

Tesis Doctoral

Estudio de la Síntesis de flavinas en *Brucella abortus* como potencial blanco terapéutico contra la brucelosis

Serer, María Inés

2015-11-18

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Serer, María Inés. (2015-11-18). Estudio de la Síntesis de flavinas en *Brucella abortus* como potencial blanco terapéutico contra la brucelosis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Serer, María Inés. "Estudio de la Síntesis de flavinas en *Brucella abortus* como potencial blanco terapéutico contra la brucelosis". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-11-18.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

"Estudio de la Síntesis de flavinas en *Brucella abortus* como potencial blanco terapéutico contra la brucelosis"

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

María Inés Serer

Director de tesis: Dr. Fernando Goldbaum

Consejera de estudios: Dra. Ángeles Zorreguieta

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir – IIBBA – CONICET

Buenos Aires, 2015

Estudio de la Síntesis de flavinas en *Brucella abortus* como potencial blanco terapéutico contra la brucelosis

Resumen

Los miembros del género *Brucella* son bacterias Gram-negativas intracelulares facultativas que se adaptan a la vida intracelular en una gran variedad de mamíferos. *Brucella* spp causan brucelosis, la zoonosis de mayor incidencia en el mundo que afecta al ganado y a humanos, y para la cual aún no se dispone de una vacuna segura y confiable. A pesar de que *Brucella* no presenta factores de virulencia clásicos, exhibe una gran flexibilidad metabólica la cual le permite adaptar su fisiología en respuesta a los distintos microambientes encontrados durante su ciclo de vida intracelular. Esta adaptación fisiológica se basa en un ágil ajuste de la expresión de distintos subconjuntos de genes, entre los que se encuentran aquellos involucrados en el metabolismo de flavinas. La riboflavina (vitamina B2) es el precursor de FMN y FAD, dos cofactores esenciales que están implicados en una amplia variedad de procesos celulares en todos los organismos. Esta vitamina es sintetizada en microorganismos y plantas, pero no en humanos y animales, los cuales deben adquirirla a través de su dieta. Los dos últimos pasos de la biosíntesis de riboflavina son catalizados por las enzimas Lumazina Sintasa (LS) y Riboflavina Sintasa (RS). Debido a la ausencia de esta vía metabólica en animales y el hecho de que las bacterias patógenas muestran una estricta dependencia de su biosíntesis de riboflavina, se ha propuesto a LS y RS como dianas potenciales para el desarrollo de fármacos antimicrobianos. En este trabajo se presentan datos que sugieren una regulación diferencial de los genes involucrados en la biosíntesis de riboflavina en *B. abortus*. Asimismo, se resolvió la estructura cristalográfica de RS de *B. abortus* unida al producto de reacción riboflavina y a dos análogos de producto. Para complementar estos resultados, se realizaron también estudios cinéticos y de unión sobre RS; y se llevó a cabo un ensayo de high throughput screening de microelectroforesis capilar de una biblioteca de 44.000 compuestos en colaboración con la empresa farmacéutica Novartis en Suiza. A partir de éste se identificaron diez compuestos con potencia micromolar del cual se identificó una serie de cinco compuestos con actividad *in vivo* contra *B. abortus* en cultivo bacteriano. En conclusión, la determinación de nuevas estructuras de RS unida a ligandos, su caracterización bioquímica y el hallazgo de nuevos inhibidores con actividad contra *B. abortus in vivo* representan un avance en la búsqueda de los antimicrobianos contra la brucelosis.

Palabras clave: Riboflavina sintasa, Síntesis de flavinas, Vitamina B2, Desarrollo de drogas, Brucelosis, *Brucella abortus*.

Study of flavin synthesis in *Brucella abortus* as a potential therapeutic target against brucellosis

Abstract

Brucella spp. are facultative intracellular Gram-negative bacteria, which are adapted to intracellular life within cells of a large variety of mammals. They cause brucellosis, a zoonotic infection with the highest incidence in the world affecting livestock and humans and for which a safe and completely reliable vaccine is still unavailable. Although *Brucella* has not classical virulence factors, it exhibits high metabolic flexibility, which allows it to adapt its physiology in response to different microenvironments found during its intracellular life cycle. This physiological adaptation is based on a flexible adjust of the expression of different subsets of genes, among which are those involved in the metabolism of flavins. Riboflavin (vitamin B2) is the precursor of FMN and FAD, two essential cofactors for all organisms that are involved in a wide variety of cellular processes. This vitamin is biosynthesized in microorganisms and plants but not in humans and animals, which must acquire it through their diet. The last two steps of riboflavin biosynthesis are catalyzed by Lumazine Synthase (LS) and Riboflavin Synthase (RS). Owing to the absence of this pathway in animals and the fact that most pathogenic bacteria show a strict dependence on riboflavin biosynthesis, it has been proposed that these enzymes may be promising targets for the development of new antimicrobial agents for the treatment of brucellosis. In this work, we show data that suggest a differential regulation of genes involved in the biosynthesis of riboflavin in *B. abortus*. Furthermore, we present the crystallographic structure of RS from *B. abortus*. In order to describe its substrate-binding sites, we solved the structure of the enzyme in the presence of bound ligands, namely one of the products of the reaction (riboflavin) and two product analogues. To complement these findings, we performed kinetic and binding studies on the enzyme. A newly High-throughput Screening capillary electrophoresis assay of 44.000 compounds library was developed in collaboration with Novartis in Switzerland, which identified 10 compounds with micromolar potency. From this subset we identified a series of 5 compounds with *in vivo* activity against *B. abortus*. In conclusion, these newly determined structures, biochemical characterization of RS and finding of novel inhibitors with activity against *B. abortus* represent a progress in the pursuit of antimicrobial compounds against brucellosis.

Keywords: Riboflavin Synthase (RS), Flavins synthesis, Vitamin B2, Drug development, Brucellosis, *Brucella abortus*.

Parte del contenido de la presente Tesis fue publicado en el siguiente artículo científico:

María I. Serer, Hernán R. Bonomi, Beatriz G. Guimarães, Rolando C. Rossi, Fernando A. Goldbaum and Sebastián Klinke. **Crystallographic and kinetic study of riboflavin synthase from *Brucella abortus*, a chemotherapeutic target with an enhanced intrinsic flexibility.** Acta Cryst.(2014)D70,1419–1434.

Agradecimientos

Al Dr. Fernando Goldbaum, Dr. Joerg Trappe, Dr. Fareed Mirza, Dr. Sebastián Klinke, Dr. Rolando Rossi, Dr. Hernán Bonomi y Dr. Viktor Hornak por su orientación y asesoramiento.

A mis compañeros de laboratorio

A mi familia y amigos

A CONICET, Instituto Leloir y Novartis por ofrecer su financiamiento e instalaciones.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	3
Generalidades.....	4
La enfermedad en diferentes hospedadores.....	5
Ciclo intracelular de <i>Brucella</i>	6
Condiciones del Brucelosoma y factores de virulencia	7
Biosíntesis de riboflavina	9
Regulación de la biosíntesis de flavinas: riboswitch FMN	10
Organización genómica de los genes <i>rib</i>	13
RibH1 y RibH2 de <i>Brucella</i> spp.....	13
Riboflavina Sintasa.....	14
Regulación de la síntesis de riboflavina en <i>B. abortus</i>	16
NrdR: un regulador global de las Ribonucleótido Reductasas.....	18
NusB: antiterminador de la transcripción	19
Biosíntesis de flavinas como potenciales blancos para el desarrollo de drogas anti-infectivas.....	21
Inhibidores de la biosíntesis de riboflavina	23
Descubrimiento y desarrollo de drogas antimicrobianas.....	24
Comportamiento de las bacterias intracelulares y la actividad de los antibióticos	28
Determinación de la estructura de proteína por cristalografía de rayos X	29
Preparación de la Proteína	30
Análisis de los Cristales	31
Resolución de la estructura	31
Construcción del modelo	32
Refinamiento	32
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	34
Hipótesis	35
Objetivo general	35
Objetivos específicos	35
RESULTADOS	36
CAPÍTULO 1	37
Organización genómica del operón <i>rib</i> de <i>B. abortus</i>	38
Regulación del gen <i>ribH1</i>	39
Cepas de <i>B. abortus</i> mutantes en <i>nrdR</i> y <i>nusB</i>	41
CAPÍTULO 2	43
Inhibidores enzimáticos.....	44
Características de la mini biblioteca de compuestos.....	44
Caracterización de la unión de RS de <i>B. abortus</i> a riboflavina	49
Screening de la mini biblioteca frente a RS y LS in vitro	51
Determinación de la actividad inhibitoria de NRP.....	55
Screening de la mini biblioteca frente a RS y LS <i>in vivo</i> : ensayo de sensibilidad a las drogas	56
CAPÍTULO 3	60
Calidad de los modelos cristalográficos.....	61
Descripción estructural de RS	62
Comparación a nivel monomérico con otras RS conocidas	64
El ensamblado de RS como trímero asimétrico	65
Sitios de unión al sustrato y el único sitio activo	68
Unión del producto de reacción riboflavina	69
Unión del análogo de producto Roseoflavina	71
Unión del análogo de producto NRP	72
Cinética y estudios de binding	73

CAPÍTULO 4.....	79
Biblioteca de compuestos.....	80
Screening de biblioteca contra RS	80
Análisis estructural de los compuestos	88
Ensayos de inhibición con los compuestos en cultivo bacteriano	90
Análisis funcional de los compuestos con actividad biológica contra <i>B. abortus</i>	93
Análisis de docking de los compuestos.....	96
Cristalización de complejos RS-inhibidores.	103
DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS	107
Regulación y organización cromosómica de los genes ribH	108
Inhibidores enzimáticos.....	110
Estudio estructural de RS.....	112
High throughput Screening.....	114
Ensayos en cultivo bacteriano	116
Análisis estructural de los compuestos BNG	118
Conclusiones y perspectivas generales.....	119
FIRMAS	122
MATERIALES Y MÉTODOS	123
Cepas bacterianas y medios de cultivo	124
Manipulación de ADN	124
Construcción de plásmidos.....	125
Intento de construcción de cepas mutante μ nusB y μ nrdR de <i>B. abortus</i> 2308	126
Conjugación biparental.....	127
Determinación de la organización genómica del operón rib.....	127
Amplificación por PCR	128
Análisis Western Blot.....	128
Método de difusión en placa de agar	129
Screening de mini biblioteca en placa de 96 pocillos	129
Screening de mini biblioteca de compuestos sobre el crecimiento de <i>B. abortus</i> en medio líquido ..	130
Caracterización de la unión RS y LS con NRP y NORP mediante técnicas fluorimétricas.	130
Cristalografía.....	131
Clonado de RS.....	131
Expresión y purificación de proteínas.....	131
Cristalización de la forma apo de RS.....	132
Cristalización de RS unida a ligandos.....	132
Colección y procesamiento de datos de difracción de rayos X	133
Resolución de la estructura, modelado manual y refinamiento	135
Validación y análisis de los modelos.....	136
Representación gráfica	136
Cálculo de pesos moleculares por dispersión estática de luz.....	136
Constante de disociación de Riboflavina y estequiometría de unión.....	136
Ensayo cinético	137
High Throughput Screening	137
Materiales y Reactivos.....	137
Reactivos enzimáticos y sustratos	138
Concentración de Reactivos	138
Procedimiento automatizado	138
Controles y standards	140
Análisis de datos	140
Cálculo de los parámetros de calidad del ensayo.....	141
Cálculo de los valores de porcentaje de inhibición	142
Lista de Hits.....	142
Cálculo de los valores de CI50 de NRP y de los 164 hits	142
Programa de evaluación HELIOS.....	142

Estudio en cultivo bacteriano de inhibidores obtenidos del High throughput screening	142
Estudios moleculares de Docking	143
Preparación del sistema	143
Protocolo de docking	143
Simulación de Dinámica Molecular	144
Análisis del modo de unión y Rescoring	145
Anexo: Buffers y reactivos del ensayo de High hroughput Screening	146
REFERENCIAS	148

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico copia
AIC	Criterio de Información de Akaike
BCV	Brucella-Containing Vacuole – Vacuola contenedora de Brucella
BSL-3	Bioseguridad nivel 3 (<i>Biosafety level 3</i>)
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria al 50%
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
DTT	Ditiotreitol
FAD	Flavina-adenina dinucleótido
FMN	Flavín Mononucleótido
GTP	Guanosín trifosfato
GW	Medio mínimo Gerhardt-Wilson
HTS	High Throughput Screening
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
Kb	Kilo bases
kDa	Kilo Dalton
LB	Medio Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
LS	6,7-dimetil-8-ribitillumazina sintetasa, o lumazina sintetasa
DM	Dinámica Molecular
o.n	over-night
ORF	Marco abierto de lectura (por Open Reading Frame)
pb	Pares de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline – Buffer Fosfato Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDB	Base de datos cristalográficos “Protein Data Bank” (www.pdb.org)
PEG	Polietilenglicol (con un número denota su PM promedio)
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA	área de superficie polar
r.m.s.d.	Desvío cuadrático medio (Root mean square deviation)
RE	Retículo Endoplásmico
R _{free}	Factor de acuerdo libre (Free reliability factor)

RNR	Ribonucleótido reductasa
RS	Riboflavina Sintasa
RS-NRP	Riboflavina Sintasa-NRP
RS-RBF	Riboflavina Sintasa-riboflavina
RS-ROS	Riboflavina Sintasa-roseoflavina
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate - Dodecil sulfato de sodio
SLS	Dispersión estática de luz (Static light scattering)
TFA	Ácido Trifluoroacético
TRIS	Tris (hidroximetilaminometano)
TSA	Medio Tryptic Soy Broth sólido
TSB	Medio Tryptic Soy Broth
u.a.	Unidades arbitrarias
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

Generalidades

Brucelosis es la enfermedad zoonótica bacteriana más común a nivel mundial, con alrededor de medio millón de personas infectadas anualmente (Pappas *et al.*, 2005). Se mantiene endémica en muchas partes del mundo, incluyendo el Medio Oriente, América Latina, Asia central y numerosas regiones de la cuenca del mediterráneo. Sin embargo, la brucelosis humana a menudo es diagnosticada erróneamente y subregistrada. *Brucella* spp. son bacterias Gram-negativas, aerobias facultativas, no móviles, no esporuladas, y no contienen plásmidos. *Brucella* spp. pertenecen al grupo α -2-proteobacteria que incluye bacterias que co-evolucionaron con hospedadores animales o vegetales, ya sea de una manera simbiótica beneficiosa como es el ejemplo de *Sinorhizobium Meliloti* (un simbiote de planta); o como patógenos tales como *Agrobacterium tumefaciens*, *Rickettsia* spp. y *Bartonella* spp.

