?

I Congreso Internacional "MICOBACTERIAS: Un reto para el Siglo XXI",
Bogotá, Colombia, 2008

Belardinelli, J.M. y Morbidoni, H.R.

Tiacetazona es efectiva sobre mutantes de *Mycobacterium smegmatis* con permeabilidad aumentada

XIII Jornadas Argentinas de Microbiología, Rosario, Argentina, 9 al 11 de octubre de 2008

Buchieri, M.V.; **Belardinelli, J.M.** y Morbidoni, H.R.

An approach to elucidate the mechanism of action of Thiacezone on *Mycobacterium smegmatis*

47th Annual Meeting, Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Potrero de los Funes, Argentina, 2011

Belardinelli, J.M. y Morbidoni, H.R.

Mutations in the β -hidroxyacyl ACP dehydratase confer resistance to Thiacezone in *M. tuberculosis* and *M. kansasii*

Drug Resistance and Persistence in Tuberculosis, Keystone Symposia,
Kampala, Uganda, 2012

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
El género <i>Mycobacterium</i>	3
Tuberculosis. Enfermedad y tratamiento	4
Envoltura celular de micobacterias	7
Síntesis y distribución de ácidos micólicos	9
Isoxil y Tiacetazona	16
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Cepas bacterianas y Medios de cultivo	20
Medios de cultivo para micobacterias	20
Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	21
Determinación de la concentración inhibitoria mínima	22
Curvas de crecimiento	23
Aislamiento de cepas resistentes a Isoxil y Tiacetazona	23
Plásmidos utilizados en el desarrollo de esta tesis	23
Oligonucleótidos cebadores utilizados	24
Extracción de ADN para Reacción en Cadena de la Polimerasa	25
Electroporación de <i>E. coli</i>	25
Electroporación de <i>M. tuberculosis</i>	26
Preparación de ADN plasmídico	26
Tratamiento con enzimas de restricción, ligasas y fosfatasa alcalinas	27
Secuenciación de ADN	27
Purificación de ADN de geles de agarosa	27
Clonado de genes	27
Análisis de la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos	28
Estudio con inhibidores de bombas de eflujo	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
ESTUDIOS PRELIMINARES	30
Perfil de resistencia a TAC e ISO de distintas especies micobacterianas	30
CAPÍTULO I: TIACETAZONA	32
Efecto de TAC sobre el crecimiento en medio líquido	32

Efecto de TAC sobre la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos	32
Aislamiento de mutantes resistentes a TAC	37
Perfil de resistencia a drogas de las mutantes aisladas	38
Análisis del perfil de ácidos micólicos de las mutantes resistentes a TAC	41
Secuenciación del gen <i>mmaA4</i> de las mutantes de <i>M. tuberculosis</i> deficientes en ácidos micólicos oxigenados	44
Rol de MmaA4 en la resistencia a TAC	46
Secuenciación de <i>ethA</i>	48
Estudio con inhibidores de bombas de eflujo	49
Sobre-expresión de los genes de FASII	50
Secuenciación del operón <i>hadABC</i> de las mutantes resistentes a TAC	53
DISCUSIÓN	56
CAPÍTULO II: ISOXIL	65
Curvas de crecimiento	65
Efecto de ISO sobre la síntesis de ácidos micólicos y ácidos grasos	66
Sobre-expresión de los genes <i>desA1</i> , <i>desA2</i> y <i>desA3</i>	69
Sobre-expresión de los genes de FASII	72
Aislamiento de mutantes resistentes a ISO	74
Estudios con inhibidores de bombas de eflujo	76
Secuenciación de los genes <i>ethA</i> y <i>hadABC</i> de las mutantes resistentes a ISO de <i>M. tuberculosis</i>	77
Secuenciación de los genes <i>ethA</i> y <i>hadABC</i> de las mutantes resistentes a ISO de <i>M. kansasii</i>	77
DISCUSIÓN	79
CONCLUSIONES	83
RESUMEN	85
BIBLIOGRAFÍA	87

ABREVIATURAS

ACP	Proteína transportadora de acilos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADS	Albúmina-Dextrosa-NaCl
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
C	Carbono
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CoA	Coenzima A
cpm	Centelleos por minuto
CSAMs	Ciclopropil Sintetas de Ácidos Micólicos
DO	Densidad Óptica
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetraacético
ETH	Etionamida
FAMEs	Metil Ésteres de Ácidos Grasos
FAS	Ácido graso sintasa
GSH	Glutación
GT	Glicerol + Tritón
H ₂ O _d	Agua Destilada
Hig	Higromicina
INH	Isoniacida
ISO	Isoxil
Km	Kanamicina
kV	KiloVoltio
LAM	Lipo Arabino Manano
LB	Luria Bertani
MAMEs	Metil Ésteres de Ácidos Micólicos
MDR-TB	Tuberculosis multi-resistente a drogas
μF	Microfaradio
MSH	Micotiol
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OADS	Ácido Oleico-Albúmina-Dextrosa-NaCl
PAS	Ácido para-amino salicílico

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAC	Tiacetazona
TB	Tuberculosis
TLC	Cromatografía en capa delgada
TLM	Tiolactomicina
Tris	N-tris-(hidroximetil)-aminoetano
UFC	Unidades formadoras de colonia
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
XDR-TB	Tuberculosis extremadamente resistente a drogas

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El género *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* se encuentra comprendido en el Phylum y clase Actinobacteria, Orden Actinomycetales, familia Mycobacteriaceae y comprende una gran cantidad de especies, entre las cuales algunas son importantes patógenos para el ser humano y diversos animales. Las micobacterias son bacilos no esporulados de 1 a 4 μm de largo, con un diámetro de 0.3~0.6 μm , considerados aerobios obligados, carentes de flagelos. La mayoría de las especies forman colonias rugosas blancas o blanco-amarillentas en los medios usuales de cultivo, a excepción de las especies que poseen pigmentos. La típica coloración de Gram, que ha servido para dividir a la gran mayoría de las bacterias en dos grandes grupos según la estructura de su pared, es de poca utilidad en este género ya que las micobacterias poseen una compleja envoltura externa. Por este motivo se ha desarrollado un método especial de coloración para estas bacterias, que se denomina usualmente coloración ácido alcohol resistente o de Ziehl-Neelsen (Figura 1).

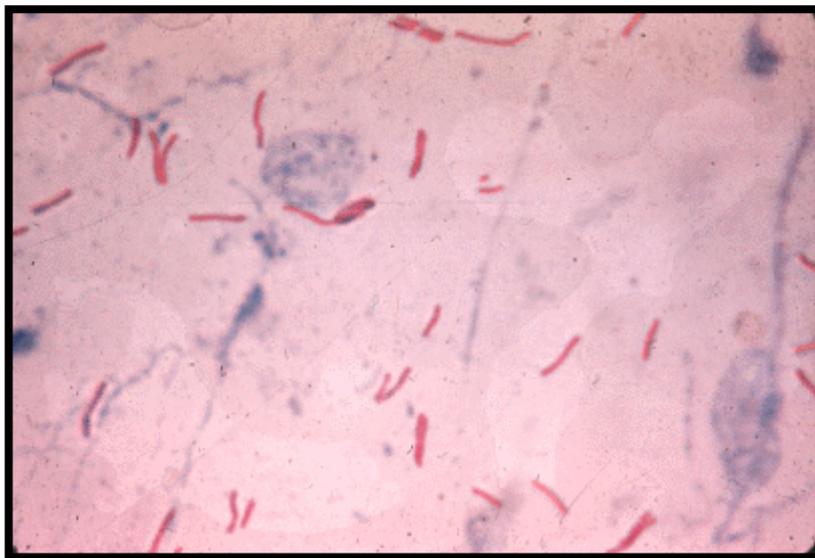


Figura 1: Observación microscópica de bacilos de *M. tuberculosis* luego de la tinción de Ziehl-Neelsen.

Las distintas especies de este género tienen marcadas diferencias en el tiempo de duplicación, el rango de temperatura y la temperatura óptima de crecimiento, pudiendo ser tan extremas como es el caso de *Mycobacterium tuberculosis* (tiempo de duplicación 18h-24h a su temperatura óptima, rango de temperatura de crecimiento 36°C-41°C, temperatura óptima 37°C) y *Mycobacterium smegmatis* (tiempo de duplicación 3h a su

temperatura óptima, rango de temperatura de crecimiento 22°C-55°C, temperatura óptima 42°C). Este género incluye especies saprófitas habitantes del suelo y del agua (como *M. smegmatis*, *M. gordonae*, *M. aurum* y otros), patógenos oportunistas (*M. avium*, *M. kansasii*, *M. abscessus*) y patógenos (como *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. leprae*) que sólo se encuentran en su hospedador.

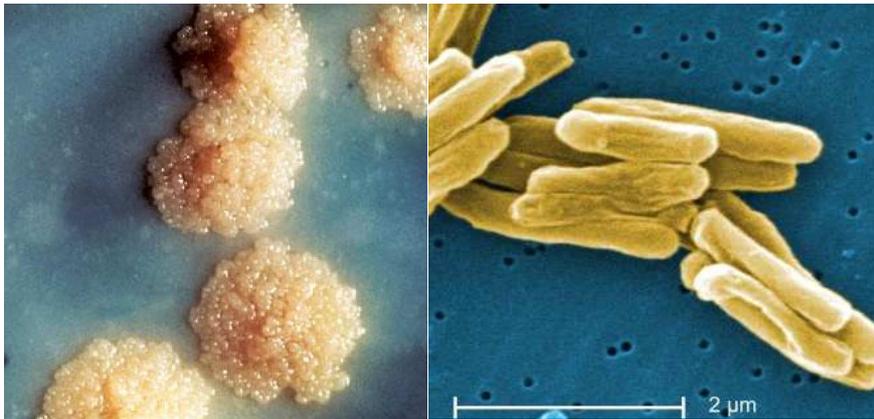


Figura 2: Colonias (izquierda) y micrografía electrónica de barrido (derecha) de *M. tuberculosis*

(Fuente: <http://ilovebacteria.com/tuberculosis.htm> y <http://www.news-medical.net/health/What-is-Tuberculosis.aspx>)

Tuberculosis: enfermedad y tratamiento

M. tuberculosis (MTB) es un patógeno humano que sigue siendo una de las causas más importantes de muerte en adultos en todo el mundo (Frieden *et al.*, 2003; Maartens & Wilkinson, 2007; Smith *et al.*, 2003). Cerca de un tercio de la población mundial, aproximadamente 2 mil millones de personas, están infectadas por el bacilo de la tuberculosis, si bien la enorme mayoría no desarrolla la forma activa de la enfermedad. Sin embargo, en 2010, hubo 8,8 millones de casos nuevos de tuberculosis, 1,1 millones de muertes por esta infección en personas seronegativas para el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y otras 350.000 muertes por tuberculosis asociada con infección por el VIH, sumando un total de 1,45 millones de muertes por esta enfermedad. La Organización Mundial de la Salud estima un total de 12 millones de personas viviendo con tuberculosis (http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/). Todo esto indica claramente la asociación entre VIH y tuberculosis, ambos en aumento desde los años 80, con su concentración inicial en el Sudeste de Asia y el África sub-sahariana y su pronta

diseminación mundial (Falzon & Raviglione, 2010; Pablos-Mendez *et al.*, 1990; Raviglione *et al.*, 1997). VIH y tuberculosis forman una combinación letal, cada uno acelerando la diseminación del otro. Debido a la destrucción del sistema inmune causada por el VIH, un individuo infectado por ambos patógenos estará más expuesto a desarrollar tuberculosis activa que un individuo con un sistema inmune activo. *M. tuberculosis* tiene una elevada capacidad de infectar al huésped, necesiéndose solamente la inhalación de unos pocos bacilos, sin embargo, en la gran mayoría de los casos su replicación es controlada por la respuesta inmune del individuo. Los considerables avances realizados en los últimos veinte años, posibles gracias al desarrollo de herramientas para la manipulación genética, han permitido comprender parcialmente los mecanismos de patogénesis. Así, trabajos recientes mostraron que este patógeno interacciona con el huésped y realiza una exquisita modulación de la respuesta inmune del mismo a través de elementos de su envoltura celular, fundamentalmente lípidos complejos y ácidos grasos (Dyer *et al.*, 2005; Glickman *et al.*, 2000; Glickman & Jacobs, Jr., 2001; Rao *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2006). Hasta el momento no se ha descrito ninguna toxina producida por *M. tuberculosis*, sin embargo el daño al pulmón puede ser de considerable magnitud. Esto es explicable dada la estimulación de una respuesta inmune inflamatoria con abundante producción de citoquinas pro-inflamatorias y destrucción de tejido en un intento del sistema inmune por contener y aislar el punto de infección en el cual se encuentra *M. tuberculosis*.

El tratamiento terapéutico de la tuberculosis requiere del uso de una combinación de drogas. El esquema actual usado en todo el mundo se basa en la administración de las llamadas drogas anti-tuberculosas de primera línea -Isoniacida, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol- durante dos meses, seguido de otros cuatro meses de Rifampicina e Isoniacida (Maher *et al.*, 2003). Si se prueba bacteriológicamente que la cepa infectante aislada del paciente es resistente a alguna de estas drogas se deben utilizar drogas antituberculosas (o antibacterianas con acción antituberculosa) de segunda línea, por lo general más costosas, menos efectivas y con mayor cantidad de efectos adversos. Entre ellas se pueden mencionar Etionamida y Acido p-Amino Salicílico (PAS).

Finalmente, cuando el uso de estas drogas no cubre la demanda de medicamentos activos contra la cepa en cuestión, se utilizan antibióticos del tipo de las quinolonas y aminoglucósidos como, por ejemplo, Estreptomina y Kanamicina (Albanna & Menzies, 2011; Tam *et al.*, 2009; Yew *et al.*, 2011). Es de resaltar que

solamente unas pocas de estas drogas son específicamente anti-tuberculosas, ya que tanto Rifampicina como Quinolonas y Aminoglucósidos son anti-bacterianos de amplio espectro. Dado que las drogas anti-tuberculosas están por lo general provistas por los planes de salud estatales sin cargo o son eventualmente accesibles a muy bajo costo, su eficacia es crítica para el éxito del tratamiento ya que si deben ser reemplazadas, las opciones son, como se mencionó, el uso de anti-bacterianos de amplio espectro y generalmente de mucho mayor costo. Lo prolongado del tratamiento y la cantidad de diferentes medicamentos administrados conllevan a un posible abandono del mismo por parte de los pacientes. Esto conduce a la aparición de cepas resistentes, lo cual, particularmente en lugares donde la co-infección con VIH es alta, plantea una seria amenaza para el control de la tuberculosis, confirmando la necesidad de fortalecer los planes de prevención y tratamiento.

Mientras la creencia generalizada es que la tuberculosis es una enfermedad del pasado, su efecto mortal está siendo cada vez más evidente, alimentado por la pandemia de VIH-SIDA. De los 8,8 millones de nuevos casos detectados en 2010 en todo el mundo, 290.000 fueron ocasionados por cepas multi-resistentes (MDR-TB), es decir, resistentes a Rifampicina e Isoniacida, pilares del tratamiento. En algunas regiones del mundo como Rusia, las repúblicas de la ex URSS y China, la proporción de casos causados por cepas multi-resistentes pasa a ser aterradora, con valores de hasta un 30% (Zignol *et al.*, 2006). La tuberculosis extremadamente resistente (XDR-TB) es una forma de tuberculosis causada por bacterias resistentes a Isoniacida y Rifampicina (es decir, tuberculosis MDR) así como a cualquier fluoroquinolona y a por lo menos uno de los fármacos antituberculosos inyectables de segunda línea (Amikacina, Kanamicina o Capreomicina) (Fattorini *et al.*, 2007; Kapp, 2007; Raviglione & Smith, 2007). Desde que se definió por primera vez la tuberculosis XDR en 2006, un total de 58 países han notificado por lo menos un caso de tuberculosis causado por una cepa XDR-TB, o sea que en un futuro muy cercano las chances de poder tratar un caso de tuberculosis con las drogas existentes en forma exitosa serán muy reducidas. La diseminación de estas cepas se ve favorecida por el largo tiempo de tratamiento, la falta de adherencia al mismo y la discontinuidad de la provisión de fármacos.

Este cuadro de situación resalta de manera dramática la necesidad de contar con nuevas drogas que reemplacen a las que están en uso y cuya eficiencia ha disminuido drásticamente. Para ello es esencial determinar los mecanismos de acción y de resistencia de las drogas anti-tuberculosas actualmente en uso, de forma de poder

introducir las modificaciones moleculares necesarias para que mantengan su actividad sobre cepas resistentes. En la última década se han identificado y caracterizado los mecanismos de acción y de resistencia de varias drogas específicamente anti-tuberculosas como Isoniacida, Etionamida, Pirazinamida y PAS (Banerjee *et al.*, 1994;Larsen *et al.*, 2002;Rengarajan *et al.*, 2004;Shi *et al.*, 2011;Vilcheze *et al.*, 2000;Vilcheze *et al.*, 2006). De la misma manera, la profusión de estudios realizados en la última década ha logrado identificar nuevos blancos moleculares que han sido validados como aptos para el diseño de drogas. Varias iniciativas están abocadas a desarrollar las mismas, incluyendo algunas que ya están en la etapa de experimentación clínica.

Envoltura celular de micobacterias

Mycobacterium tuberculosis -y las micobacterias en general- muestra una muy baja permeabilidad celular, en parte explicable por la envoltura rica en ácidos grasos, lípidos, glicolípidos y carbohidratos que recubren a la pared celular (Figura 3)(Daffe & Draper, 1998;Draper, 1998;Lee *et al.*, 1996;Nikaido & Jarlier, 1991). El conocimiento de la arquitectura de la envoltura celular de las micobacterias es central para nuestra comprensión de problemas no resueltos de las enfermedades causadas por micobacterias como ser la dificultad de tratamiento de micobacterias patógenas oportunistas caracterizadas por una muy baja permeabilidad, la interacción con el sistema inmune del hospedador, la preferencia por determinados tejidos para el desarrollo de la enfermedad y finalmente la identificación de nuevos blancos para el desarrollo de drogas noveles.

La envoltura celular de las micobacterias está compuesta por dos estructuras: una membrana plasmática y un esqueleto de pared celular formado por el peptidoglicano, un lipoglicano denominado Lipo Arabino Manano (LAM) y el micoloil arabinogalactano (Brennan & Nikaido, 1995;Lee *et al.*, 1996;Nikaido & Jarlier, 1991). Estas últimas moléculas están consistentemente presentes en las diversas especies de micobacterias si bien con diferente composición molecular y pequeñas diferencias estructurales. También se encuentran formando parte de la envoltura celular varios lípidos extraíbles o unidos no covalentemente, que difieren entre especies en estructura; entre ellos se encuentran glicolípidos conteniendo trehalosa, fenil-ftiocerol glicósidos y glicopéptidos.

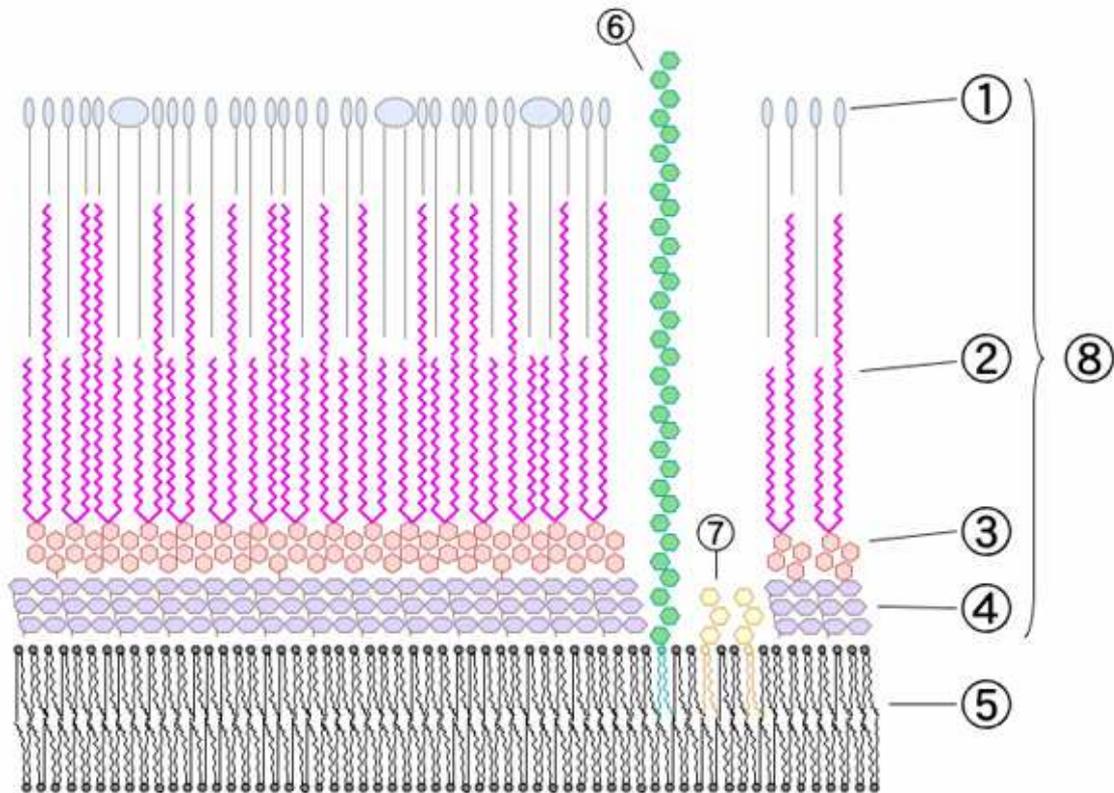


Figura 3: Esquema de la envoltura celular micobacteriana: 1) Lípidos extraíbles, 2) Ácidos Micólicos, 3) Arabino-Galactano, 4) Peptidoglicano, 5) Membrana Citoplasmática, 6) Lipo Arabino Manano, 7) Fosfatidil Inositol Manósido 8) Pared celular

El tratamiento de las infecciones por micobacterias es difícil debido a la resistencia intrínseca de las mismas a los antibióticos comunes a pesar que estas bacterias poseen los blancos moleculares hacia los cuales los antibióticos están dirigidos (Chopra & Brennan, 1997). Esta situación se explica por la baja permeabilidad celular producto de la muy inusual composición de la envoltura celular. La fracción mayoritaria de la envoltura celular está compuesta de ácidos grasos de cadena larga denominados ácidos micólicos. Estos ácidos grasos α -alquil, β -hidroxilados de hasta 90 átomos de carbono, están unidos covalentemente al Arabino-Galactano, a su vez unido a la molécula de Peptidoglicano por una unión fosfodiéster (Barry, III *et al.*, 1998). Si bien se ha estudiado intensamente la biogénesis de las distintas moléculas que forman parte de la envoltura celular, se sabe mucho menos de su organización física y se han planteado diversos modelos para la organización de la misma (Hong & Hopfinger, 2004; Nikaido *et al.*, 1993). Recientemente, se analizó la organización física de los lípidos de la envoltura de *M. smegmatis* y *M. bovis* utilizando una técnica de tomografía crio electrónica, confirmando que las micobacterias poseen una membrana externa en

forma de bicapa lipídica, constando de una capa externa moderadamente fluida, constituida por los lípidos extraíbles, y de una capa interna de extremadamente baja fluidez, donde se localizaban los ácidos micólicos y otros lípidos apolares (Hoffmann *et al.*, 2008). Esta construcción determina que la permeabilidad de la pared micobacteriana sea extremadamente baja a solutos lipofílicos, incluyendo muchos agentes quimioterápicos y por lo tanto indica la conveniencia de estudiar las rutas de síntesis de los componentes involucrados, no solo por el conocimiento de su biología genética y bioquímica sino por la oportunidad de identificar genes cuyas funciones estén ausentes en el ser humano a fin de proponer nuevas moléculas con acción anti-micobacteriana. Es importante recalcar que esta acción podría ser directa inhibiendo enzimas de naturaleza esencial o indirecta inhibiendo enzimas no esenciales pero cuya pérdida se traduzca en una mayor permeabilidad de la célula micobacteriana y por lo tanto permitiendo el tratamiento con un antibiótico al cual la micobacteria es naturalmente impermeable.

Síntesis y distribución de ácidos micólicos

Los ácidos micólicos son ácidos grasos de cadena larga (hasta C90) compuestos por una cadena principal, denominada ácido meromicólico (C50-C60), con una cadena de alquilo en posición α (con una longitud de entre C22 y C26, dependiendo de la especie micobacteriana) y un grupo hidroxilo en posición β .

La biosíntesis de estas moléculas en *Mycobacterium* requiere dos sintasas de ácidos grasos (Fatty Acid Synthase o FAS) diferentes, denominadas FASI y FASII (Figura 4) (Asselineau *et al.*, 2002; Takayama *et al.*, 2005). FASI es una enzima multifuncional que cataliza la síntesis *de novo* de ácidos grasos, similar en estructura y función a FASI de células eucariotas (Schweizer & Hofmann, 2004). En cambio, FASII es una sintasa disociada que utiliza una serie de proteínas monofuncionales, cada una de las cuales cataliza un paso de la vía de síntesis (Lu *et al.*, 2004). Es importante remarcar que FASII es a su vez similar al sistema FASII encontrado en otras bacterias como *E. coli*; sin embargo sus productos difieren ya que en *E. coli* y otras bacterias FASII sintetiza ácidos grasos *de novo* de hasta 18 átomos de carbono mientras que en micobacterias es incapaz de realizar la síntesis *de novo*; en cambio, utiliza precursores de C14-C18 provenientes de FASI para producir ácidos grasos de hasta C60, que luego darán lugar al ácido meromicólico. Experimentos bioquímicos han demostrado que la

elongación de los acil-CoAs por FASI tiene un comportamiento bimodal, es decir, produce ácidos grasos C16-C18 (que servirán de precursores para FASII y para la síntesis de fosfolípidos) y C22-C26 (que formarán la ramificación en α del ácido micólico). Esta es una característica exclusiva de FASI de micobacterias (Vilcheze *et al.*, 2000; Zimhony *et al.*, 2004).

La enzima β -cetoacil-ACP sintasa III, MtFabH (*Rv0533c*) conecta FASI y FASII, catalizando la condensación de los acil-CoAs provenientes de FASI con malonil-ACP (Choi *et al.*, 2000). De esta manera, el sustrato inicial de FASII es un β -cetoacil-ACP de cadena mediana. Luego este sustrato es reducido por la β -cetoacil-ACP reductasa MabA (*Rv1483*), deshidratado por las hidroxiacil-ACP deshidratasas HadAB (*Rv0635-0636*) y HadBC (*Rv0636-0637*) y reducido por la enoil-ACP reductasa InhA (*Rv1484*) (Marrakchi *et al.*, 2000; Marrakchi *et al.*, 2002; Sacco *et al.*, 2007). Las β -cetoacil-ACP sintasas KasA (*Rv2245*) y KasB (*Rv2246*) catalizan la condensación con unidades de malonil-ACP para continuar con la extensión (Bhatt *et al.*, 2007; Kremer *et al.*, 2002). Una vez sintetizado el ácido meromicólico la enzima Pks13 (*Rv3800c*) es la encargada de realizar la condensación de éste con un ácido graso de 22C-26C (dependiendo de la especie) proveniente de FASI dando como producto un intermediario β -cetoacil ácido graso (Portevin *et al.*, 2004) que luego es reducido por la reductasa CmrA (*Rv2509*) para dar el ácido micólico maduro (Lea-Smith *et al.*, 2007) que luego será transportado a la pared y transferido a un aceptor final como el Arabino Galactano o la Trehalosa.

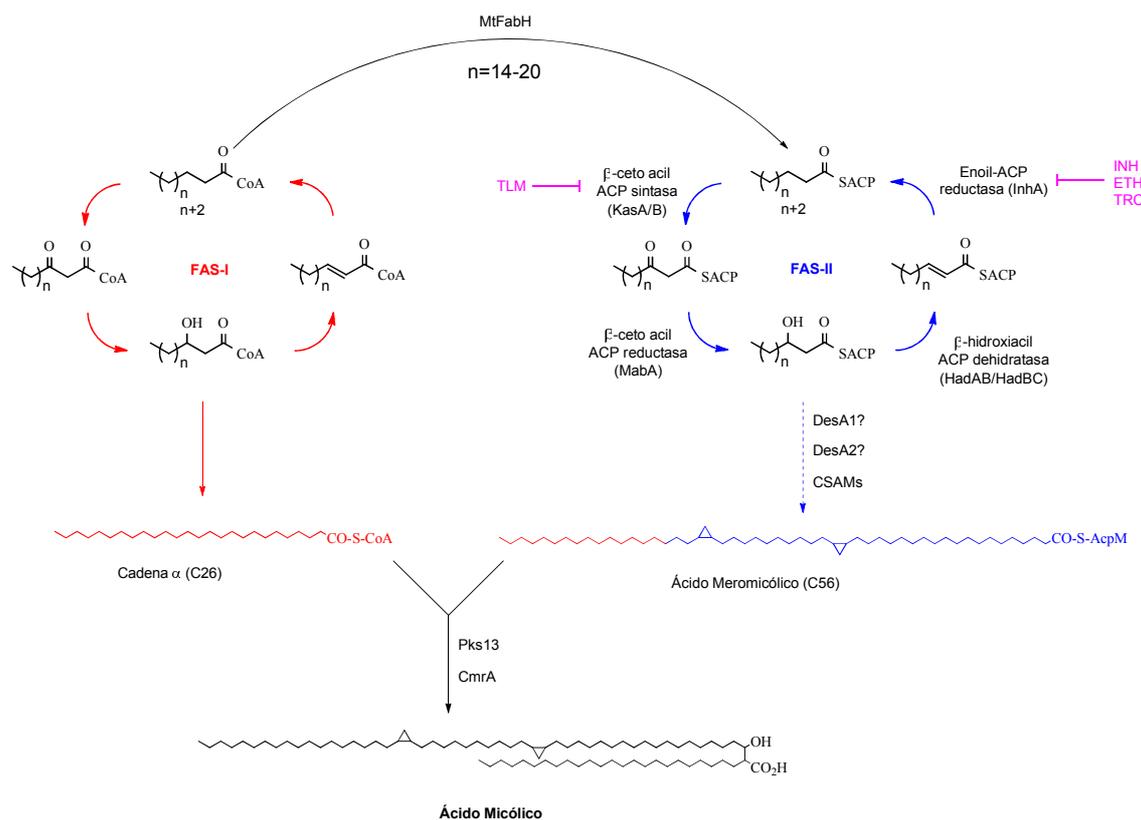


Figura 4: Biosíntesis de ácidos micólicos y ácidos grasos en micobacterias. La contribución de FASI y FASII en la síntesis de ácidos micólicos se muestra en rojo y azul, respectivamente. El sitio de inhibición de FASII de distintos compuestos anti-micobacterianos se encuentra resaltado en violeta.

