

# **Sociedad Argentina de Microbiología General (SAMIGE)**

## **IV CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA GENERAL**

**27 y 28 de septiembre 2007  
Fundación Instituto Leloir  
Buenos Aires**

***"Dedicado a la presentación de trabajos de investigación básica sobre  
microorganismos (bacterias, arqueas, hongos y levaduras)"***

### **Comisión Organizadora SAMIGE 2007**

Carlos Argaraña, Néstor Cortez, Marcela Ferrero, Axel Hollmann, Viviana Lepek, Nancy López, Beatriz Méndez, Claudio Valverde, Diana Vullo, Osvaldo Yantorno, Daniela Russo y Angeles Zorreguieta.

### **Comisión SAMIGE**

Augusto García, Mario Aguilar, Héctor Álvarez, Néstor Cortez, Graciela De Antoni, Diego de Mendoza, Marcela Ferrero, Antonio Lagares, Nancy López, Beatriz Méndez, Graciela Salerno, Graciela Savoy, Liliana Semorile, Faustino Siñeriz, Claudio Valverde, Adrián Vojnov, Diana Vullo, Osvaldo Yantorno (Vicepresidente) y Angeles Zorreguieta (Presidente).

### **Comité de Honor**

Marcelo Dankert, Gabriel Favelukes y Horacio Pontis

síntesis de ácidos  $\alpha$  - y epoxi- micólicos; 3) la pérdida de los ácidos no oxigenados  $\alpha'$ . La sensibilidad a drogas aumentó muy ligeramente al perderse los ácidos epoxi-micólicos (fracción minoritaria del total) pero fue significativamente mayor al perderse la síntesis de los ácidos  $\alpha$  - micólicos.

Estos resultados sugieren que los ácidos micólicos tienen un rol fundamental sobre la arquitectura de la envoltura celular micobacteriana, incrementando la susceptibilidad a drogas aún cuando solo una de las familias es alterada. La identificación de los genes afectados en estas mutantes permitirá dilucidar nuevas etapas en la biosíntesis de las distintas familias de ácidos micólicos, mientras que sus productos aportarían nuevos blancos para el desarrollo de drogas antimicobacterianas.

#### **P75: DETERMINANTES ESTRUCTURALES DE LA SELECTIVIDAD DE METAL DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA DE *Rhodobacter capsulatus*.**

Di Capua, Cecilia; Tabares, Leandro; Cortez, Néstor. Instituto de Biol. Molec. de Rosario (IBR – CONICET). Fac. de Cs. Bioq. y Farm., UNR. Suipacha 531, S2002LRK Rosario. <dicapua@ibr.gov.ar> <cortez@ibr.gov.ar>

Las superóxido dismutasas (SODs) son metaloproteínas que catalizan la detoxificación del radical superóxido, un subproducto inevitable de la respiración aeróbica. Estas enzimas se clasifican en función del cofactor metálico, siendo las SODs de Fe o Mn la forma evolutivamente más antigua. Estas se encuentran en bacterias y en organelas de eucariotes y muestran alta homología de secuencia, plegamientos similares e idéntica geometría del sitio activo. Funcionalmente, pueden diferenciarse en tres clases: las FeSODs, sólo activas con Fe; las MnSODs, sólo activas con Mn; y las Fe/MnSODs cambialísticas, que presentan actividad tanto con Fe como con Mn.

La SOD de *R. capsulatus* (RcSOD) una preferentemente Mn y es más activa con este metal. Cuando la bacteria es crecida en condiciones aeróbicas, el porcentaje de MnSOD es del 90%, aunque en condiciones fotosintéticas disminuye a 60%. Con objeto de identificar determinantes estructurales de la selectividad de metal, se analizaron apilamientos de secuencias de enzimas de la familia Fe/MnSOD con diferente preferencia de metal, identificándose posiciones conservadas para cada tipo (Fe, Mn o cambialística) construyéndose las mutantes puntuales C63S, F73R, S77A, A160P, G163T así como la delección  $\Delta(61-67)$ . Tanto la enzima salvaje RcSOD como las mutantes fueron clonadas en el vector pES3228 para su expresión como proteínas recombinantes en *E.coli*. Se ensayaron protocolos de cultivo para optimizar la expresión soluble de la proteína recombinante, alcanzándose unos 6mg de proteína soluble por litro de cultivo. Las mutantes F73R

**IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007** y Del61-67 no mostraron expresión soluble detectable en ninguna de las condiciones ensayadas. Para investigar el efecto de las mutaciones en la captura de metal *in vivo*, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes en medio mínimo en presencia de FeSO<sub>4</sub> o de MnSO<sub>4</sub>. Se realizaron geles de actividad SOD a pH 6 y 8, considerando que la forma FeSOD presenta una variación de actividad vs pH mucho mayor que la forma MnSOD. Si bien las inducciones en presencia de MnSO<sub>4</sub> no generaron diferencias entre proteína salvaje y mutantes, los ensayos en presencia de Fe mostraron que sólo las mutantes A160P y G163T exhibieron diferencias respecto de la proteína salvaje sugiriendo que habrían unido una proporción menor de Fe. Estos resultados sugieren una influencia de residuos específicos en la selectividad de metal, la cual no estaría determinada exclusivamente por la disponibilidad de metal en el medio celular.

#### **P76: CARACTERIZACIÓN DE INHIBIDORES DE ACIL-COA CARBOXILASAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*: UN NUEVO BLANCO PARA EL DESARROLLO DE DROGAS**

Daniel Kurth, Gabriela Gago, y Hugo Gramajo. Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)-Area Microbiología CONICET, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, Suipacha 531, (S2002LRK) Rosario, Argentina. E-mail: kurth@ibr.gov.ar

La pared celular de *M. tuberculosis* posee numerosos lípidos de estructura compleja que no sólo son necesarios para la viabilidad y patogenicidad del microorganismo, sino que son capaces de modular la respuesta inmune del huésped. Entre éstos, unos de los más característicos son los ácidos micólicos. Algunas de las drogas antituberculosas más usadas afectan justamente estas vías biosintéticas. Sin embargo, se conoce muy poco acerca de las vías involucradas en la biosíntesis de los precursores de estos lípidos complejos. Nuestra hipótesis de trabajo es que los  $\alpha$ -carboxi acil-CoAs utilizados para la biosíntesis de los ácidos grasos de membrana y de la pared celular son producidos por los complejos acil-CoA carboxilasas (ACCasas) presentes en *M. tuberculosis*. Estas enzimas, cuya estructura es diferente a la de la acetil-CoA carboxilasa de humanos, son un blanco atractivo para el diseño de nuevos agentes anti-micobacterianos específicos. En nuestro laboratorio se han caracterizado dos complejos ACCasa a nivel bioquímico y estructural. La obtención de las estructuras cristalográficas de las subunidades carboxiltransferasas de estos complejos permitió la búsqueda *in silico* de inhibidores, resultando en la identificación varios compuestos capaces de inhibir la actividad enzimática *in vitro*. Uno de estos compuestos también fue capaz de inhibir, a concentraciones

micromolares, el crecimiento de diferentes especies de micobacterias, incluyendo cepas mutirresistentes de *M. tuberculosis*. Nuestros resultados sugieren que su acción antimicobacteriana se debe a la inhibición de una ACCasa específica. Por un lado se observó que en presencia del inhibidor disminuye la incorporación de 1-[<sup>14</sup>C-acetato], y también la biosíntesis de ácidos grasos y micólicos. Además la actividad acetil-CoA carboxilasa es menor en extractos de cultivos tratados con el inhibidor, mientras que la actividad ácido graso sintasa no se encuentra afectada. En conjunto, estos datos confirman que los complejos ACCasa podrían proveer una herramienta para el diseño de nuevos compuestos antimicobacterianos específicos.

#### **P77: IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA LIGASA INVOLUCRADA EN LA VÍA ENDÓGENA DE LIPOILACIÓN PROTEICA EN *BACILLUS SUBTILIS***

Natalia Martin, Diego de Mendoza y María Cecilia Mansilla

IBR-CONICET, Fac. de Cs. Bioq. y Farm., UNR, Suipacha 531, 2000 - Rosario, Argentina.