Al momento diez especies del género *Brucella* han sido reconocidas con la nomenclatura basada en sus respectivos hospedadores preferenciales (Moreno *et al.*, 2002, Audic *et al.*, 2009). Las especies más patógenas para los seres humanos y más relevantes para los animales domésticos son *B. melitensis* que infecta cabras, ovejas y camellos; *B. abortus* que causa la brucelosis bovina y *B. suis* que es asociada a la brucelosis en el ganado porcino. Otras tres especies como *B. ovis* (ovejas y carneros), *B. canis* (perros), y *B. neotomae* (ratas del desierto) son de baja patogenicidad para los seres humanos. Desde 1990 algunas cepas de *Brucella* que infectan animales marinos han sido descritas en la literatura, ilustrando el amplio rango de hospedadores mamíferos de este patógeno bacteriano. Dos cepas distintivas fueron identificadas como *B. ceti* y *B. pinnipedialis* (Foster *et al.*, 2007). *Brucella ceti* se encuentra en delfines, marsopas, y ballenas, y *B. pinnipedialis* afecta principalmente a focas. Un número creciente de reportes asocian a cepas de mamíferos marinos con brucelosis humana, sugiriendo que estas especies de *Brucella* pueden ser patogénicas para los humanos (Sohn *et al.*, 2003, Whatmore *et al.*, 2008). Una nueva especie ha sido recientemente descrita como *B. microti* (ratones de campo y zorros) y otras cepas desconocidas han sido recientemente aisladas de pacientes con brucelosis como *B. inopinata* (aisladas de implantes de mama infectados) (Scholz, Hubalek, Sedlacek, *et al.*, 2008) y la segunda cepa es fenotípica y molecularmente similar a *B. inopinata* y fue aislada de un paciente con infección pulmonar crónica (Tiller *et al.*, 2010). Estas nuevas cepas descubiertas destacan la complejidad del creciente género *Brucella*.

Los seres humanos no son huéspedes naturales de *Brucella* ya que el contagio de humano a humano es muy raro, y la fuente de infección se encuentra fundamentalmente en reservorios de animales domésticos o salvajes. La exposición ocupacional y la ingesta de productos

alimentos contaminados son las principales rutas de infección para humanos. Sin embargo, la alta infectividad mediante aerosolización coloca a *Brucella* en la categoría B de la lista de agentes para el bioterrorismo y representa la infección bacteriana más común adquirida en laboratorios. La contención de la brucelosis humana depende de una vacunación exitosa del ganado y la imposición de medidas estrictas de higiene en los criaderos, vigilancia y medidas de control de la infección. En animales se utilizan con relativo éxito cepas atenuadas como *B. abortus* S19 ó RB51 para vacas y *B. melitensis* Rev 1 para ovejas y cabras (Corbel, 2006)

En nuestro país la brucelosis bovina es un problema sanitario importante. En un estudio realizado en el 2002 se estimó que entre el 10 a 13% de los rodeos se encuentran infectados con *B. abortus*, siendo la tasa individual en los bovinos del 4-5%. También se ha reportado brucelosis en cabras, ovejas, cerdos y perros y recientemente en armadillos (Kin *et al.*, 2014). En el caso de la brucelosis humana, la mayoría ocurre en zonas rurales que carecen de control sobre la enfermedad en los animales. Además se considera que la incidencia de esta enfermedad en regiones aisladas está subestimada, siendo su incidencia mayor a lo reportado (Samartino, 2002). Debido a que nuestro país es un gran productor ganadero, esta enfermedad conlleva a grandes pérdidas económicas cada año (60 millones de dólares al año) debido al número de vacas infectadas. Y en Latinoamérica se estima que sólo la brucelosis bovina causa pérdidas anuales por u\$s 600 millones. Por otro lado, se ha demostrado la posible transmisión desde reservorios hasta el momento no considerados, como lo eran las especies marinas (Sohn *et al.*, 2003, McDonald *et al.*, 2006). Además, hay preocupación por la colonización de nuevos hábitats por cepas virulentas como se observa en un reporte de *B. melitensis* aislada de peces del río Nilo (El-Tras *et al.*, 2010). La incidencia creciente de la brucelosis en la vida salvaje como una potencial fuente de infecciones humanas plantea un nuevo reto a la erradicación de esta enfermedad en todo el mundo.

La enfermedad en diferentes hospedadores

En hospedadores animales primarios, *Brucella* tiene un tropismo particular por el sistema reproductivo, frecuentemente generando abortos en hembras preñadas, seguido de una colonización bacteriana extensa de la placenta, y esterilidad en machos. La transmisión entre animales es facilitada por la presencia de un gran número de bacterias en el feto abortado, las descargas del tracto reproductivo y la leche. Los animales pueden presentar severas complicaciones pero pueden también convertirse en transportadores de la bacteria y continuamente dispersar bacterias durante muchos años (Moreno E, 2006). La naturaleza crónica de la brucelosis es un aspecto clave de la enfermedad que se observa tanto en el

hospedador natural, modelos animales experimentales y durante la infección en humanos. En humanos, la adquisición de la enfermedad ocurre por (i) la exposición ocupacional, (ii) el consumo de productos lácteos derivados de animales infectados sin pasteurización, (iii) a partir del contacto directo con animales infectados y (iv) por medio de aerosoles. El inicio de la brucelosis se manifiesta comúnmente con síntomas similares a una gripe, con fiebre recurrente incrementándose durante la noche, asociada a dolores musculares y de articulaciones. Si los pacientes no reciben tratamiento, *Brucella* puede colonizar múltiples sitios en el cuerpo. La complicación más común es la artritis, y entre las más severas se incluyen la formación de abscesos hepáticos, neurobrucelosis y endocarditis. El tratamiento aplicado en la actualidad para la brucelosis humana involucra una combinación de antibióticos que pueden penetrar en las células (como macrófagos) y actuar en el ambiente intracelular ácido. Estos incluyen doxiciclina, estreptomina, gentamicina, rifampicina, ofloxacina y ciprofloxacina. Los tratamientos pueden extenderse durante largos periodos de tiempo pero no siempre son efectivos. El tratamiento recomendado por la OMS establece el uso de doxiciclina en combinación con rifampicina o estreptomina, a pesar de que este tratamiento ha presentado una tasa de recaída del 5 al 15%.

Ciclo intracelular de *Brucella*

La entrada más común de *Brucella* en animales y en humanos son las membranas mucosas del tracto respiratorio y digestivo, y en el hospedador natural también el tejido conjuntivo y las membranas que cubren los órganos sexuales. *Brucella* es capaz de invadir y replicar en fagocitos profesionales (Baldwin & Winter, 1994), así como también en células no fagocíticas (Dettleux *et al.*, 1990) como fibroblastos, osteoblastos, sinoviocitos, entre otros (Roop *et al.*, 2009, Pizarro-Cerda, Meresse, *et al.*, 1998, Billard *et al.*, 2005). En humanos, cualquier órgano puede ser infectado. *Brucella* se replica extensivamente dentro de las células del hospedador hasta que se produce la ruptura y las bacterias se liberan a sangre produciéndose una bacteremia. Esta replicación intracelular está asociada a la patogenicidad de *Brucella*. La progresión de la enfermedad a un estadio crónico está relacionado con la habilidad de la bacteria de persistir por períodos prolongados dentro de las células del hospedador y resistir a la respuesta inmune (Martirosyan *et al.*, 2011).

Casi el 90% de las *Brucella* internalizadas por los macrófagos son eliminadas pronto luego de la fagocitosis, pero algunas bacterias logran escapar y establecer un nicho intracelular replicativo sin afectar la supervivencia de la célula. Para poder invadir y sobrevivir dentro de estas células

la bacteria hace uso de una estrategia única en la que modifica el proceso de maduración de los fagosomas e inhibe la fusión de lisosomas a la vacuola que la contiene, estableciendo un nicho celular en donde se multiplica (Sangari & Aguero, 1996, Pizarro-Cerda, Moreno, *et al.*, 1998, Arenas *et al.*, 2000). Las bacterias ingresan a la célula en un macropinosoma (vesícula), proceso que depende de la presencia de rafts lipídicos (balsas lipídicas) (Naroeni & Porte, 2002, Watarai *et al.*, 2002) y del lipopolisacárido (LPS) de *Brucella* (Lapaque *et al.*, 2005). Una vez dentro de la célula, *Brucella* inhibe la fusión de la vacuola que la contiene con los lisosomas (Pizarro-Cerda, Meresse, *et al.*, 1998, Arenas *et al.*, 2000, Naroeni & Porte, 2002, Celli *et al.*, 2003). Las vacuolas que contienen a *Brucella* (BCV, por sus siglas en inglés *Brucella* containing vacuole) interactúan transitoriamente con endosomas tempranos (Pizarro-Cerda, Meresse, *et al.*, 1998, Celli *et al.*, 2003). Posteriormente, la activación de la bomba de protones ATPasa vacuolar disminuye el pH de la BCV, siendo esta acidificación una señal esencial para la activación de varios genes de virulencia de *Brucella* spp. (Porte *et al.*, 1999). El escape a la fusión lisosomal por parte de *Brucella* es dependiente del sistema de secreción de proteínas tipo IV VirB y de la síntesis de los glucanos cíclicos, entre otros factores (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). Seguido a la interacción transitoria con la vía endocítica, los BCVs en los macrófagos experimentan una extensiva interacción con la ruta secretoria antes de finalmente fusionarse con el retículo endoplásmico (RE), en un proceso que también es dependiente de VirB. En células epiteliales, en cambio, las BCVs entran en contacto con vacuolas autofágicas probablemente presentes en forma previa en la célula tal vez inducidas por la infección como parte de una respuesta inmune innata (Gorvel & de Chastellier, 2005). Sin embargo las bacterias virulentas escapan a estos compartimentos autofagosomales y alcanzan el RE. Recién en esta BCV madura, llamada brucelosoma o BCV replicativa, la bacteria puede replicar (Pizarro-Cerda, Meresse, *et al.*, 1998, Comerci *et al.*, 2001, Celli *et al.*, 2003, Celli & Gorvel, 2004, Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). Mediante este mecanismo, *Brucella* evade los mecanismos naturales que tiene la célula para lidiar con los patógenos y logra establecerse en su nicho replicativo. En la figura I-1 se muestra el modelo de tráfico intracelular de *Brucella*.