El ácido meromicólico inmaduro posee 2 dobles enlaces en las posiciones proximal y distal, de acuerdo a su posición respecto al carboxilo. No se sabe con exactitud si la introducción de estos dobles enlaces se produce durante o una vez terminada la síntesis del meromicolato, también se desconoce la manera en que se introducen estas insaturaciones. La secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) reveló la presencia de 3 genes que codifican desaturasas putativas. De estos 3 genes, *Rv0824c* (que codifica para DesA1) y *Rv1094* (que codifica para DesA2) se encuentran anotados como acil-ACP desaturasas solubles homólogas a las acil-ACP desaturasas presentes en plantas (Cole & Barrell, 1998; Fox *et al.*, 1993; Shanklin & Somerville, 1991). La estructura de DesA2, determinada por medidas de difracción de rayos X, concuerda con esta asignación (Dyer *et al.*, 2005). Además, estudios de fusión a fosfatasa alcalina en el caso de DesA1 (Jackson *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 1995) y de fusión a nucleasas en el caso de DesA2 (Downing *et al.*, 1999) indicaron que estas dos enzimas podrían ser transportadas al espacio extracelular, de hecho, DesA1 es uno de

los principales antígenos de superficie en pacientes infectados por micobacterias (Jackson *et al.*, 1997). La observación de que estas dos proteínas se encuentran altamente conservadas en todas las especies de micobacterias y son esenciales en *M. tuberculosis* (Sasseti *et al.*, 2003), sumado a su identificación como acil-ACP desaturasas llevó a pensar que estarían involucradas en la introducción de los dobles enlaces presentes en el ácido meromicólico inmaduro (Barry, III *et al.*, 1998; Raman *et al.*, 2005; Raman *et al.*, 2007). Sin embargo, no existe hasta el presente ninguna evidencia experimental que lo demuestre.

Estas insaturaciones presentes en el ácido meromicólico son luego modificadas por enzimas denominadas Ciclopropil Sintetas de Ácidos Micólicos (CSAMs) dando lugar a las distintas familias de ácidos micólicos (Dubnau *et al.*, 1997; Dyer *et al.*, 2005; Glickman *et al.*, 2000; Glickman *et al.*, 2001; Glickman, 2003; Schroeder & Barry, III, 2001; Yuan *et al.*, 1997). En el genoma de *M. tuberculosis* se encuentran genes que codifican para 8 de estas enzimas, con una gran homología entre sí (>70% de similitud). A pesar de ello, cada una de estas enzimas realiza modificaciones específicas sobre el ácido meromicólico (Figura 5). Recientemente se ha determinado lo crucial de estas sutiles modificaciones sobre los ácidos micólicos ya que si bien estas enzimas no son esenciales, mutantes afectados en la síntesis de estas funciones químicas se ven afectados en la permeabilidad celular y disminuyen su virulencia (Barkan *et al.*, 2009; Dao *et al.*, 2008; Dyer *et al.*, 2005; Glickman *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 1998).

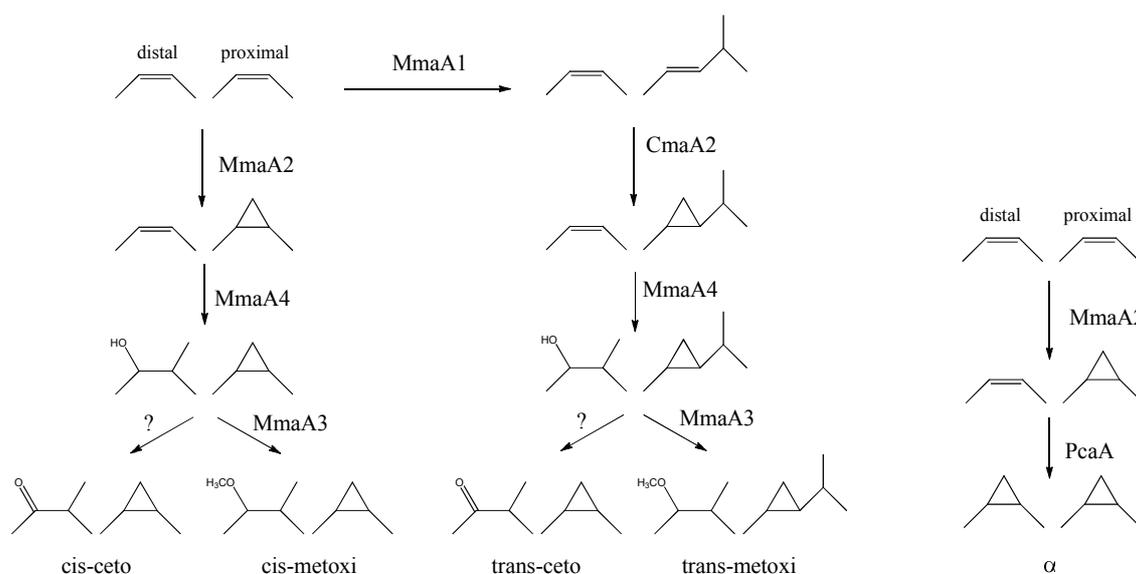


Figura 5: Modificaciones realizadas sobre las insaturaciones proximales y distales presentes en el ácido meromicólico por parte de las CSAMs de *M. tuberculosis*, dando lugar a las distintas familias de ácidos micólicos α , metoxi y ceto.

Como se ha mencionado, los ácidos micólicos son ácidos grasos de cadena larga con una cadena de alquilo y un grupo hidroxilo en posiciones α y β respectivamente. Los estudios químicos realizados en la década del 70 mostraron que estos ácidos grasos se pueden agrupar en familias dependiendo de su longitud, de la cantidad de dobles enlaces y de la existencia o no de funciones oxigenadas en su molécula. Una clasificación por longitud y número de dobles enlaces identifica a los ácidos α y α' mientras que de acuerdo a la presencia de funciones oxigenadas se agrupan en ceto, metoxi, epoxi, éster y ω -metoxi (Barry, III *et al.*, 1998; Nikaido *et al.*, 1993). La Figura 6 muestra la estructura de cada uno de estos grupos y en la Tabla I se puede observar su distribución en distintas especies de micobacterias.

Tabla I: distribución de ácidos micólicos en diferentes especies del Género *Mycobacterium*.

Abreviaturas: α : alpha, α' : alpha', M: metoxi, K: ceto, ϵ : epoxi, WE: éster, ω -1 M: ω -1 metoxi.

Los datos presentados entre paréntesis corresponden a componentes minoritarios.

Especies	Ácidos micólicos							Longitud de la ramificación en α
	α	α'	M	K	ϵ	WE	ω -1 M	
Patógenas de crecimiento lento								
<i>M. africanum</i>	+		+	+				26
<i>M. avium</i>	+			+		+		(22)-24
<i>M. bovis</i>	+		+	+				(24)-26
<i>M. bovis BCG</i>	+		+	+				(24)-26
<i>M. intracellulare</i>	+			+		+		(22)-24
<i>M. kansasii</i>	+		+	+				(22)-24
<i>M. leprae</i>	+		+	+				22-24
<i>M. marinum</i>	+		+	+				24-(26)
<i>M. microti</i>	+		+	+				26
<i>M. paratuberculosis</i>	+			+		+		24
<i>M. tuberculosis</i>	+		+	+				(24)-26
<i>M. ulcerans</i>	+		+	+				24
No patógenas de crecimiento lento								
<i>M. goodii</i>	+		+	+				(22)-24
Patógenas de crecimiento rápido								
<i>M. abscessus</i>	+	+						(20-22)-24
<i>M. chelonae</i>	+	+						(22)-24
<i>M. fortuitum</i>	+	+			+		+	(22)-24
No patógenas de crecimiento rápido								
<i>M. aurum</i>	+			+		+		22-24
<i>M. phlei</i>	+			(+)		+		22-24
<i>M. smegmatis</i>	+	+			+			(22)-24
<i>M. thermoresistibile</i>	+	+	+	+				(22)-24
<i>M. vaccae</i>	+	+		+		+		22-24

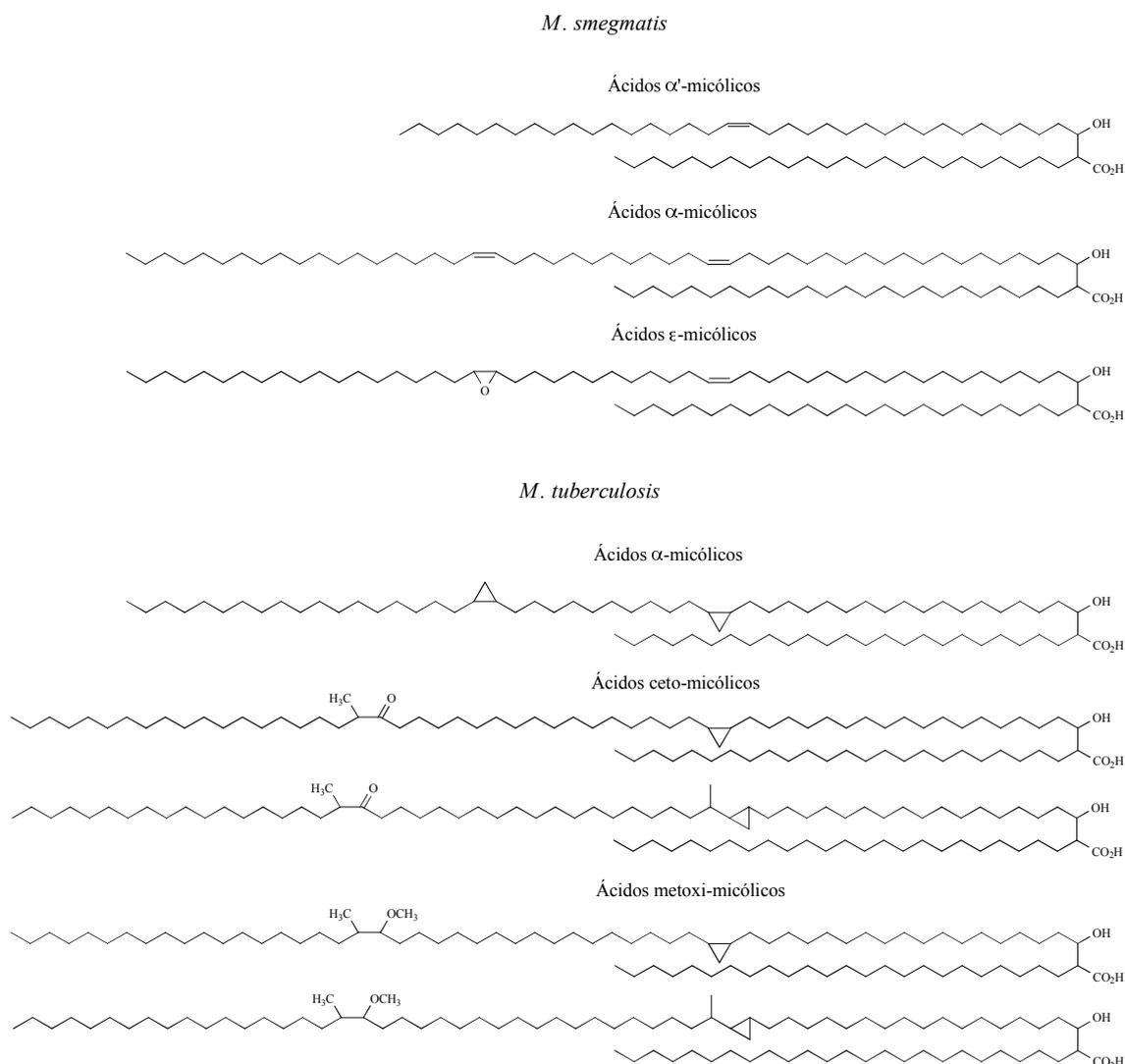


Figura 6: Estructura de los ácidos micólicos presentes en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*

Durante los estudios llevados a cabo para determinar el mecanismo de acción de la droga anti-tuberculosa Isoniacida, se identificó un gen, denominado *inhA*, codificando para una enoil-ACP reductasa parte del ciclo FASII de síntesis de ácidos micólicos (Banerjee *et al.*, 1994; Vilcheze *et al.*, 2000). El interés derivado de estos resultados se tradujo en una larga lista de trabajos publicados referidos a drogas que actúan sobre dicha síntesis así como también sobre la expresión y regulación de las enzimas componentes de FASII. Una de las conclusiones obtenidas es que la mayoría de las drogas específicamente anti-micobacterianas actúan sobre la vía de síntesis de los ácidos micólicos, resaltando la importancia de dicha vía. Así, otras drogas como Etionamida, y moléculas activas pero sin uso terapéutico como Triclosan y Tiolactomicina, también actúan sobre la vía mencionada (Larsen *et al.*, 2002; McMurry

et al., 1999; Parikh *et al.*, 2000; Slayden *et al.*, 1996). Posteriores estudios genéticos, enzimáticos y bioinformáticos confirmaron la presencia de genes codificando otras enzimas del ciclo FASII, como *kasA*, *kasB*, *mabA*, codificando para las β -ceto acil ACP sintasas A y B y β -ceto acil ACP reductasa, respectivamente. Finalmente, en el año 2007 se identificó el último componente del sistema FASII, la β -hidroxiacil ACP deshidratasa, codificada por el operón *hadABC*. El hecho que por la naturaleza de sus substratos (acilos de cadena larga) estas enzimas son esenciales para la supervivencia de la micobacteria y no se encuentran presentes en el humano las hace un blanco interesante para el diseño de drogas.

Isoxil y Tiacetazona

Dos drogas activas sobre *M. tuberculosis*, Isoxil (ISO) y Tiacetazona (TAC), han sido utilizadas en tratamientos terapéuticos, pero han sido posteriormente dejadas de lado por presentar efectos adversos y elevada aparición de resistencia (Dukes *et al.*, 1992; Ellard *et al.*, 1974; Favez *et al.*, 1970; Kampelmann, 1970; Punzalan *et al.*, 1970). La identificación de los blancos moleculares para estas drogas, mecanismos de acción y de resistencia permitiría proponer modificaciones racionales sobre sus estructuras que puedan posibilitar el uso de derivados de las mismas. Se ha determinado que ambas drogas son en realidad pro-drogas que requieren una activación intra-celular. Esto no es sorprendente ya que muchas drogas anti-tuberculosas son en realidad pro-drogas que necesitan de un paso previo de activación para ejercer su efecto. Entre los ejemplos que podemos citar se encuentran INH, activada por la catalasa-peroxidasa KatG (Marcinkeviciene *et al.*, 1995; Wengenack *et al.*, 1998); Pirazinamida, activada por la pirazinamidasa PncA (Scorpio & Zhang, 1996) y Etionamida, activada por EthA (DeBarber *et al.*, 2000). En el caso de ISO y TAC esta activación es mediada por EthA, la misma mono-oxigenasa que también activa a Etionamida (Dover *et al.*, 2007). La expresión del gen *ethA* está regulada por un represor transcripcional de la familia TetR denominado EthR que se encuentra corriente arriba del gen *ethA* (Baulard *et al.*, 2000). Si bien se desconoce el rol biológico que cumple esta enzima en la micobacteria se ha visto que tanto mutaciones en el gen *ethA* como mutaciones en el promotor de *ethR* que aumenten su transcripción generan resistencia a ISO, TAC y ETH (Booniam *et al.*, 2010; DeBarber *et al.*, 2000; Kordulakova *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que ISO es un inhibidor de la síntesis de ácido oleico y ácidos micólicos y es efectivo contra cepas multirresistentes de *M. tuberculosis* (Phetsuksiri *et al.*, 1999; Phetsuksiri *et al.*, 2003; Winder *et al.*, 1971). En contraste con la incertidumbre que existe con respecto a la función de DesA1 y DesA2, DesA3 (codificada por el gen *Rv3229c*) es una enzima de membrana que posee actividad estearoil-CoA desaturasa (Phetsuksiri *et al.*, 2003). Uno de los productos de esta reacción, el ácido oleico, es un constituyente esencial de los fosfolípidos de membrana y los triglicéridos (Hung & Walker, 1970; Okuyama *et al.*, 1967; Walker *et al.*, 1970). La sobre-expresión de *desA3* en *M. bovis* confirió una leve resistencia a ISO, sugiriendo que es uno de los blancos de esta droga (Phetsuksiri *et al.*, 2003). La inhibición de la síntesis de ácido oleico y ácidos micólicos por parte de ISO es independiente; esto se ha comprobado utilizando inhibidores específicos de la síntesis de ácido oleico, como por ejemplo el ácido estercúlico, que no alteran la síntesis de ácidos micólicos. Por otro lado se han diseñado análogos estructurales de ISO que pierden la capacidad de inhibir la síntesis de ácido oleico pero retienen la capacidad de inhibir ácidos micólicos (Bhowruth *et al.*, 2006). Todo esto indica que existe otro blanco involucrado en la síntesis de ácidos micólicos que aún no ha sido identificado. Sería interesante postular que ISO esté inhibiendo otra desaturasa que se encuentre implicada en la síntesis de ácidos micólicos. Una hipótesis interesante es que ISO esté inhibiendo también las desaturasas DesA1 y DesA2, y que esto genere la inhibición en la síntesis de los ácidos micólicos. Sin embargo, existe también la posibilidad de que esté actuando sobre un blanco completamente distinto involucrado en la síntesis de ácidos micólicos como, por ejemplo, alguno de los componentes del ciclo FASII.

Por otra parte, TAC es una droga cuyo uso se ha ido discontinuando en una gran cantidad de países debido a sus efectos adversos, sobre todo en pacientes con VIH, en los cuales genera un síndrome muco-cutáneo que puede progresar a una necrosis tóxica epidérmica (Dukes *et al.*, 1992). Sin embargo, todavía es utilizada como alternativa terapéutica para el tratamiento de cepas multi-resistentes en algunos países subdesarrollados en pacientes VIH negativos debido a su bajo costo. Se ha probado que TAC inhibe la síntesis de ácidos micólicos en micobacterias, aunque se desconoce su blanco de acción. A partir de estudios en *M. bovis* var. BCG Pasteur, *M. chelonae* y *M. marinum* Alahari *et al.* postularon a las ciclopropano sintasas de ácidos micólicos (CSAMs) como el blanco de acción de TAC (Alahari *et al.*, 2007). Las CSAMs fueron descritas como blanco de acción de TAC a partir de la observación de la acumulación

de precursores insaturados de ácidos micólicos luego del tratamiento de *M. bovis* BCG Pasteur con la droga. Sin embargo, la sobre-expresión independiente de los genes de las CSAMs no alteró la concentración inhibitoria mínima para TAC y además se probó que concentraciones sub inhibitorias de TAC inhiben las CSAMs sin producir alteración alguna sobre el crecimiento en cultivo. No existe evidencia hasta el momento de que estas enzimas sean esenciales en micobacterias. Todo esto apunta a la existencia de otro blanco esencial afectado por TAC en micobacterias.

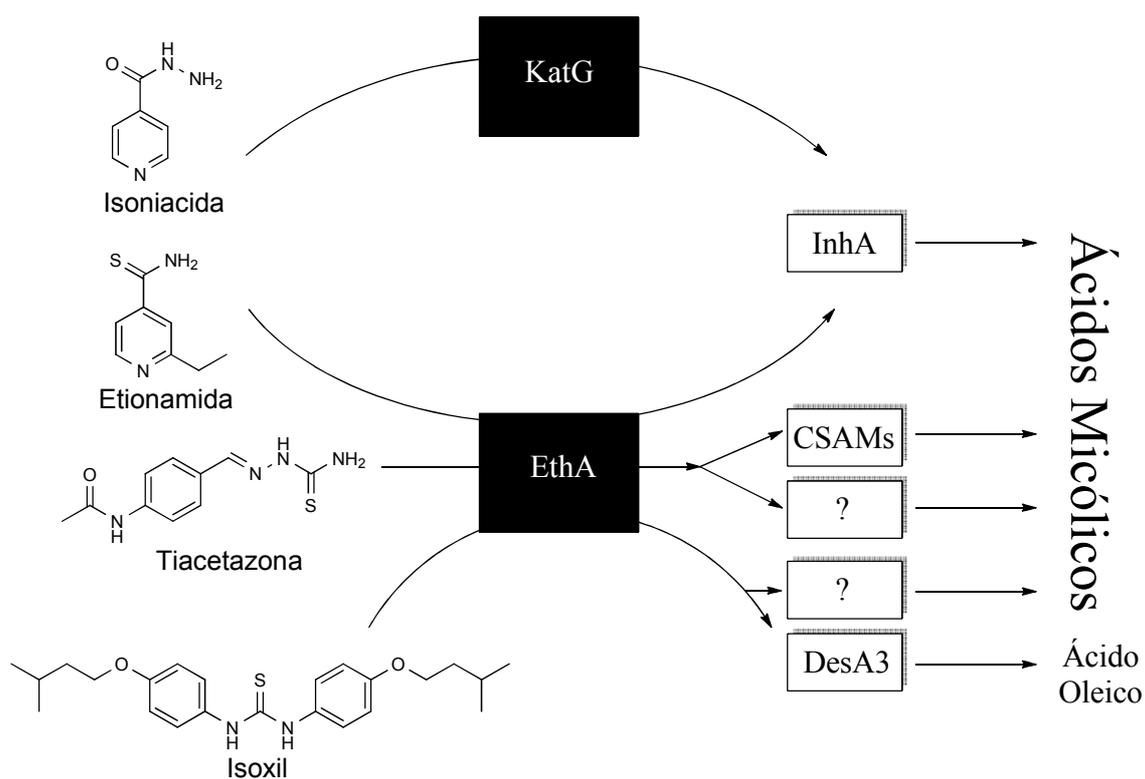


Figura 7: Estructuras de las drogas antituberculosas Isoniacida (INH), Etionamida (ETH), Tiacetazona (TAC) e Isoxil (ISO), sus activadores y sitios de inhibición. (Modificado de Dover, *et al.*, 2007)

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar los blancos y dilucidar los mecanismos de resistencia de las drogas Tiacetazona e Isoxil en micobacterias, de manera de validar nuevos blancos para el diseño de drogas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la CIM de ISO y TAC para distintas especies micobacterianas
- Estudiar el efecto de las drogas ISO y TAC sobre la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos en micobacterias
- Aislar mutantes espontáneas resistentes a estas drogas y caracterizarlas por: nivel de resistencia, mecanismo de resistencia, mutaciones implicadas.
- Sobre-expresar los distintos componentes de FASII y las desaturasas DesA1 y DesA2 y determinar el efecto de esta sobre-expresión sobre la resistencia y/o sensibilidad a las drogas en estudio

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y Medios de cultivo

Las cepas utilizadas en este trabajo de tesis fueron *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG Pasteur, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. smegmatis* mc² 155, *M. fortuitum* y *M. aurum*. Para la manipulación de ADN y construcción de vectores se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α (F⁻ *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ ⁻).*

Para los experimentos con las distintas especies y las mutantes obtenidas en este trabajo se utilizaron los siguientes medios: Middlebrook 7H9-glicerol, Middlebrook 7H9-glicerol sólido, en ambos casos con o sin el agregado de suplemento de ADS u OADS (albúmina, dextrosa, cloruro de sodio o ácido oleico, albúmina, dextrosa, cloruro de sodio respectivamente) utilizado al 10% v/v. Para los trabajos con *E. coli* DH5 α se utilizó medio Luria-Bertani. Dada la notoria capacidad de las micobacterias para dar un crecimiento no homogéneo debido a asociación inter-celular, se usan tensioactivos en la formulación de los medios de cultivo líquidos. Durante este trabajo se utilizó Tritón WR 1339 (0.25 % p/v).

Se utilizaron los antibióticos Kanamicina o Higromicina a 20 μ g/ml o 50 μ g/ml, respectivamente, cuando fuera necesario.

Medios de cultivo para micobacterias

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

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

Piridoxina	0,001
Biotina	0,0005

ADS

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

OADS

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

Preparación de un litro de medio 7H9 ADS sólido:

Agua destilada	890ml
7H9	4,7g
ADS	100ml
Glicerol 50%	10ml
Agar	15g

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

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

Agua destilada	890ml
7H9	4,7g
ADS	100ml
Glicerol 50% v/v	10ml
Tritón WR1339 250 mg/ml	1ml

Medios de cultivo para *E. coli*

Luria-Bertani (LB)

Agua destilada	1000ml
----------------	--------

NaCl	10g
Extracto de levadura	5g
Triptona	10g

Terrific Broth

Agua destilada	csp 1000ml
Triptona	12g
Extracto de levadura	24g
Glicerol	4ml
K ₂ HPO ₄	12,54g
KH ₂ PO ₄	2,31g

Medio GYT (para preparación de células electrocompetentes de *E. coli*)

Agua destilada	900ml
Glicerol	100ml
Extracto de levadura	1,25g
Triptona	2,5g

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM₉₉)

La CIM₉₉ -cantidad mínima de droga que inhibe el crecimiento del 99% del inóculo sembrado- fue determinada sembrando una dilución (equivalente a 10³ células aproximadamente) de cultivos saturados de las distintas cepas crecidos a 37°C, en medio sólido 7H9-ADS sin antibióticos o suplementado con concentraciones crecientes de los antibióticos en estudio. Los resultados fueron leídos luego de incubar las placas por 30 días en el caso de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium*, 15 días en el caso de *M. kansasii* y 5 días en el caso de *M. smegmatis*, *M. fortuitum* y *M. aurum*, todos a 37°C. La concentración considerada como CIM₉₉ fue aquella que causó una reducción del 99% en los recuentos de células viables respecto a la cantidad de células presentes en medio de cultivo sin el agregado de antibióticos. Asimismo se evaluó la actividad a lo largo de las concentraciones utilizadas determinando alteraciones en el tamaño de las colonias sin pérdida del número de las mismas respecto a placas control.

Curvas de crecimiento

El análisis del crecimiento de las cepas se realizó utilizando cultivos crecidos en medio líquido 7H9ADS-GT. Cultivos saturados de las cepas en estudio fueron utilizados para inocular medio fresco e incubadas hasta una DO_{600nm} inicial = 0,2-0,3; en este punto los cultivos se dividieron en alícuotas, a las cuales se les agregó distintas concentraciones de las drogas en estudio. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos de los cultivos y se determinó la DO_{600nm} .

Aislamiento de cepas resistentes a Isoxil y Tiacetazona

Para el aislamiento de mutantes resistentes a drogas se crecieron 3 cultivos independientes de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. kansasii*, se sembraron 100 μ l de cultivo saturado y 100 μ l de una dilución 10^{-1} de cada cultivo en placas de 7H9 ADS con concentraciones de TAC de 2, 5 y 10 μ g/ml (CIM= 0,1-0,5 μ g/ml) o ISO 5, 10 y 25 μ g/ml (CIM= 0,5-1 μ g/ml). Además se sembró una dilución 10^{-6} para determinar las UFC/ml. A partir de estos datos se pudo determinar la frecuencia de aparición de resistencia a ambos antibióticos. Las placas fueron incubadas por 30 días (o más cuando fuera necesario) y las colonias que crecieron fueron repicadas en medio sólido 7H9 ADS-Glicerol con y sin el antibiótico para el que fueron seleccionadas de manera tal de confirmar la resistencia.

Plásmidos utilizados en el desarrollo de esta tesis

El vector utilizado para clonar los distintos genes fue el pMV261. Este plásmido permite clonar genes bajo el control del promotor constitutivo *hsp60* y posee un cassette de resistencia a Kanamicina que permite la selección de las cepas que poseen este plásmido.

Los vectores pML1342 y pML1357 son plásmidos que se integran en los sitios attB utilizados por los micobacteriofagos L5 y Giles, respectivamente, lo cual permite integrar distintos genes en el cromosoma de micobacterias. Poseen un cassette de resistencia a Higromicina. Una vez que se obtiene la cepa con el plásmido integrado se transforma la misma con el plásmido pCreSacBI (Km^R) que posee la recombinasa Cre que remueve el esqueleto (donde se encuentra la integrasa y el cassette de resistencia a Higromicina) dejando integrado en el cromosoma solamente el gen de interés. Este último plásmido posee un marcador de contra selección que impide el crecimiento en

medios con sacarosa de modo tal que una vez obtenidas las colonias se repican en placas con 7H9-ADS-Glicerol + sacarosa 2% (p/v) para curar el plásmido pCreSacBI.

Para el clonado de genes se utilizó el plásmido pCR®-Blunt II-TOPO® (inVitrogen).