E-mail: [nmartin@ibr.gov.ar](mailto:nmartin@ibr.gov.ar)

El ácido lipoico (ácido 6,8-tioctico), es un cofactor esencial para el funcionamiento de enzimas clave del metabolismo oxidativo de la mayoría de los organismos, tanto eucariotas como procariotas. Entre las enzimas lipoiladas se encuentran los complejos piruvato deshidrogenasa, 2-oxoglutarato deshidrogenasa, deshidrogenasa de cetoácidos ramificados y el sistema de clivado de la glicina. El modelo actual de la biosíntesis y utilización de ácido lipoico es el de *Escherichia coli*, que involucra dos vías, una exógena en la cual el lipoato ingresa a la célula y es transferido a las apoproteínas en un proceso dependiente de ATP, catalizado por la Lipoato ligasa A (LplA) y una vía de síntesis endógena. Esta segunda vía requiere del producto del gen *lipB*, la proteína lipoil (octanoil)-[ACP]-proteína-*N*-lipoiltransferasa, la cual transfiere el ácido octanoico endógeno a las proteínas lipoilables. Estos dominios octanoilados son posteriormente modificados, mediante la inserción de dos átomos de azufre, por la enzima lipoil sintasa (LipA), generándose los derivados lipoilados.

El análisis bioinformático del genoma de *Bacillus subtilis* reveló la existencia de dos marcos abiertos de lectura que codifican productos con homología a LplA (*yhfJ* e *yqhM*), sin embargo no se encontró ninguno con similitud significativa a la proteína LipB. Recientemente demostramos que *B. subtilis* es capaz de sintetizar ácido lipoico y ligarlo a las apoenzimas, lo que sugiere la presencia de al menos una enzima responsable de la lipoilación endógena. Un candidato es el gen *ywfL*, localizado corriente abajo de un gen relacionado con la asimilación de azufre, este gen codifica un producto de función desconocida y presenta moderada similitud con YhfJ. Se llevó a cabo

**IV Congreso Argentino de Microbiología General SAMIGE 2007**  
la construcción de la mutante nula en *ywfL*, NM51. Esta cepa es incapaz de crecer en medio mínimo, pero su crecimiento se restaura al adicionar acetato más los precursores de los ácidos grasos ramificados o ácido lipoico. Por otra parte, NM51 presenta baja frecuencia de esporulación en medio SM. Este fenotipo se revierte parcialmente al suplementar el medio con ácido lipoico. Además, en esta cepa existe una fuerte inducción de la transcripción del gen de la desaturasa, confirmando que es incapaz de sintetizar los precursores de los ácidos grasos ramificados, y por lo tanto la fluidez de su membrana sólo puede aumentarse con la síntesis de ácidos grasos insaturados. Estos resultados sugieren que la presencia de YwfL funcional es indispensable para la incorporación de ácido lipoico endógeno a los complejos enzimáticos piruvato deshidrogenasa y deshidrogenasa de cetoácidos ramificados de *B. subtilis*, por lo que renombramos a YwfL como LipL.

#### **P78: EXPRESIÓN HETEROLOGA Y PURIFICACIÓN DE UN PÉPTIDO CON ESTRUCTURA TIPO-UBIQUITINA DE *NATRIALBA MAGADII***

Ordóñez, María Victoria; Nercessian, Debora; De Castro, Rosana; Conde, Ruben Danilo

Instituto de Investigaciones Biológicas, CONICET-UNMdP. Funes 3250 4to nivel, CC: 1245, CP:7600, Mar del Plata, Argentina.

[mvordone@mdp.edu.ar](mailto:mvordone@mdp.edu.ar)

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos altamente conservada en todos los organismos eucariotas, pero son escasas las evidencias de su presencia en procariotas. Se han descrito proteínas tipo ubiquitina (Ubls), que presentan principalmente una baja homología de secuencia primaria, pero una alta homología a nivel de estructura secundaria y funcional con ubiquitina. Las Ubls se encuentran tanto en eucariotas como en procariotas. En nuestro laboratorio se estudia la presencia de este tipo de proteínas en arqueas haloalcalófilas y haloneutrofilas. Mediante técnicas de PCR se ha aislado una secuencia de ADN del genoma del arquea haloalcalófila *Natrialba magadii* denominado p400. La secuencia de aminoácidos deducida de p400 presenta, al ser modelada, homología estructural con ubiquitina. Con el objetivo de corroborar los resultados obtenidos durante el modelado del fragmento p400 con herramientas bioinformáticas se decidió expresar dicho péptido en un sistema heterólogo. En el presente trabajo se describe la expresión de dicha secuencia en la cepa Rosetta de *Escherichia coli*. El fragmento p400 fue subclonado en el vector pet24b que presenta una cola de histidina en su región C-terminal. Luego de la inducción con IPTG, el péptido expresado en este sistema se encontró en cuerpos de inclusión. Con el objetivo de estudiar su posible homología con ubiquitina se realizó la purificación del péptido