Condiciones del Brucelosoma y factores de virulencia

La BCV consiste en un nicho replicativo con propiedades inhóspitas. Durante el tránsito intracelular y dentro de la BCV, las células de *Brucella* están sometidas a diversos factores de

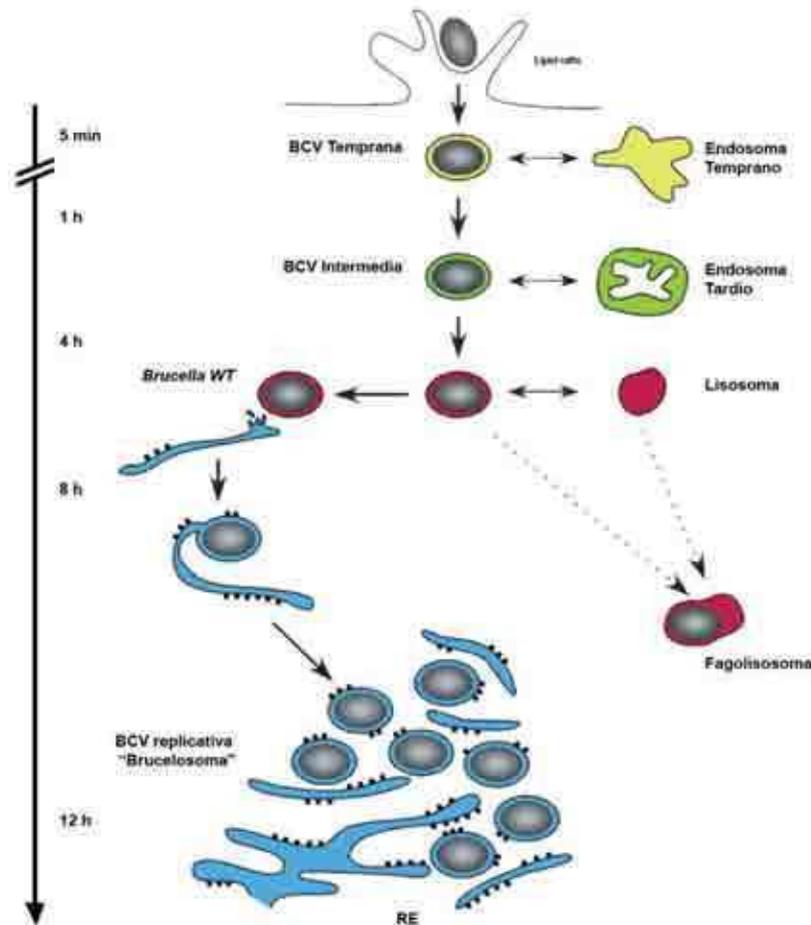


Figura I-1. Esquema del proceso de infección intracelular de *Brucella*. Las bacterias entran a la células mediante interacción con lipid rafts presentes en la membrana celular. Por invaginación de la membrana celular, se forma una vacuola conteniendo a *Brucella* (BCVs por sus siglas en inglés) que circula por la vía endocítica. Las BCVs interactúan secuencialmente con los compartimentos tempranos (amarillo) que maduran en endosomas tardíos (verde) y lisosomas (rojo). Si el proceso de maduración de los fagosomas no puede ser modificado y éstos derivan en fagolisosomas, las bacterias son eliminadas. Las BCVs se fusionan al Retículo Endoplásmico (azul) y generan BCVs replicativas derivadas de RE (brucelosoma). Figura adaptada de Starr y col. (Starr *et al.*, 2008).

estrés como baja tensión de oxígeno, bajo pH, especies reactivas de oxígeno, especies nitrogenadas y privación de nutrientes. Para ello, *Brucella* ha desarrollado diversos mecanismos que le permiten detectar las condiciones de estrés que encuentra dentro de las células que infecta y adaptarse a ellas por medio de una adecuada modificación de la expresión de genes y proteínas (Roop *et al.*, 2009, Atluri *et al.*, 2011, Barbier *et al.*, 2011, von Bargen *et al.*, 2012). Por ende, su éxito como patógeno reside en su capacidad de sobrevivir a estas condiciones extremas y persistir por largos períodos dentro de la BCV (Figura I-1).

A diferencia de otros patógenos, en *Brucella* no se han descrito factores de virulencia clásicos, como exotoxinas, cápsula, fimbrias, plásmidos, ni fagos lisogénicos (Moreno & Moriyon, 2002). Sin embargo *Brucella* ha evolucionado morfológica y metabólicamente para

sortear las defensas del hospedador y adaptarse a la vida intracelular. El principal factor de virulencia en *Brucella* consiste en el sistema de secreción tipo IV VirB, el cual es esencial para el tráfico intracelular de *Brucella* (Sieira *et al.*, 2000, Comerci *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2003, Celli *et al.*, 2003, Billard *et al.*, 2005). Además, *Brucella* expresa un LPS de composición particular el cual ha evolucionado para ser un débil inductor de la respuesta inflamatoria, de la activación del complemento y tiene baja actividad endotóxica (Moreno *et al.*, 1981, Barquero-Calvo *et al.*, 2007). Asimismo, los glucanos cíclicos β -1,2 (C β G) son necesarios para el establecimiento de la infección puesto que evitan la fusión con los lisosomas y la correcta maduración de los mismos (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). Además, el sistema de dos componentes de *Brucella* BvrR/BvrS dirige la expresión de varios genes involucrados en la internalización, supervivencia y eventos tempranos dentro de la célula (Scholz *et al.*, 2008), y también regula la expresión del opéron VirB (Martinez-Nunez *et al.*, 2010). Otros factores de virulencia conocidos son dos enzimas superóxido dismutasa SodC y SodA, periplasmática y citoplasmática respectivamente. La primera protege a *Brucella* del O₂⁻ exógeno proveniente del ataque del macrófago (Gee *et al.*, 2005), y la segunda del O₂⁻ de origen endógeno, generado por la respiración aeróbica (Sriranganathan *et al.*, 1991). Por otra parte, en las BCVs replicativas, los complejos Citocromo c oxidasa tipo-cbb3 y Citocromo bd ubiquinol oxidasa son necesarios para mantener la respiración de las bacterias a bajas concentraciones de O₂. La enzima óxido nítrico reductasa NorD de *Brucella* es un elemento clave en la combatir el efecto microbicida del óxido nítrico producido por el macrófago. Además, debido a que la bacteria puede reducir nitrato, nitrito y óxido nitroso, *Brucella* podría usar NO₃⁻ en lugar de O₂ como aceptor final de electrones en la respiración (Loisel-Meyer *et al.*, 2006). Integrantes del laboratorio del Dr. Fernando Goldbaum probaron que dos sistemas de dos componentes PrrAB y NtrYX son esenciales para lograr una respuesta adaptativa a las condiciones de baja tensión de oxígeno en el brucelosoma (Carrica Mdel *et al.*, 2013, Carrica Mdel *et al.*, 2012). Por último, si bien *Brucella* es una bacteria no móvil, en *B. melitensis* 16M se ha demostrado que bajo ciertas condiciones de cultivo se forma una estructura similar a un flagelo, el cual es importante para la virulencia, pero del cual aún se desconoce su función (Fretin *et al.*, 2005).

Biosíntesis de riboflavina

La riboflavina (vitamina B2) es un compuesto esencial y ubicuo en la naturaleza. Bacterias, plantas, hongos y arqueobacterias son capaces de sintetizarla. Es el precursor directo de los cofactores esenciales redox: flavin mononucleótido (FMN) y flavin adenin dinucleótido (FAD) (Bacher *et al.*, 2000). Los organismos que no producen riboflavina deben, indefectiblemente,

obtenerla mediante la dieta como un micronutriente, o a través de bacterias saprófitas, para sintetizar FMN y FAD. Éstos son cofactores de flavoenzimas que participan en una enorme cantidad de procesos fisiológicos de la célula: en reacciones de deshidrogenación, oxidación, transferencia de 1 ó 2 electrones o hidroxilación. Por ejemplo, las flavoenzimas están involucradas en procesos de respiración celular, síntesis de macromoléculas como ácidos grasos, reparación de ADN y sensado de luz (Joosten & van Berkel, 2007).

El camino metabólico de riboflavina en bacterias, plantas y hongos ha sido descrito con detalle (Fischer & Bacher, 2005, 2008). En eubacterias, la biosíntesis de riboflavina comienza con una molécula de GTP cuyo ciclo imidazol es hidrolizado por la enzima GTP ciclohidrolasa II (GCH), dando lugar a 4,5-diaminopirimidina. Ésta es convertida en 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona por una secuencia de deaminación, reducción de la cadena lateral y defosforilación. Las enzimas Fosforibosilamino pirimidina deaminasa (FPD), Fosforibosilamino pirimidina reductasa (FUR) y Monoéster fosfórico hidrolasa (MFH) catalizan los pasos de dicha secuencia de reacciones respectivamente. La ribulosa-5-fosfato, proveniente de la ruta de las pentosas fosfato, es transformada a 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato por la Butanona fosfato sintasa (BFS). La Lumazina sintasa (LS) condensa 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona y 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato dando como resultado 6,7-dimetil-8-ribitillumazina (lumazina). La dismutación de dos moléculas de lumazina, que es catalizada por la Riboflavina sintasa (RS), resulta en una molécula de riboflavina y una de 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona, la cual es reciclada en la ruta metabólica por la LS. La biosíntesis de una molécula de riboflavina requiere en total una molécula de GTP y dos moléculas de ribulosa-5-fosfato. Finalmente, la riboflavina es fosforilada por la riboflavina quinasa (RK) para generar FMN, el cual es adenilado por la FAD sintetasa (FS) para dar FAD (Figura I-2).

Las enzimas involucradas en la ruta biosintética de la riboflavina suelen denominarse con el nombre de Rib, seguido por el agregado de una letra (con la excepción de la enzima Monoéster fosfórico hidrolasa (MFH)). Debido a la falta de un consenso explícito en la nomenclatura de los genes *rib*, en muchos de los organismos anotados suele haber algunas discrepancias en la letra usada para identificar a cada enzima. La notación empleada en esta Tesis es la encontrada más frecuentemente en las bases de datos y en la literatura.

Regulación de la biosíntesis de flavinas: riboswitch FMN

En lo que respecta a la regulación de la biosíntesis de riboflavina, *Bacillus subtilis* fue el microorganismo que más fue estudiado. Los genes de la biosíntesis de riboflavina en *B. subtilis*

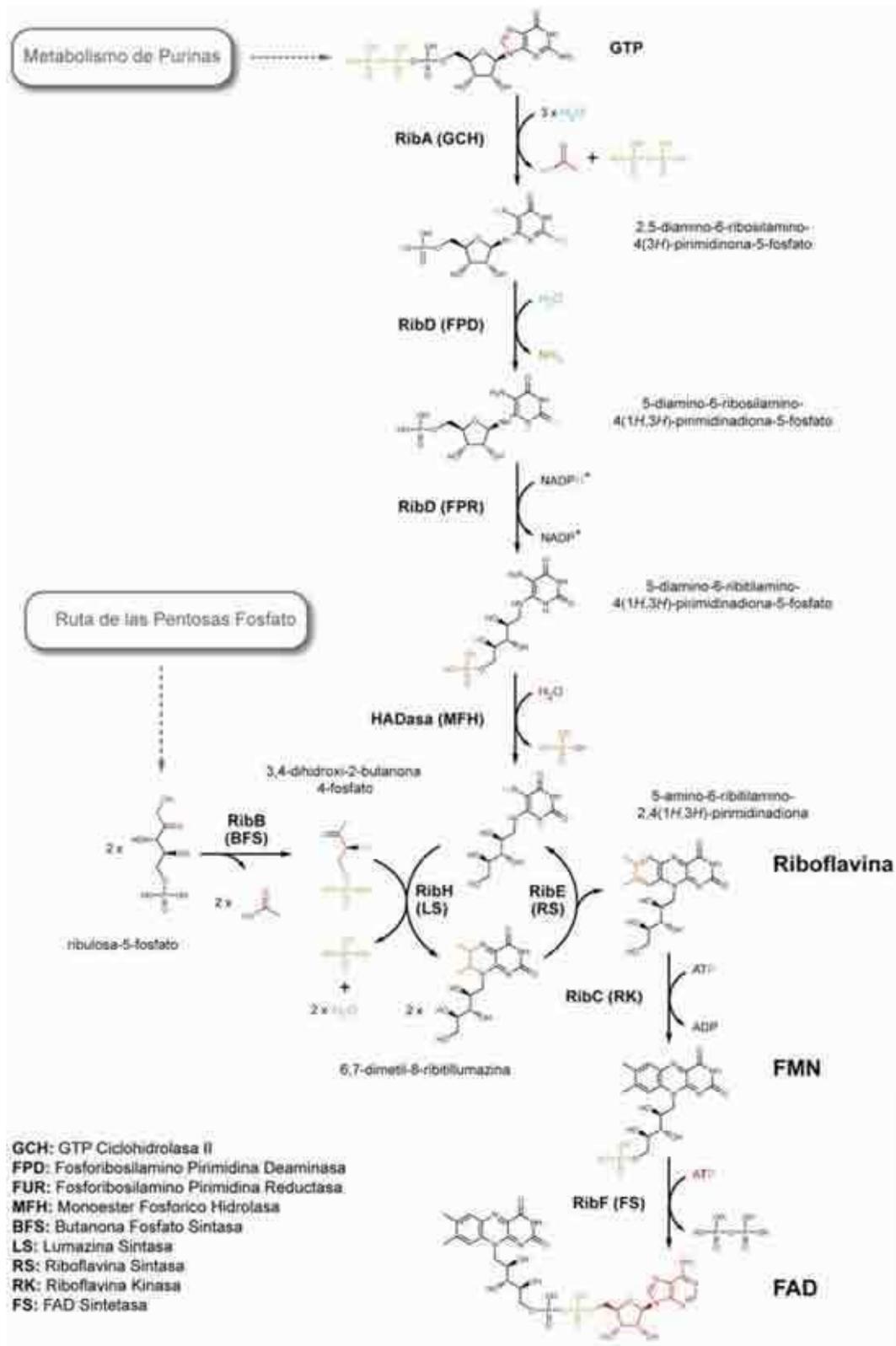


Figura I-2. Ruta de biosíntesis de riboflavina, FMN y FAD en eubacterias y plantas. Una molécula de GTP y dos moléculas de ribulosa-5-fosfato son necesarias para la biosíntesis de una molécula de riboflavina, finalmente los cofactores FMN y FAD son obtenidos luego de la fosforilación y adenilación de la riboflavina. HADasa: Monoéster Fosfórico Hidrolasa, RibA: GTP Ciclohrolasa II, RibD: Fosforibosilamino Pirimidina Deaminasa/Reductasa, RibB: Butanona Fosfato Sintasa, RibH: Lumazina Sintasa, RibE: Riboflavina Sintasa, RibC: Riboflavina Kinasa, RibF: FAD Sintetasa.

forman un unidad de transcripción única (*ribDG-E-AB-H*) cuya expresión es regulada por un riboswitch FMN ("*ribDG* FMN riboswitch"), localizado en la región 5' no codificante del correspondiente *ribDG-E-AB-H-ARNm* (Mironov *et al.*, 2002). Los riboswitch FMN son estructuras de ARN no codificantes que modulan la expresión de genes por medio de atenuación transcripcional o traduccional, al adoptar determinadas estructuras secundarias en respuesta a la concentración de diversos metabolitos celulares, por ejemplo FMN (Winkler *et al.*, 2002, Mironov *et al.*, 2002). Estos genes están involucrados en la biosíntesis de riboflavina y/o su transporte. En contraste a *B. subtilis*, los genes de biosíntesis de riboflavina en *E. coli*: *ribA*, *ribB*, *ribDG*, *ribH* y *ribE* no forman un operón. Hay evidencia experimental de una unidad de transcripción que involucra *ribH-nusB-thiL-pgpA*, la cual es expresada desde el promotor *ribEp* dependiente de σ_{32} que está localizado frente a *ribH* (Nonaka *et al.*, 2006). Además, los genes *ribDG* y *ribH* podrían ser co-transcriptos como parte de una hipotética unidad transcripcional *nrdR-ribDG-ribH-nusB-thiL-pgpA*, dirigida por el putativo promotor *nrdRp* dependiente de σ_{70} (Torrents *et al.*, 2007). Los genes *ribA*, *ribB* y *ribE* están separados completamente uno de otro en el cromosoma. El gen *ribCF* codifica una enzima que cataliza la conversión de riboflavina en FMN y FAD y no es co-transcripta con el resto de los genes de la biosíntesis de riboflavina. La expresión de *ribB* es dirigida por el promotor *sroGp2* y se propuso que su regulación es regida por el *ribB* FMN riboswitch presente en su región 5' no codificante (Vitreschak *et al.*, 2002). Se predice que este *ribB* riboswitch representa un híbrido entre un inhibidor transcripcional y uno traduccional ya que actúa por control de ambos mecanismos, es decir, transcripcionalmente exponiendo una secuencia terminadora ante la unión de FMN y traduccionalmente secuestrando el sitio de unión al ribosoma (RBS, por sus siglas en inglés) (Pedrolli *et al.*, 2015). Como consecuencia, menos RibB es producido eventualmente, llevando a la reducción de la concentración de riboflavina (y de FMN) en el citoplasma de *E. coli*.