Oligonucleótidos cebadores utilizados

Primer	Secuencia	Sitio de corte	Descripción
deh Fw TB	GGATCCCGTGGCGTTGAGCGCAGACA	BamHI	para clonar en pMV261
Rv0635 Rv	GAATTCTGAACTCACGCAGCGCCATC	EcoRI	para clonar en pMV261
Rv0636 Fw	GGATCCTCTGATGGCGCTGCGTGAGTTC	BamHI	para clonar en pMV261
Rv0636 Rv	GAATTCCTACGCTAACTTCGCCGAGGCGAT	EcoRI	para clonar en pMV261
Rv0637 Fw	GGATCCTATGGCGCTCAAGACCGATATCC	BamHI	para clonar en pMV261
deh Rv TB	GAATTCAGCGGCCAGTTGCTAATTACG	EcoRI	para clonar en pMV261
mabA Fw	GAATTCGTGACTGCCACAGCCACTGA	EcoRI	para clonar en pMV261
mabA Rv	AAGCTTTCAGTGGCCATACCCATGC	HindIII	para clonar en pMV261
desA1 Fw	GGATCCCATGTCTAGCCAAGCTGACCG	BamHI	para clonar en pMV261
desA1 Rv	GAATTCGCGGGGCTAACGACGGCTC	EcoRI	para clonar en pMV261
desA2 Fw	GAATTCGCGATGGCACAGAAACCTGTC	EcoRI	para clonar en pMV261
desA2 Rv	AAGCTTGGGTGTCTAGCCCGTGACGAAT	HindIII	para clonar en pMV261
Rv3230 Fw	AAGCTTCTATGAGCAAGAAACACACGACGCTTA	HindIII	para clonar en pMV261
Rv3230 Rv	GTAAACACTAGATGTCCAGCACGCAATCA	HpaI	para clonar en pMV261
desA3 Fw	AAGCTTCGATGGCGATCACTGACGTCGACGTA	HindIII	para clonar en pMV261
desA3 Rv	GTAAACCGCCGAGCAATCTTAGGCTGCCA	HpaI	para clonar en pMV261
pMV261 Fw	TTGAGCCGTCGCTCGCGGGCACT	No tiene	p/chequear pMV261
pMV261 Rv	GATCACCGCGGCCATGATGGCA	No tiene	p/chequear pMV261
ethA Fw	AAGCTTCCATGACCGAGCACCTCGACGTTGT	HindIII	para clonar en pMV261
ethA Rv	GTAAACGGCGCTAAACCGTCGCTAAAGCTAAA	HpaI	para clonar en pMV261
mmaA4 Fw	GGATCCGAACATGACGAGAATGGCCGAGAA	BamHI	para clonar en pMV261
mmaA4 Rv	GAATTCCTCGCCGGGCTTAGGCCGCGGCAC	EcoRI	para clonar en pMV261
deh seq Fw1 TB	AGGCTGTCAACCTTGCCTGCGAA	No tiene	p/secuenciar hadABC de TB
deh seq Fw1 K	GCCGACGAGGAGGAATACGACGAG	No tiene	p/sec hadABC de kansasii
deh seq Rv1 TB y K	ATGTTGGGAAAACCCCGAGGTCCGAGTG	No tiene	p/sec hadABC de TB y kansasii
ethA Fw1 (K)	GCAGCTTACCGCGTGTGATAGT	No tiene	p/sec ethA de kansasii
ethA Fw1 (tb)	GCAGCTTACTACGTGTCGATA	No tiene	p/sec ethA de TB
ethA Fw2 (K y tb)	ATCATCCATCCGCAGCACTG	No tiene	p/sec ethA de kansasii y TB
ethA Fw3 (K y tb)	ACCGCAACGGGGTTGAACCT	No tiene	p/sec ethA de kansasii y TB
ethA Rv1 (tb)	ATATCGCTACAGCGACGACGAC	No tiene	p/sec ethA de TB
ethA Rv1 (K)	ATTCGTGCCGGGCGAAGTCTCTAC	No tiene	p/sec ethA de kansasii
ethA Rv2 (K)	GTTGCGGTGACGATGATGTCGG	No tiene	p/sec ethA de kansasii
ethA Rv2 (tb)	GTTGCGGTAATGATGATGTCAGC	No tiene	p/sec ethA de TB
ethA Rv3 (K y tb)	CAGTGTGCGGATGGATGAT	No tiene	p/sec ethA de kansasii y TB
mmaA4 Fw1 (K)	ACCAGTTCACACTCGCCAAGTAGA	No tiene	p/sec mmaA4 de kansasii
mmaA4 Fw1 (tb)	CCGAATGGGCTACATCGACTGCAA	No tiene	p/sec mmaA4 de TB
mmaA4 Fw2 (K y tb)	GACACCAACCGCTCACGTCA	No tiene	p/sec mmaA4 de kansasii y TB
mmaA4 Rv2 (K y tb)	GAAGAAGTCGTCGTAGTTCTCGTG	No tiene	p/sec mmaA4 de kansasii y TB
mmaA4 Rv1 (K)	TGCGGTCGCGCTCTTGCTGAT	No tiene	p/sec mmaA4 de kansasii
mmaA4 Rv1 (tb)	CCATCCATCACCCGCAACTTCGC	No tiene	p/sec mmaA4 de TB

Extracción de ADN para Reacción en Cadena de la Polimerasa

El ADN de las micobacterias se obtuvo mediante el protocolo descrito por Madiraju (Madiraju *et al.*, 2000):

Se toman colonias de una placa y se pasan a un tubo de microcentrífuga con tapa O-ring que tiene 100µl de Tris-EDTA pH=8. Se agregan bolitas de Zirconio de 100 µm hasta que quede una película de Tris-EDTA sobre las mismas. Luego se siguieron los siguientes pasos:

- Agitar mecánicamente 1min
- Incubar en hielo 1min
- Agitar mecánicamente 1min
- Incubar en hielo 1min
- Incubar a 95°C 10min
- Centrifugar a 12.000 rpm 2min
- Agitar mecánicamente 1min
- Incubar en hielo 1min
- Centrifugar a 12.000 rpm 2min
- Pasar sobrenadante a tubo eppendorf y utilizar 1µl para 50µl de mezcla de PCR

Electroporación de *E. coli*

Se inocularon 25 ml de LB con una colonia de *E. coli*. Se incubó toda la noche a 37°C y se diluyó en 500ml de LB. Se dejó llegar el cultivo a DO_{600nm} de 0,35-0,4 y se puso en hielo por 15 minutos. A partir de aquí todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C y las soluciones utilizadas se incubaron previamente en hielo. Se centrifugó 15min a 1000g, se resuspendió en agua, se centrifugó 20 min a 1000g, se resuspendió en 250ml de glicerol 10%, se centrifugó 20 min a 1000g, se resuspendió en 10ml de glicerol 10%, se centrifugó 20 min a 1000g y se resuspendió en 1ml de medio GYT frío. Se midió la DO_{600nm} de una dilución 1 en 100 y se llevó a una DO=80-120 en caso de ser necesario. Se guardaron alícuotas de 40µl a -20°C para su posterior utilización.

Para la transformación se utilizaron cubetas de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad), previamente enfriadas, donde se incubaron las células con 10 a 100 ng de ADN en un volumen de 2µl. La electroporación se llevó a cabo en un electroporador MicroPulser™ (Bio-Rad), fijando el pulso programado EC2 (2,5 kV). Se recuperó

agregando 1ml de LB e incubando a 37°C por 1h, luego de lo cual se sembraron 100 µl en placas de LB agar con el antibiótico correspondiente.

Electroporación de *M. tuberculosis*

Se crecieron 20ml de *M. tuberculosis* H37Rv en medio 7H9-ADS-GT a 37°C. Una vez alcanzada una DO_{600nm} de 0,5-1 se centrifugó el cultivo 15min a 2000g y se lavó 3 veces con una solución de glicerol 10% (v/v) a temperatura ambiente. El precipitado fue resuspendido en 200µl de glicerol 10% (v/v), se agregó el ADN y se dejó a temperatura ambiente por 10min. Se colocaron las células en cubetas de electroporación de 0,2 cm (Bio-Rad) y se le dio un pulso de 2,5V y 25µF, con una resistencia de 1000Ω. Se agregó inmediatamente 1ml de medio 7H9-ADS-GT, se traspasó a un tubo de 15ml y se dejó incubando con agitación toda la noche a 37°C. Al día siguiente se centrifugó, se resuspendió el pellet en 100µl de medio y se sembró en placas de 7H9 ADS Glicerol con los antibióticos correspondientes. Las placas fueron incubadas a 37°C por 30 días.

MANIPULACION DE ADN

Preparación de ADN plasmídico

Se siguió el protocolo de lisis alcalina:

Se inoculó una colonia de *E. coli* en 2,5 ml de medio Terrific Broth en un tubo de 15 ml con el antibiótico adecuado. Se incubó toda la noche a 37°C con agitación. Se tomaron 2 ml de la suspensión en un tubo eppendorf y se centrifugó a 12500 rpm por 1 minuto. Se removió el sobrenadante y se centrifugó a la misma velocidad por 2 segundos, descartando el exceso de líquido. Se resuspendió el pellet en 200 µl de buffer de lisis (50mM glucosa, 25mM Tris-HCl (pH 8,0), 10mM EDTA y lisozima 5 mg/ml), se agitó mecánicamente por 5 segundos e incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se agregaron 400 µl de solución alcalina fresca (0,2 N NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión 5 veces y se colocó el tubo en baño de agua helada por 5 minutos. Se agregaron 300 µl de acetato de amonio 7.5M frío (pH 7.6) a la solución, se mezcló por inversión suave 5 veces y se colocó el tubo en baño de agua helada por 5 minutos. Se centrifugó la mezcla a 12500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf. Se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol y se

incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó la mezcla 12500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 100 μ l de acetato de amonio 2M (pH 7,4) al pellet, se agitó mecánicamente y se incubó en baño de agua helada por 5 minutos. Se centrifugó la mezcla a 12500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente y se separó el sobrenadante. Se agregaron 100 μ l de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó la mezcla a 12500 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con etanol 70%. Se removió el etanol por centrifugación y se dejó secar el pellet. Finalmente, se disolvió el pellet en 50 μ l de agua destilada.

Tratamiento con enzimas de restricción, ligasas y fosfatasas alcalinas

Las condiciones generales para los tratamientos de ADN con enzimas de restricción, fosfatasa alcalina y reacciones de ligación con T4 ADN ligasa fueron realizadas mediante métodos convencionales según Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989), y según las recomendaciones de los manuales de los laboratorios proveedores de las enzimas utilizadas.

Secuenciación de ADN

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

Purificación de ADN de geles de agarosa

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

Clonado de genes

Para el clonado de genes se utilizó en todos los casos la misma estrategia: se utilizaron oligonucleótidos sintéticos (que poseen sitios de restricción para clonar en el sitio de múltiple clonado del plásmido pMV261) en una reacción de PCR. La mezcla de reacción de PCR contenía:

H ₂ O miliQ	37,5µl
Buffer 10X	5µl
dNTPs (10mM c/u)	1,5µl
DMSO	2,5µl
Oligo Fw (20µM)	1µl
Oligo Rv (20µM)	1µl
ADN cromosomal	1µl
Pfx ADN polimerasa (Invitrogen)	0,5µl

Las mezclas fueron sometidas a desnaturalización (94°C, 1 min), seguido de 25 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), anillado (1 min) y extensión (68°C, 1 a 2 min de acuerdo a la longitud del fragmento a amplificar).

Los fragmentos amplificados fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa (0,8% p/v). Los productos de PCR fueron clonados en el vector pCR®-Blunt II-TOPO® (Invitrogen) y el inserto clonado fue confirmado por análisis de restricción y secuenciación.

Análisis de la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos

La síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos fue analizada en las distintas cepas mediante la incorporación del precursor radiactivo [1-¹⁴C] ácido acético. Cultivos de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. kansasii* fueron crecidos en 7H9 ADS-GT hasta una DO_{600nm}=0,3. En este punto se dividieron los cultivos en alícuotas las cuales fueron tratadas con distintas concentraciones de ISO o TAC e incubadas por 16h a 37°C, luego se agregó [1-¹⁴C] ácido acético y se continuó la incubación por 8h a 37°C. Luego de la marcación las células fueron colectadas por centrifugación, lavadas dos veces con agua y sometidas a hidrólisis alcalina con hidróxido de tetrabutilamonio (TBAH, Aldrich) al 15% (v/v) a 100°C por 12hs. Posteriormente se adicionaron 2ml de CH₂Cl₂ y 100µl de CH₃I a cada tubo, mezclándose los mismos por rotación a temperatura ambiente por 1h. Los metil-ésteres así formados fueron obtenidos mediante separación de las fases acuosa y orgánica por centrifugación a baja velocidad. La fase orgánica fue recuperada y secada a 55°C bajo atmósfera de nitrógeno luego de lo cual se resuspendió en 2 ml de eter etílico. Se dejó decantar por precipitación los restos sólidos presentes en la muestra y el sobrenadante, conteniendo los metil ésteres de ácidos grasos y ácidos micólicos

(FAMEs y MAMEs, de sus siglas en inglés), se traspasó a otro tubo y se secó a 55°C bajo atmósfera de nitrógeno.

Los MAMEs y FAMEs fueron separados por cromatografía en capa delgada (TLC) utilizando sílica G 60 como soporte. Para la TLC mono-dimensional se utilizó éter de petróleo:éter etílico (85:15 v/v) como fase móvil. Las muestras (aprox. 40.000 cpm) fueron sembradas y desarrolladas tres veces en este sistema. Para las TLC mono-dimensionales con Ag^+ se impregnaron las placas con una solución de AgNO_3 10% p/v y se utilizó el mismo sistema de solventes. Para la TLC bidimensional las muestras (aprox. 100.000 cpm) fueron sembradas en placas de sílica previamente tratadas con una solución de AgNO_3 10% p/v y desarrolladas dos veces en hexano-acetato de etilo (95:5 v/v) en la primer dirección y tres veces en éter de petróleo-éter etílico (85:15 v/v) en la segunda dirección. En ambos casos la radioactividad presente fue evidenciada por autorradiografía a -80°C en placas X-OMAT (Kodak).

Para los ensayos de recuento de radioactividad se marcó en la placa de cromatografía la zona correspondiente a las manchas de ácidos grasos y ácidos micólicos presentes en la placa de autorradiográfica. Luego se raspó la sílica de la placa de TLC, se pasó a un vial de plástico, se le agregó el líquido centelleador y se midieron las cpm en el contador de centelleo.

Estudio con inhibidores de bombas de eflujo

Para realizar el ensayo con inhibidores de bombas de eflujo se determinó la concentración inhibitoria mínima en medio sólido 7H9 al cual se adicionó carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP) o Verapamilo en concentraciones sub-inhibitorias de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESTUDIOS PRELIMINARES

Perfil de resistencia a TAC e ISO de distintas especies micobacterianas

Debido a que tanto TAC como ISO han sido utilizadas exclusivamente para el tratamiento clínico de la tuberculosis, existen muy pocos reportes de su acción sobre otras especies de micobacterias. Por tal motivo decidimos establecer el perfil de resistencia a estas drogas de distintas especies micobacterianas que se encontraban en ese momento en el laboratorio y que poseen características diferentes en cuanto a su crecimiento (lento o rápido) y al perfil de ácidos micólicos presentes en su envoltura. Para ello se determinó la CIM a estas drogas para las siguientes especies micobacterianas: *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG Pasteur, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. aurum* y *M. smegmatis* mc² 155 (Tabla II)

Tabla II: CIM en medio sólido 7H9 ADS para ISO y TAC de especies micobacterianas de crecimiento lento y rápido

Especies de crec. lento	CIM (µg/ml)	
	TAC	ISO
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0,1-0,25	0,5-1
<i>M. bovis</i> BCG Pasteur	1,5-3	0,5
<i>M. kansasii</i>	0,5	1-2,5
<i>M. avium</i>	100	>50
Especies de crec. rápido		
<i>M. fortuitum</i>	>100	>50
<i>M. aurum</i>	50	>50
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	>100	>50

Como puede observarse en la Tabla II, todas las especies de crecimiento rápido presentaron una alta resistencia a ambas drogas, con valores de CIM ≥ 50 µg/ml. Por el contrario, las especies de crecimiento lento, con la excepción de *M. avium*, presentaron valores de CIM más bajos de entre 0,1 y 3 µg/ml. A partir de estos resultados se decidió continuar los estudios con las siguientes especies: *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG Pasteur y *M. kansasii*.

Si bien se realizaron muchos experimentos en común para ambas drogas, los estudios realizados con TAC e ISO serán presentados en dos capítulos separados para permitir una mejor comprensión de los resultados y los pasos que se siguieron con cada una de estas drogas.

CAPITULO I: TIACETAZONA

Efecto de TAC sobre el crecimiento en medio líquido

Se analizó el efecto de TAC sobre el crecimiento en medio líquido 7H9-ADS-GT en las especies seleccionadas mencionadas anteriormente. De esta manera pudo observarse un efecto dosis dependiente de TAC sobre el crecimiento de todas las especies (Figura 8).

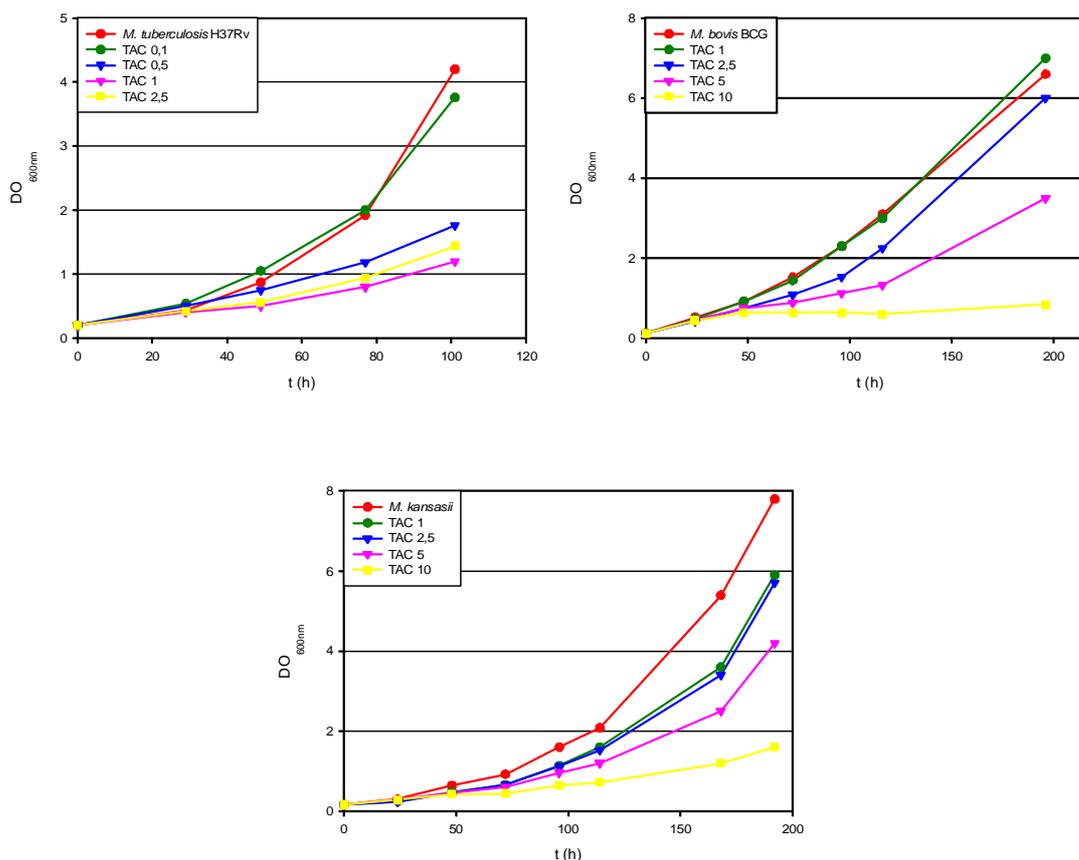


Figura 8: Efecto de TAC sobre el crecimiento en medio líquido 7H9-ADS-GT de *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG Pasteur y *M. kansasii*. Las concentraciones de TAC están expresadas en $\mu\text{g/ml}$. Los valores representan el promedio de tres repeticiones independientes.

Efecto de TAC sobre la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos

Prosiguiendo con el estudio de TAC en *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG y *M. kansasii* y tratando de dilucidar su mecanismo de acción se realizaron ensayos de incorporación de $[1-^{14}\text{C}]$ ácido acético en medio líquido 7H9-ADS-GT en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de TAC, como se describe en Materiales y

Métodos. Los metil ésteres de ácidos grasos y ácidos micólicos (FAMEs y MAMEs) obtenidos fueron analizados por TLC impregnada con AgNO_3 , lo que permite separar los ácidos grasos y ácidos micólicos de acuerdo a la insaturación de los mismos ya que el ion Ag^+ se une a los dobles enlaces presentes en las moléculas retardando su migración.

En este punto es necesario aclarar que mientras este trabajo de tesis se estaba llevando a cabo fue publicado un artículo (Alahari *et al.*, 2007) donde se afirmaba, a través de estudios con *M. bovis* BCG Pasteur y *M. marinum*, que TAC inhibía la ciclopropanación de ácidos micólicos en micobacterias, actuando sobre las CSAMs. Los autores llegaron a esta conclusión mediante la observación de la acumulación de un precursor insaturado de ácidos micólicos que presentaba una migración retardada con respecto a los ácidos micólicos maduros luego del tratamiento con TAC. Sin embargo, estos mismos autores afirmaban que la inhibición de las CSAMs no sería el blanco letal de TAC ya que la inhibición de las CSAMs se produce a concentraciones muy por debajo del valor de la CIM para esta droga y la sobre-expresión individual de las CSAMs por separado no confirió resistencia a la misma.

Como puede observarse en la Figura 9, TAC inhibió todas las familias de ácidos micólicos en las 3 especies, siendo los ácidos ceto-micólicos más resistentes a la inhibición. En el caso particular de *M. bovis* BCG Pasteur puede observarse la acumulación de un precursor, que llamaremos X, con una migración menor en la TLC, lo que está de acuerdo con lo observado por Alahari *et al.*. Sin embargo, en *M. tuberculosis* y *M. kansasii* no se observó una acumulación significativa de este precursor lo cual indicaría que TAC no está inhibiendo las CSAMs de estas especies.

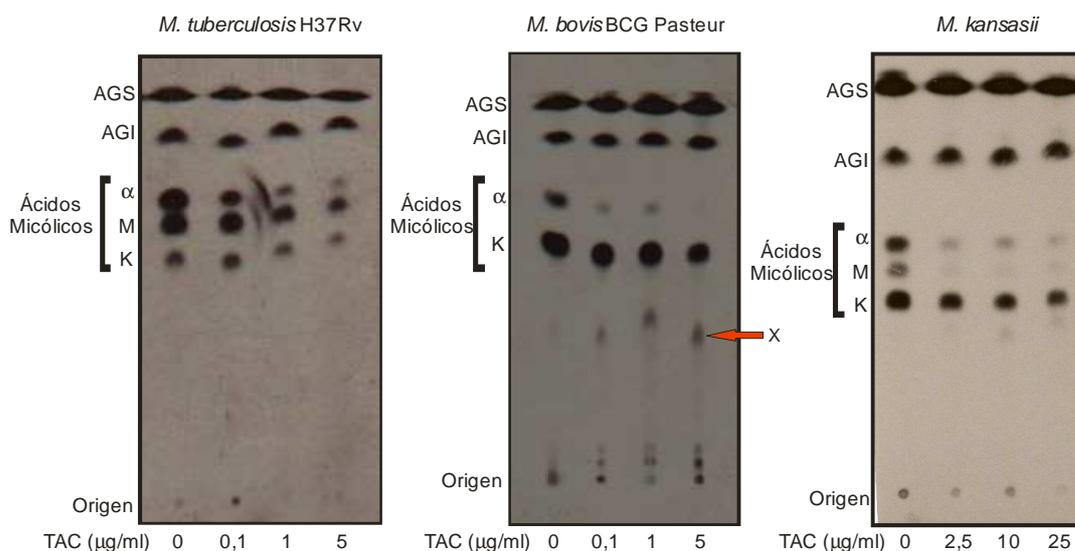


Figura 9: TLC impregnada con AgNO_3 de cultivos de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG Pasteur y *M. kansasii* marcados con $[1-^{14}\text{C}]$ ácido acético luego de tratar con TAC. Los FAMEs y MAMEs fueron extraídos y se sembraron 40.000 cpm en la TLC. Las muestras fueron corridas 3 veces con éter de petróleo-éter etílico (85:15). AGS: Ácidos grasos saturados; AGI: Ácidos grasos insaturados; α : Ácidos α -micólicos; M: Ácidos metoxi-micólicos; K: Ácidos ceto-micólicos; X: Precursor insaturado de ácidos micólicos

Para obtener una mejor resolución de los ácidos micólicos y los precursores insaturados, que podrían solaparse en una TLC normal 1D debido a la polaridad de los mismos, los FAMEs y MAMEs fueron sometidos a una TLC 2D que permite separar los compuestos en cuanto a su polaridad (primer dimensión) y a su nivel de insaturación (segunda dimensión, con Ag^+). De esta manera pudo observarse nuevamente que el precursor X solo se acumuló en *M. bovis* BCG Pasteur luego del tratamiento pero no en *M. tuberculosis* o en *M. kansasii* (Figura 10).

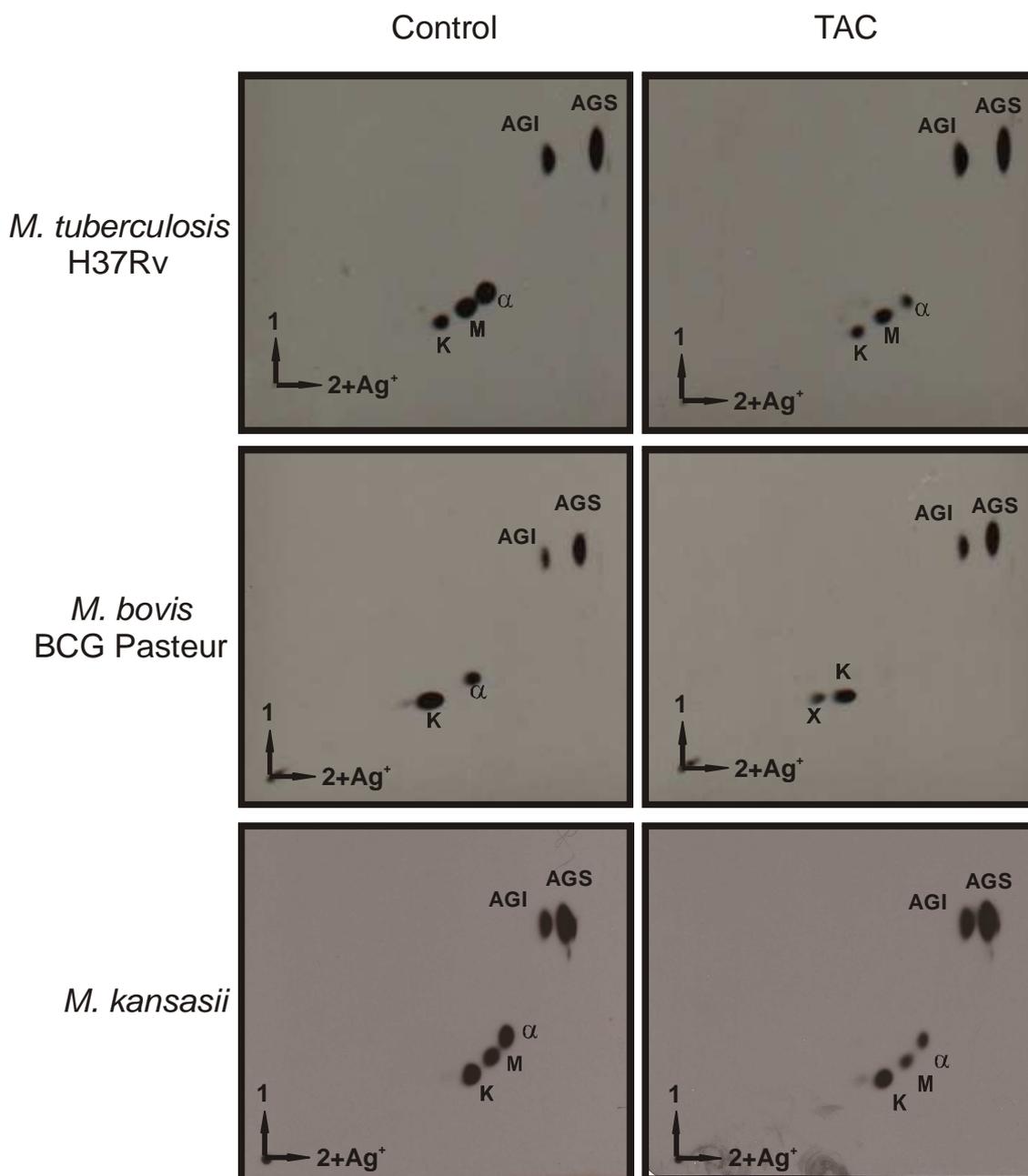


Figura 10: TLC-2D impregnada con AgNO_3 de cultivos de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG Pasteur y *M. kansasii* marcados con $[1-^{14}\text{C}]$ ácido acético tratados o no con TAC ($5 \mu\text{g/ml}$ para *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG y $25 \mu\text{g/ml}$ para *M. kansasii*). Los MAMEs y FAMEs fueron extraídos y se sembraron 100.000 cpm en cada TLC. Las muestras fueron corridas 2 veces con hexano-acetato de etilo (95:5) en la primer dirección y 3 veces con éter de petróleo-éter etílico (85:15) en la segunda dirección. AGS: Ácidos grasos saturados; AGI: Ácidos grasos insaturados; α : Ácidos α -micólicos; M: Ácidos metoxi-micólicos; K: Ácidos cetom-micólicos; X: Precursor insaturado de ácidos micólicos.

Esto nos llevó a pensar que TAC no estaría actuando de la misma manera en estas especies o bien la acumulación del precursor no era tan significativa como para observarse a simple vista en la TLC. Por este motivo decidimos cuantificar la intensidad de cada mancha, esto se hizo marcando el contorno de cada una en la TLC, raspándola y midiendo la cantidad de cuentas presente en las mismas. Se determinó así el porcentaje de cuentas de cada mancha respecto al total de cuentas (Figura 11); puede observarse que en las 3 especies hay una disminución en la síntesis de ácidos micólicos, siendo los α - y metoxi-micólicos los más afectados. También pudo observarse que el incremento del precursor X solo se produce en *M. bovis* BCG mientras que en las otras dos especies prácticamente no se alteró la cantidad de este precursor. Fue interesante observar también en todas las especies un incremento o acumulación de ácidos grasos, tanto saturados como insaturados, en la misma medida en que disminuyó la síntesis de ácidos micólicos.