Las bacterias Gram-positivas *Streptomyces davawensis* y *Streptomyces cinnabarinus* producen el antibiótico roseoflavina, un análogo estructural de riboflavina. La roseoflavina es encontrada en el sobrenadante de cultivos de *S. davawensis* suplementados con almidón y es fácil de identificar por su característico color rosa. Hasta el momento, no se han encontrado transportadores exclusivos para la roseoflavina. Sin embargo, el hecho de que la roseoflavina esté presente en el sobrenadante y no en el citoplasma, sugiere que esta roseoflavina externa se debe a la excreción más que a la lisis celular (Pedrolli *et al.*, 2013). La roseoflavina es convertida a roseoflavina mononucleótido (RoFMN) y roseoflavina adenine dinucleótido (RoFAD) por la flavoquinasa (RibF) y la FAD sintetasa (RibC) en *B. subtilis* (Grill *et al.*, 2008), *S. davawensis*/*Streptomyces coelicolor* (Pedrolli *et al.*, 2012), *E. coli* (Langer *et al.*, 2013) y humanos (Pedrolli *et al.*, 2011). La roseoflavina es incorporada por los transportadores de

riboflavina en *B. subtilis*, *S. davawensis*, y *C. glutamicum* (Vogl *et al.*, 2007). Los blancos celulares indudables para RoFMN y RoFAD son las flavoenzimas. Estas proteínas, como fue mencionado anteriormente, dependen de FMN o FAD y se descubrió que algunas de ellas son menos activas o completamente inactivas en sus formas RoFMN/RoFAD (Walsh *et al.*, 1978, Yorita *et al.*, 2000, Grill *et al.*, 2008, Langer *et al.*, 2013). Además de las flavoenzimas, los riboswitch FMN también son blancos de la riboflavina en bacterias. La RoFMN reduce la expresión de genes controlados por FMN riboswitch en *Listeria monocytogenes*, *S. coelicolor* y *B. subtilis* (Lee *et al.*, 2009, Ott *et al.*, 2009, Mansjo & Johansson, 2011) y también afecta negativamente el *ribB* riboswitch FMN de *E. coli* (Pedrolli *et al.*, 2015) llevando a las células a ser auxótrofas para riboflavina.

Por último, el genoma de todas las proteobacterias, con excepción de *Rickettsia*, poseen numerosos genes *rib* aislados como también un probable operón *rib* el cual, usualmente es precedido por el gen *nrdR* (o su homólogo *ybaD* en *E. coli*) y seguido por *nusB*. La proteína NrdR (YbsD) en *E. coli* contiene un dominio Zn-ribbon que está altamente conservado en bacterias y participa en varias funciones, particularmente unión a ADN o ARN y reacciones redox. NusB, por su parte es una proteína de unión a ARN y está involucrada en la anti-terminación del operón ribosomal en *E. coli* (Luttgen *et al.*, 2002). La relación funcional de ambos genes con la biosíntesis de riboflavina no es clara, pero se ha sugerido que NrdR es el represor de riboflavina. Por tanto, podría ser relevante que *nrdR* y *nusB*, contenidos en el operón *rib*, no son regulados por el riboswitch FMN.

Organización genómica de los genes *rib*

Algunos de los genes de biosíntesis de riboflavina están localizados en una misma unidad transcripcional denominada “operón *rib*”. Los genes que componen al operón *rib* no son siempre los mismos y varían según el taxón. Es común encontrar a los genes *ribD*, *ribE* y *ribH* dentro de estos operones conservando el orden. En proteobacterias, además de los genes *rib*, suelen encontrarse en el mismo cluster genómico a *glyA*, *nrdR*, *nusB* y *thiL*. El gen *glyA* está involucrado en el metabolismo de glicina, *nrdR* es un represor transcripcional de los operones RNR (ribonucleótido reductasa), *nusB* es un factor de antiterminación y *thiL* está involucrado en la biosíntesis de tiamina (Torrents *et al.*, 2007, Burmann *et al.*, 2010). En la literatura no existen reportes que involucren funcionalmente a estos genes con el operón *rib*.

RibH1 y RibH2 de *Brucella* spp.

RibH1 y RibH2 constituyen genes parálogos para la enzima 6,7-dimetil-8-ribitillumazina sintasa (lumazina sintasa, LS) en *B. abortus*. LS cataliza el penúltimo paso en la biosíntesis de la riboflavina, condensando 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona (1) y 3,4-dihidroxi-2-butanona-4-fosfato (2), para generar 6,7-dimetil-8-ribitillumazina (3) (Figura I-3). Este paso, junto al último de la ruta de biosíntesis de riboflavina realizado por RS, están estrictamente conservados en eubacterias, hongos, plantas o arqueobacterias.

Las enzimas LS (o RibH) se las clasifica en dos categorías: LSs Tipo-I, pentaméricas o icosaédricas y LSs Tipo-II, decaméricas (Zylberman *et al.*, 2006), y se denomina RibH o RibH1 a las LSs de Tipo-I y RibH2 a las LSs de Tipo-II. Los organismos que poseen una LS Tipo-II también poseen necesariamente otra LS Tipo-I. Este grupo está constituido por eubacterias, mayoritariamente α -proteobacterias, entre las que se encuentra *Brucella* spp. y los simbiontes de plantas *Rhizobium leguminosarum*, *Mesorhizobium loti* y *S. meliloti* (Klinke *et al.*, 2007). Por su parte, *B. subtilis* posee una LS icosaédrica, mientras que *Saccharomyces cerevisiae*, una pentamérica (Ritsert *et al.*, 1995). Si bien las secuencias primarias y los arreglos cuaternarios de las diferentes LS pentaméricas, icosaédricas y decaméricas son muy distintos, la estructura terciaria de los monómeros es esencialmente la misma (Gerhardt, Haase, *et al.*, 2002). Como se aclaraba anteriormente, todas las especies de *Brucella* secuenciadas hasta el momento codifican RibH1 y RibH2, y sus secuencias se encuentran conservadas. RibH1 cuenta con un arreglo cuaternario tipo pentamérico (Klinke *et al.*, 2005) mientras que RibH2 tiene una organización cuaternaria de dímero de pentámero (Zylberman *et al.*, 2004, Klinke *et al.*, 2005). Además, RibH2 de *B. abortus* es capaz de unir riboflavina, tal como lo hace la LS de *Schizosaccharomyces pombe*, presentando constantes de disociación (Kd) similares (Gerhardt, Haase, *et al.*, 2002, Fischer *et al.*, 2002). La actividad enzimática *in vitro* de RibH2 es muy baja comparada con la de otras LSs ya caracterizadas (con una kcat 10-15 veces menor a las LS conocidas) (Klinke *et al.*, 2005).

Riboflavina Sintasa

Riboflavina Sintasa cataliza el último paso de la vía biosintética de riboflavina. La reacción de dismutación se puede resumir como la transferencia de una unidad de cuatro carbonos entre dos moléculas de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina, con la molécula donante y aceptora mostrando una orientación opuesta de sus grupos 6- y 7-metilo en el sitio activo (Figura I-4). Brevemente, el mecanismo más aceptado consta de tres pasos principales: (i) la transferencia de un ion hidruro del aceptor a la molécula donante, (ii) una cicloadición (4+2) que produce un

intermediario pentacíclico y (iii) una secuencia de dos β -eliminaciones dando como resultado el anillo xileno de riboflavina (Illarionov, Eisenreich, *et al.*, 2001, Kim *et al.*, 2010).

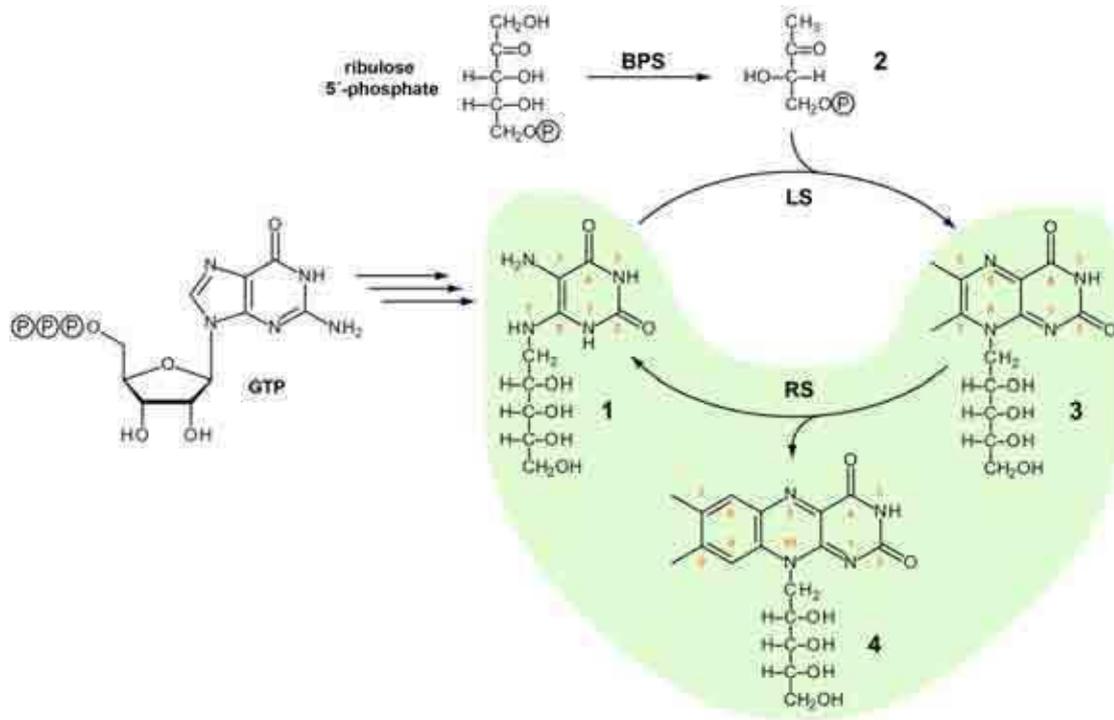


Figura I-3. Los pasos catalíticos principales implicadas en la biosíntesis de riboflavina. (1) 5-amino-6-ribitilamino-2,4 (1H, 3H) pirimidinadiona, (2) 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato, (3) 6,7-dimetil-8-ribitilumazina, (4) riboflavina, DHBPS: 3,4-dihidroxi-2-butanona 4-fosfato sintasa, LS: 6,7-dimetil-8-ribitilumazina sintasa, RS: riboflavina sintasa (reacción destacada en fondo verde).

Curiosamente, los estudios catalíticos de mutaciones puntuales seleccionadas en RS de *E. coli* mostraron que un gran número de residuos polares altamente conservados pueden ser mutados a alanina sin un cambio significativo en la actividad catalítica (Illarionov, Kemter, *et al.*, 2001). Además, la formación de riboflavina también puede proceder bajo otras condiciones, como llevando a ebullición una solución acuosa de 6,7-dimetil-8-ribitilumazina a pH neutro o ácido (Beach & Plaut, 1969). Estas observaciones sugieren que RS podría realizar su actividad catalítica tan sólo asegurando la orientación apropiada del sustrato en el sitio activo. RS se ensambla como un homotrímero en eubacterias, hongos y plantas (Eberhardt *et al.*, 1996, Liao *et al.*, 2001, Gerhardt, Schott, *et al.*, 2002, Fischer & Bacher, 2005), mientras que se pliega como un homopentámero con una secuencia de aminoácidos no relacionada en arqueas (Fischer *et al.*, 2004). La información estructural sobre RS de eubacterias y hongos comprende (i) la enzima trimérica de *E. coli* (que fue resuelta solo en su forma apo (Liao *et al.*, 2001), (ii) la RS de *S. pombe* (que se resolvió en la presencia de un análogo de sustrato, pero

fue cristalizada como monómero debido a la disociación del trímero en la gota de cristalización (Gerhardt, Schott, *et al.*, 2002), y (iii) la estructura del dominio N-terminal del monómero de RS de *E. coli* en complejo con riboflavina (Truffault *et al.*, 2001, Meining *et al.*, 2003).