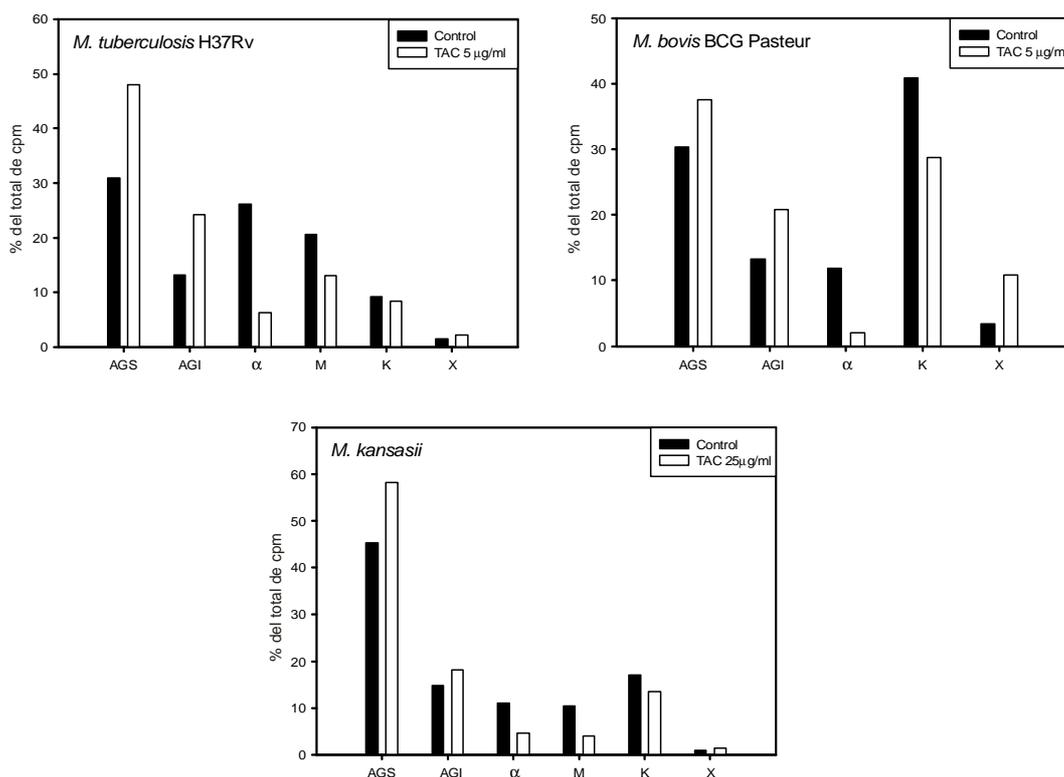


Figura 11: Porcentaje de marca total extraída de las TLC-2D antes (barras negras) y después (barras blancas) del tratamiento con TAC. AGS: Ácidos grasos saturados; AGI: Ácidos grasos insaturados; α : Ácidos α -micólicos; M: Ácidos metoxi-micólicos; K: Ácidos ceto-micólicos; X: Precursor insaturado de ácidos micólicos. Promedio de 3 repeticiones.

Si las únicas enzimas afectadas por TAC en la síntesis de ácidos micólicos fueran las CSAMs sería esperable que la disminución de la síntesis de ácidos micólicos maduros causara la acumulación de los precursores insaturados. En cambio, lo que se observó fue que la disminución en la síntesis de ácidos micólicos generó una acumulación de ácidos grasos. Es interesante señalar que estos efectos, es decir, inhibición de ácidos micólicos y acumulación de ácidos grasos, son similares a los observados luego del tratamiento con INH y ETH, inhibidores de la enoil ACP reductasa de FASII (Vilcheze *et al.*, 2000; Winder *et al.*, 1971). Esto nos llevó a pensar en dos posibilidades para la acción de TAC: a) que estuviese inhibiendo una enzima del ciclo FASII y de esta manera causando un efecto similar al de otras drogas que inhiben FASII, o b) que la inhibición de múltiples blancos, incluidas las CSAMs, produjera alguna señal que frene la síntesis de ácidos micólicos.

Teniendo en cuenta estas 2 hipótesis decidimos aislar mutantes espontáneas resistentes a esta droga que pudieran darnos una respuesta.

Aislamiento de mutantes resistentes a TAC

El aislamiento de mutantes resistentes y su caracterización ha sido una estrategia tradicional y muy valiosa para la determinación de genes involucrados en el mecanismo de acción de antibióticos así como para determinar mecanismos de resistencia a los mismos (Grzegorzewicz *et al.*, 2012; Kenney & Churchward, 1994; La Rosa *et al.*, 2012; Morlock *et al.*, 2000; Nessar *et al.*, 2011). Por tal motivo se aislaron mutantes espontáneos de *M. tuberculosis* H37Rv y *M. kansasii* resistentes a TAC. Para ello se inocularon 3 cultivos independientes con aproximadamente 10^4 células cada uno y se dejaron crecer los cultivos hasta saturación. Una vez obtenidos los cultivos saturados se sembraron distintas diluciones en medio sólido 7H9-ADS-Glicerol con TAC; las concentraciones de TAC utilizadas fueron 2, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ para *M. tuberculosis* H37Rv y 5, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ para *M. kansasii*. Las colonias así obtenidas fueron repicadas en medio sólido con y sin TAC para confirmar la resistencia. También se sembraron diluciones en medio sin droga para realizar el recuento de UFC inicial. De esta manera se pudo calcular la frecuencia de aparición de mutantes resistentes con valores promedio de $4,4 \times 10^{-6}$ y $1,8 \times 10^{-6}$ para *M. tuberculosis* y *M. kansasii*, respectivamente. De esta forma se seleccionaron 20 mutantes resistentes a TAC de *M. tuberculosis* y 15 de *M. kansasii* para continuar con la caracterización.

Perfil de resistencia a drogas de las mutantes resistentes aisladas

Ya se han reportado en la literatura cepas clínicas resistentes a TAC que poseen mutaciones en *ethA* (DeBarber *et al.*, 2000), gen que codifica para la mono-oxigenasa EthA que cataliza la activación de TAC. Se han encontrado mutaciones a lo largo de toda la secuencia del gen lo cual indica que la resistencia está mediada por la inactivación de su producto. También se han encontrado mutaciones en la región promotora de *ethR*, que codifica para un represor de la familia TetR y regula la transcripción de *ethA*; de esta manera mutaciones que producen sobre-expresión de EthR provocan una disminución en la transcripción de *ethA* y por lo tanto resistencia a las drogas activadas por EthA, es decir, TAC, ISO y ETH. Si bien la delección de *ethA* produce resistencia a las 3 drogas, se han reportado mutaciones puntuales que provocan sustituciones de aminoácidos que confieren resistencia a una o dos drogas solamente, la razón de esta discrepancia no ha sido debidamente aclarada (DeBarber *et al.*, 2000).

Al aislar mutantes resistentes a Tiacetazona existe la posibilidad de que estas posean mutaciones en *ethA* o en el promotor de *ethR*, las cuales serían resistentes no solo a TAC sino también a ISO y/o ETH. Para descartar este tipo de mutaciones se determinó la CIM de las mutantes de *M. tuberculosis* y *M. kansasii* aisladas para las 3 drogas activadas por EthA, de esta manera aquellas que solo presentaran resistencia a TAC deberían tener mutaciones en el blanco de la droga. Los resultados se describen en las Tablas III, IV, V y VI.

Tabla III: CIM para TAC, ETH e ISO de *M. tuberculosis* H37Rv y las mutantes espontáneas resistentes a TAC aisladas.

	CIM (µg/ml)		
	ETH	TAC	ISO
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	2,5	0,15	2,5
MTBR4	2,5	>5	2,5
MTBR5	2,5	>5	2,5
MTBR6	2,5	>5	2,5
MTBR7	2,5	>5	2,5
MTBR8	2,5	>5	2,5
MTBR11	2,5	>5	2,5
MTBR12	2,5	>5	2,5
MTBR17	2,5	>5	2,5
MTBR18	2,5	>5	2,5
MTBR16	2,5	>5	5
MTBR1	2,5	>5	5
MTBR2	2,5	>5	10-25
MTBR3	2,5	>5	5
MTBR9	2,5	>5	10
MTBR10	2,5	>5	5
MTBR13	2,5	>5	5
MTBR14	2,5	>5	10
MTBR19	2,5	>5	10
MTBR15	25	>5	>25
MTBR20	25	>5	10

Tabla IV: Agrupamiento de las 20 mutantes de *M. tuberculosis* H37Rv aisladas en función de su resistencia y/o sensibilidad a TAC, ETH e ISO.

ETH	TAC	ISO	n
S	R	S	9
S	R	R	9
R	R	S	0
R	R	R	2
Total			20

Tabla V: CIM para TAC, ETH e ISO de *M. kansasii* y las mutantes espontáneas resistentes a TAC aisladas.

	CIM (µg/ml)		
	ETH	TAC	ISO
<i>M. kansasii</i>	1	0,5	1
MKR 5.1	1	25	>25
MKR 5.3	1	>25	>25
MKR 5.4	1	>25	>25
MKR 10.2	1	>25	>25
MKR 10.6	1	>25	10
MKR 10.7	1	>25	2,5
MKR 10.9	1	>25	5
MKR 25.3	1	>25	10-25
MKR 5.2	2,5	>25	>25
MKR 5.9	2,5	>25	>25
MKR 10.1	2,5	>25	>25
MKR 10.10	2,5	>25	>25
MKR 10.12	2,5	>25	>25
MKR 25.1	2,5	>25	10-25
MKR 25.2	2,5	>25	10-25

Tabla VI: Agrupamiento de las 15 mutantes de *M. kansasii* aisladas en función de su resistencia y/o sensibilidad a TAC, ETH e ISO.

ETH	TAC	ISO	n
S	R	S	0
S	R	R	8
R	R	S	0
R	R	R	7
Total			15

De las 20 mutantes resistentes a TAC de *M. tuberculosis*: 9 fueron resistentes solo a TAC, otras 9 fueron resistentes a TAC e ISO y las 2 restantes fueron resistentes a las 3 drogas. A partir de aquí decidimos seguir trabajando solo con las 9 mutantes resistentes sólo a TAC, es decir, MTBR4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 17 y 18.

Por otro lado, ninguna de las 15 mutantes de *M. kansasii* aisladas presentaron resistencia sólo a TAC sino que 7 de ellas presentaron resistencia a TAC, ISO y ETH y las 8 restantes fueron resistentes a TAC e ISO. Si bien no pudimos aislar ninguna mutante resistente a TAC y sensible a ISO y ETH, decidimos continuar con la caracterización de todas estas mutantes ya que no existen hasta el momento reportes de los mecanismos, ya sea por mutaciones en *ethA* u otro gen, que median la resistencia a estas drogas en *M. kansasii*.

Análisis del perfil de ácidos micólicos de las mutantes resistentes a TAC

Como parte de la caracterización de las mutantes resistentes a TAC se realizaron ensayos de incorporación de [1-¹⁴C] ácido acético y posterior extracción de FAMEs y MAMEs. Estos fueron resueltos tanto en TLC normal como en TLC con AgNO₃.

En el caso de las mutantes de *M. tuberculosis* se observó que 6 de las 9 mutantes solo tenían ácidos α-micólicos y no poseían ácidos micólicos oxigenados, es decir, metoxi- y ceto-micólicos. Las 3 mutantes restantes presentaron un perfil de ácidos micólicos igual al de la cepa parental (Figura 12A).

Cuando se corrieron estas mismas muestras en una TLC impregnada con AgNO₃ (Figura 12B) se observó que en las muestras de las 6 mutantes que no tenían ácidos micólicos oxigenados había una mancha (denominada Y) que corría más retrasada que la de los ácidos α-micólicos maduros. Teniendo en cuenta que en la TLC normal esta mancha no se ve, es decir que corre junto con los α-micólicos maduros se llegó a la conclusión de que la mancha Y correspondería a un ácido α-micólico inmaduro que posee una insaturación en lugar de una ciclopropanación (Figura 13). Esto se correlaciona con una publicación donde se deletó el gen *mmaA4*, que codifica para la CSAM que forma el precursor de los micólicos oxigenados (ver Figura 5); los ácidos micólicos de esta mutante consistían en ácidos α-micólicos maduros diciticlopropanados y ácidos α-micólicos mono-ciclopropanados con un ciclopropano en posición proximal y un doble enlace en posición distal (Dinadayala *et al.*, 2003).

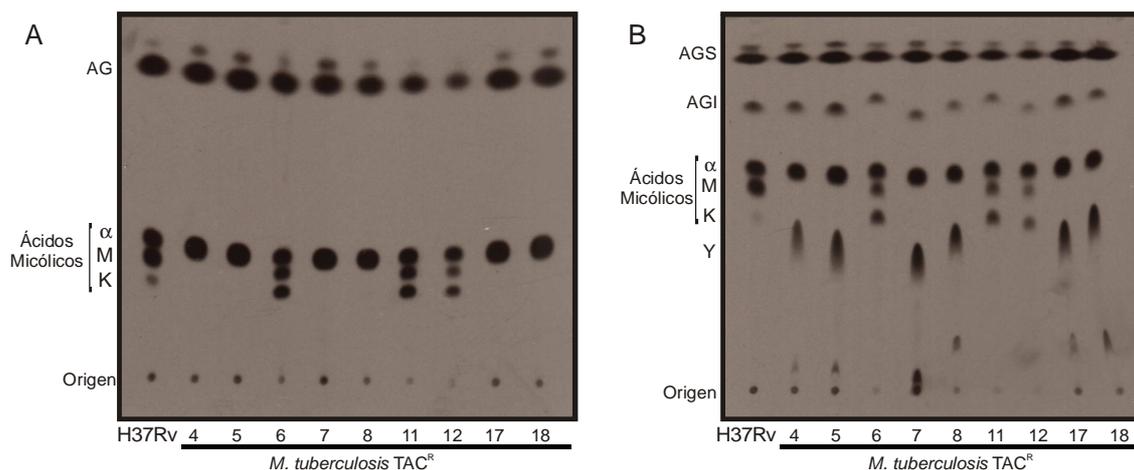


Figura 12: TLC sin (A) y con (B) AgNO_3 de ácidos micólicos y ácidos grasos de *M. tuberculosis* H37Rv y las mutantes resistentes a TAC. AG: Ácidos grasos; AGS: Ácidos grasos saturados; AGI: Ácidos grasos insaturados; α : Ácidos α -micólicos; M: Ácidos metoximicólicos; K: Ácidos ceto-micólicos; Y: Ácidos α -micólicos mono-insaturados.

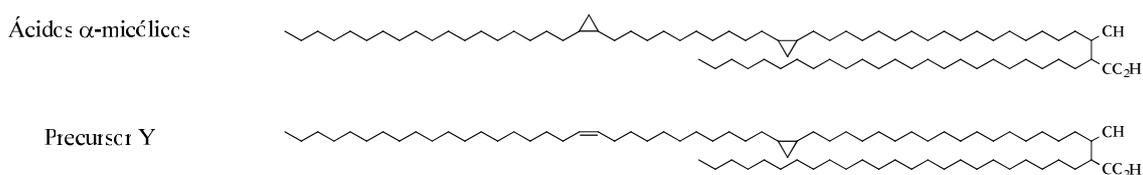


Figura 13: Estructura de los ácidos α -micólicos maduros de *M. tuberculosis* y del precursor mono-insaturado Y.

Al mismo tiempo se realizaron los mismos ensayos para las mutantes de *M. kansasii* resistentes a TAC encontrándose que todas las mutantes presentaron el mismo perfil que la cepa parental tanto en la TLC normal como en la impregnada con AgNO_3 (Figura14).

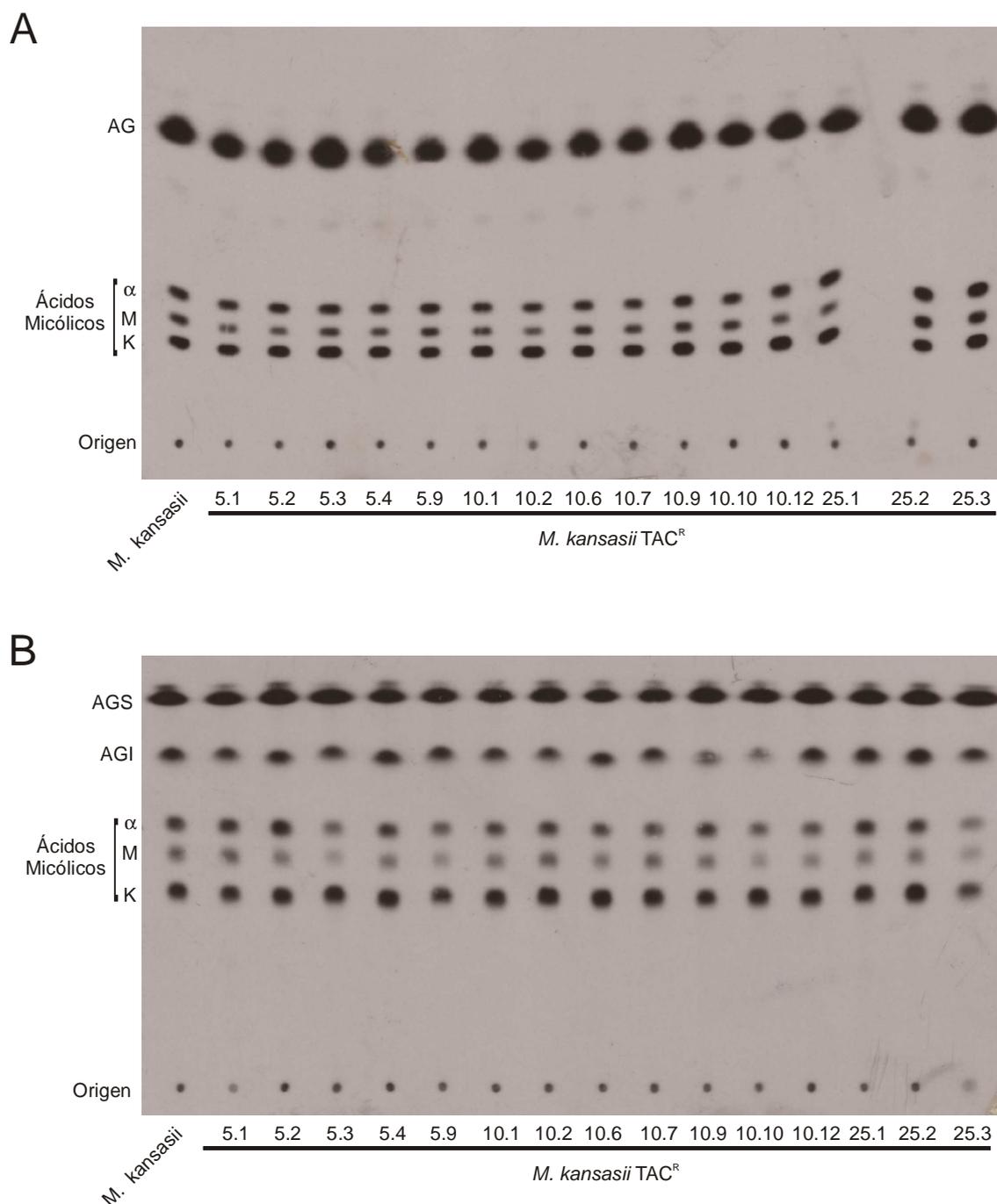


Figura 14: TLC sin (A) y con (B) AgNO_3 de ácidos micólicos y ácidos grasos de *M. kansasii* y las mutantes resistentes a TAC. AG: Ácidos grasos; AGS: Ácidos grasos saturados; AGI: Ácidos grasos insaturados; α : Ácidos α -micólicos; M: Ácidos metoxi-micólicos; K: Ácidos ceto-micólicos.

Secuenciación del gen *mmaA4* de las mutantes de *M. tuberculosis* deficientes en ácidos micólicos oxigenados

En un trabajo publicado en el año 2009 (Alahari *et al.*, 2009) se aislaron mutantes resistentes a TAC de *M. bovis* BCG y observaron que 5 de las 9 mutantes aisladas no sintetizaban ácidos micólicos oxigenados, tenían mutaciones en *mmaA4* y que estas mutaciones estaban localizadas a lo largo de toda la proteína; el resto de las mutantes aisladas no fueron caracterizadas en dicha publicación. Luego de tratar las mutantes obtenidas con TAC y realizar ensayos de marcación y TLC, vieron inhibición de las CSAMs aún a bajas concentraciones de droga, lo cual indicaba que TAC seguía inhibiendo las CSAMs. Además, el análisis de una mutante insercional en una región temprana del gen *mmaA4* mostró que la misma tenía alta resistencia a TAC, por lo tanto concluyeron que la pérdida de este gen provocaba que TAC no se active y no pueda ejercer su efecto. A partir de estas observaciones postularon el siguiente modelo de acción de TAC: esta pro-droga sería activada por EthA, produciéndose intermediarios capaces de inhibir las CSAMs y luego se produciría una segunda activación mediada por MmaA4 que daría el producto que inhibe el blanco esencial de TAC (Figura 15).

Cabe destacar que las 5 mutantes de *M. bovis* BCG Pasteur con mutaciones en *mmaA4* aisladas por Alahari, *et al.* presentaron el mismo perfil de ácidos micólicos que las 6 mutantes de *M. tuberculosis* aisladas en este trabajo de tesis que fueron descritas más arriba.

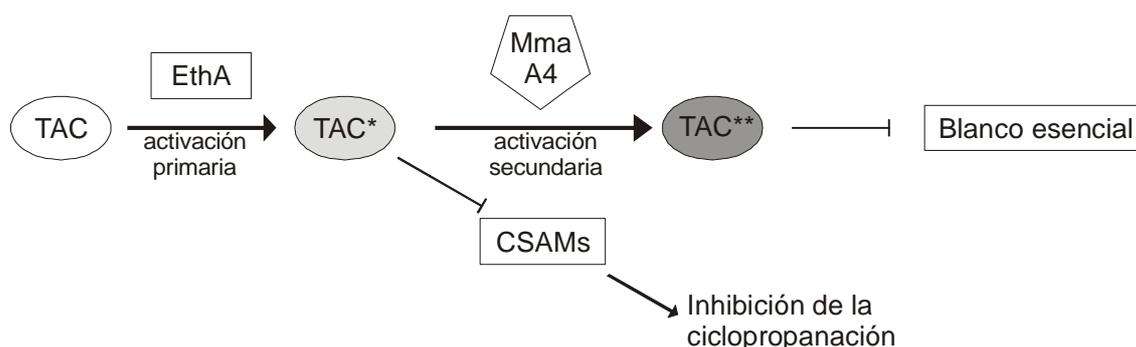


Figura 15: Modelo de activación de TAC por parte de EthA y MmaA4 y sitios de inhibición propuestos por Alahari *et al.* (Alahari *et al.*, 2009)

Para confirmar si la deficiencia en la síntesis de ácidos micólicos oxigenados en las mutantes de *M. tuberculosis* resistentes a TAC se debía a mutaciones en la enzima

MmaA4, o había otro tipo de mutaciones que dieran este fenotipo, se secuenció el gen *mmaA4* de todas las mutantes resistentes. De esta manera se pudo determinar que las 6 mutantes que eran deficientes en la síntesis de ácidos micólicos oxigenados poseían mutaciones en el gen *mmaA4*; 4 de las mutaciones generaron sustituciones de aminoácidos, una produjo un codón de terminación y la restante un cambio en el marco de lectura (Tabla VII y Figura 16). Por otro lado, las 3 mutantes que tenían un perfil normal de ácidos micólicos no presentaron mutaciones en *mmaA4*, confirmando que la resistencia a TAC no se debe a mutaciones en este gen.

Tabla VII: CIM para TAC, perfil de ácidos micólicos y cambios en *mmaA4* de las mutantes de *M. tuberculosis* H37Rv resistentes a TAC

	CIM TAC ($\mu\text{g/ml}$)	Micólicos Oxigenados	Cambios en <i>mmaA4</i>	
			Nucleótido	Aminoácido
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0,1-0,25	Si		
MTBR4	50	No	Δg748	Cambio de marco
MTBR5	50	No	c552g	Termina en 184
MTBR6	10	Si	Sin cambios	Sin cambios
MTBR7	10	No	g302a	G101D
MTBR8	10	No	g671a	G224D
MTBR11	25	Si	Sin cambios	Sin cambios
MTBR12	25	Si	Sin cambios	Sin cambios
MTBR17	25	No	c552g	Termina en 184
MTBR18	25	No	c170t	A57V

```

1   MTRMAEKPI SPTKTRTRFEDIQAHYDVSDDFFALFQDPTRTYSCAYFEPPELTLEEAQYA
                                     V(MTBR18)
61   KVDLNLDKL DLKPGMTLLDIGCGWGTMRRAVERFDVNVIGLTL SKNQHARCEQVLASID
                                     D(MTBR7)
121  TNRSRQVLLQGWEDFAEPVDRIVSIEAFEHFGHENYDDFFKRCFNIMPADGRMTVQSSVS
      vSTOP(MTBR5 y 17)                                     D(HRTAC8)
181  YHPYEMAARGKKLSFETARFIKFIVTEIFPGGRLPSTEMMVEHGEKAGFTVPEPLSLRPH
      vΔ1nt(MTBR4)
241  YIKTLRIWGDTLQSNKDKAIEVTSEEVYNRYMKYLRGCEHYFTDEMLDCSLVTYLKPAA
301  A

```

Figura 16: Secuencia de aminoácidos de la enzima MmaA4 y mutaciones presentes en las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a TAC. El sitio de unión a S-adenosil metionina se encuentra subrayado.

Rol de MmaA4 en la resistencia a TAC

Es interesante notar que, según Alahari, *et al.*, TAC estaría inhibiendo todas las CSAMs con excepción de MmaA4 y que además esta CSAM en particular sería un activador secundario de TAC. Si bien mutaciones en *mmaA4*, llevando a la pérdida de actividad de la enzima, fueron suficientes para conferir alta resistencia a TAC, esto no parece suficiente para afirmar que es un activador secundario. Por este motivo decidimos estudiar el efecto de la sobre-expresión de la mono-oxigenasa EthA, de MmaA4 y de ambas enzimas sobre la sensibilidad a TAC en *M. tuberculosis*.

Para ello clonamos los genes *ethA* y *mmaA4* en el plásmido pMV261, que permite la expresión de estos genes bajo el promotor *hsp60* de micobacterias. Tanto la sobre-expresión de *ethA* como de *mmaA4* produjo una leve reducción (2 veces) en el valor de CIM para TAC (Tabla VIII).

Tabla VIII: CIM para TAC de las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv control (pMV261) y sobre-expresando la mono-oxigenasa EthA y la metil-transferasa MmaA4

	CIM TAC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>M. tuberculosis</i> pMV261	0,1
<i>M. tuberculosis</i> pMV261:: <i>ethA</i>	0,05
<i>M. tuberculosis</i> pMV261:: <i>mmaA4</i>	0,05

Continuando con la hipótesis que plantea que MmaA4 sería un activador pensamos que si ambas enzimas fueran necesarias para activar TAC y así ejercer su efecto sobre el blanco esencial, entonces la sobre-expresión de ambas enzimas debería producir un efecto aditivo y en consecuencia presentar un valor de CIM a TAC más bajo que la sobre-expresión de cada una por separado.

Para ver si esta hipótesis era cierta utilizamos 2 metodologías distintas. Por un lado decidimos utilizar un compuesto, denominado 2 fenil etil butirato (PEB), que induce la sobre-expresión de la mono-oxigenasa EthA a través de la inhibición de la unión del represor EthR al promotor de *ethA*; de esta manera el agregado de este compuesto en el medio de crecimiento aumenta la sensibilidad a drogas activadas por EthA (Grau *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2008). De esta manera utilizamos la cepa de *M. tuberculosis* que sobre-expresa MmaA4 y determinamos la CIM a TAC en ausencia o presencia de PEB. El agregado de PEB al medio no produjo una disminución en la CIM a TAC como se hubiese esperado si tanto EthA como MmaA4 fuesen activadores de esta droga (Tabla IX).

Tabla IX: CIM para TAC de las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv pMV261 (control) y la cepa sobre-expresando la metiltransferasa MmaA4 en ausencia o presencia de PEB.

	CIM TAC ($\mu\text{g/ml}$)	
	sin PEB	+ PEB 0,5mM
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv pMV261	0,1	0,05
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv pMV261:: <i>mmaA4</i>	0,05	0,05

Por otra parte, se construyeron cepas de *M. tuberculosis* H37Rv que poseen en el cromosoma una copia extra de los genes *mmaA4* y *ethA* bajo el promotor *hsp60*. Para ello se utilizó una técnica descrita recientemente (Huff *et al.*, 2010) que permite integrar genes en distintos lugares del cromosoma de *M. tuberculosis* utilizando una serie de vectores, denominados pML, que poseen integrasas de distintos micobacteriofagos. Brevemente, se clonó el gen de interés bajo el promotor *hsp60* del plásmido pMV261, luego se subclonó el gen junto con el promotor *hsp60* en un plásmido de la serie pML, el cual se integra en el cromosoma de la micobacteria ya que expresa una integrasa de micobacteriofagos que inserta el plásmido en un sitio attB específico; esta serie de plásmidos posee resistencia a Higromicina. Una vez integrada la construcción en el cromosoma se transforma esta cepa con el plásmido pCreSacBI (Km^{R}) que expresa una recombinasa específica que elimina el esqueleto del plásmido que se encontraba integrado dejando solo el gen de interés en el cromosoma. El plásmido pCreSacBI es eliminado pasando la cepa por medio de cultivo con sacarosa, ya que este plásmido posee un marcador de contra selección que impide su crecimiento en medios con sacarosa. Luego, a partir de esta cepa, se vuelven a repetir los pasos anteriores con otro gen de interés y utilizando otro plásmido de la serie pML que se integre en otro sitio attB del cromosoma. De esta manera quedan solo los genes de interés integrados en el cromosoma y se eliminan los marcadores de resistencia. Utilizando esta técnica se construyeron cepas de *M. tuberculosis* con copias extra de los genes *mmaA4*, *ethA* y de ambos genes. Al determinar la CIM para TAC de la cepa merodiploide para ambos genes se vio que no presentó mayor sensibilidad lo que sugiere que MmaA4 no sería activador de TAC (Tabla X).

Tabla X: CIM para TAC de las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv pML1342 (control) y las cepas con una copia extra del gen *mmaA4*, del gen *ethA* y de ambos genes.