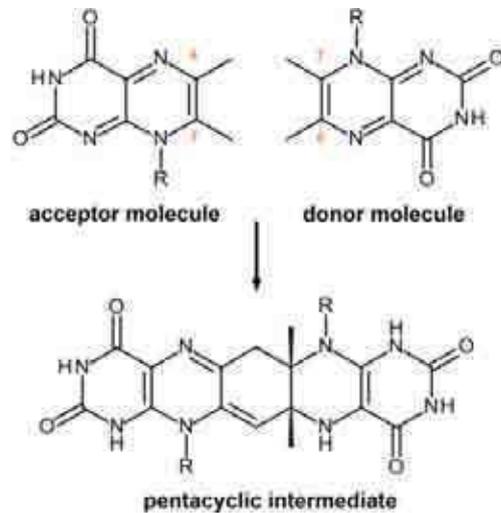


Figura I-4. Orientación relativa propuesta de los grupos 6- y 7-metil de ambas moléculas de sustrato, dando lugar al intermediario pentacíclico luego del paso inicial de transferencia del hidruro.

Regulación de la síntesis de riboflavina en *B. abortus*.

Brucella posee dos cromosomas. El cromosoma I tiene un tamaño aproximado de 2 Mpb y codifica para genes involucrados en el mantenimiento celular, mientras que el cromosoma II tiene un tamaño aproximado de 3,3 Mpb y contiene la secuencia correspondiente a la mayoría de los factores de virulencia (Viadas *et al.*, 2009, Wattam *et al.*, 2009). *Brucella* codifica para los dos tipos de LS detallados previamente, tipo I (RibH1) y II (RibH2). Al menos una LS debe estar presente para la viabilidad de *B. abortus* y es RibH2, no RibH1, la necesaria para la replicación intracelular de *Brucella* debido a su actividad de LS *in vivo*. De este modo se demostró que la biosíntesis de flavinas es esencial para la supervivencia de *Brucella* en células y en ratones (Figura I-5) (Bonomi *et al.*, 2010).

El gen *ribH2* está codificado en el cromosoma II, corriente abajo y de manera convergente al gen *fdhD*, que codifica para la formato deshidrogenasa, y corriente arriba y de manera divergente al gen BAB2_0546 que codifica para una proteína putativa con un dominio de la familia de la isocitrato liasa (Figura I-6). El Dr. Hernán Bonomi, miembro del laboratorio del Dr. Goldbaum, estudió la expresión y regulación de *ribH2* en su trabajo de Tesis doctoral ("Rol del Metabolismo de Flavinas en la Virulencia de *Brucella abortus*"). Determinó que *ribH2* posee un

elemento riboswitch ubicado en la región 5' no codificante el cual estaría atenuando traduccionalmente y no transcripcionalmente los niveles de RibH2, en presencia de FMN y riboflavina *in vivo*. En otros trabajos publicados se describió que RibH2 se expresa diferencialmente a nivel proteína y mRNA en células en cultivo infectadas y entre las cepas de *B. abortus* S19 (atenuda) y 2308 (infecciosa), respectivamente (Al Dahouk *et al.*, 2008, Lamontagne *et al.*, 2009). Más aún, RibH2 es necesaria para una infección normal de *B. abortus* siendo requisito que su actividad enzimática se encuentre intacta. RibH1 parece no tener un rol evidente en la infección bacteriana y sería una LS activa en el ciclo extracelular de *Brucella* (Bonomi *et al.*, 2010). Estos datos convierten a los riboswitches del tipo RFN en atractivos blancos para drogas análogas de FMN.

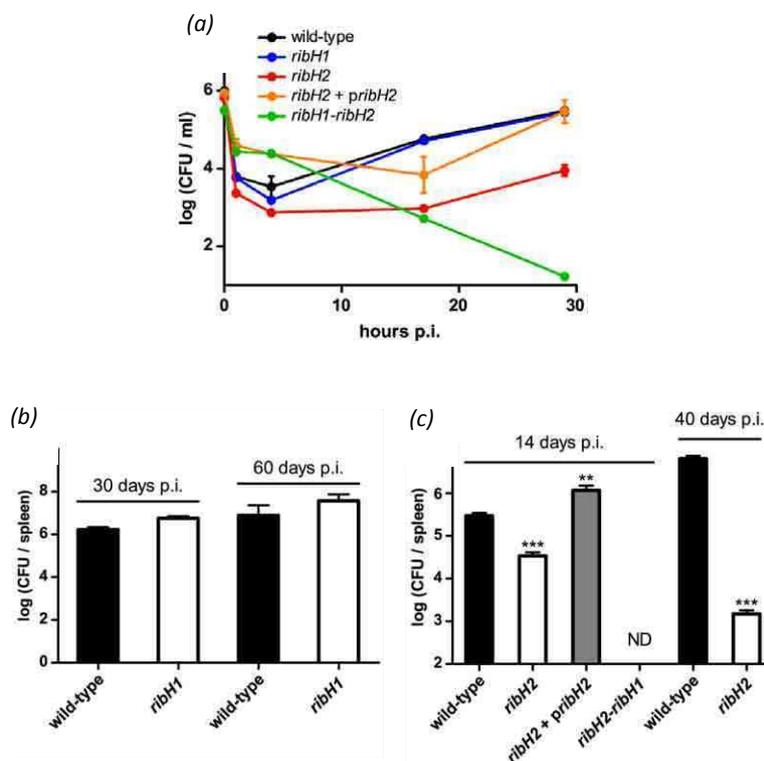


Figura I-5. (a) RibH2 está involucrada en la supervivencia y replicación de *B. abortus* en la línea celular macrofágica J774A.1. Las células infectadas con *B. abortus* silvestre, las mutantes en *ribH1*, *ribH2* y *ribH1-ribH2*, y la cepa complementada de *ribH2* (*ribH2+pribH2*) fueron lisadas y se contabilizó las UFCs/ml a distintos tiempos luego de la inoculación. (b) Ratones fueron infectados con *B. abortus* 2308 silvestre, la mutante en *ribH1*, μ *ribH2* o μ *ribH2* + *pribH2*. Los bazos fueron disecados y homogeneizados a los 14, 30, 40 ó 60 días. Las UFC por bazo se determinaron plaqueando diluciones seriadas de los homogenatos en placas TSA. Se grafica la media + la desviación estándar. El análisis estadístico se hizo con la prueba *t-Student* no pareada de dos colas (***) $p < 0.001$) (Bonomi *et al.*, 2010)

Por otro lado, el gen *ribH1* está codificado en el operón putativo de biosíntesis de riboflavina, en el cromosoma I, junto con los genes *ribD* y *ribE*, rodeados por los genes reguladores *nrdR* y *nusB* (Figura I-6). NrdR y NusB han sido implicados en funciones reguladoras en otras bacterias como será detallado en la siguiente sección.

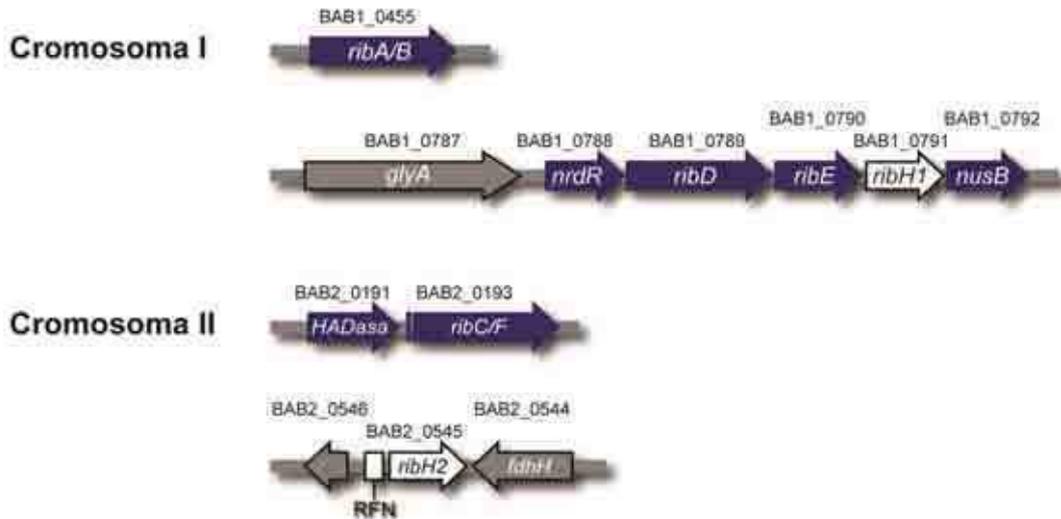


Figura I-6. Organización de los genes del metabolismo de las flavinas en *Brucella*. Un esquema de la distribución de los distintos marcos abiertos de lectura que conforman al conjunto de enzimas involucradas en el metabolismo de las flavinas en *B. abortus* (azules y blancos) y algunos genes vecinos (en gris). Se resaltan los genes *ribH* (blanco) donde *ribH1* se encuentra dentro del operón *rib* y *ribH2* está aislada con el elemento RFN en su zona regulatoria.

NrdR: un regulador global de las Ribonucleótido Reductasas

Publicaciones recientes han descrito la regulación transcripcional de diferentes clases de Ribonucleótido Reductasas (RNR). Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo la expresión de diferentes RNR pueden ser coordinadas en microorganismos que codifican distintas clases de RNR. Las RNR catalizan la conversión de los cuatro ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos y son esenciales para la síntesis de ADN. Existen tres clases de RNR (I, II y III), con diferentes dependencias de oxígeno y características bioquímicas (Torrents *et al.*, 2002). Un nuevo factor de transcripción, NrdR, ha sido recientemente implicado en la regulación de las tres clases de RNR a través de la unión a NrdR-boxes conservadas en la región promotora de casi todos los genes que codifican RNRs (Grinberg *et al.*, 2006, Torrents *et al.*, 2007, Mowa *et al.*, 2009, Panosa *et al.*, 2010, Case *et al.*, 2011). Todas las eubacterias actualmente conocidas codifican un gen *nrdR*, excepto *Rickettsia*, *Helicobacter*, y *Desulfovibrio*.

El grupo de Borokov fue el primero en identificar en *Streptomyces coelicolor* un marco de lectura abierto que codifica a NrdR, una proteína que se une a las regiones promotoras de las RNR clase I y II (Borovok *et al.*, 2004). Posteriormente, un estudio computacional comparando todas las regiones promotoras a nivel genómico de las RNR reveló una secuencia palindrómica altamente conservada llamada NrdR-box, con la secuencia consenso acaCwAtATaTwGtg (Rodionov & Gelfand, 2005). Esta NrdR-box ha sido identificada en los genomas de eubacterias y está ausente en arqueas y eucariotas. Habitualmente se detectan dos copias de la NrdR-box

en la región promotora de diferentes genes *nrd*. Actualmente, NrdR ha sido clasificada como un miembro de la familia de proteínas altamente conservadas confinadas exclusivamente a procariotas, eubacterias y algunas archaea (Lundin *et al.*, 2009). NrdR es una proteína de 150 – 200 aminoácidos que posee dos dominios: un dominio N-terminal dedos de Zn de unión al ADN y un dominio C-terminal ATP-cone que une nucleótidos. El dominio N-terminal contiene un motivo Zn-ribbon para unirse a la NrdR-box en la región regulatoria corriente arriba de los genes *nrd*. El dominio ATP-cone es similar al observado en algunas RNR con actividad alostérica. La proteína NrdR de *S. coelicolor* es la mejor caracterizada. NrdR forma oligómeros, es capaz de unir ATP y dATP, se une a las regiones reguladoras en segmentos que incluyen la NrdR-box en tandem, y para esta interacción es necesario el dominio Zn-ribbon en el extremo N-terminal, y en menor medida, el dominio ATP-cone (Grinberg *et al.*, 2006, Grinberg *et al.*, 2009). La NrdR-box en algunos casos se superpone con la caja -35 del promotor. Estos experimentos se hicieron mediante ensayo de retardo en gel, pero no hay ensayos de footprinting que muestren la unión específica de NrdR en la NrdR-box (Torrents *et al.*, 2007). Un modelo reciente reportó un mecanismo de NrdR como regulador transcripcional con cooperativismo complejo y un mecanismo de regulación alostérica que sintoniza finamente la expresión génica de las RNR en respuesta al nivel de nucleótidos celulares (McKethan & Spiro, 2013). Sin embargo, hasta la fecha no hay evidencia experimental del papel de NrdR en la regulación de la biosíntesis de riboflavina. Algunos de los genes que contienen la NrdR-box también poseen un riboswitch B12, regulado negativamente por la coenzima B12, como el operón *nrdAB* en *Bacteroides fragilis* y *nrdABS* en *Streptomyces*. Sin embargo, no se encuentran NrdR-boxes en las regiones reguladoras del operón de biosíntesis de riboflavina. Si existe regulación, podría ser indirecta, o unirse en regiones sin NrdR-box. Además de *Streptomyces*, también se ha demostrado que NrdR es capaz de regular las tres clases de RNR presentes en *E. coli*, uniéndose a las regiones reguladoras, las cuales presentan dos copias en tándem de la NrdR-box. La copia proximal al promotor es necesaria para la unión, mientras que la distal no (Torrents *et al.*, 2007). En *E. coli*, NrdR está codificado en aparente operón con otros genes de biosíntesis de riboflavina, aunque no es exactamente igual al operón de *Brucella*, pues *ribE* está ausente, además de variar el entorno genético del operón (Torrents *et al.*, 2007).