	CIM TAC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv pML1342	0,1
<i>M. tuberculosis</i> + <i>mmaA4</i>	0,1
<i>M. tuberculosis</i> + <i>ethA</i>	0,05
<i>M. tuberculosis</i> + <i>mmaA4</i> + <i>ethA</i>	0,05

Estos resultados nos llevan a pensar que, si bien no se puede negar que *MmaA4* es necesaria para la acción de TAC, esta enzima no sería un activador secundario sino que estaría cumpliendo otro rol aún no determinado.

Secuenciación de *ethA*

Como se indicó en la Tabla V, las mutantes de *M. kansasii* aisladas presentaron 2 tipos de perfiles de resistencia, TAC^R-ETH^S-ISO^R (Grupo I) y TAC^R-ETH^R-ISO^R (Grupo II). Si bien es esperable que se puedan obtener mutantes resistentes a las 3 drogas, ya que comparten el activador EthA, es llamativo que 8 de las 15 mutantes presenten resistencia cruzada solo a ISO. Existen reportes de cepas clínicas de *M. tuberculosis* que poseen mutaciones en *ethA* que confieren resistencia a solo una o dos de las drogas activadas por esta mono-oxigenasa, siendo sensibles para las otras, lo cual sugiere que podrían existir mutaciones en *ethA* que presenten un fenotipo de resistencia cruzada entre TAC e ISO. Por este motivo, decidimos secuenciar el gen *ethA* de las 8 mutantes del Grupo I, es decir, que presentaron resistencia cruzada solo a ISO. También incluimos en el estudio a una de las mutantes del Grupo II que presentaba resistencia cruzada a ISO y ETH (KRTAC 5.2). Como puede observarse en la Tabla XI, las 8 mutantes secuenciadas que presentaron resistencia cruzada a ISO y TAC pero no a ETH (5.1, 5.3, 5.4, 10.2, 10.6, 10.7, 10.9 y 25.3) no tienen mutaciones en el activador EthA mientras que la mutante resistente a las 3 drogas (KRTAC 5.2) tiene una mutación que produce un cambio de aminoácido (T366M), lo que sugiere que esta mutación sería la responsable de la resistencia a TAC, ISO y ETH. De esta manera pudimos concluir que la resistencia cruzada a TAC e ISO en las 8 mutantes del Grupo I secuenciadas no se debe a mutaciones en el activador. Por lo tanto decidimos seguir caracterizando este sub-grupo de mutantes.

Tabla XI: Perfil de resistencia a TAC, ISO y ETH; perfil de ácidos micólicos y mutaciones en *ethA* de las mutantes de *M. kansasii* resistentes a TAC del Grupo I y GrupoII. Nd: No Determinado.

		CIM (µg/ml)			Micólicos oxigenados	Cambios en <i>ethA</i>	
		TAC	ISO	ETH		Nucleótido	Aminoácido
	<i>M. kansasii</i>	0,5	1	1	SI	Sin cambios	Sin cambios
Grupo I	KRTAC 5.1	25	>25	1	SI	Sin cambios	Sin cambios
	KRTAC 5.3	>25	>25	1	SI	Sin cambios	Sin cambios
	KRTAC 5.4	>25	>25	1	SI	Sin cambios	Sin cambios
	KRTAC 10.2	>25	>25	1	SI	Sin cambios	Sin cambios
	KRTAC 10.6	>25	10	1	SI	Sin cambios	Sin cambios
	KRTAC 10.7	>25	2,5	1	SI	Sin cambios	Sin cambios
	KRTAC 10.9	>25	5	1	SI	Sin cambios	Sin cambios
	KRTAC 25.3	>25	10-25	1	SI	Sin cambios	Sin cambios
GrupoII	KRTAC 5.2	>25	>25	2,5	SI	c1098t	T366M
	KRTAC 5.9	>25	>25	2,5	SI	Nd	Nd
	KRTAC 10.1	>25	>25	2,5	SI	Nd	Nd
	KRTAC 10.10	>25	>25	2,5	SI	Nd	Nd
	KRTAC 10.12	>25	>25	2,5	SI	Nd	Nd
	KRTAC 25.1	>25	10-25	2,5	SI	Nd	Nd
	KRTAC 25.2	>25	10-25	2,5	SI	Nd	Nd

Por otro lado, si bien las mutantes de *M. tuberculosis* aisladas presentaron un perfil TAC^R-ETH^S-ISO^S, para estar seguros de que no había mutaciones en *ethA* se secuenció este gen en las mutantes MTBR6, 11 y 12, es decir las mutantes que no tenían mutaciones en *mmaA4*. La secuencia del gen *ethA* de estas 3 mutantes no presentó ningún cambio respecto a la cepa parental con lo cual podemos concluir que la mutación responsable de la resistencia se encuentra en otra parte del genoma.

Estudio con inhibidores de bombas de eflujo

Los mecanismos de eflujo que median la resistencia bacteriana a distintos antibióticos han sido muy estudiados en diversas bacterias, incluyendo las micobacterias (da Silva *et al.*, 2011;Poole, 2005). A partir de la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) se han identificado muchos genes que codifican para bombas de eflujo putativas (De *et al.*, 2002;Gupta *et al.*, 2006;Sander *et al.*, 2000). Además, la sobre-expresión de distintas bombas de eflujo se encuentra asociada con la resistencia a múltiples drogas en aislamientos clínicos de *M. tuberculosis* (da Silva *et al.*, 2011;Hao *et al.*, 2011;Rodrigues *et al.*, 2011;Singh *et al.*, 2011). Estas bombas de eflujo son proteínas de membrana que exportan sustratos fuera de la célula a partir de un mecanismo dependiente de energía, que puede provenir de la hidrólisis de ATP o de la

fuerza protón motriz de la membrana. La función principal de las mismas es expulsar las sustancias tóxicas presentes en el ambiente así como diversos metabolitos producidos dentro de la célula, protegiendo a la misma de los efectos tóxicos que éstos pudieran producir.

Existen diversos inhibidores que afectan distintas familias de bombas de eflujo, impidiendo así la expulsión de las sustancias al exterior, que pueden ser utilizados para determinar si la resistencia a antibióticos esta mediada por este tipo de mecanismos. Entre los inhibidores más utilizados podemos mencionar al Verapamilo, un bloqueador de canales dependientes de calcio que inhibe un gran rango de bombas de eflujo, y la carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP), un desacoplador del gradiente de protones.

Con el fin de determinar si la resistencia a TAC en las mutantes aisladas podía deberse a mecanismos que involucren bombas de eflujo se determinó la CIM a TAC en ausencia o en presencia de concentraciones sub-inhedorias de Verapamilo o CCCP, las concentraciones determinadas y utilizadas posteriormente fueron 40 $\mu\text{g/ml}$ (CIM=100 $\mu\text{g/ml}$) y 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (CIM=4 $\mu\text{g/ml}$), respectivamente.

Se seleccionaron las 3 mutantes resistentes a TAC de *M. tuberculosis* que no presentaron mutaciones en *mmaA4* y las mutantes resistentes del Grupo I de *M. kansasii*. La CIM para TAC de estas mutantes en presencia de los inhibidores de bombas de eflujo no se alteró por lo cual podemos concluir que la resistencia no se debe a la expulsión de la droga por parte de bombas de eflujo, por lo menos aquellas que pueden ser inhibidas por Verapamilo o CCCP.

Sobre-expresión de los genes de FASII

El efecto de TAC, es decir, inhibición de la síntesis de ácidos micólicos y acumulación de ácidos grasos es similar al observado luego del tratamiento con INH y ETH. Si recordamos, el blanco de estos dos antimicobacterianos es la enoil ACP reductasa *InhA* de FASII, la inhibición de esta enzima provoca el cese de la síntesis de ácidos micólicos y la consecuente acumulación de ácidos grasos que no pueden ser elongados por FASII.

Para evaluar si TAC actúa sobre alguna enzima del ciclo FASII que pudiera traducirse en el mismo efecto, decidimos sobre-expresar los componentes del ciclo de elongación, es decir; *kasA*, *inhA*, *mabA* y *hadABC* que codifican para la β -cetoacil ACP

sintasa A, la enoil ACP reductasa, la β -cetoacil ACP reductasa y el complejo β -hidroxiacil ACP deshidratasa, respectivamente. Se clonaron estos genes en el plásmido pMV261 bajo el control del promotor *hsp60* y se transformó *M. tuberculosis* H37Rv. Las colonias obtenidas fueron repicadas y se determinó la CIM para TAC y como control también se determinó la CIM para INH y ETH.

Fue interesante observar que la sobre-expresión del operón *hadABC* confirió resistencia a TAC, pero no a INH o ETH, con un valor de CIM >50 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 17), más de 500 veces el valor de la cepa parental. El resto de los componentes de FASII no confirió resistencia a las drogas ensayadas salvo *inhA* para el caso de INH y ETH como era de esperarse (Tabla XII).

Tabla XII: CIM para TAC, INH y ETH de *M. tuberculosis* H37Rv sobre-expresando los distintos componentes de FASII.

<i>M tuberculosis</i> H37Rv	CIM ($\mu\text{g/ml}$)		
	TAC	INH	ETH
pMV261	0,1	0,05	1
pMV261:: <i>inhA</i>	0,1	>1	>5
pMV261:: <i>kasA</i>	0,05	0,05	1
pMV261:: <i>mabA</i>	0,1	0,05	1
pMV261:: <i>hadABC</i>	>50	0,05	1

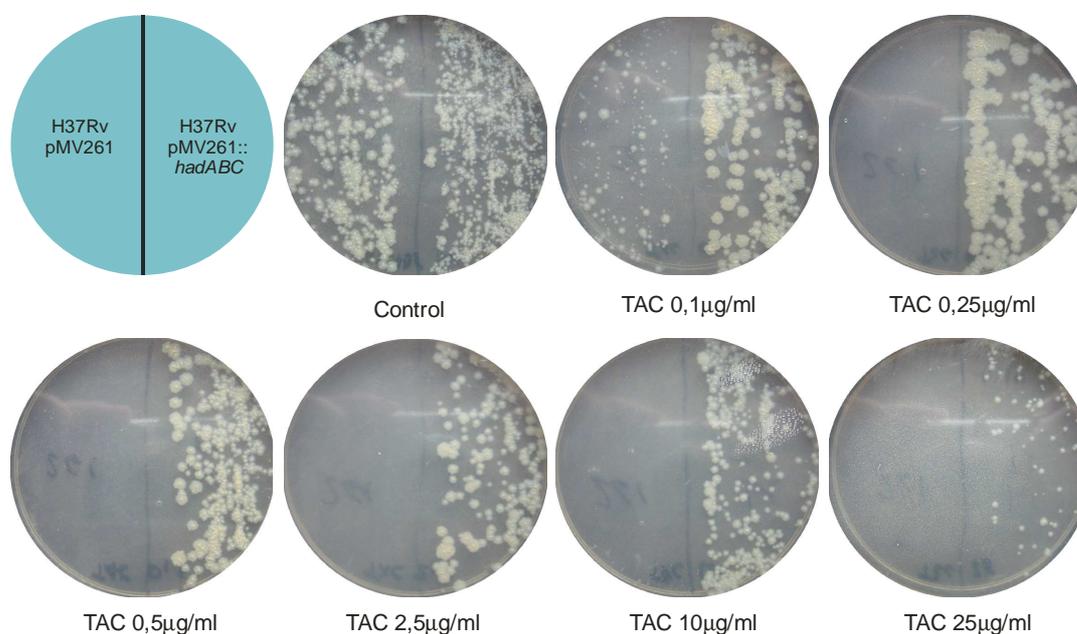


Figura 17: Determinación de la CIM a TAC en medio sólido 7H9-ADS de la cepa control de *M. tuberculosis* (pMV261) y la cepa sobre-expresando el complejo de la deshidratasa (pMV261:*hadABC*). Se sembraron aproximadamente 10^2 - 10^3 ufc de cada cepa y las fotos fueron tomadas luego de 30 días de incubación a 37°C.

Este resultado estaría indicando que la β -hidroxiacil ACP deshidratasa de FASII podría ser el blanco esencial de TAC ya que su sobre-expresión genera alta resistencia a la misma. Recientemente se caracterizó el complejo de la β -hidroxiacil ACP deshidratasa, en este trabajo se concluyó que este complejo consiste en dos heterodímeros, HadAB y HadBC, que actuarían secuencialmente en la síntesis del ácido meromicólico ya que poseen afinidad por acil ACPs de distinta longitud. El heterodímero HadAB actuaría en los pasos iniciales e intermedios de elongación, mientras que HadBC sería el encargado de los últimos pasos (Cantaloube, *et al.*, 2011).

Como siguiente paso decidimos determinar cual de los genes del operón de la deshidratasa estaba confiriendo la resistencia a TAC, para ello clonamos cada uno de los 3 genes individualmente en el plásmido pMV261. Sorprendentemente, la sobre-expresión de ninguno de los genes individualmente confirmó el mismo nivel de resistencia a TAC que el operón entero y solo la sobre-expresión de HadC dio una moderada resistencia, con un valor de CIM de 0,5-1 $\mu\text{g/ml}$, 5 a 10 veces la CIM de la cepa con el plásmido vacío (Tabla XIII). A partir de estos resultados pensamos que TAC podría estar inhibiendo más de un componente del complejo deshidratasa. Por ello decidimos clonar los genes *hadAB* y *hadBC*, codificando para los dos heterodímeros funcionales. Se determinó la CIM a TAC para estas 2 construcciones y pudo observarse que mientras la cepa sobre-expresando *hadAB* tiene una CIM de 2,5 $\mu\text{g/ml}$, la que sobre-expresa *hadBC* tiene una CIM $>50 \mu\text{g/ml}$, igual valor al que presenta la cepa sobre-expresando el operón entero (Tabla XIII). Lamentablemente por razones de solubilidad de la droga en el medio de cultivo no se pudieron utilizar valores mayores a 50 $\mu\text{g/ml}$ y no se puede determinar si el heterodímero HadBC confiere exactamente la misma resistencia que el operón entero. Esto significa que si bien ambos heterodímeros confieren resistencia a TAC, la sobre-expresión del heterodímero HadBC otorga mayor resistencia y, por lo tanto, sería el más afectado por TAC. Esto es sorprendente ya que de acuerdo a estudios de mutagénesis con librerías de transposones (Sasseti *et al.*, 2003), HadC no sería esencial para el crecimiento *in vitro* de *M. tuberculosis*. Por otro lado el operón *hadABC* se encuentra conservado en todas las micobacterias, incluso en *M. leprae*, cuyo genoma es el más reducido dentro de este género y que ha perdido muchos genes a lo largo de la evolución, manteniendo sólo el mínimo necesario para sobrevivir en el huésped. Si bien es necesario hacer estudios de delección del gen, esta

última observación junto con los resultados de resistencia a TAC indicarían que HadC es esencial en micobacterias.

Tabla XIII: CIM de TAC sobre *M. tuberculosis* H37Rv pMV261 (control) y *M. tuberculosis* sobre-expresando los distintos componentes del complejo de la β -hidroxiacil ACP deshidratasa.

<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	CIM TAC ($\mu\text{g/ml}$)
pMV261	0,1
pMV261:: <i>hadABC</i>	>50
pMV261:: <i>hadA</i>	0,1
pMV261:: <i>hadB</i>	0,05
pMV261:: <i>hadC</i>	0,5-1
pMV261:: <i>hadAB</i>	2,5
pMV261:: <i>hadBC</i>	>50

Secuenciación del operón *hadABC* de las mutantes resistentes a TAC

La observación de que la sobre-expresión del operón que codifica para el complejo deshidratasa genera resistencia a TAC en *M. tuberculosis* nos llevó pensar que las mutantes resistentes a TAC aisladas previamente podrían tener mutaciones en estos genes. De esta manera seleccionamos las 3 mutantes resistentes a TAC de *M. tuberculosis* H37Rv que no tenían mutaciones en *mmaA4* ni en *ethA* (MTBR6, 11 y 12) y las 8 mutantes de *M. kansasii* del Grupo I (5.1, 5.3, 5.4, 10.2, 10.6, 10.7, 10.9 y 25.3). Se amplificó por PCR el operón *hadABC* junto con 700pb por arriba del mismo, para cubrir posibles mutaciones que provoquen la sobre-expresión del operón (Figura 18), se purificó el producto luego de correr en un gel de agarosa y se envió a secuenciar.

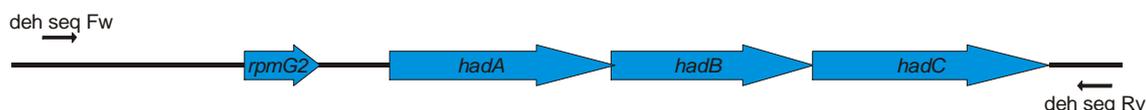


Figura 18: Organización génica del operón que codifica para el complejo de la β -hidroxiacil ACP deshidratasa. Se encuentra indicado el sitio de hibridación de los oligos utilizados para amplificar y secuenciar el operón junto con 700pb corriente arriba del mismo. El gen *rpmG2* codifica para la proteína ribosomal L33.

Del análisis de las secuencias del operón *hadABC* se desprenden los resultados presentados en las Tablas XIV y XV. De las 3 mutantes de *M. tuberculosis*, 2 de ellas presentaron mutaciones en el operón *hadABC*. La mutante MTBR6 tiene una mutación en *hadC* que provoca una sustitución de la Alanina en posición 151 por Valina, mientras que la mutante MTBR12 tiene una mutación en *hadA* que provoca la sustitución de la Cisteína en posición 61 por Serina. La mutante MTBR11 no tiene mutaciones en este operón, lo cual sugiere que existen otros mecanismos de resistencia a TAC aún no identificados.

Tabla XIV: CIM a TAC y cambios en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de las mutantes de *M. tuberculosis* resistentes a TAC

	CIM TAC ($\mu\text{g/ml}$)	Cambios en el operón <i>hadABC</i> de <i>M. tuberculosis</i>	
		Nucleótido	Aminoácido
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	0,15		
MTBR6	10	c451t de <i>hadC</i>	A151V de HadC
MTBR11	25	Sin cambios	
MTBR12	25	g182c de <i>hadA</i>	C61S de HadA

Con respecto a las mutantes de *M. kansasii*, 6 de las 8 mutantes presentaron mutaciones en el operón. Una de ellas, KRTAC 10.2, tiene exactamente la misma mutación en HadA (C61S) que una de las mutantes de *M. tuberculosis* (MTBR12), lo cual es una evidencia fuerte de que esta mutación sería responsable de la resistencia a TAC. Las mutantes KRTAC 5.4 y 10.7 tienen una mutación en *hadC* que provoca la sustitución de la Valina en posición 85 por Isoleucina. La mutante KRTAC 5.3 tiene una inserción de 3 nucleótidos en *hadA* que provoca la duplicación de la Tirosina 108. Por otro lado, 2 mutantes (KRTAC 10.6 y 25.3) presentaron una mutación silente en *hadA* (c303t) que no provoca un cambio de aminoácido; estas mutantes fueron aisladas en forma independiente por lo cual pensamos que esta mutación es responsable de la resistencia a TAC. Dado que no hay un cambio de aminoácido creemos que esta mutación podría estar afectando algún tipo de regulación transcripcional o alterando de algún modo la traducción, aunque se deben hacer más estudios para comprobarlo. Finalmente, las 2 mutantes restantes (KRTAC 5.1 y 10.9) no tienen mutaciones en el operón *hadABC* y la razón de su resistencia no pudo ser determinada.

DISCUSIÓN

Uno de los avances más importantes en la lucha contra la tuberculosis ha sido el entendimiento de los mecanismos moleculares de acción de las drogas antituberculosas y de los mecanismos de resistencia a estas drogas. Investigaciones llevadas a cabo durante las últimas dos décadas lograron identificar los blancos de acción de la mayoría de las drogas antituberculosas como, por ejemplo, INH, ETH, Pirazinamida (PZA) y el ácido p-amino-salicílico (PAS), componentes principales del arsenal antituberculoso. Al mismo tiempo, se descubrieron los mecanismos de resistencia a las drogas mencionadas anteriormente, esto es muy importante para el diseño de nuevas drogas que puedan sortear esos mecanismos de resistencia y de esta manera ser efectivas contra cepas multi-resistentes. Llamativamente, los tres primeros compuestos mencionados más arriba son pro-drogas, una característica cada vez más común dentro de las drogas antituberculosas o antimicobacterianas específicas, es decir, que requieren un paso previo de activación para generar el/los metabolito/s activo/s que actuarán con su molécula diana. Esta activación es llevada a cabo por diferentes enzimas; la catalasa-peroxidasa KatG es la responsable de la activación de INH, la amidasa pirazinamidasa convierte PZA en ácido pirazinoico y la flavín mono-oxigenasa EthA modifica ETH para dar el metabolito reactivo que finalmente actuará sobre InhA. EthA es también responsable de la activación de otras dos drogas antituberculosas, ISO y TAC. Recientemente, a partir de trabajos llevados a cabo por el grupo de Kremer, se propuso un mecanismo de acción de TAC y también se dilucidaron nuevos mecanismos de resistencia a esta pro-droga; en sus reportes observaron que TAC inhibía la ciclopropanación de los ácidos micólicos y postularon que actuaba a nivel de las CSAMs; además, mostraron que mutaciones en MmaA4, una de las CSAMs, generaba resistencia a TAC y postularon a esta CSAM como un segundo activador de TAC, necesario para ejercer su efecto letal (Alahari *et al.*, 2007; Alahari *et al.*, 2009; Dover *et al.*, 2007). A pesar de esto, los mismos autores sostienen que las CSAMs no son el blanco esencial de TAC y que el mismo no pudo ser identificado en ese reporte. Estos trabajos, que fueron publicados mientras esta tesis estaba en progreso, mostraban que luego del tratamiento de cultivos de *M. bovis* BCG Pasteur con TAC se acumulaban precursores insaturados de ácidos micólicos. Nuestros resultados, trabajando con *M. tuberculosis* H37Rv y *M. kansasii*, mostraron que TAC afecta la síntesis de ácidos micólicos sin producir una acumulación significativa de estos precursores insaturados.

Es importante resaltar que cuando utilizamos *M. bovis* BCG Pasteur pudimos reproducir las observaciones reportadas, lo cual sugiere que el uso de esta cepa puede haber influido en la acumulación de este precursor y llevar a una conclusión errónea. Es necesario recordar que *M. bovis* BCG Pasteur es naturalmente deficiente en la síntesis de ácidos metoxi-micólicos debido a una mutación en *MmaA3*, la CSAM responsable de síntesis de esta familia de ácidos micólicos; esta diferencia con *M. tuberculosis* H37Rv y *M. kansasii*, que poseen ácidos α -, metoxi- y ceto-micólicos, podría explicar los distintos efectos de TAC sobre estas especies. Por lo tanto, si bien existe inhibición de las CSAMs como consecuencia del tratamiento con TAC, la acumulación de los precursores insaturados parece ser especie-dependiente. Esta variación en los efectos observados luego del tratamiento con TAC nos llevó a pensar si la inhibición de las CSAMs era suficiente para justificar el arresto de crecimiento o si TAC podría estar actuando sobre otro blanco aún no identificado. Realizando estos mismos estudios en *M. tuberculosis* y *M. kansasii* observamos que TAC estaba afectando la síntesis de todas las familias de ácidos micólicos en ambas especies, aunque los ácidos ceto-micólicos fueron más resistentes a la inhibición. La cuantificación de la cantidad de radioactividad en ácidos grasos, en las distintas familias de ácidos micólicos y en los precursores insaturados reveló que, luego del tratamiento con TAC, se producía una acumulación de ácidos grasos a expensas de la inhibición de la síntesis de ácidos micólicos, mientras que la cantidad de precursores insaturados permanecía constante.

Estos resultados nos llevaron a pensar que podría haber otra enzima en la vía de síntesis de ácidos micólicos que estuviese afectada por alguno de los metabolitos generados luego de la activación de TAC. Fue por ello que decidimos clonar y sobre-expresar todos los componentes de FASII y ver como impactaba esto en la resistencia a TAC. Solo la sobre-expresión del operón que codifica para el complejo de la β -hidroxi-acil ACP deshidratasa en *M. tuberculosis* confirió resistencia a TAC con valores de 500 veces la CIM de la cepa control con el plásmido vacío. Recientemente se demostró que el complejo de la deshidratasa actúa formando dos heterodímeros, HadAB y HadBC, uno actuando en los ciclos iniciales e intermedios de elongación (HadAB) y el otro en los últimos ciclos (HadBC) (Sacco *et al.*, 2007). Por otro lado, cuando se sobre-expresó cada gen por separado, ninguno confirió gran resistencia y solo HadC presentó una CIM mayor (5 veces) a la cepa control. Este resultado puede significar que, o bien TAC actúa sobre más de una subunidad del complejo o que la expresión de uno solo de los monómeros no sea suficiente para producir un plegamiento estable y la correspondiente

interacción entre las subunidades, y se necesite la co-expresión de ambas subunidades para obtener una proteína estable. En concordancia con esto, en estudios recientes de interacción proteína-proteína de los distintos componentes del complejo deshidratasa, observaron que al expresar cada gen por separado se producían interacciones inespecíficas con otras proteínas concluyendo que esto se debía a un plegamiento incorrecto de cada monómero por separado lo que generaba la inespecificidad de interacción; es decir, que se necesita la expresión simultánea para que se formen los heterodímeros y, por lo tanto, no sorprende que ninguno de los tres genes independientes confiriera resistencia a TAC (Cantaloube *et al.*, 2011). Sin embargo, al expresar los genes que codifican para los heterodímeros funcionales HadAB y HadBC se observó una mayor resistencia a TAC, con valores de CIM de 2,5 µg/ml y >50 µg/ml, respectivamente. El hecho de que el heterodímero HadBC confiera mayor resistencia a TAC, similar a la del operón entero, hace suponer que este heterodímero, o por lo menos la subunidad HadC del mismo, sea el más afectado por TAC. Se ha propuesto que el heterodímero HadBC actúa en los últimos pasos del ciclo de elongación de FASII, similar a lo observado para la β-cetoacil ACP sintasa KasB (Cantaloube *et al.*, 2011; Veyron-Churlet *et al.*, 2005). En estos reportes se postula la existencia de dos complejos de elongación de FASII, denominados E1FASII y E2FASII; en el primer complejo actuarían las enzimas InhA, KasA, MabA y el heterodímero HadAB y en el segundo complejo KasA y HadAB serían reemplazadas por KasB y HadBC (Figura 20). A su vez las distintas CSAMs (MmaA1, MmaA2, MmaA3, MmaA4, CmaA2, UmaA y PcaA) interaccionarían específicamente con las distintas subunidades (KasA o KasB; HadAB o HadBC) dependiendo de la posición, distal o proximal, donde actúen. Estudios realizados en *M. tuberculosis* y *M. marinum* demostraron que la β-cetoacil ACP sintasa KasB no es esencial en estas especies (Bhatt *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2003); la cepa de *M. tuberculosis* con la delección del gen *kasB* produce ácidos micólicos más cortos (2 a 6 carbonos) pero es viable *in vitro*. A partir de estudios de mutagénesis de alta densidad (Sasseti *et al.*, 2003) el gen que codifica para la subunidad HadC del complejo deshidratasa es considerado no esencial aunque no se han hecho estudios de delección de este gen para confirmarlo. Teniendo en cuenta que HadBC actuaría en el complejo E2FASII junto con KasB, y que esta última es no esencial en micobacterias, sería lógico pensar que la delección de *hadC* sería similar a la delección de *kasB*. Sin embargo, si bien deben realizarse los estudios de delección del gen *hadC* mencionados

anteriormente, a partir de los resultados obtenidos en este trabajo y teniendo en cuenta que mutantes resistentes a TAC presentan mutaciones en esta subunidad tanto en *M. tuberculosis* como en *M. kansasii*, es difícil pensar que HadC sea no esencial en micobacterias.

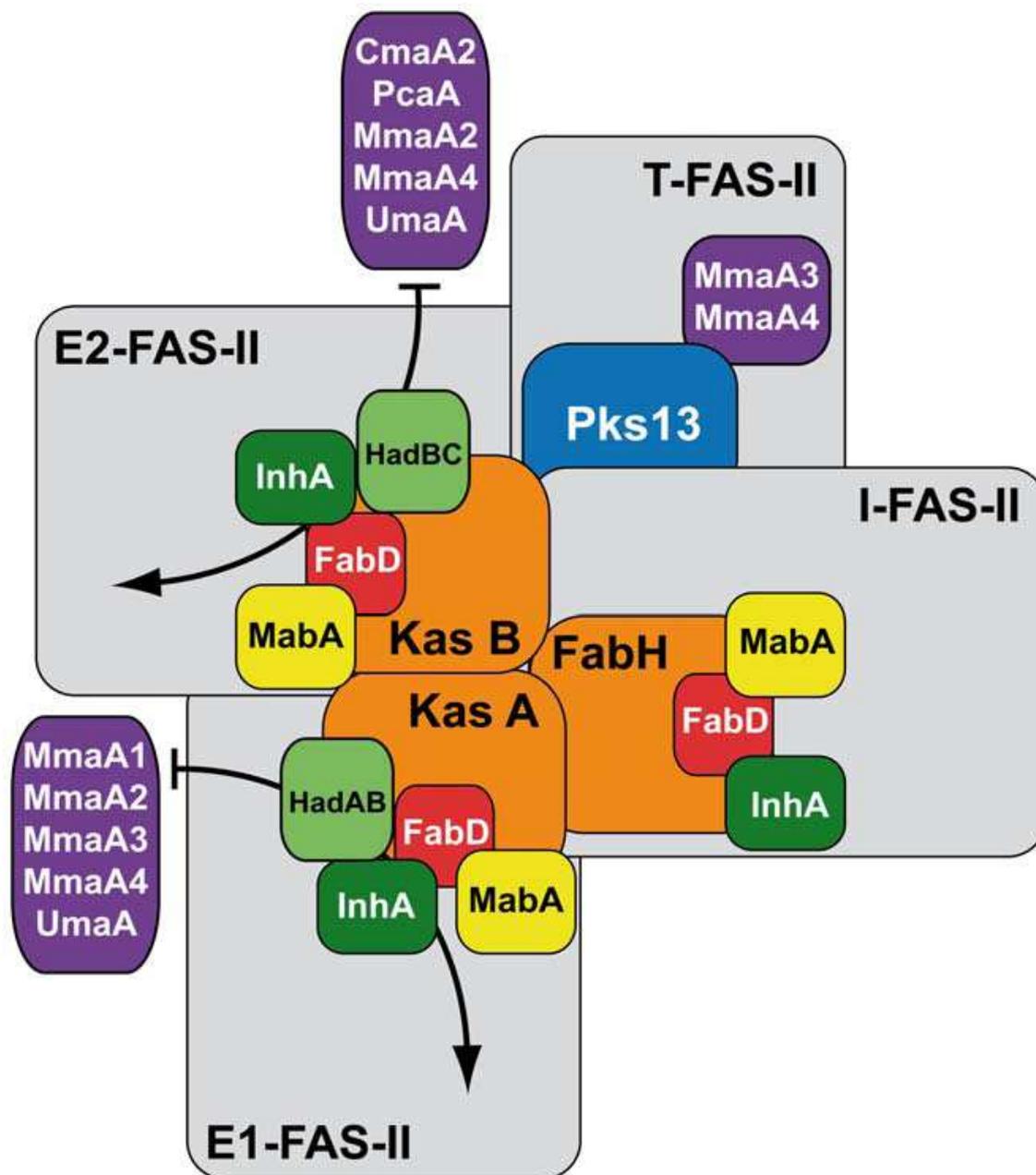


Figura 20: Modelo de los distintos complejos de FASII que se formarían durante la síntesis de ácidos micólicos, propuesto por Cantaloube *et al.* a partir de estudios de interacción proteína-proteína de los distintos componentes del ciclo de FASII y las CSAMs. I-FASII: Complejo de Iniciación; E1-FASII: Complejo de Elongación 1; E2-FASII: Complejo de Elongación 2; T-FASII: Complejo de Terminación. (Adaptado de Cantaloube *et al.* 2011).

Nuestros estudios combinando genética y lipidómica demostraron que 6 de las 9 mutantes de *M. tuberculosis* tenían alteraciones en el perfil de ácidos micólicos, siendo deficientes en la síntesis de ácidos micólicos oxigenados, y presentaban mutaciones en el gen *mmaA4*. A esta CSAM se le ha asignado un rol importante en la resistencia a TAC, ya que mutaciones en este gen generan alta resistencia, por lo cual se le ha postulado como segundo activador de TAC. La pérdida independiente de *ethA* o *mmaA4* genera una alta resistencia a TAC lo cual soporta esta hipótesis, ya que si actúan en pasos sucesivos la pérdida de uno sólo de los activadores impediría que se forme el metabolito activo. Nuestros resultados mostraron que la sobre-expresión de *mmaA4*, en presencia de un inhibidor de EthR y, por lo tanto, provocando también la sobre-expresión de EthA, no aumentó la sensibilidad de TAC más allá de la sobre-expresión de cada gen individualmente. Además una cepa con merodiploide para ambos genes tampoco fue más sensible que las cepas merodiploides para cada gen individualmente. Estos resultados contradicen la hipótesis de MmaA4 como segundo activador ya que si esto fuese así la sobre-expresión de ambos debería generar mayor resistencia que la sobre-expresión de uno solo de los activadores. Esto sugiere que si bien se necesita que la enzima MmaA4 sea funcional para retener la sensibilidad a TAC, es poco probable que sea un activador secundario de esta droga. Además si MmaA4 fuera un activador secundario deberían poder aislarse mutantes con mutaciones en *mmaA4* que no activen la droga y retengan su función como metil-transferasa. Por el contrario, todas las mutantes en *mmaA4* pierden su capacidad de sintetizar ácidos micólicos oxigenados sugiriendo que o bien la síntesis de esta familia de micólicos es de algún modo indispensable para que TAC ejerza su efecto o es necesaria la presencia de esta enzima para estabilizar la unión de la droga con su blanco.

Por otro lado, las 15 mutantes resistentes a TAC de *M. kansasii* presentaron un perfil normal de ácidos micólicos. El análisis bioinformático del genoma de *M. kansasii* reveló la presencia de 7 genes con homología a CSAMs. Si pensamos que en esta especie TAC debe ser activada por una CSAM con la misma función que tiene MmaA4 en *M. tuberculosis*, resulta extraño que no se hayan aislado mutantes deficientes en este gen que provoquen la pérdida de los ácidos micólicos oxigenados. Este es otro argumento en contra de MmaA4 como segundo activador de TAC.

Si tenemos en cuenta la hipótesis de que MmaA4 actuaría estabilizando de alguna manera la unión de TAC a su blanco esencial, existe la posibilidad de que otra de las CSAMs esté cumpliendo el mismo rol que MmaA4 en *M. tuberculosis*. Debido a que

las mutantes presentaron un perfil normal de ácidos micólicos no teníamos ningún indicio de cual de las CSAM podría estar afectada en estas mutantes, si es que había alguna afectada, y por lo tanto no nos pareció útil secuenciar todas las CSAMs de estas mutantes.

A partir de los resultados obtenidos de sobre-expresión del operón que codifica para el complejo de la β -hidroxiacil ACP deshidratasa de FASII pensamos que este complejo enzimático podría ser el blanco esencial de TAC y sería lógico suponer que mutaciones en estos genes pudiesen conferir resistencia a esta droga. Por este motivo decidimos secuenciar el operón en las 3 mutantes de *M. tuberculosis* TAC^R-ETH^S que no tenían mutaciones en *mmaA4*. Fue interesante observar que 2 de las 3 mutantes poseían mutaciones en esta región, una en HadA y la otra en HadC. Sin embargo, es difícil conciliar el hecho de que tanto mutaciones en los polipéptidos HadA y HadC como mutaciones en la metiltransferasa MmaA4 son suficientes para generar alta resistencia a TAC en *M. tuberculosis* ya que las deshidratasas (por lo menos HadAB) actúan mucho antes que las CSAMs en la síntesis del ácido mero-micólico. Es interesante mencionar que las mutaciones aquí descritas se encuentran localizadas en las subunidades HadA y HadC de la β -hidroxiacil ACP deshidratasa; más interesante aún, no se aislaron mutantes en la subunidad HadB, la cual es compartida por ambos heterodímeros. La predicción de la estructura terciaria de HadA, HadB y HadC indica que las mismas poseen una estructura denominada “single hot dog fold” (SHD) (Sacco *et al.*, 2007), dominio característico de enzimas con actividad hidratasa y deshidratasa (Pidugu *et al.*, 2009); todas las enzimas caracterizadas hasta el momento con esta estructura forman homodímeros que poseen 2 sitios activos en su estructura cuaternaria (Hisano *et al.*, 2003; Koski *et al.*, 2004). Por el contrario, la β -hidroxiacil ACP deshidratasa de FASII sería la primer deshidratasa que forma heterodímeros. Este resultado puede ser comprendido si tenemos en cuenta el rol de cada subunidad; mientras que HadB es la subunidad que presenta el dominio catalítico, HadA y HadC serían las encargadas de estabilizar la larga cadena de acilo. La estructura cristalográfica y el modelado molecular de las deshidratasas Rv0130 y Rv0216 de *M. tuberculosis* han sido recientemente publicadas (Castell *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2006). Desafortunadamente, ninguna de estas proteínas se asocia con proteínas del tipo HadA o HadC; por lo tanto, aunque estamos aportando evidencias de la participación de la β -hidroxiacil ACP deshidratasa de FASII en la resistencia a TAC, la falta de información

estructural acerca de este tipo de heterodímeros formados por HadAB y HadBC impide un mayor análisis del impacto que tienen las mutaciones encontradas en la actividad o en las interacciones proteína-proteína. Como mencionamos anteriormente, existen interacciones proteína-proteína entre las enzimas de FASII y con las CSAMs; en particular podemos destacar el hecho de que MmaA4 interactúa con los heterodímeros HadAB y HadBC. Considerando nuestros resultados y los de Alahari *et al.* sería interesante postular que TAC, una vez activado por EthA, inhibe la síntesis de ácidos micólicos alterando las interacciones proteína-proteína entre componentes de FASII y las CSAMs en lugar de inhibir la función de una enzima específica; de este modo mutaciones en la metil transferasa MmaA4 y en las subunidades del complejo deshidratasa podrían proteger a estas proteínas de la acción de TAC, manteniendo la interacción entre ellas.

Por otro lado, 6 de las 8 mutantes de *M. kansasii* resistentes a TAC presentan mutaciones en *hadA* o *hadC*, teniendo todas estas un perfil de ácidos micólicos idéntico a la cepa parental. Aún más interesante resulta el hecho que 2 de las mutantes resistentes presenten una mutación silenciosa dentro del operón que codifica para la β -hidroxiacil ACP deshidratasa. Esta mutación no genera un cambio de aminoácidos en la subunidad HadA, y por lo tanto existe la posibilidad de que la resistencia esté ligada de alguna manera a un mecanismo de regulación transcripcional o que se esté alterando de algún modo la traducción de las subunidades. En este sentido deben realizarse estudios que permitan determinar el nivel de transcripción de los genes del operón *hadABC* en estas mutantes y determinar si estas mutaciones producen un incremento en la transcripción de los mismos.

Aunque deben realizarse más estudios a fin de determinar el impacto a nivel estructural de las mutaciones encontradas en las distintas subunidades del complejo deshidratasa así como de las mutaciones silenciosas halladas en *M. kansasii*, los resultados obtenidos a partir de la sobre-expresión del operón *hadABC* permiten afirmar que estas mutaciones son las responsables de la resistencia a TAC. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se han diseñado cepas merodiploides para *ethA* y *mmaA4* en *M. tuberculosis* a fin de aislar nuevas mutantes resistentes y determinar si existen otras mutaciones posibles en las subunidades del complejo deshidratasa que generen resistencia a TAC; estas mutaciones, junto al análisis estructural de estas enzimas permitirá determinar donde se ubican los cambios y, en consecuencia, cual sería el sitio de acción de TAC dentro de la proteína. Sin embargo,

considerando que alguna de las mutantes no tienen mutaciones en los genes secuenciados (*ethA*, *mmaA4*, *hadABC*), no puede descartarse la posibilidad de que haya otros mecanismos de resistencia involucrados.

Con respecto a este último punto debemos también mencionar los estudios realizados con respecto a la activación de TAC por parte de EthA, que se encuentra resumido en la Figura 21. En estos reportes se llegó a la conclusión que la acción de EthA sobre TAC produce un ácido sulfénico que luego puede ser convertido en dos metabolitos distintos, un ácido sulfínico y una carbodiimida (Nishida & Ortiz de Montellano, 2011). Se ha visto que la adición de glutatión (GSH) al inicio de la reacción inhibe la formación de estos metabolitos. Las micobacterias no producen glutatión sino que sintetizan micotiol (MSH, acetyl-L-cysteine-1-D-myo-inositol-2-deoxy-D-glucopyranoside), siendo éste el principal tiol hallado en micobacterias. El micotiol, al igual que GSH, tiene la función de proteger las células contra el estrés oxidativo y diversos compuestos electrofílicos y es mantenido en su estado reducido por una micotiol reductasa. El ácido sulfénico formado luego de la acción de EthA puede reaccionar con GSH, regenerando TAC en un ciclo fútil que puede dejar a la célula sin protección contra el estrés oxidativo. Por otra parte, ha sido demostrado que el metabolito carbodiimida puede reaccionar con GSH o MSH, formándose un complejo TAC-GSH (o TAC-MSH) mediante una unión covalente. Este metabolito tendría la capacidad de unirse covalentemente a cisteínas u otros residuos nucleofílicos presentes en proteínas esenciales y, mediante la formación de un aducto, ejercer un efecto letal sobre la micobacteria. Es interesante notar que 2 de las mutantes aisladas resistentes a TAC, una en *M. tuberculosis* y la otra en *M. kansasii*, posean una mutación que reemplaza una Cisteína por Serina en la posición 61 de HadA; lo cual nos lleva a pensar si este metabolito generado luego de la activación de TAC por parte de EthA no podría estar reaccionando con la Cisteína presente en HadA y, de esta manera, inhibiendo su función. Claramente, se deben realizar más estudios para comprobar o descartar esta posibilidad.

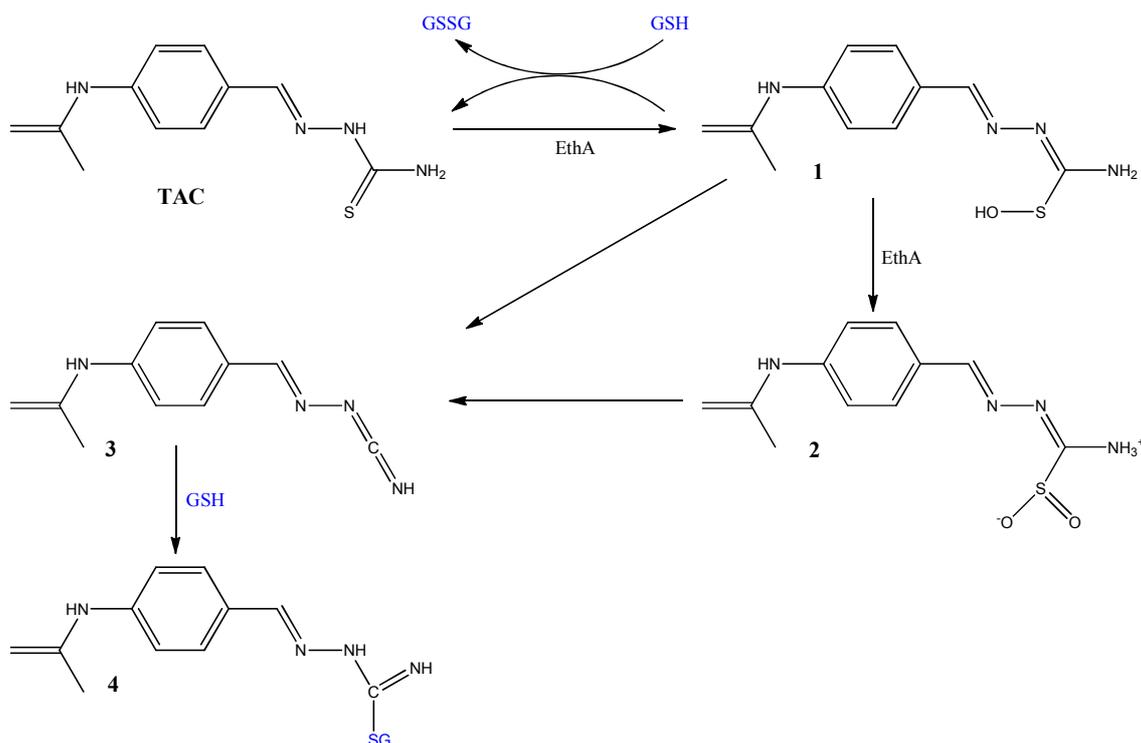


Figura 21: Metabolitos formados luego de la activación de TAC por la mono-oxigenasa EthA y reacciones que involucran al glutatión (GSH). 1: Acido sulfénico; 2: Acido sulfínico; 3: Carbodiimida; 4: Complejo Carbodiimida-Glutatión.

(Adaptado de Nishida y Ortiz de Montellano)

Además debemos tener en cuenta que estos resultados validan a la β -hidroxiacil ACP deshidratasa como un blanco atractivo para el diseño de nuevas drogas ya que son esenciales en micobacterias, porque no existe un sistema FASII en humanos y también por la estructura particular que adoptarían estas enzimas dentro de la familia de las deshidratasas.

CAPITULO II: ISOXIL

Como se mencionó en la Introducción, existen reportes que demuestran que ISO inhibe la síntesis de todas las familias de ácidos micólicos en *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y *M. aurum* A⁺. Además de la inhibición de ácidos micólicos, se observó una disminución en la síntesis de ácidos grasos, opuesto a lo que se observa luego del tratamiento con inhibidores de FASII como INH y ETH, donde la inhibición de ácidos micólicos va acompañada de una acumulación de ácidos grasos (Phetsuksiri *et al.*, 1999). El análisis de la composición de estos ácidos grasos luego del tratamiento con ISO permitió comprobar que se estaba inhibiendo la síntesis de ácido oleico, ácido graso insaturado mayoritario en estas especies. Además, el agregado de ácido oleico en el medio de cultivo permitió aliviar ligeramente la toxicidad de ISO. La sobre-expresión del gen *desA3* que codifica para la estearoil-CoA desaturasa generó una leve resistencia a esta droga por lo cual se concluyó que ésta era la enzima inhibida por ISO que impedía la síntesis del ácido oleico (Phetsuksiri *et al.*, 2003). Existen distintas evidencias que soportan la hipótesis que la inhibición de la síntesis de ácidos micólicos es independiente de la inhibición de la síntesis de ácido oleico. Por una parte, estudios realizados con ácido estercúlico, un inhibidor específico de estearoil desaturasas, provocó inhibición de la síntesis de ácido oleico sin afectar los ácidos micólicos (Phetsuksiri *et al.*, 2003). Por otro lado, estudios con análogos estructurales de ISO mostraron que algunos de estos perdieron la capacidad de inhibir la síntesis de ácido oleico pero seguían manteniendo su actividad contra los ácidos micólicos (Bhowruth *et al.*, 2006).

Como mencionamos al principio de la sección Resultados, de todas las especies ensayadas, solo *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y *M. kansasii* fueron sensibles a ISO con valores de CIM entre 0,5 µg/ml y 2,5 µg/ml. Debido a que, según los reportes mencionados anteriormente, el efecto de ISO sobre *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG es el mismo, decidimos continuar nuestro trabajo con *M. tuberculosis* H37Rv y con *M. kansasii*, especie sobre la cual no existía ningún reporte en cuanto al efecto de ISO.

Curvas de crecimiento

Se analizó el efecto de ISO sobre el crecimiento en medio líquido 7H9-ADS-GT en *M. tuberculosis* y *M. kansasii* (Figura 22). De esta manera pudo observarse un efecto dosis dependiente de ISO sobre el crecimiento en medio líquido de ambas especies

aunque se necesitaron concentraciones mayores para inhibir el crecimiento en *M. kansasii*, concordando con los valores de CIM en medio sólido.

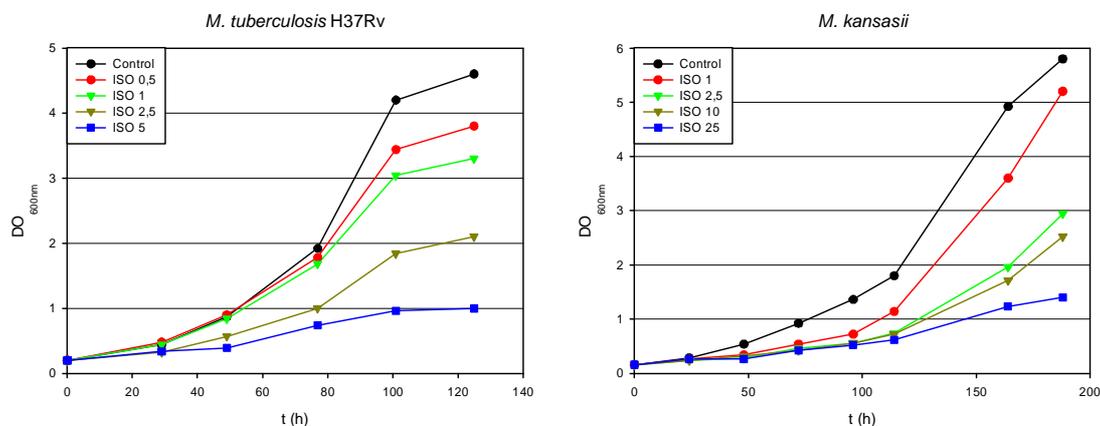


Figura 22: Curvas de crecimiento en medio 7H9-ADS-GT de cultivos de *M. tuberculosis* H37Rv (izquierda) y *M. kansasii* (derecha) tratados con ISO. Las concentraciones de ISO están expresadas en µg/ml. Los valores representan el promedio de tres repeticiones.

Efecto de ISO sobre la síntesis de ácidos micólicos y ácidos grasos

Si bien el efecto de ISO sobre *M. tuberculosis* ha sido estudiado, nunca se realizaron este tipo de ensayos en *M. kansasii*. Por lo tanto decidimos comparar el efecto de ISO sobre la síntesis de ácidos micólicos y ácidos grasos, en especial ácido oleico, en estas dos especies. Para ello se realizaron ensayos de incorporación de [$1-^{14}\text{C}$] ácido acético en ausencia o presencia de distintas concentraciones de ISO. Posteriormente se realizó la extracción de los FAMES y MAMES y se analizaron por TLC con AgNO_3 . En el caso de *M. tuberculosis* H37Rv se observó una inhibición tanto de la síntesis de todas las familias de ácidos micólicos (α , metoxi y ceto) como de los ácidos grasos insaturados, efecto similar al reportado en la literatura (Figura 23). Es necesario aclarar en este punto que los ácidos grasos insaturados en *M. tuberculosis* están compuestos en su gran mayoría por ácido oleico (Chou *et al.*, 1998; Hung & Walker, 1970; Lambert *et al.*, 1986). En cuanto a *M. kansasii*, no se observó inhibición de la síntesis de ácidos grasos insaturados aún a concentraciones de 25 µg/ml de ISO; por otro lado, si bien se observó una disminución en la síntesis de todas las familias de ácidos micólicos, siendo los ácidos ceto-micólicos más resistentes a la inhibición, esta inhibición no fue tan significativa como en el caso de *M. tuberculosis*. En ningún caso se observó la aparición de manchas nuevas en el cromatograma.

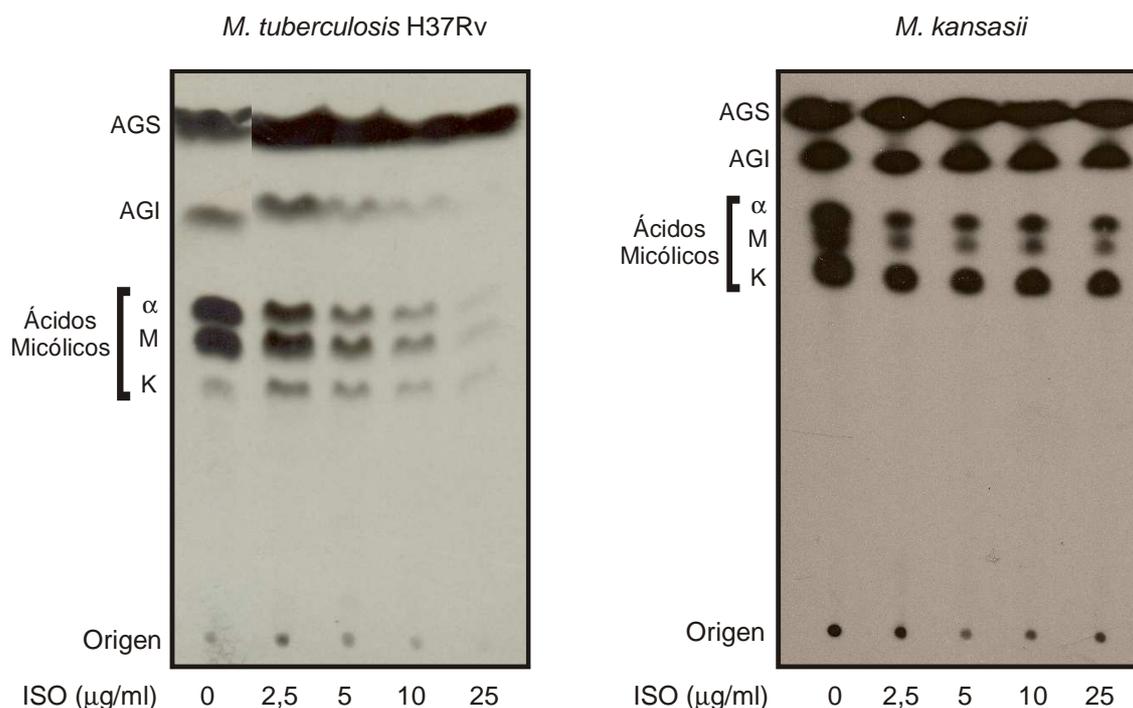


Figura 23: TLC impregnada con AgNO_3 de cultivos de *M. tuberculosis* (izquierda) y *M. kansasii* (derecha) marcados con ácido $[1-^{14}\text{C}]$ acético luego de tratar con ISO. Los metil-ésteres de ácidos micólicos y ácidos grasos fueron extraídos y se sembraron 40.000 cpm en la TLC. Las muestras fueron corridas 3 veces con éter de petróleo-éter etílico (85:15). AGS: Ácidos grasos saturados; AGI: Ácidos grasos insaturados; α : Ácidos α -micólicos; M: Ácidos metoxi-micólicos; K: Ácidos ceto-micólicos.

Como mencionamos anteriormente, el tratamiento de *M. kansasii* con ISO no produjo inhibición de la síntesis de ácido oleico, contrario a lo observado en *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG. La inhibición de la síntesis de ácido oleico por parte de ISO en estas dos especies estaría mediada por la inhibición de la estearoil-CoA desaturasa, codificada por el gen *desA3* en *M. tuberculosis* H37Rv y por el gen *BCG_3259c* en *M. bovis* BCG Pasteur; siendo las únicas estearoil-CoA desaturasas presentes en el genoma de estas dos especies. Esta enzima posee tres cajas de histidina que son características de las acil-lípido y acil-CoA desaturasas y cuya secuencia consenso es HX_{3-4}H , HX_{2-3}HH y $\text{H(Q)X}_{2-3}\text{HH}$. Experimentos de mutagénesis sitio dirigida de estas histidinas demostraron que todas son esenciales, estando probablemente involucradas en la coordinación del centro de di-hierro del sitio activo (Avelange-Macherel *et al.*, 1995; Los & Murata, 1998; Shanklin *et al.*, 1994). El análisis del genoma de *M. kansasii* en busca de genes homólogos a la estearoil-CoA desaturasa reveló que existen 3 genes con homología a *desA3*, con una similitud del 93%, 89% y

Fue interesante observar que dos de estos genes, *Mkan_DesA3.1* y *Mkan_DesA3.2*, se encuentran contiguos en el genoma lo cual permite especular que podrían haberse originado a partir de una duplicación génica. Si bien deben realizarse estudios para determinar no solo si estas 3 desaturasas se expresan en *M. kansasii* sino también la especificidad de las mismas, el hecho de que ISO no inhiba la síntesis de ácido oleico en esta especie sugiere que, o bien una de estas desaturasas no es inhibida por ISO y permite compensar la inhibición de las demás, o se necesita una mayor cantidad de droga para observar la inhibición de la síntesis ya que hay una mayor cantidad de desaturasas que unirían droga disminuyendo por lo tanto el efecto biológico.

Sobre-expresión de los genes *desA1*, *desA2* y *desA3*

Como se mencionó en la Introducción, existen en el genoma de *M. tuberculosis* otras 2 desaturasas, anotadas como acil-ACP desaturasas. Estas desaturasas se encuentran conservadas en todas las especies de micobacterias secuenciadas hasta el momento y están postuladas como esenciales en *M. tuberculosis* (Sassetti *et al.*, 2003). Si bien se les ha asignado un rol en la síntesis de ácidos micólicos, introduciendo los dobles enlaces distales y proximales del ácido meromicólico (Dyer *et al.*, 2005; Raman *et al.*, 2005; Raman *et al.*, 2007), no existen hasta el momento evidencias genéticas y/o bioquímicas que prueben este rol.

Partiendo de la hipótesis de que tanto DesA1 como DesA2 están involucradas en la síntesis de ácidos micólicos y teniendo en cuenta el hecho de que ISO inhibe la síntesis de ácido oleico y ácidos micólicos, esto nos llevó a pensar que quizás este compuesto esté inhibiendo todas las desaturasas de *M. tuberculosis* lo cual explicaría que actúe sobre ambas vías. Para comprobar si esta hipótesis era correcta decidimos clonar y sobre-expresar todas las desaturasas de *M. tuberculosis* y determinar si esta sobre-expresión generaba resistencia a ISO. Para ello se clonaron estos genes en el plásmido pMV261 y se determinó la CIM a ISO y como control se determinó la CIM para INH y ETH. La sobre-expresión de ninguna de las 3 desaturasas generó resistencia a ISO y solo la construcción que contiene *desA1* presentó una leve resistencia de apenas el doble que la cepa control con el plásmido vacío (Tabla XVI). Esto fue esperable ya que según lo reportado por Phetsuksiri (Phetsuksiri *et al.*, 2003), la sobre-expresión de *desA3* en *M. bovis* BCG incrementó la CIM a ISO solo al doble, lo cual puede deberse a diferencias en la técnica de determinación del valor de CIM. Si bien no puede negarse

que DesA3 es la estearoil-CoA desaturasa responsable de la síntesis de ácido oleico en micobacterias (Chang *et al.*, 2008; Chang & Fox, 2006; Phetsuksiri *et al.*, 2003), no está claro si éste es el blanco afectado por ISO que causa la inhibición de la síntesis de ácido oleico ya que no existe hasta el momento una evidencia directa que lo compruebe.

Tabla XVI: CIM para ISO, INH y ETH de *M. tuberculosis* pMV261 (control) y sobre-expresando las desaturasas DesA1, DesA2 y DesA3.

	CIM (µg/ml)		
	ISO	INH	ETH
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv pMV261	0,5	<0,1	1
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv pMV261:: <i>desA1</i>	1	<0,1	1
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv pMV261:: <i>desA2</i>	0,5	<0,1	1
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv pMV261:: <i>desA3</i>	0,5	<0,1	1

Aunque la sobre-expresión de los genes que codifican para las desaturasas DesA1 y DesA2 no generaron resistencia a ISO, teniendo en cuenta su rol hipotético en la síntesis de ácidos micólicos, quisimos ver si la sobre-expresión de estos genes alteraba el perfil de ácidos micólicos y/o ácidos grasos en *M. tuberculosis* H37Rv. Para ello realizamos ensayos de marcación con [1-¹⁴C] ácido acético de cultivos de *M. tuberculosis* H37Rv transformadas con los plásmidos pMV261, pMV261::*desA1* y pMV261::*desA2* y posteriormente los ácidos grasos y ácidos micólicos extraídos fueron resueltos en una TLC con AgNO₃. Como puede observarse en la TLC (Figura 25), no hubo ninguna diferencia significativa tanto en el perfil de ácidos grasos como de ácidos micólicos en las cepas que sobre-expresan las desaturasas DesA1 y DesA2 con respecto al control, por lo tanto, el rol de estas desaturasas en la síntesis de ácidos micólicos, si es que existe, no pudo ser determinado.