NusB: antiterminador de la transcripción

La regulación transcripcional mediante anti-terminación opera en bacterias protegiendo a las moléculas de ARN nacientes de una terminación prematura a través de la unión de un

conjunto de proteínas específicas. Este mecanismo fue descubierto en *E. coli* en estudios sobre la transición entre el ciclo de vida lisogénico y lítico del bacteriófago λ mediada por la proteína N codificada por el fago (Das, 1992). La anti-terminación ha demostrado un rol en la regulación fina de la transcripción del ARN ribosomal que debe estar coordinado con la velocidad de biosíntesis de proteínas ribosomales con gran precisión. La proteína NusB forma un complejo heterodimérico con la proteína NusE. La regulación transcripcional se inicia cuando el complejo NusB/NusE se unen a motivos de ARN, designados BoxA (Stagno *et al.*, 2011). Los motivos BoxA constituyen secuencias dodecaméricas que se encuentra conservadas de manera absoluta en los siete operones de ARN ribosomal (*rrn*) de *E. coli* (Luttgen *et al.*, 2002, Burmann *et al.*, 2010). El proceso de anti-terminación de la transcripción es mediado por NusA. NusA es una proteína que interactúa con la ARN polimerasa (ARNP), y dependiendo de la secuencia contexto de DNA/ARN y la presencia o ausencia de factores adicionales, puede producir efectos opuestos en la transcripción (Richardson, 1996): NusA puede estimular ciertos tipos de pausa y terminación Rho-independiente intrínseca y también puede inducir anti-terminación en terminadores Rho-dependientes en el ARN ante la presencia de secuencias nut, o elementos nut-like (BoxA, B, C). En complejo con otros factores Nus (NusG, NusB, NusE) o proteínas N y Q del fago λ , NusA estimula la anti-terminación en ambos terminadores, Rho-dependientes e independientes (Richardson, 1996). Los sitios nut constan de la secuencias de ARN de cadena sencilla BoxA, la estructura de tallo y asa palindrómica BoxB, y una secuencia espaciadora entre estas dos regiones a la que se une NusA (Burmann *et al.*, 2008, Luo *et al.*, 2008) (Figura I-7). Una búsqueda de la secuencia BoxA en el operón de biosíntesis de riboflavina arroja una secuencia parecida (7 nucleótidos conservados de 12) en la región codificante del operón, cerca del extremo 5'. Sin embargo, es necesario un análisis más detallado incluyendo una matriz para determinar si la identidad es significativa. El gen *nusB* se encuentra codificado en el operón de biosíntesis de riboflavina (que incluye a *nrdR*) en otras bacterias, como *E. coli* K-12 y *T. crunogena*, pero en otros microorganismos posee un contexto genómico distinto, sin la presencia de los genes para la biosíntesis de riboflavina o el gen *nrdR* asociado. No existe evidencia experimental del papel de NusB en la regulación del operón de biosíntesis de riboflavina.

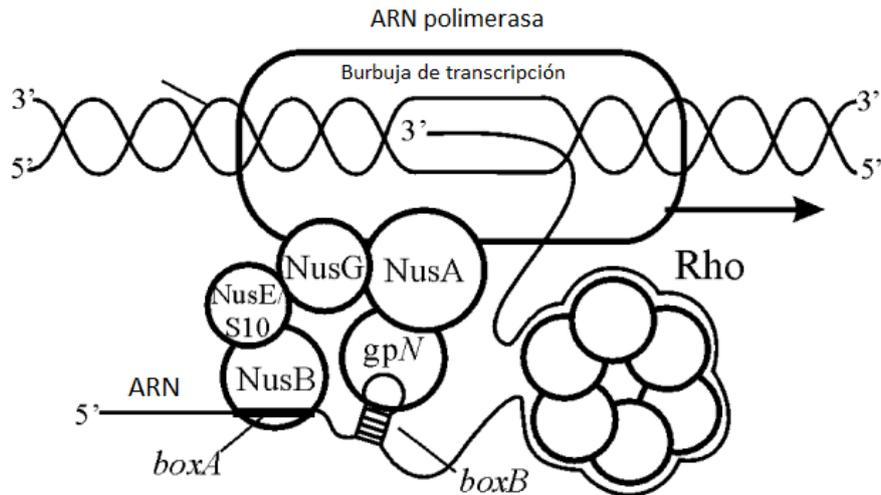


Figura I-7. Topología hipotética del complejo de anti-terminación mediado por proteínas N en *E. coli*. Figura adaptada de Mühlberger (Muhlberger *et al.*, 2003).

En conjunto, estos datos sugieren diferencias en la regulación de los genes *ribH* que permiten su expresión diferenciada. El análisis permite formular la hipótesis de la regulación por riboflavina en la expresión de *ribH2*, y el papel de *nrdR* y *nusB* como reguladores negativo y positivo respectivamente, en la expresión de *ribH1*.

Biosíntesis de flavinas como potenciales blancos para el desarrollo de drogas anti-infectivas

Las últimas dos décadas han sido testigo de un desenfreno de organismos resistentes a antibióticos. Esto se ejemplifica por neumococos resistentes a penicilina y macrólidos, estafilococos resistentes a meticilina, enterococos resistentes a vancomicina, y *Mycobacterium tuberculosis* resistente a múltiples fármacos (Norrby *et al.*, 2005). Una escasez de nuevos antibióticos ha exacerbado este escenario. Para no recaer en la decadencia de la era pre-antibiótica, es imperativo fortalecer el descubrimiento de fármacos novedosos. Recordando lo mencionado previamente, los verdaderos factores de virulencia de *Brucella* son un complejo conjunto de determinantes moleculares que le confieren al patógeno la capacidad metabólica de prosperar en las severas condiciones intracelulares que le permiten invadir, resistir a la muerte intracelular, construir el nicho replicativo y multiplicarse. De este modo, podemos predecir que la búsqueda de blancos terapéuticos en los caminos metabólicos de *Brucella* resultaría en un acierto. Esta estrategia de descubrimiento de fármacos basados en blancos moleculares (target-based) ha sido ampliamente reconocido por su efectividad (Knowles & Gromo, 2003, Lindsay, 2003).

La riboflavina es indispensable para las flavoenzimas, y representa el cofactor redox más versátil. Las flavoenzimas están involucradas en decenas de procesos celulares cruciales tales como metabolismo energético, reacciones redox, detoxificación y biosíntesis (Joosten & van Berkel, 2007). Por ejemplo, el FMN (cuyo precursor es la riboflavina) es requerido como un aceptor de electrones para las deshidrogenasas en la cadena respiratoria, y su deficiencia induce incrementos en los niveles de Citocromo bd, una oxidasa terminal que trabaja en condiciones de microaerobiosis, y que está presente también en *Brucella* (Jimenez de Bagues *et al.*, 2007). Con la excepción de *L. monocytogenes*, todos los patógenos bacterianos intracelulares dependen exclusivamente de la riboflavina endógena, por lo que la inhibición de su biosíntesis implicaría la inanición del patógeno (Morgunova *et al.*, 2010). En *Mycobacteria*, por ejemplo, contundentes datos sugieren una naturaleza esencial de la biosíntesis de riboflavina, al demostrarse que el genoma de *M. leprae* incluye un set completo de genes que codifican enzimas de la biosíntesis de riboflavina a pesar del hecho que aproximadamente la mitad de su genoma experimenta fragmentación durante la transición a una vida intracelular obligatoria (Cole *et al.*, 2001). Algo similar ocurre con el patógeno *Salmonella*. Recientemente se ha demostrado que el gen *ribB*, involucrado en la biosíntesis de riboflavina, es esencial en diferentes modelos de enfermedad por *Salmonella* (Rollenhagen & Bumann, 2006, Becker *et al.*, 2006). En base a todas estas evidencias, deducimos que es probable que el metabolismo de flavinas pueda estar relacionado con la patogénesis bacteriana. Y en particular se puede hacer mención de *Brucella*, ya que necesita sobrevivir al estrés oxidativo, condiciones de microaerobiosis y a la deprivación de nutrientes, donde las flavoenzimas o flavinas por sí mismas podrían estar cumpliendo un rol importante en estos procesos. A pesar de esto, el metabolismo de flavinas ha sido escasamente enlazado con la virulencia bacteriana.

Las plantas y la mayoría de los microorganismos patógenos pueden sintetizar riboflavina. En contraste, los metazoos, donde están incluidos los humanos y los hospedadores de *Brucella* spp., carecen de las enzimas de la vía biosintética de riboflavina y la obtienen enteramente de la dieta. Por lo tanto, se espera que los inhibidores de la biosíntesis de riboflavina muestren una citotoxicidad selectiva para estos microorganismos patógenos y no para los hospedadores. A su vez, *Brucella* spp. y otros patógenos como *Mycobacterium* dependen estrictamente de la biosíntesis endógena de riboflavina pues carecen de transportadores para esta molécula (Dahl *et al.*, 2004). Asimismo, como se describe en la figura I-2, los dos últimos pasos de la biosíntesis de riboflavina constituyen un ejemplo claro de reciclaje celular. En estas etapas uno de los dos productos de la catálisis de RS, la 5-amino-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona, resulta ser el sustrato de la enzima antecesora, la LS. Por lo tanto, un buen candidato como antimetabolito inhibitorio será aquel que posea la capacidad de inhibir a estas dos enzimas en

forma simultánea, de este modo disminuirá considerablemente la tendencia al desarrollo de resistencia. Por último, pero no menos importante es el hecho que el riboswitch altamente conservado mencionado en secciones anteriores, ha sido ampliamente considerado un blanco terapéutico prometedor debido a la ausencia de una contraparte en humanos (Blount & Breaker, 2006). En resumen, para los mamíferos la biosíntesis de riboflavina resulta ser una vía metabólica muy fructuosa en blancos terapéuticos altamente selectivos.

Inhibidores de la biosíntesis de riboflavina

La mayoría de los inhibidores son diseñados racionalmente siguiendo el siguiente protocolo: primero, se resuelve la estructura cristalina del blanco molecular. Segundo, se propone el mecanismo de acción de la enzima. Tercero, se sintetiza un posible intermediario. Y cuarto, si se demuestra actividad, se co-cristaliza el potencial inhibidor con la enzima para determinar los sitios de interacción. En base a esto, LS y RS son los principales blancos para el diseño racional de drogas inhibitorias de la biosíntesis de riboflavina. Esto se debe al amplio conocimiento que se posee acerca de la estructuras de estas enzimas, cuyos cristales han sido obtenidos de numerosos organismos; y al vasto conocimiento de su química de reacción. Las reacciones catalizadas por estas enzimas están vinculadas estrechamente, como se observa en la figura I-2. Sutiles modificaciones en los sustratos naturales producen muchos análogos, llamados antimetabolitos. Los antimetabolitos inhiben a la enzima al competir por la misma enzima con el metabolito conocido. Los análogos pueden ser de sustrato, producto o asimilarse a un estado de transición o a un intermediario de reacción. Se han descubierto compuestos inhibitorios entre análogos de 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona y 6,7-dimetil-8-ribitillumazina. Los análogos del primero inhiben tanto a LS como a RS por inhibición por sustrato o represión por catabolito. La mayoría son compuestos con sustituciones P-alquil (Cushman *et al.*, 1999, Meining *et al.*, 2000), nitro (Gerhardt, Haase, *et al.*, 2002), carboxialquil (Cushman *et al.*, 2002) en el 5-amino de la pirimidinadiona, o poseen un carbonilo agregado en la misma posición (Zhang *et al.*, 2008). Los valores de K_i de los antimetabolitos ensayados poseen un rango desde micromolar (Cushman *et al.*, 2001, Cushman *et al.*, 2002) a nanomolar (Cushman *et al.*, 2004). Sin embargo, todos estos compuestos son muy polares por lo que no tienen actividad *in vivo*, y su fracaso para inhibir el crecimiento microbiano se ha atribuido a su incapacidad de penetrar las células. No obstante, se han descubierto mediante high throughput screening una serie de compuestos que inhiben a la RS de *M. tuberculosis*, los cuales presentaron por primera vez actividad antimicrobiana.

Ellos resultaron promisorios para superar al fenotipo persistente *M. tuberculosis* puesto que son activos tanto contra el bacilo replicativo como con el no replicativo (Zhao *et al.*, 2009).

Descubrimiento y desarrollo de drogas antimicrobianas

El descubrimiento de antibióticos ha sido desestimado en estos últimos años, pero la resistencia ya ha evolucionado para cada antibiótico ingresado en la práctica clínica, cualquiera sea la clase química o blanco molecular de la droga. A pesar de que varios focos bacterianos amenazan la salud pública (cepas multiresistentes a drogas, patógenos emergentes y organismos de amenaza biológica), muchas empresas farmacéuticas han abandonado los programas de descubrimiento de antibióticos. Numerosos factores contribuyen a esta éxodo: (i) predicciones dificultosas del desarrollo de resistencia, agregando riesgo a la inversión en investigación y el desarrollo (I+D), (ii) significativos obstáculos científicos, (iii) requerimientos regulatorios complejos y divergentes y (iv) el desafío del modelo comercial, es decir, enorme inversión y escaso retorno de la inversión comparado con otras áreas terapéuticas (Roca *et al.*, 2015).