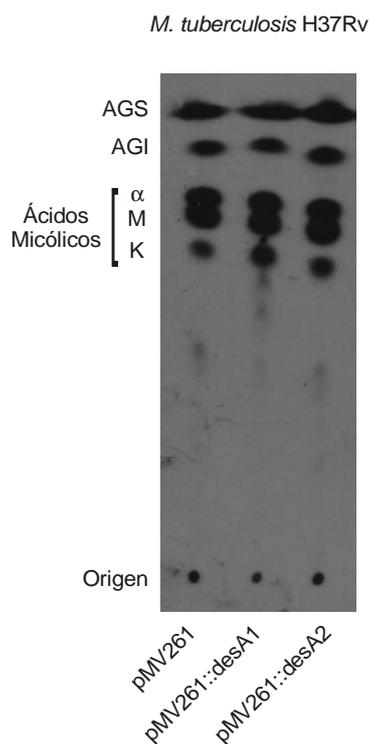


Figura 25: TLC con AgNO_3 de ácidos grasos y ácidos micólicos de *M. tuberculosis* pMV261, pMV261::*desA1* y pMV261::*desA2*. Se sembraron 40.000 cpm de cada muestra y se corrieron 3 veces con éter de petróleo-éter etílico (85:15). AGS: Ácidos grasos saturados, AGI: Ácidos grasos insaturados, α : Ácidos α -micólicos, M: Ácidos metoxi-micólicos, K: Ácidos cetomícólicos

El hecho de que la sobre-expresión de DesA1 y DesA2 no genera resistencia a ISO no permite descartar la posibilidad de que ambas desaturasas sean blanco de esta droga y que la sobre-expresión de una de ellas no sea suficiente ya que la otra sigue siendo inhibida. Para confirmar, o descartar, esta posibilidad decidimos insertar ambos genes en el cromosoma de *M. tuberculosis* bajo el promotor *hsp60* utilizando la técnica descrita en el capítulo I (Huff *et al.*, 2010) que permite integrar genes en distintos lugares del cromosoma de *M. tuberculosis*.

Utilizando esta técnica clonamos los genes que codifican para las desaturasas DesA1 y DesA2 bajo el promotor *hsp60*, las subclonamos en los plásmidos pML1342 y pML1357, respectivamente y las integramos en distintas partes del cromosoma de *M. tuberculosis*. Se determinó así la CIM a ISO de las cepas expresando cada gen individualmente y la cepa que expresa ambos genes (Tabla XVII). No hubo diferencia entre las distintas cepas en cuanto a la resistencia a ISO, por lo cual, descartamos

definitivamente a las desaturasas DesA1 y DesA2 como posible blanco de acción de ISO.

Tabla XVII: CIM para ISO de *M. tuberculosis* con los genes *desA1* y/o *desA2* integrados en el cromosoma bajo la expresión del promotor *hsp60*. La CIM fue determinada en medio sólido 7H9 sin (ADS) y con (OADS) el agregado de ácido oleico.

	CIM ISO ($\mu\text{g/ml}$)	
	ADS	OADS
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv pML1342	0,5	1
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv + <i>desA1</i>	0,5	1
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv + <i>desA2</i>	0,5	1
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv + <i>desA1</i> + <i>desA2</i>	0,5	1

Sobre-expresión de los genes de FASII

El hecho de que la sobre-expresión de las desaturasas DesA1 y DesA2 no generó resistencia a ISO sugiere que no son el blanco de esta droga y, a partir de esta observación, pensamos que quizás ISO estaba actuando sobre otro componente de FASII. Por este motivo, clonamos y sobre-expresamos en *M. tuberculosis* H37Rv las enzimas de elongación del ciclo FASII, es decir, KasA, InhA, MabA y HadABC y determinamos la CIM para ISO. Teniendo en cuenta que ISO inhibe la síntesis de ácido oleico y esto podría interferir en la determinación de la CIM, los ensayos fueron realizados en dos medios distintos, uno es el medio que se venía utilizando, es decir, 7H9-ADS-Gli y el otro es el mismo medio con el agregado de ácido oleico (el ácido oleico se agrega en la preparación de ADS), al cual denominamos 7H9-OADS-Gli. En la Tabla XVIII puede observarse que la sobre-expresión del operón *hadABC*, pero no la del resto de los componentes de FASII, generó resistencia a ISO, con una CIM de 2,5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ en ausencia y presencia de ácido oleico en el medio, respectivamente; esto es 5 veces la CIM de la cepa control con el plásmido vacío, lo cual nos llevó a pensar que el complejo de la β -hidroxiacil ACP deshidratasa podría ser blanco de ISO. El agregado de ácido oleico en el medio alivió la toxicidad a ISO incrementando levemente los valores de CIM en todos los casos.

Tabla XVIII: CIM para ISO de *M. tuberculosis* sobre-expresando los distintos componentes de FASII en ausencia y presencia de ácido oleico en el medio de cultivo.

	CIM ISO ($\mu\text{g/ml}$)	
	ADS	OADS
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv pMV261	0,5	1
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv pMV261:: <i>inhA</i>	0,5	1
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv pMV261:: <i>mabA</i>	0,25	1
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv pMV261:: <i>kasA</i>	0,25	0,5
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv pMV261:: <i>hadABC</i>	2,5	5

Los resultados obtenidos sugieren que el complejo β -hidroxiacil ACP deshidratasa de FASII estaría involucrado en la resistencia a ISO. Para determinar que subunidad en particular es la que estaría involucrada, clonamos cada gen por separado y además, teniendo en cuenta lo que se había observado para TAC en la sección anterior, se clonaron los genes que codifican para los heterodímeros HadAB y HadBC. Se determinó nuevamente la CIM para *M. tuberculosis* sobre-expresando cada una de estas construcciones. Como puede observarse en la Tabla XIX, la sobre-expresión de cada gen por separado no generó resistencia a ISO, esto no resultó extraño ya que, como mencionamos anteriormente, la expresión de cada subunidad por separado no permitiría formar un complejo funcional. Por otro lado, la sobre-expresión de HadAB y HadBC confirió una resistencia comparable a la del operón entero.

Tabla XIX: CIM para ISO de *M. tuberculosis* H37Rv pMV261 (control) y *M. tuberculosis* sobre-expresando los distintos componentes del complejo de la β -hidroxiacil ACP deshidratasa.

<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	CIM ISO ($\mu\text{g/ml}$)
pMV261	0,5
pMV261:: <i>hadABC</i>	2,5
pMV261:: <i>hadA</i>	0,5
pMV261:: <i>hadB</i>	0,5
pMV261:: <i>hadC</i>	0,5
pMV261:: <i>hadAB</i>	2,5
pMV261:: <i>hadBC</i>	2,5

Aislamiento de mutantes resistentes a ISO

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de sobre-expresión del complejo deshidratasa, decidimos aislar mutantes resistentes a ISO de *M. tuberculosis* y *M. kansasii* y caracterizarlas a fin de determinar los mecanismos de resistencia a esta droga. Para el aislamiento de las mutantes se inocularon 3 cultivos independientes con aproximadamente 10^4 células cada uno y se dejaron crecer hasta saturación. Una vez obtenidos los cultivos saturados se sembraron distintas diluciones en medio sólido 7H9-OADS-Glicerol con ISO; las concentraciones de ISO utilizadas fueron 5, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$. Se utilizó este medio complementado con ácido oleico a fin de evitar aislar cepas resistentes que tengan mutaciones en la vía de síntesis del mismo. Las colonias fueron repicadas en medio sólido con y sin ISO para confirmar la resistencia. También se sembraron diluciones en medio sin droga para realizar el recuento de UFC inicial. Así se pudo calcular la frecuencia de aparición de mutantes resistentes con valores promedio de $1,5 \times 10^{-7}$ y $6,9 \times 10^{-7}$ para *M. tuberculosis* y *M. kansasii*, respectivamente. De esta manera se seleccionaron 28 mutantes resistentes a TAC de *M. tuberculosis* y 20 de *M. kansasii* para continuar con la caracterización.

Como primer paso en la caracterización de las mutantes de *M. tuberculosis* resistentes a ISO, y a fin de descartar aquellas mutantes que pudiesen tener mutaciones en el gen que codifica para la mono-oxigenasa EthA, se determinó la CIM para TAC y ETH. De esta forma se seleccionaron aquellas cepas que, siendo resistentes a ISO, siguen siendo sensibles a TAC y ETH. De esta manera nos quedamos con 6 mutantes para posterior análisis en profundidad (Tabla XX)

Tabla XX: Perfil de resistencia de las mutantes de *M. tuberculosis* H37Rv seleccionadas.

	CIM ($\mu\text{g/ml}$)			
	ISO (ADS)	ISO (OADS)	TAC	ETH
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1	2,5	0,5	1
HRISO 5.8	5	25	0,5	1
HRISO 5.9	5	25	0,5	1
HRISO 5.13	5	25	0,5	1
HRISO 5.14	5	25	0,5	1
HRISO 5.16	5	25	0,5	1
HRISO 5.18	5	25	0,5	1

Por otra parte, también se determinó el perfil de resistencia de las 20 mutantes de *M. kansasii* (Tabla XXI). Fue interesante observar que 19 de las 20 mutantes presentaban resistencia cruzada para TAC y solo una era sensible a esta droga (KRISO

10.2); llamativamente, esta mutante presentaba una leve resistencia a ISO (2,5 µg/ml) mientras que las demás presentaban mayor resistencia (>10 µg/ml). Además ninguna de las mutantes presentó resistencia a ETH.

Al realizar los ensayos de CIM en medio suplementado con ácido oleico nos sorprendió ver que las mutantes de *M. kansasii* presentaban valores de CIM a ISO menores que en ausencia de dicho suplemento. Esto es opuesto a lo observado en *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG, donde el agregado de ácido oleico alivia la toxicidad de ISO. La razón de esta discrepancia no ha podido ser determinada pero el hecho de que ISO no inhiba la síntesis de ácido oleico en *M. kansasii*, como indicamos anteriormente, puede ser la razón de esta diferencia de comportamiento frente a la suplementación con ácido oleico.

A partir de estos resultados decidimos continuar la caracterización de 7 de las mutantes tratando de seleccionar (ver Tabla XXI) todos los perfiles de resistencia distintos posibles.

Tabla XXI: Perfil de resistencia a ISO, TAC y ETH de las mutantes de *M. kansasii* resistentes a ISO aisladas. Las mutantes que se seleccionaron para seguir caracterizándose se encuentran resaltadas.

	CIM (µg/ml)			
	ISO (ADS)	ISO (OADS)	TAC	ETH
<i>M. kansasii</i>	1	1	0,5	2,5
KRISO 25.1	>25	5-10	>5	2,5
KRISO 25.2	>25	5-10	>5	2,5
KRISO 25.3	>25	2,5	>5	2,5
KRISO 25.4	>25	5-10	>5	2,5
KRISO 10.1	>25	2,5	>5	2,5
KRISO 10.2	2,5	2,5	0,5	2,5
KRISO 10.3	10-25	2,5	>5	2,5
KRISO 10.4	10-25	2,5	>5	2,5
KRISO 10.5	>25	10	>5	2,5
KRISO 10.6	>25	5	>5	2,5
KRISO 10.7	>25	10-25	>5	2,5
KRISO 10.8	>25	5	>5	2,5
KRISO 10.9	>25	5	>5	2,5
KRISO 10.10	>25	>25	>5	2,5
KRISO 5.1	>25	5	>5	2,5
KRISO 5.2	>25	5	>5	2,5
KRISO 5.3	>25	5	>5	2,5
KRISO 5.4	>25	5	>5	2,5
KRISO 5.5	>25	5	>5	2,5
KRISO 5.6	>25	5	>5	2,5

Estudios con inhibidores de bombas de eflujo

Para determinar si la resistencia a ISO en las mutantes de *M. tuberculosis* y *M. kansasii* resistentes a ISO se debía a bombas de eflujo se decidió estudiar cómo la presencia de inhibidores de bombas de eflujo afectaba la CIM a ISO de las mutantes aisladas. Para ello se determinó la CIM a ISO en medio sólido 7H9 OADS en ausencia y en presencia de concentración sub-inhbitorias de Verapamilo (40 µg/ml) y CCCP (1 µg/ml).

En el caso de las mutantes de *M. tuberculosis* (Tabla XXII) la presencia de Verapamilo en el medio disminuyó la CIM de todas las mutantes mientras que la presencia de CCCP disminuyó la CIM de las mutantes HRISO 5.9, 5.13, 5.16 y 5.18. Esto indicaría que existen bombas de eflujo involucradas en la resistencia a ISO en estas mutantes.

Por lo tanto, si bien estos resultados sugieren una o más bombas de eflujo involucradas en la resistencia a ISO en *M. tuberculosis*, se hace imposible identificarla/s debido a la gran cantidad de genes que codifican para las mismas.

Tabla XXII: CIM de las mutantes de *M. tuberculosis* resistentes a ISO en ausencia o presencia de concentraciones sub-inhbitorias de CCCP o Verapamilo.

	CIM ISO (µg/ml) en 7H9 OADS		
	s/inhibidor	CCCP	Verapamilo
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1	0,5	0,5
HRISO 5.8	10-25	10-25	2,5
HRISO 5.9	10-25	5	2,5
HRISO 5.13	10-25	5	2,5
HRISO 5.14	10-25	10-25	2,5
HRISO 5.16	10-25	5	2,5
HRISO 5.18	10-25	5	2,5

Por otro lado, cuando se determinó la CIM a ISO de las mutantes seleccionadas de *M. kansasii*, que se encuentran resaltadas en la Tabla XXI, no se observó ninguna diferencia en la CIM para ISO en presencia de los inhibidores de bombas de eflujo lo cual sugiere que en estas mutantes la resistencia no estaría mediada por este mecanismo.

Secuenciación de los genes *ethA* y *hadABC* de las mutantes resistentes a ISO de *M. tuberculosis*

Si bien el estudio con inhibidores de bombas de eflujo estaría indicando que la resistencia de las mutantes de *M. tuberculosis* aisladas se debería a un mecanismo de expulsión de ISO fuera de la micobacteria decidimos secuenciar los genes *ethA* y el operón *hadABC* para descartar mutaciones en estos genes que sean responsables de la resistencia a ISO. Ninguna de las mutantes secuenciadas presentó mutaciones en estos genes lo que refuerza aún más la idea de un mecanismo de resistencia mediado por bombas de eflujo.

Secuenciación de los genes *ethA* y *hadABC* de las mutantes resistentes a ISO de *M. kansasii*

Continuando con la caracterización de las mutantes de *M. kansasii* resistentes a ISO, y siguiendo con el mismo razonamiento del capítulo anterior, decidimos secuenciar los genes *ethA* y *hadABC* de estas mutantes. El motivo por el cual decidimos secuenciar *ethA* fue que casi todas las mutantes, salvo una, presentaron resistencia cruzada a TAC, por lo tanto quisimos descartar la posibilidad de que haya mutaciones en el gen que codifica para EthA y que se traduzca en este fenotipo de resistencia cruzada. Para ello se amplificó no solo el gen *ethA* sino también la región promotora de *ethR* (Figura 26). Ninguna de las mutantes presentó mutaciones en el gen *ethA* ni en la región promotora de *ethR*, lo cual indica que la resistencia no se debe a una falta de activación.

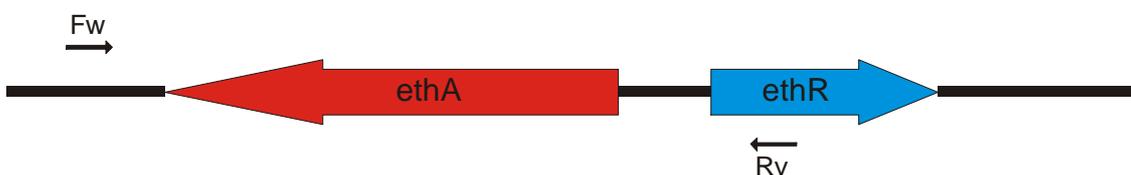


Figura 26: Organización genética de *ethA* y *ethR* en *M. kansasii*. Los oligos Fw y Rv se utilizaron para amplificar y secuenciar el gen *ethA* y el promotor de *ethR*.

Por otro lado, a partir del impacto de la sobre-expresión del operón *hadABC* en la CIM a ISO de *M. tuberculosis*, y ante el hecho de que en esta especie no pudimos aislar mutantes resistentes en el posible blanco de ISO, decidimos ver si en *M. kansasii* podría haber mutaciones en este operón que confirieran resistencia a ISO. Del mismo

modo que lo descrito en el capítulo anterior, se amplificó y secuenció el operón *hadABC* junto con 700pb por arriba del operón para descartar mutaciones en el promotor que pudieran alterar la transcripción del mismo. Se secuenciaron 7 de las mutantes resistentes a ISO, 4 de ellas (KRISO 25.1, 10.7, 10.10 y 5.1) no tenían mutaciones en esta región mientras que las 3 restantes (KRISO 10.2, 10.3 y 25.3) tenían mutaciones silenciosas en *hadA*, donde se cambia un codón gac por gat, ambos codificando para ácido aspártico (Tabla XXIII). Lo que nos llamó la atención fue que 2 de estas 3 mutantes (KRISO 10.2 y 25.3) presentaban la misma mutación silenciosa encontrada en 2 de las mutantes resistentes a TAC (KRTAC 10.6 y 25.3) descritas en el capítulo anterior, lo que significa que se aisló la misma mutación seleccionando resistencia a dos drogas distintas. Estas 4 mutantes presentan resistencia cruzada a TAC e ISO, y teniendo en cuenta el efecto de la sobre-expresión del operón *hadABC* en la CIM a TAC e ISO en *M. tuberculosis*, se refuerza aún más la idea de que esta mutación podría tener algún efecto en la transcripción de estos genes, que provoque un incremento de las enzimas del complejo deshidratasa y así la concomitante resistencia a ambas drogas.

Tabla XXIII: Perfil de resistencia a ISO, TAC y ETH y mutaciones en el operón *hadABC* de las mutantes de *M. kansasii* resistentes a ISO aisladas en este trabajo.

	CIM ($\mu\text{g/ml}$)			Cambios en <i>ethA</i>	Cambios en <i>hadABC</i>	
	ISO	TAC	ETH		Nucleótido	Aminoácido
<i>M. kansasii</i>	1	0,5	2,5			
KRISO 25.1	>25	>5	2,5	No	No	
KRISO 25.3	>25	>5	2,5	No	c303t de <i>hadA</i>	D101D de HadA
KRISO 10.2	2,5	0,5	2,5	No	c399t de <i>hadA</i>	D133D de HadA
KRISO 10.3	10-25	>5	2,5	No	c303t de <i>hadA</i>	D101D de HadA
KRISO 10.7	>25	>5	2,5	No	No	
KRISO 10.10	>25	>5	2,5	No	No	
KRISO 5.1	>25	>5	2,5	No	No	

DISCUSIÓN

La sobre-expresión del operón que codifica para la β -hidroxiacil ACP deshidratasa de FASII generó resistencia a ISO en *M. tuberculosis* y esto, sumado al hecho de que esta enzima está involucrada en la síntesis de ácidos micólicos, nos llevó a pensar que éste era el blanco esencial de ISO en la vía de síntesis de estos ácidos grasos esenciales. Para comprobar esto decidimos aislar mutantes espontáneas y secuenciar el operón *hadABC* a fin de encontrar mutaciones en estos genes que fueran responsables de la resistencia y confirmen la hipótesis. Lamentablemente, ninguna de las mutantes resistentes a ISO de *M. tuberculosis* aisladas presentó mutaciones en dicho operón.

La resistencia a drogas no es adquirida mediante transferencia horizontal de genes en *M. tuberculosis* ya que este patógeno no contiene plásmidos y no existe transferencia de ADN (Zainuddin & Dale, 1990). Por lo tanto, la resistencia a drogas antituberculosas en micobacterias se genera por mutaciones espontáneas en la molécula blanco, en el activador en el caso de pro-drogas o en regiones regulatorias. Sin embargo, cepas clínicas de *M. tuberculosis* resistentes a drogas (de un 5% a un 30% dependiendo la droga) no poseen mutaciones en estos genes sugiriendo, por lo tanto, la existencia de otros mecanismos de resistencia (Dalla Costa *et al.*, 2009; Musser, 1995; Telenti *et al.*, 1993). El eflujo de drogas es uno de los mecanismos de resistencia a antibióticos más diseminado entre los microorganismos, siendo encontrado en bacterias Gram positivas y Gram negativas incluyendo especies de importancia clínica (Kohler *et al.*, 1999). Las bombas de eflujo han sido clasificadas en 5 familias: ABC (ATP binding cassette), MFS (major facilitator superfamily), SMR (small multidrug resistance), RND (resistance-nodulation-cell division) y MATE (multidrug and toxic compounds extrusion) (Saier, Jr., 2000). El genoma de *M. tuberculosis* contiene genes que codifican para transportadores de todas estas familias (<http://www.membranetransport.org/>) y varias bombas de eflujo de micobacterias han sido caracterizadas experimentalmente (De *et al.*, 2006). Uno de los ensayos más utilizados para estudiar la existencia de un mecanismo de eflujo en la resistencia a drogas es observar cómo los inhibidores de bombas de eflujo afectan la resistencia a una determinada droga. Entre los inhibidores de bombas de eflujo más utilizados podemos mencionar el Verapamilo y CCCP, que actúan como bloqueador de canales de calcio y desacoplador del gradiente de protones, respectivamente (Adams *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2010; Milano *et al.*, 2009; Pasca *et al.*, 2004; Pasca *et al.*, 2005). De acuerdo a los ensayos con estos inhibidores de bombas de

eflujo, los cuales disminuyeron la CIM a ISO de las mutantes de *M. tuberculosis* resistentes, el mecanismo de resistencia a esta droga en las mutantes aisladas se debería a una o más bombas de eflujo que estarían bombeando la droga al exterior. Si bien esta es la primer evidencia de un mecanismo de eflujo involucrado en la resistencia ISO, existen más de 25 genes en *M. tuberculosis* que codifican para bombas de eflujo putativas en esta especie, lo cual hace difícil identificar cual sería la responsable de la resistencia a ISO.

Es interesante el hecho de que hasta el momento no hayan podido aislarse mutantes que permitan identificar el blanco esencial de ISO en *M. tuberculosis*. Esto podría deberse a que ISO inhibe por lo menos dos vías esenciales distintas en *M. tuberculosis*, por un lado inhibe la síntesis de ácido oleico y por otro la síntesis de ácidos micólicos. Como explicamos anteriormente, existe suficiente evidencia para afirmar que estos efectos son independientes uno de otro y, por lo tanto, se necesitarían mutaciones en más de un blanco que generen resistencia a la droga. Esto explicaría porqué las mutantes resistentes a ISO aisladas en esta especie, de acuerdo al estudio con los inhibidores Verapamilo y CCCP, presentaron un mecanismo de resistencia mediado por bombas de eflujo. Este mecanismo de resistencia sería el más frecuentemente aislado para una droga que inhibe múltiples blancos ya que una mutación que genere una mayor expulsión de la droga al exterior debería aislarse con mucha mayor frecuencia que varias mutaciones en los distintos blancos. Una posibilidad es que ISO esté actuando sobre ambos heterodímeros del complejo de la deshidratasa, es decir, HadAB y HadBC y, por lo tanto se necesiten mutaciones en ambos heterodímeros para generar resistencia. Por otro lado existe otra posibilidad que permitiría obtener resistencia a una pro-droga que afecta múltiples blancos y es que se impida la activación de la misma; en el caso de las mutantes de *M. tuberculosis* aisladas en este trabajo de tesis esa posibilidad fue descartada ya que se secuenció el gen que codifica para la mono-oxigenasa EthA y se observó que ninguna de las mutantes tenía alteraciones en la secuencia de ADN respecto a la cepa parental. Por lo tanto, a pesar de que la sobre-expresión de la β -hidroxiacil ACP deshidratasa genera resistencia a ISO y que esta droga inhibe la síntesis de ácidos micólicos, no se pudo determinar con certeza si esta enzima es el blanco o uno de los blancos de ISO.

Por otra parte, también se aislaron mutantes resistentes a ISO en *M. kansasii*. En esta especie ISO no inhibió la síntesis de ácido oleico y, por lo tanto, pensamos que esto quizás nos permitiría aislar mutantes en la molécula blanco. Fue sorprendente observar

que 19 de las 20 mutantes aisladas presentaban resistencia cruzada a TAC pero no a ETH. Esto podría deberse a: a) mutaciones en el activador EthA que afecten solo la activación de estas 2 drogas, b) que ambas drogas compartan el mismo blanco o c) que exista un mecanismo de resistencia aún no identificado que solo genere resistencia a TAC e ISO pero no a ETH. Para ver cual de estas hipótesis era la correcta decidimos escoger 7 de estas mutantes y secuenciar tanto el gen *ethA* como el operón *hadABC*. Ninguna de las 7 mutantes presentó mutaciones en *ethA*, lo cual indica que la resistencia no se debía a una falta de activación de ISO. Por otra parte, 2 de las 7 mutantes (KRISO 10.3 y 25.3) tenían mutaciones en el operón *hadABC*, presentando una mutación silenciosa en *hadA* que no modifica la secuencia de aminoácidos. Esta mutación fue la misma que se había encontrado en 2 de las mutantes de *M. kansasii* resistentes a TAC que se describieron en el capítulo anterior (KRTAC 10.6 y 25.3). Si recordamos estas 2 mutantes presentaron resistencia cruzada a ISO, es decir, se aisló la misma mutación seleccionando para dos drogas distintas y esta mutación confiere resistencia cruzada a ISO y TAC pero no a ETH. La causa de la resistencia de estas mutantes no pudo ser determinada pero teniendo en cuenta que la sobre-expresión de la β -hidroxiacil ACP deshidratasa genera resistencia a ISO y TAC, pero no a ETH, en *M. tuberculosis*; es posible que esta mutación permita sobre-expresar las subunidades del complejo deshidratasa y de esta manera generar resistencia a ambas drogas.

Estudios de la activación de ISO por parte de EthA permitieron concluir que luego de la acción de esta mono-oxigenasa se generan metabolitos similares a los que se producen luego de la activación de TAC (Figura 27) (Kordulakova *et al.*, 2007). En este reporte se identificaron, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, los distintos metabolitos que se forman luego de la activación de ISO. Es interesante notar la formación de un compuesto con un grupo funcional carbodiimida (compuesto 4 en la Figura 27), similar al que se había visto en la activación de TAC, y que los autores postulan como el metabolito activo de ISO. Queda por determinar si este compuesto se une a proteínas esenciales de la micobacteria o si forma algún tipo de aducto que luego actúe sobre su molécula blanco. El hecho de que luego de ser activados por EthA tanto TAC como ISO formen metabolitos similares apoya la teoría de que ambas drogas podrían actuar sobre el mismo blanco, es decir, la β -hidroxiacil ACP deshidratasa de FASII. Además, esto permitiría explicar que existan mecanismos de resistencia independientes de EthA que generen resistencia a ambas drogas pero no a ETH como puede observarse en un gran número de las mutantes aisladas en este trabajo

de tesis. Como mencionamos en el capítulo anterior el micotiol puede reaccionar con estos metabolitos impidiendo su acción sobre la molécula blanco lo cual permite pensar que este podría ser un mecanismo que genere resistencia a ambas drogas.

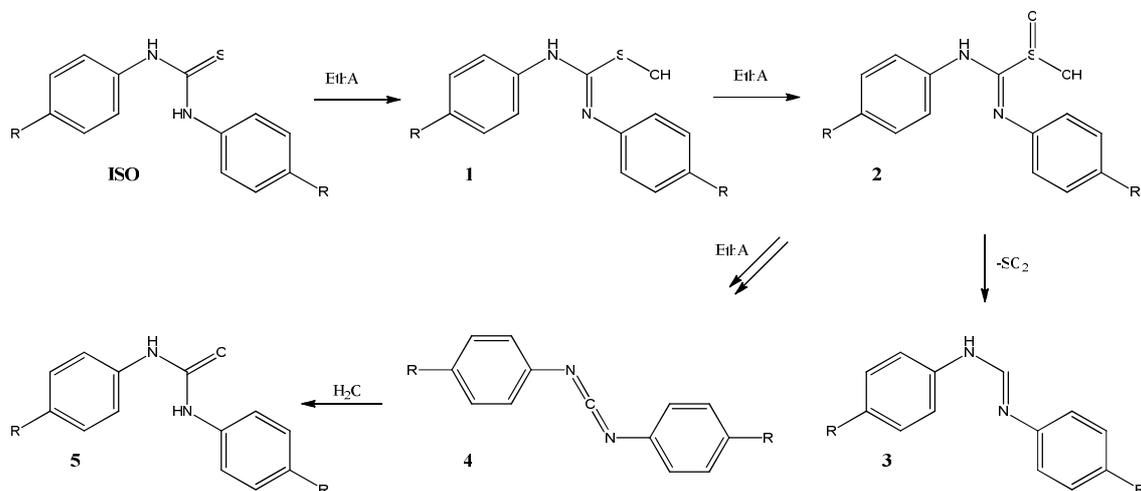


Figura 27: Metabolitos generados luego de la activación de ISO por parte de EthA. El compuesto 4 es la carbodiimida que se postuló como el metabolito activo de ISO.