Sin embargo, tal vez lo menos apreciado es cuán difícil es técnicamente y cuánto tiempo consume crear un nuevo antibiótico (Figura I-8). Convertir un proyecto químico temprano en un medicamento que pueda ser usada en pacientes, es un profundo desafío científico.

Parte de la dificultad asociada con el descubrimiento de nuevas clases de compuestos antibacterianos ha sido definida por los requisitos estrictos por un antibiótico seguro y de amplio espectro: (i) el blanco debe ser esencial para el patógeno, (ii) altamente conservado entre las diversas especies bacterianas y (iii) ausente, diferente o no esencial en los seres humanos. El inhibidor debe ser potente e idealmente debe mostrar actividad en todas las células, con una baja propensión a la aparición de resistencia. Además, el esqueleto del primer "hit" debe ser susceptible a cambios estructurales para permitir la optimización de su potencia, eficacia, seguridad y convertirse en un "lead" en las etapas posteriores (O'Shea & Moser, 2008).



Figura I-8. Diagrama de flujo adaptado de la literatura del descubrimiento y desarrollo de drogas antimicrobianas.

La figura muestra la línea de tiempo y los riesgos asociados con el descubrimiento de fármacos antibacterianos. Se define hit a un inhibidor químicamente manejable, de potencia micromolar baja contra el blanco, y por lo menos 10 veces más selectivo con el blanco patológico que con la versión del mamífero. Un "lead" fue un "hit" que además tiene actividad antibacteriana, sumando la evidencia que este mecanismo antibacteriano se debe a la inhibición del blanco estudiado. No se identifican "leads" directamente de un ensayo de HTS. En todos los casos los "leads" evolucionan siguiendo modificaciones químicas de los "hits". La optimización de "lead" es la fase más difícil y prolongada en el descubrimiento de drogas. La probabilidad de éxito durante la optimización del lead está fuertemente ligada al tamaño del esfuerzo de la química medicinal dedicado al proyecto.

En los últimos años, la identificación sistemática de nuevos compuestos líderes ha ganado cada vez más atención. En la Tabla I-1 se resumen las distintas estrategias que están siendo usadas para el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibacterianos. El progreso de la química combinatorial (la síntesis en paralelo de un gran número de compuestos) y el high throughput screening (o HTS, el análisis en paralelo de la bioactividad de un gran número de compuestos) facilitó la exploración de vastos espacios químicos para los compuestos con propiedades deseables. Para llevar a cabo con eficacia un programa de descubrimiento de fármacos, la biblioteca de drogas debería contener compuestos que muestran propiedades razonables para facilitar el camino hacia los productos finales o "drug-like properties". Éste término es evaluado por la regla de 5 de Lipinski.

Estrategia	Descripción	Referencia
Derivativos de drogas	La modificación de la estructura básica de agentes antimicrobianos conocidos o desarrollo de inhibidores de un mecanismo de resistencia específico (es decir, nuevos β -lactámicos o inhibidores de la bomba de flujo de salida).	(Goemaere <i>et al.</i> , 2012, Walsh & Wenciewicz, 2014),
Descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos	Ensayos clásicos antibacterianos o de "célula completa" para encontrar antibióticos producidos por microorganismos de fuentes diferentes. Descubrimiento genómico o target-based de	(Singh <i>et al.</i> , 2011)

	antibióticos mediante el uso de nuevas herramientas como la química combinatorial y la genómica.	
Drogas antivirulentas	Anticuerpos o compuestos que bloquean o inhiben factores de virulencia.	(Waldor, 2006)
Nanopartículas	Desarrollo de péptidos antibacterianos o peptidomiméticos	(Pelgrift & Friedman, 2013)
Bacteriófagos o enzibióticos	Suministro de bacteriófagos o enzimas bacteriolíticas	(Pastagia <i>et al.</i> , 2013, Bragg <i>et al.</i> , 2014)
Enfoques de biología ecológica/evolutiva	Dirigido a orientarse en la ecología y evolución de la resistencia de antibióticos, incluidos los inhibidores de transferencia de plásmidos de resistencia y oligómeros antisentido de silenciamiento de genes.	(Mosqueda <i>et al.</i> , 2014)

Tabla I-1. Estrategias para el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas antibacterianas.

En el descubrimiento de drogas, la regla de 5 (Ro5, por sus siglas en inglés) de Lipinski es considerada una referencia en la definición del perfil de propiedades fisicoquímicas y estructurales de las drogas candidatas para una biodisponibilidad oral óptima (Lipinski *et al.*, 2001). Fueron establecidos los límites superiores de cuatro descriptores moleculares basados en un conjunto de drogas conocidas y se refieren a (i) peso molecular ≤ 500 Da, (ii) coeficiente de partición octanol / agua ($\log P$, hidrofobicidad) ≤ 5 (iii) número de donantes de enlaces de hidrógeno ≤ 5 y (iv) número de aceptores de enlaces de hidrógeno ≤ 10 . Las moléculas que obedecen estas reglas deberían mostrar una solubilidad aceptable y propiedades de permeabilidad celular, y fueron definidas como “drug-like” (Lipinski *et al.*, 2001). El trabajo de Lipinski representa el primer intento sistemático de correlacionar propiedades fisicoquímicas de compuestos con su biodisponibilidad oral y las posibles dificultades y tasas de deserción durante el desarrollo preclínico y clínico. La regla no se aplica a sustratos de transportadores biológicos ni a productos naturales. Igualmente, los compuestos antibacterianos han sido considerados una excepción a algunas de estas reglas. Esto podría explicarse de la siguiente manera en el caso de bacterias Gram-negativas, por ejemplo: los compuestos con actividad contra estos organismos deben superar barreras adicionales para funcionar, como es la penetración de la membrana lipídica externa y la evasión de bombas de expulsión. Estos requerimientos adicionales parecen ser los responsables de estas diferencias en las propiedades fisicoquímicas ideales planteadas anteriormente, con mayores masas moleculares (con un límite estricto de 600 Da) y una mayor polaridad (Leeson & Davis, 2004). Respecto a este último punto, un estudio reveló que el valor promedio de $\text{clogD}_{7.4}$, que representa el estado de carga de las moléculas a pH neutro, es un poco más de cuatro unidades logarítmicas

menor (más hidrofobicidad) para drogas contra bacterias Gram-negativas en comparación con un conjunto de drogas comerciales tomadas de referencia (O'Shea & Moser, 2008).

Otra definición simplificada de drug-likeness basada en reglas fue establecida por Veber. Él aseguró que la hidrofobicidad y la masa molecular no ofrecen una real idea respecto a las propiedades estructura-específicas que influyen en la biodisponibilidad oral. Sus observaciones sugieren que los compuestos que cumplen solamente con sólo dos criterios: (1) 10 o menos enlaces rotables y (2) el área de superficie polar (PSA, por sus siglas en inglés) igual o menor de 140Å (o 12 o menos donantes y aceptadores de enlaces de H) tendrán una alta probabilidad de buena biodisponibilidad oral en el modelo animal de rata (Veber *et al.*, 2002).

Sin embargo, en los últimos años, con el fin de superar los duros límites establecidos por los filtros tradicionales para drug-likeness, estos modelos fueron derivando a modelos con enfoques más cualitativos. Así, Bickerton y col. han desarrollado la denominada estimación cuantitativa de drug-likeness (QED, por sus siglas en inglés), fundado en reglas simples en base a las propiedades fisicoquímicas y también estructurales del conjunto de datos disponibles. Estos enfoques cualitativos usan descriptores como masa molecular, número de aceptores y dadores de enlaces de hidrógeno, logP (hidrofobicidad), área de superficie polar (PSA por sus siglas en inglés), número de enlaces rotables, número de anillos aromáticos y alertas estructurales. El enfoque se basa en este número relevante de descriptores moleculares trazando una distribución continua de moléculas en función de sus características de "deseabilidad" (Bickerton *et al.*, 2012).

Común a todos estos análisis es el hecho de que la diversidad de organismos bacterianos es grande, y el factor clave para cualquier actividad celular de las drogas candidatas es su capacidad para penetrar la pared celular. Las bacterias Gram-negativas contienen además de la membrana interna y la capa de peptidoglicanos, una membrana externa que actúa como una barrera impermeable para muchas moléculas pequeñas. La experiencia sugiere que es más fácil encontrar el blanco celular de un compuesto antibacteriano, que desarrollar estrategias de permeabilidad en un inhibidor. Por lo tanto, los ensayos celulares resultan favorecedores para encontrar un compuesto que tiene un mínimo de actividad antibacteriana, pero los ensayos bioquímicos y estudios genéticos son vitales para determinar el modo de acción de estos compuestos. El uso de cepas mutantes de determinadas dianas es un modo de detectar compuestos que tienen tanto especificidad de target como actividad antibacteriana (Payne *et al.*, 2007).

Por último, en los últimos años ha surgido una nueva perspectiva entre varios autores que se orienta al enfoque total sobre el descubrimiento de nuevas moléculas, más que al desarrollo. Este punto de vista está centrado en la molécula, es decir, en considerar que la estrategia más

robusta para enfrentar el dilema del desarrollo de antimicrobianos es mediante la síntesis de nuevas estructuras químicas que interactúen y/o bloqueen blancos ya establecidos, pero de una manera novedosa (Payne *et al.*, 2007, Walsh & Wencewicz, 2014).

Comportamiento de las bacterias intracelulares y la actividad de los antibióticos

Las bacterias intracelulares se definen por su capacidad de sobrevivir y vivir dentro de células eucariotas hospedadoras. Como resultado, han desarrollado diversas estrategias de supervivencia. Estas bacterias son responsables de gran morbilidad y mortalidad en el mundo y son difíciles de eliminar con ciertos antibióticos. La principal barrera al tratamiento antibiótico contra las bacterias intracelulares es la diferencia entre la localización de los antibióticos dentro de los compartimentos celulares de las células infectadas y la localización de las bacterias (McOrist, 2000). El tratamiento de las infecciones bacterianas es cada vez más complicado además por la capacidad de las bacterias para desarrollar resistencia a diferentes antibióticos. Esta resistencia puede ser causada por una variedad de mecanismos: (i) la presencia de una enzima que inactiva el agente antimicrobiano; (ii) una mutación en la diana del antimicrobiano que reduce su capacidad de unión; (iii) modificaciones post-transcripcionales y post-traduccionales en la diana del antibiótico, lo que reduce su capacidad de unión; (iv) reducción en la absorción del compuesto; y (v) su expulsión activa del a través de bombas de expulsión (Fluit *et al.*, 2001). En particular las bacterias pueden desarrollar resistencia a los antibióticos a través dos procesos genéticos: (i) intercambio de genes entre cepas y especies (transferencia horizontal) y (ii) mutación y selección (transferencia vertical de genes). En bacterias intracelulares, la resistencia a antibióticos se debe principalmente a mutaciones espontáneas o múltiples mutaciones en el genoma bacteriano, es decir, la transferencia vertical de genes. Por ejemplo, en *M. tuberculosis*, todos los determinantes de resistencia a fármacos son codificados a nivel cromosomal, surgidos exclusivamente a través de la adquisición y mantenimiento de mutaciones cromosómicas espontáneas en genes diana o genes complementarios (Ramaswamy & Musser, 1998). Como se mencionó anteriormente, la localización intracelular de algunas bacterias continúa siendo el punto crítico del fracaso de algunos tratamientos con antibióticos en huéspedes infectados. Existen cuatro mecanismos para explicar la supervivencia de bacterias intracelulares. Brevemente: (a) supervivencia en el citoplasma después de la salida de un compartimento endosomal con o sin fusión de la vacuola con los lisosomas (por ejemplo, *Rickettsia*, *Shigella* y *Listeria*); (b) supervivencia en fagosomas no fusionados (*Bartonella*, *Brucella* y *Legionella*); (c) supervivencia en fagosomas fusionados (*Clamidia*); y (d) supervivencia en fagolisosomas fusionados (por ejemplo, *Coxiella*,

Tropheryma y *Francisella*). La actividad de los antibióticos contra las bacterias intracelulares depende de varios factores, incluyendo las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de los antibióticos. En primer lugar los antibióticos deben llegar al tejido correspondiente donde se encuentran las células infectadas, a través de la vía sistémica. En segundo lugar, los antibióticos deben llegar y concentrarse dentro de compartimentos intracelulares. La relación entre la concentración intracelular/extracelular (I/E) es un factor muy importante y puede ser determinada por varios métodos, incluyendo radiometría, fluorometría y técnicas químicas. Y por último, en tercer lugar, los antibióticos deben permanecer activos dentro del compartimento celular al que están dirigidos, sin sufrir inactivación por metabolismo celular y/o efecto deletéreo de pH. Algunos antibióticos son más eficaces a valores de pH neutro o básico (como las fluoroquinolonas), pero otros (por ejemplo, rifampicina) son más eficaces a valores de pH ácidos (Jean-Marc Rolain, 2003).