(Adaptado de Kordulakova *et al.*)

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Se determinó el efecto de TAC sobre la síntesis de ácidos micólicos y ácidos grasos en *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG Pasteur y *M. kansasii* observándose un efecto inhibitorio sobre la síntesis de los primeros y un concomitante incremento de los últimos lo que indica que TAC actúa a nivel de FASII.
- La sobre-expresión del operón que codifica para la β -hidroxiacil ACP deshidratasa, pero no del resto de las enzimas de FASII, en *M. tuberculosis* confirió resistencia a TAC.
- Se aislaron mutantes resistentes a TAC de *M. tuberculosis* y *M. kansasii* que presentaron mutaciones en las subunidades HadA y HadC del complejo de la β -hidroxiacil ACP deshidratasa. Estas mutaciones serían las responsables de la resistencia a TAC.
- Teniendo en cuenta estos datos podemos concluir que TAC actúa inhibiendo el ciclo de elongación de FASII, y más específicamente, la β -hidroxiacil ACP deshidratasa validando esta enzima como blanco para el diseño de drogas.
- Se determinó el efecto de ISO sobre *M. tuberculosis* y *M. kansasii*. En *M. tuberculosis* ISO inhibe la síntesis de ácidos micólicos y ácido oleico mientras que en *M. kansasii* inhibe la síntesis de ácidos micólicos sin afectar la síntesis de ácido oleico.
- Se sobre-expresaron las desaturasas DesA1 y DesA2 por separado y las dos juntas en *M. tuberculosis*. Ninguna de estas cepas presentó resistencia a ISO lo cual indica que las desaturasas DesA1 y DesA2 no son blanco de ISO.
- Se sobre-expresaron los genes que codifican para las enzimas de elongación de FASII en *M. tuberculosis*. Solo la sobre-expresión del

operón que codifica para el complejo de la β -hidroxiacil ACP deshidratasa confirió resistencia a ISO.

- Se aislaron mutantes resistentes a ISO en *M. tuberculosis* y *M. kansasii*. El estudio con inhibidores de bombas de eflujo indicaría que el mecanismo de resistencia en las mutantes de *M. tuberculosis* aisladas se debería a la presencia de una o más bombas de eflujo que está expulsando la droga al exterior.
- La secuenciación del operón *hadABC* de las mutantes de *M. kansasii* resistentes a ISO reveló que dos mutantes presentan una mutación silenciosa en *hadA*, estas mutantes no solo son resistentes a ISO sino también a TAC. Esta misma mutación fue aislada en mutantes de *M. kansasii* resistentes a TAC lo cual refuerza la idea de que esta mutación es la responsable de la resistencia a ambas drogas. La razón por la cual esta mutación genera la resistencia no pudo ser determinada.
- Los resultados obtenidos a partir de este trabajo de tesis, junto con estudios estructurales de la β -hidroxiacil ACP deshidratasa, permitirán sintetizar derivados de TAC e ISO con el fin de aumentar su acción bactericida y disminuir sus efectos adversos.
- Se identificaron nuevos genes involucrados en la resistencia a TAC e ISO. Esto permitirá construir cepas merodiploides para estos genes en *M. tuberculosis* a fin de dilucidar si existen otros blancos y determinar nuevos mecanismos de resistencia a estas drogas.

RESUMEN

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno humano que causa más de un millón de muertes anuales, siendo el agente infeccioso bacteriano más letal. El surgimiento de cepas multi resistentes y extremadamente resistentes de *M. tuberculosis*, prácticamente intratables con los antibióticos que existen actualmente, ha generado la necesidad de contar con nuevas drogas para combatir esta enfermedad. Por tal motivo es necesario validar nuevos blancos de acción de drogas y estudiar los mecanismos de resistencia a las mismas.

Isoxil y Tiacetazona son dos drogas que fueron utilizadas para el tratamiento de la tuberculosis y luego dejadas de lado por producir efectos adversos. Si bien se ha estudiado su acción sobre la síntesis de ácidos micólicos, ácidos grasos de cadena larga que son componentes esenciales de la envoltura celular de las micobacterias, su blanco de acción en *M. tuberculosis* aún se desconoce.

Por lo tanto en este trabajo de tesis decidimos realizar estudios a fin de develar el/los blancos de estas drogas. Para ello se utilizó una estrategia combinada basada en lipidómica y genómica a partir del estudio del efecto de las drogas sobre la síntesis de ácidos grasos y ácidos micólicos y de la secuenciación genómica de mutantes resistentes a las drogas.

A partir de estudios llevados a cabo con Tiacetazona se comprobó que la enzima esencial β -hidroxiacil ACP deshidratasa de FASII juega un rol inesperado en la resistencia a esta droga. La sobre-expresión del operón que codifica para esta proteína generó resistencia a TAC y además mutantes espontáneas resistentes a TAC presentaron mutaciones en distintas subunidades de la proteína, lo que sugiere que esta enzima sería el blanco esencial de TAC.

En el caso de Isoxil la sobre-expresión de la β -hidroxiacil-ACP deshidratasa de FASII generó resistencia a esta droga pero no se han podido encontrar mutaciones en el operón en las mutantes resistentes de *M. tuberculosis*. Estudios con inhibidores de bombas de eflujo permiten concluir que la resistencia en las mutantes resistentes a ISO aisladas podría deberse a bombas de eflujo que estén expulsando la droga al exterior. Por otro lado, al analizar las mutantes resistentes de *M. kansasii*, encontramos una mutación silente dentro del operón que estaría generando resistencia a ISO, aunque no se pudo determinar de qué manera lo está haciendo.

Estos resultados validan a la β -hidroxiacil ACP deshidratasa de FASII como blanco para el diseño de drogas antituberculosas y abren la puerta para el desarrollo racional de drogas que inhiban esta enzima esencial de micobacterias.

Los resultados obtenidos a partir de este trabajo de tesis, junto con estudios estructurales de la β -hidroxiacil ACP deshidratasa, permitirá sintetizar derivados de TAC e ISO con el fin de aumentar su acción bactericida y disminuir sus efectos adversos.

Además la información obtenida se podrá utilizar para generar cepas merodiploides en los genes involucrados en la resistencia a fin de poder dilucidar si existen más blancos esenciales de ISO y TAC así como otros mecanismos de resistencia.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Adams, K. N., Takaki, K., Connolly, L. E., Wiedenhoft, H., Winglee, K., Humbert, O., Edelstein, P. H., Cosma, C. L. & Ramakrishnan, L. (2011). Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macrophage-induced efflux mechanism. *Cell* **145**, 39-53.

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

Alahari, A., Trivelli, X., Guerardel, Y., Dover, L. G., Besra, G. S., Sacchetti, J. C., Reynolds, R. C., Coxon, G. D. & Kremer, L. (2007). Thiacetazone, an antitubercular drug that inhibits cyclopropanation of cell wall mycolic acids in mycobacteria. *PLoS One* **2**, e1343.

Albanna, A. S. & Menzies, D. (2011). Drug-resistant tuberculosis: what are the treatment options? *Drugs* **71**, 815-825.

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

Avelange-Macherel, M. H., Macherel, D., Wada, H. & Murata, N. (1995). Site-directed mutagenesis of histidine residues in the delta 12 acyl-lipid desaturase of *Synechocystis*. *FEBS Lett* **361**, 111-114.

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

Barkan, D., Liu, Z., Sacchetti, J. C. & Glickman, M. S. (2009). Mycolic acid cyclopropanation is essential for viability, drug resistance, and cell wall integrity of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol* **16**, 499-509.

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

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

Bhatt, A., Molle, V., Besra, G. S., Jacobs, W. R., Jr. & Kremer, L. (2007). The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Mol Microbiol* **64**, 1442-1454.

Bhowruth, V., Brown, A. K., Reynolds, R. C., Coxon, G. D., Mackay, S. P., Minnikin, D. E. & Besra, G. S. (2006). Symmetrical and unsymmetrical analogues of isoxyl; active agents against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 4743-4747.

Boonaiam, S., Chaiprasert, A., Prammananan, T. & Leechawengwongs, M. (2010). Genotypic analysis of genes associated with isoniazid and ethionamide resistance in MDR-TB isolates from Thailand. *Clin Microbiol Infect* **16**, 396-399.

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

Cantaloube, S., Veyron-Churlet, R., Haddache, N., Daffe, M. & Zerbib, D. (2011). The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II Dehydratases and Methyltransferases Define the Specificity of the Mycolic Acid Elongation Complexes. *PLoS One* **6**, e29564.

Castell, A., Johansson, P., Unge, T., Jones, T. A. & Backbro, K. (2005).Rv0216, a conserved hypothetical protein from *Mycobacterium tuberculosis* that is essential for bacterial survival during infection, has a double hotdog fold. *Protein Sci* **14**, 1850-1862.

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

Chang, Y., Wesenberg, G. E., Bingman, C. A. & Fox, B. G. (2008).In vivo inactivation of the mycobacterial integral membrane stearyl coenzyme A desaturase DesA3 by a C-terminus-specific degradation process. *J Bacteriol* **190**, 6686-6696.

Choi, K. H., Kremer, L., Besra, G. S. & Rock, C. O. (2000).Identification and substrate specificity of beta -ketoacyl (acyl carrier protein) synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **275**, 28201-28207.

Chopra, I. & Brennan, P. (1997).Molecular action of anti-mycobacterial agents. *Tuber Lung Dis* **78**, 89-98.

Chou, S., Chedore, P. & Kasatiya, S. (1998).Use of gas chromatographic fatty acid and mycolic acid cleavage product determination to differentiate among *Mycobacterium genavense*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium simiae*, and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **36**, 577-579.

Cole, S. T. & Barrell, B. G. (1998).Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Novartis Found Symp* **217**, 160-172.

Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S. & other authors (1998).Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-544.

da Silva, P. E., Von, G. A., Martin, A. & Palomino, J. C. (2011). Efflux as a mechanism for drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **63**, 1-9.

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

Dalla Costa, E. R., Ribeiro, M. O., Silva, M. S., Arnold, L. S., Rostirolla, D. C., Cafrune, P. I., Espinoza, R. C., Palaci, M., Telles, M. A. & other authors (2009). Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. *BMC Microbiol* **9**, 39.

Dao, D. N., Sweeney, K., Hsu, T., Gurcha, S. S., Nascimento, I. P., Roshevsky, D., Besra, G. S., Chan, J., Porcelli, S. A. & other authors (2008). Mycolic acid modification by the *mmaA4* gene of *M. tuberculosis* modulates IL-12 production. *PLoS Pathog* **4**, e1000081.

De, R. E., Ainsa, J. A. & Riccardi, G. (2006). Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev* **30**, 36-52.

De, R. E., Arrigo, P., Bellinzoni, M., Silva, P. A., Martin, C., Ainsa, J. A., Gugliera, P. & Riccardi, G. (2002). The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Med* **8**, 714-724.

DeBarber, A. E., Mdluli, K., Bosman, M., Bekker, L. G. & Barry, C. E., III (2000). Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9677-9682.

Dinadayala, P., Laval, F., Raynaud, C., Lemassu, A., Laneelle, M. A., Laneelle, G. & Daffe, M. (2003). Tracking the putative biosynthetic precursors of oxygenated mycolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Structural analysis of fatty acids of a mutant strain devoid of methoxy- and ketomycolates. *J Biol Chem* **278**, 7310-7319.

Dover, L. G., Alahari, A., Gratraud, P., Gomes, J. M., Bhowruth, V., Reynolds, R. C., Besra, G. S. & Kremer, L. (2007). EthA, a common activator of thiocarbamide-containing drugs acting on different mycobacterial targets. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1055-1063.

Downing, K. J., McAdam, R. A. & Mizrahi, V. (1999). *Staphylococcus aureus* nuclease is a useful secretion reporter for mycobacteria. *Gene* **239**, 293-299.

Draper, P. (1998). The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers. *Front Biosci* **3**, D1253-D1261.

Dubnau, E., Laneelle, M. A., Soares, S., Benichou, A., Vaz, T., Prome, D., Prome, J. C., Daffe, M. & Quemard, A. (1997). *Mycobacterium bovis* BCG genes involved in the biosynthesis of cyclopropyl keto- and hydroxy-mycolic acids. *Mol Microbiol* **23**, 313-322.

Dukes, C. S., Sugarman, J., Cegielski, J. P., Lallinger, G. J. & Mwakyusa, D. H. (1992). Severe cutaneous hypersensitivity reactions during treatment of tuberculosis in patients with HIV infection in Tanzania. *Trop Geogr Med* **44**, 308-311.

Dyer, D. H., Lyle, K. S., Rayment, I. & Fox, B. G. (2005). X-ray structure of putative acyl-ACP desaturase DesA2 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Protein Sci* **14**, 1508-1517.

Ellard, G. A., Dickinson, J. M., Gammon, P. T. & Mitchison, D. A. (1974). Serum concentrations and antituberculosis activity of thiacetazone. *Tubercle* **55**, 41-54.

Falzon, D. & Raviglione, M. (2010). Giving a voice to those who die young: the fatal impact of tuberculosis and HIV in South Africa. *Future Microbiol* **5**, 1641-1643.

Fattorini, L., Migliori, G. B. & Cassone, A. (2007). Extensively drug-resistant (XDR) tuberculosis: an old and new threat. *Ann Ist Super Sanita* **43**, 317-319.

Favez, G., Gonin, J. D., Guberan, E., De Kalbermatten, J. P., Willa, C. & Vulliemoz, P. (1970).Results and randomized original treatment in cases of pulmonary tuberculosis with isoniazid-streptomycin versus isoniazid-thiocarlide. *Chest* **57**, 234-238.

Fox, B. G., Shanklin, J., Somerville, C. & Munck, E. (1993).Stearoyl-acyl carrier protein delta 9 desaturase from *Ricinus communis* is a diiron-oxo protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2486-2490.

Frieden, T. R., Sterling, T. R., Munsiff, S. S., Watt, C. J. & Dye, C. (2003).Tuberculosis. *Lancet* **362**, 887-899.

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

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

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

Glickman, M. S., Cox, J. S. & Jacobs, W. R., Jr. (2000).A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell* **5**, 717-727.

Glickman, M. S. & Jacobs, W. R., Jr. (2001).Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell* **104**, 477-485.

Grau, T., Selchow, P., Tigges, M., Burri, R., Gitzinger, M., Bottger, E. C., Fussenegger, M. & Sander, P. (2012).Phenylethyl Butyrate Enhances the Potency of Second-Line Drugs against Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 1142-1145.

Grzegorzewicz, A. E., Pham, H., Gundi, V. A., Scherman, M. S., North, E. J., Hess, T., Jones, V., Gruppo, V., Born, S. E. & other authors (2012).Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane. *Nat Chem Biol*.

Gupta, A. K., Chauhan, D. S., Srivastava, K., Das, R., Batra, S., Mittal, M., Goswami, P., Singhal, N., Sharma, V. D. & other authors (2006).Estimation of efflux mediated multi-drug resistance and its correlation with expression levels of two major efflux pumps in mycobacteria. *J Commun Dis* **38**, 246-254.

Gupta, A. K., Reddy, V. P., Lavania, M., Chauhan, D. S., Venkatesan, K., Sharma, V. D., Tyagi, A. K. & Katoch, V. M. (2010).*jefA* (Rv2459), a drug efflux gene in *Mycobacterium tuberculosis* confers resistance to isoniazid & ethambutol. *Indian J Med Res* **132**, 176-188.

Hao, P., Shi-Liang, Z., Ju, L., Ya-Xin, D., Biao, H., Xu, W., Min-Tao, H., Shou-Gang, K. & Ke, W. (2011).The role of ABC efflux pump, Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c, from *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in China. *Folia Microbiol (Praha)* **56**, 549-553.

Hisano, T., Tsuge, T., Fukui, T., Iwata, T., Miki, K. & Doi, Y. (2003).Crystal structure of the (R)-specific enoyl-CoA hydratase from *Aeromonas caviae* involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *J Biol Chem* **278**, 617-624.

Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J. M. & Engelhardt, H. (2008).Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3963-3967.

Hong, X. & Hopfinger, A. J. (2004).Construction, molecular modeling, and simulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell walls. *Biomacromolecules* **5**, 1052-1065.

Huff, J., Czyz, A., Landick, R. & Niederweis, M. (2010).Taking phage integration to the next level as a genetic tool for mycobacteria. *Gene* **468**, 8-19.

Hung, J. G. & Walker, R. W. (1970).Unsaturated fatty acids of Mycobacteria. *Lipids* **5**, 720-722.

Jackson, M., Portnoi, D., Catheline, D., Dumail, L., Rauzier, J., Legrand, P. & Gicquel, B. (1997).*Mycobacterium tuberculosis* Des protein: an immunodominant target for the humoral response of tuberculous patients. *Infect Immun* **65**, 2883-2889.

Johansson, P., Castell, A., Jones, T. A. & Backbro, K. (2006).Structure and function of Rv0130, a conserved hypothetical protein from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Sci* **15**, 2300-2309.

Kampelmann, F. (1970).Results of monotherapy with Isoxyl in untreated pulmonary tuberculosis cases of different difficulties and Isoxyl in routine-therapy. *Antibiot Chemother* **16**, 96-104.

Kapp, C. (2007).XDR tuberculosis spreads across South Africa. *Lancet* **369**, 729.

Kenney, T. J. & Churchward, G. (1994).Cloning and sequence analysis of the *rpsL* and *rpsG* genes of *Mycobacterium smegmatis* and characterization of mutations causing resistance to streptomycin. *J Bacteriol* **176**, 6153-6156.

Kohler, T., Pechere, J. C. & Plesiat, P. (1999).Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. *Cell Mol Life Sci* **56**, 771-778.

Kordulakova, J., Janin, Y. L., Liav, A., Barilone, N., Dos, V. T., Rauzier, J., Brennan, P. J., Gicquel, B. & Jackson, M. (2007).Isoxyl activation is required for

bacteriostatic activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3824-3829.

Koski, M. K., Haapalainen, A. M., Hiltunen, J. K. & Glumoff, T. (2004).A two-domain structure of one subunit explains unique features of eukaryotic hydratase 2. *J Biol Chem* **279**, 24666-24672.

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

La Rosa, V., Poce, G., Canseco, J. O., Buroni, S., Pasca, M. R., Biava, M., Raju, R. M., Porretta, G. C., Alfonso, S. & other authors (2012).MmpL3 is the cellular target of the antitubercular pyrrole derivative BM212. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 324-331.

Lambert, M. A., Moss, C. W., Silcox, V. A. & Good, R. C. (1986).Analysis of mycolic acid cleavage products and cellular fatty acids of *Mycobacterium* species by capillary gas chromatography. *J Clin Microbiol* **23**, 731-736.

Larsen, M. H., Vilcheze, C., Kremer, L., Besra, G. S., Parsons, L., Salfinger, M., Heifets, L., Hazbon, M. H., Alland, D. & other authors (2002).Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. *Mol Microbiol* **46**, 453-466.

Lea-Smith, D. J., Pyke, J. S., Tull, D., McConville, M. J., Coppel, R. L. & Crellin, P. K. (2007).The reductase that catalyzes mycolic motif synthesis is required for efficient attachment of mycolic acids to arabinogalactan. *J Biol Chem* **282**, 11000-11008.

Lee, R. E., Brennan, P. J. & Besra, G. S. (1996).*Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Curr Top Microbiol Immunol* **215**, 1-27.

- Lim, E. M., Rauzier, J., Timm, J., Torrea, G., Murray, A., Gicquel, B. & Portnoi, D. (1995).** Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA sequences encoding exported proteins by using *phoA* gene fusions. *J Bacteriol* **177**, 59-65.
- Los, D. A. & Murata, N. (1998).** Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim Biophys Acta* **1394**, 3-15.
- Lu, Y. J., Zhang, Y. M. & Rock, C. O. (2004).** Product diversity and regulation of type II fatty acid synthases. *Biochem Cell Biol* **82**, 145-155.
- Maartens, G. & Wilkinson, R. J. (2007).** Tuberculosis. *Lancet* **370**, 2030-2043.
- Madiraju, M. V., Qin, M. H. & Rajagopalan, M. (2000).** Development of simple and efficient protocol for isolation of plasmids from mycobacteria using zirconia beads. *Lett Appl Microbiol* **30**, 38-41.
- Maher, D., Uplekar, M., Blanc, L. & Raviglione, M. (2003).** Treatment of tuberculosis. *BMJ* **327**, 822-823.
- Marcinkeviciene, J. A., Magliozzo, R. S. & Blanchard, J. S. (1995).** Purification and characterization of the *Mycobacterium smegmatis* catalase-peroxidase involved in isoniazid activation. *J Biol Chem* **270**, 22290-22295.
- Marrakchi, H., Ducasse, S., Labesse, G., Montrozier, H., Margeat, E., Emorine, L., Charpentier, X., Daffe, M. & Quemard, A. (2002).** MabA (FabG1), a *Mycobacterium tuberculosis* protein involved in the long-chain fatty acid elongation system FAS-II. *Microbiology* **148**, 951-960.
- Marrakchi, H., Laneelle, G. & Quemard, A. (2000).** InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology* **146** (Pt 2), 289-296.

- McMurry, L. M., McDermott, P. F. & Levy, S. B. (1999).** Genetic evidence that InhA of *Mycobacterium smegmatis* is a target for triclosan. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 711-713.
- Milano, A., Pasca, M. R., Provvedi, R., Lucarelli, A. P., Manina, G., Ribeiro, A. L., Manganeli, R. & Riccardi, G. (2009).** Azole resistance in *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by the MmpS5-MmpL5 efflux system (*Edinb*) **89**, 84-90.
- Morlock, G. P., Plikaytis, B. B. & Crawford, J. T. (2000).** Characterization of spontaneous, In vitro-selected, rifampin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 3298-3301.
- Musser, J. M. (1995).** Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* **8**, 496-514.
- Nessar, R., Reyrat, J. M., Murray, A. & Gicquel, B. (2011).** Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. *J Antimicrob Chemother* **66**, 1719-1724.
- Nikaido, H. & Jarlier, V. (1991).** Permeability of the mycobacterial cell wall. *Res Microbiol* **142**, 437-443.
- Nikaido, H., Kim, S. H. & Rosenberg, E. Y. (1993).** Physical organization of lipids in the cell wall of *Mycobacterium chelonae*. *Mol Microbiol* **8**, 1025-1030.
- Nishida, C. R. & Ortiz de Montellano, P. R. (2011).** Bioactivation of antituberculosis thioamide and thiourea prodrugs by bacterial and mammalian flavin monooxygenases. *Chem Biol Interact* **192**, 21-25.
- Okuyama, H., Kankura, T. & Nojima, S. (1967).** Positional distribution of fatty acids in phospholipids from Mycobacteria. *J Biochem* **61**, 732-737.

Pablos-Mendez, A., Raviglione, M. C. & Battan, R. (1990). Drug-resistant tuberculosis in AIDS. *Chest* **97**, 511-512.

Parikh, S. L., Xiao, G. & Tonge, P. J. (2000). Inhibition of InhA, the enoyl reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, by triclosan and isoniazid. *Biochemistry* **39**, 7645-7650.

Pasca, M. R., Gugliera, P., Arcesi, F., Bellinzoni, M., De, R. E. & Riccardi, G. (2004). Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3175-3178.

Pasca, M. R., Gugliera, P., De, R. E., Zara, F. & Riccardi, G. (2005). *mmpL7* gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4775-4777.

Phetsuksiri, B., Baulard, A. R., Cooper, A. M., Minnikin, D. E., Douglas, J. D., Besra, G. S. & Brennan, P. J. (1999). Antimycobacterial activities of isoxyl and new derivatives through the inhibition of mycolic acid synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1042-1051.

Phetsuksiri, B., Jackson, M., Scherman, H., McNeil, M., Besra, G. S., Baulard, A. R., Slayden, R. A., DeBarber, A. E., Barry, C. E., III & other authors (2003). Unique mechanism of action of the thiourea drug isoxyl on *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **278**, 53123-53130.

Pidugu, L. S., Maity, K., Ramaswamy, K., Surolia, N. & Suguna, K. (2009). Analysis of proteins with the 'hot dog' fold: prediction of function and identification of catalytic residues of hypothetical proteins. *BMC Struct Biol* **9**, 37.

Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* **56**, 20-51.

Portevin, D., de Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., Grimaldi, C., Chami, M., Daffe, M. & Guilhot, C. (2004).A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 314-319.

Punzalan, J. M., Ranoa, C. P. & Nolasco, B. (1970).Observations in the use of D-4' diisoamyloxythiocarbanilide (ISOXYL) in pulmonary tuberculosis. *Newsette* **10**, 9-13.

Raman, K., Rajagopalan, P. & Chandra, N. (2005).Flux balance analysis of mycolic acid pathway: targets for anti-tubercular drugs. *PLoS Comput Biol* **1**, e46.

Raman, K., Rajagopalan, P. & Chandra, N. (2007).Hallmarks of mycolic acid biosynthesis: a comparative genomics study. *Proteins* **69**, 358-368.

Rao, V., Fujiwara, N., Porcelli, S. A. & Glickman, M. S. (2005).*Mycobacterium tuberculosis* controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *J Exp Med* **201**, 535-543.

Rao, V., Gao, F., Chen, B., Jacobs, W. R., Jr. & Glickman, M. S. (2006).Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses *Mycobacterium tuberculosis* -induced inflammation and virulence. *J Clin Invest* **116**, 1660-1667.

Raviglione, M. C., Harries, A. D., Msiska, R., Wilkinson, D. & Nunn, P. (1997).Tuberculosis and HIV: current status in Africa. *AIDS* **11 Suppl B**, S115-S123.

Raviglione, M. C. & Smith, I. M. (2007).XDR tuberculosis--implications for global public health. *N Engl J Med* **356**, 656-659.

Rengarajan, J., Sasseti, C. M., Naroditskaya, V., Sloutsky, A., Bloom, B. R. & Rubin, E. J. (2004).The folate pathway is a target for resistance to the drug para-aminosalicylic acid (PAS) in mycobacteria. *Mol Microbiol* **53**, 275-282.

Rodrigues, L., Machado, D., Couto, I., Amaral, L. & Viveiros, M. (2011).Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infect Genet Evol.*

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

Saier, M. H., Jr. (2000).A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 354-411.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sander, P., De, R. E., Boddington, B., Cantoni, R., Branzoni, M., Bottger, E. C., Takiff, H., Rodriguez, R., Lopez, G. & other authors (2000).Contribution of the multidrug efflux pump LfrA to innate mycobacterial drug resistance. *FEMS Microbiol Lett* **193**, 19-23.

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

Schroeder, B. G. & Barry, C. E., III (2001).The specificity of methyl transferases involved in trans mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *Bioorg Chem* **29**, 164-177.

Schweizer, E. & Hofmann, J. (2004).Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 501-517.

Scorpio, A. & Zhang, Y. (1996).Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* **2**, 662-667.

Shanklin, J. & Somerville, C. (1991).Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2510-2514.

Shanklin, J., Whittle, E. & Fox, B. G. (1994).Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* **33**, 12787-12794.

Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Yuan, H., Lee, J. S., Barry, C. E., III, Wang, H., Zhang, W. & Zhang, Y. (2011).Pyrazinamide inhibits trans-translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **333**, 1630-1632.

Singh, M., Jadaun, G. P., Ramdas, Srivastava, K., Chauhan, V., Mishra, R., Gupta, K., Nair, S., Chauhan, D. S. & other authors (2011).Effect of efflux pump inhibitors on drug susceptibility of ofloxacin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian J Med Res* **133**, 535-540.

Slayden, R. A., Lee, R. E., Armour, J. W., Cooper, A. M., Orme, I. M., Brennan, P. J. & Besra, G. S. (1996).Antimycobacterial action of thiolactomycin: an inhibitor of fatty acid and mycolic acid synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 2813-2819.

Smith, K. C., Armitige, L. & Wanger, A. (2003).A review of tuberculosis: reflections on the past, present and future of a global epidemic disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* **1**, 483-491.

Takayama, K., Wang, C. & Besra, G. S. (2005).Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* **18**, 81-101.

Tam, C. M., Yew, W. W. & Yuen, K. Y. (2009).Treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: current status and future prospects. *Expert Rev Clin Pharmacol* **2**, 405-421.

Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M. J., Matter, L., Schopfer, K. & Bodmer, T. (1993).Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341**, 647-650.

Veyron-Churlet, R., Bigot, S., Guerrini, O., Verdoux, S., Malaga, W., Daffe, M. & Zerbib, D. (2005).The biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis* relies on multiple specialized elongation complexes interconnected by specific protein-protein interactions. *J Mol Biol* **353**, 847-858.

Vilcheze, C., Morbidoni, H. R., Weisbrod, T. R., Iwamoto, H., Kuo, M., Sacchettini, J. C. & Jacobs, W. R., Jr. (2000).Inactivation of the *inhA*-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASII end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **182**, 4059-4067.

Vilcheze, C., Wang, F., Arai, M., Hazbon, M. H., Colangeli, R., Kremer, L., Weisbrod, T. R., Alland, D., Sacchettini, J. C. & other authors (2006).Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat Med* **12**, 1027-1029.

Walker, R. W., Barakat, H. & Hung, J. G. (1970).The positional distribution of fatty acids in the phospholipids and triglycerides of *Mycobacterium smegmatis* and *M. bovis* BCG. *Lipids* **5**, 684-691.

Weber, W., Schoenmakers, R., Keller, B., Gitzinger, M., Grau, T., Daoud-El, B. M., Sander, P. & Fussenegger, M. (2008).A synthetic mammalian gene circuit reveals antituberculosis compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9994-9998.

Wengenack, N. L., Todorovic, S., Yu, L. & Rusnak, F. (1998).Evidence for differential binding of isoniazid by *Mycobacterium tuberculosis* KatG and the isoniazid-resistant mutant KatG(S315T). *Biochemistry* **37**, 15825-15834.

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

Yew, W. W., Lange, C. & Leung, C. C. (2011).Treatment of tuberculosis: update 2010. *Eur Respir J* **37**, 441-462.

Yuan, Y., Crane, D. C., Musser, J. M., Sreevatsan, S. & Barry, C. E., III (1997).MMAS-1, the branch point between cis- and trans-cyclopropane-containing oxygenated mycolates in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **272**, 10041-10049.

Yuan, Y., Zhu, Y., Crane, D. D. & Barry, C. E., III (1998).The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **29**, 1449-1458.

Zainuddin, Z. F. & Dale, J. W. (1990).Does *Mycobacterium tuberculosis* have plasmids? *Tubercle* **71**, 43-49.

Zignol, M., Hosseini, M. S., Wright, A., Weezenbeek, C. L., Nunn, P., Watt, C. J., Williams, B. G. & Dye, C. (2006).Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis* **194**, 479-485.

Zimhony, O., Vilcheze, C. & Jacobs, W. R., Jr. (2004).Characterization of *Mycobacterium smegmatis* expressing the *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase I (*fasI*) gene. *J Bacteriol* **186**, 4051-4055.