En comparación con otras bacterias Gram-negativas, *Brucella* muestra una membrana externa con una mayor permeabilidad a los compuestos hidrófobos (Martinez de Tejada *et al.*, 1995). Esta característica se ha asociado a las propiedades de su lipopolisacárido, que permite la exposición de parches hidrófobos. La permeabilidad elevada a moléculas hidrofóbicas de la membrana externa de *Brucella* hace que las bombas de expulsión sean particularmente relevantes para la supervivencia dentro del huésped (Posadas *et al.*, 2007). Esto fue descrito mediante el perfil de resistencia de *B. suis* el cual indica que posee dos bombas de expulsión del tipo RND funcionales capaces de excluir antibióticos, incluyendo tetraciclina, doxiciclina y fluoroquinolonas. Dichos sistemas de expulsión podrían contribuir a su virulencia (Martin, Posadas, *et al.*, 2009).

Determinación de la estructura de proteína por cristalografía de rayos X

La cristalografía de rayos X es esencialmente como una forma de microscopía de muy alta resolución. Permite visualizar la estructura de macromoléculas a nivel atómico e incrementar nuestro conocimiento del funcionamiento de las proteínas. Específicamente podemos estudiar cómo las proteínas interactúan con otras moléculas, sus cambios conformacionales, y en el caso de las enzimas, la forma en que realizan su actividad catalítica. Con toda esta información podemos diseñar nuevos fármacos dirigidos a una proteína en particular, o racionalmente construir una enzima para un proceso industrial específico.

Para ver proteínas en detalle atómico se requiere aplicar el fenómeno físico de difracción, el cual ocurre únicamente si la separación entre los objetos difractantes es del mismo orden que la longitud de onda de la radiación electromagnética utilizada. Como el objetivo es determinar

las posiciones atómicas (cuyas distancias típicas de enlace se hallan entre 1 y 2 Å), tenemos que trabajar con radiación electromagnética de esa longitud de onda, la cual corresponde a los llamados rayos X del espectro electromagnético.

La difracción de una sola molécula sería demasiado débil para ser medible. Por lo tanto para magnificar la señal se necesita utilizar una matriz tridimensional ordenada de moléculas, es decir, un cristal. Un pequeño cristal de proteína puede contener mil millones de moléculas. Si el orden interno del cristal es pobre, entonces los rayos X no difractarán con resolución alta y los datos no producirán una estructura detallada. Si el cristal está bien ordenado, entonces la difracción será medible en alta resolución y resultará una estructura con gran detalle. Los rayos X son difractados por los electrones de la materia y en consecuencia el resultado de un experimento de rayos X es un mapa de 3 dimensiones que muestra la distribución electrónica en la estructura.

Un cristal se comporta como una cuadrícula de difracción tridimensional, lo que da lugar a ambos tipos de interferencia en el patrón de difracción: constructiva y destructiva. En el detector se muestran una serie de puntos discretos que se conocen como reflexiones (interferencia constructiva). Cada reflexión contiene información sobre todos los átomos en la estructura y a la inversa, cada átomo contribuye a la intensidad de cada reflexión. Como sucede con todas las formas de radiación electromagnética, los rayos X tienen propiedades de onda, es decir, tienen una amplitud y una fase. Ambos parámetros son necesarios para combinar un patrón de difracción para cada reflexión. Lamentablemente, sólo las amplitudes pueden ser registradas experimentalmente y toda la información de las fases se pierde. Esto se conoce como "el problema de las fases". Cuando los cristalógrafos dicen que han resuelto una estructura, significa que se ha resuelto "el problema de las fases". En otras palabras, que han obtenido la información de fase suficiente para permitir un mapa de densidad electrónica interpretable para ser calculada.

Preparación de la Proteína

En primer lugar es necesario obtener la proteína con la máxima pureza posible. Esta puede lograrse por su aislamiento desde su fuente natural o por el clonado del gen en un sistema de sobre expresión. Luego para proceder con la cristalización, la muestra necesita ser evaluada para determinar su aptitud. Los criterios que se evalúan son la pureza, homogeneidad, estabilidad, solubilidad, correcto plegamiento, que se trate de una muestra monodispersa, sin agregados, y que mantenga su actividad. Si la muestra falla en uno o más de los criterios, será necesario volver a revisar los protocolos de expresión y purificación, y eventualmente intentar

algo diferente o adicionar pasos de purificación. Antes de comenzar los ensayos, la muestra necesita ser concentrada hasta unos 10 mg/ml aproximadamente y transferida a una solución con la menor fuerza iónica y capacidad buffer posible que mantenga su estabilidad. Existen numerosos métodos para cristalizar proteínas. El método de difusión de vapor por gota colgante, el cual fue utilizado en este trabajo, se trata de la mezcla en volúmenes iguales de una solución precipitante y una muestra concentrada de proteína. Esta mezcla se coloca en un cubreobjeto siliconizado el cual es invertido sobre un reservorio que contiene más solución precipitante, y se sella. Al comienzo, la concentración de precipitante en la gota es la mitad de la que hay en el reservorio. Luego, las soluciones se equilibran por medio de difusión hacia la fase vapor. Brevemente, la gota pierde agua en forma de vapor la cual se dirige al reservorio hasta que la concentración de precipitante se iguala a la del reservorio, o más formalmente hablando, hasta igualación de potenciales químicos del agua en la gota y el reservorio. En algún punto la solución de proteína se vuelve sobresaturada e impulsa a la proteína salir de la solución en forma de cristales.

Análisis de los Cristales

Una vez que tenemos los cristales, se los debe incidir con rayos X. El cristal debe ser montado ya sea en un capilar a temperatura ambiente o en un bucle de nylon y enfriado a 100 K (el método más utilizado actualmente), y luego conectado a un dispositivo llamado cabeza goniométrica que permite que la muestra sea alineada con precisión en la trayectoria del haz de rayos X. Para la colección criogénica de datos, una corriente de nitrógeno gaseoso mantiene el cristal a 100 K durante todo el experimento. Los rayos X emergen de un dispositivo estrecho llamado colimador e inciden al cristal para producir un patrón de difracción. Esto se registra en el detector de rayos X. En las condiciones correctas se debería ver una cuadrícula de puntos claros y nítidos. Lo ideal sería que el cristal difracte al menos a 3 Å de resolución. La colección de datos de alta resolución se realiza muchas veces a partir de mediciones generadas en un sincrotrón, donde los rayos X son de muy alta intensidad en comparación con los equipos de rayos X clásicos de laboratorio.

Resolución de la estructura

Con el fin de visualizar la estructura es necesario resolver el problema de las fases, es decir, obtener alguna información del valor de las mismas. Existen tres métodos para la determinación de la estructura de proteínas. Si ya existen las coordenadas de una proteína

similar se puede tratar de resolver la estructura mediante uno de estos métodos denominado Reemplazo Molecular (el cual fue el utilizado en esta Tesis). Éste consiste en tomar un modelo conocido homólogo a la estructura problema, girarlo y trasladarlo al nuevo sistema cristalino hasta lograr una buena coincidencia con los datos experimentales. En caso de tener éxito, se podrán extraer las amplitudes y fases de esta solución previa y luego combinarlas con los datos nuevos para producir un mapa de densidad electrónica. Esto se logra utilizando una síntesis de Fourier. Los otros dos métodos para resolver la estructura son Reemplazo isomorfo y Dispersión anómala.

Construcción del modelo

En este proceso se interpreta el mapa de densidad electrónica en términos de un conjunto de coordenadas atómicas. La interpretación se facilita en el caso de reemplazo molecular porque ya se cuenta con un conjunto de coordenadas para trabajar. La información con la que se cuenta a esta altura se trata, esencialmente, de un rompecabezas en tres dimensiones cuyas piezas son los residuos aminoacídicos. El procedimiento normal es primero instalar el esqueleto de la proteína y luego, si la resolución lo permite, insertar la secuencia. La cantidad de detalle visible depende de la resolución y la calidad de las fases (Figura I-9). A menudo las regiones de alta flexibilidad no son visibles debido a (i) desorden estático, donde la estructura varía de una molécula a la siguiente dentro del cristal, o (ii) desorden dinámico, donde la región es móvil dentro del cristal. Este último tipo de desorden se erradica en la colección criogénica de datos.

Refinamiento

Una vez que se tiene un modelo preliminar puede refinarse contra los datos experimentales. De este modo se mejoran las fases lo cual se traduce en mapas más claros y por lo tanto en mejores modelos. Normalmente este ciclo se itera varias veces conjuntamente con el modelado manual de la estructura hasta obtener convergencia en los estadísticos del refinamiento, siendo el más utilizado el factor de acuerdo "R". En esta etapa es de esperar un valor de R-factor por debajo del 25%. Esta es una medida de similitud entre el modelo planteado y los datos experimentales, y a menor R-factor mejor es el modelo. Sin embargo, el modelo final debe tener sentido químico y no deben haber grandes regiones de densidad electrónica no asignadas. Para terminar, el modelo final se deposita en el Protein Data Bank en forma de archivo "PDB" para facilitar a toda la comunidad científica el acceso al mismo.

Actualmente la Protein Data Bank posee más de 110000 estructuras de macromoléculas depositadas (datos de Agosto de 2015).

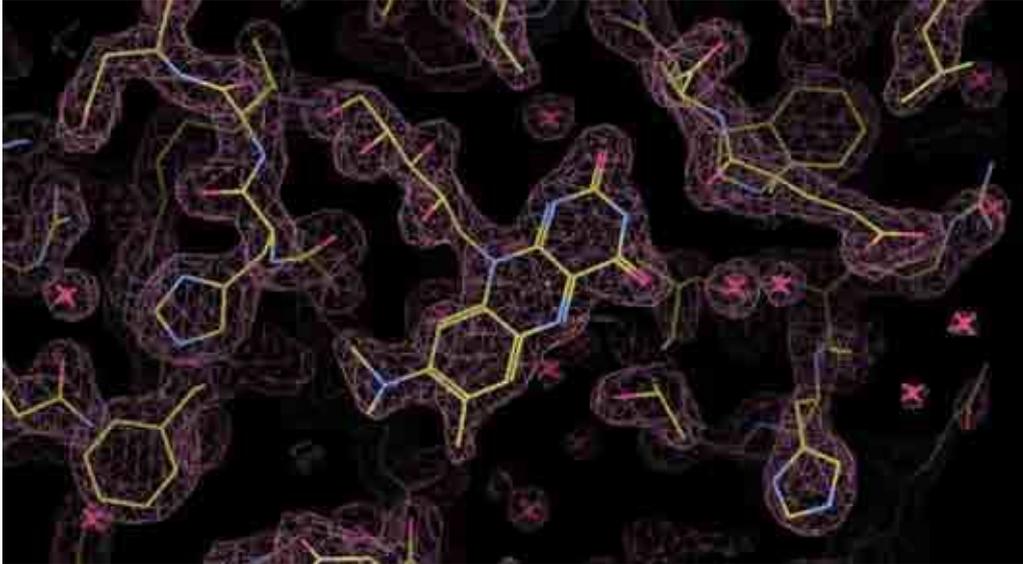


Figura I-9. Mapa de densidad electrónica de alta resolución del complejo RS-roseoflavina (pdb 4G6I).

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Consideramos que el metabolismo de flavinas está implicado en la patogénesis de *Brucella*. Por lo tanto algunas de sus enzimas son blancos interesantes para el desarrollo de nuevos compuestos antibióticos.

Objetivo general

Evaluar la vía biosintética de riboflavina como blancos para quimioterapia contra brucelosis.

Objetivos específicos

- Estudiar el rol de las proteínas NrdR y NusB en la regulación del operón *rib*.
- Explorar la búsqueda de compuestos inhibitorios contra RS y LS de *B. abortus* por medio del análisis de una mini biblioteca de compuestos diseñados para LSs de otros microorganismos.
- Determinar la estructura cristalográfica de RS de *B. abortus*.
- Describir la arquitectura del sitio activo de RS por medio de soaking y co-cristalización de ligando.
- Estudiar del mecanismo cinético de RS.
- Generar de información estructural para el diseño racional de inhibidores para RS.
- Estudiar bibliotecas de compuestos por medio de High Throughput Screening en busca de posible actividad inhibitoria contra RS de *B. abortus*.
- Estudiar la actividad *in vivo* sobre *B. abortus* de los compuestos obtenidos por HTS y su relación estructura-función.

Resultados

Capítulo 1

Estudio del rol de las proteínas NrdR y NusB en la regulación del operón *rib*

Como fue mencionado en la introducción, algo que distingue a *Brucella* de otros patógenos es que no se han descrito factores de virulencia clásicos capaces de dañar directamente a las células eucariotas, como son las exotoxinas. Sin embargo, a pesar de esto, posee una batería de mecanismos fisiológicos y adaptaciones metabólicas que, en definitiva, son los que le permiten sortear las defensas del hospedador y adaptarse a la vida intracelular. Fundamentando esto, investigaciones previas en nuestro laboratorio han demostrado la relación entre el metabolismo de flavinas y la patogénesis de *B. abortus* (Bonomi *et al.*, 2010). En esta sección nos proponemos elucidar los detalles de regulación de la vía metabólica de la riboflavina en *B. abortus*.

Organización genómica del operón *rib* de *B. abortus*

Como fue descrito en la Introducción, el genoma de *B. abortus* conserva dos genes para la lumazina sintetasa: *ribH1* y *ribH2*. Por un lado, *ribH2* se encuentra codificada de manera monocistrónica en el cromosoma II, bajo la regulación de un riboswitch tipo RFN en la región 5' no codificante que es capaz de unir flavinas reprimiendo la transcripción o traducción de los genes. Por otro lado *ribH1* se encuentra codificado en el cromosoma I, bajo la organización del operón putativo para la biosíntesis de riboflavina: operón *rib*. El operón *rib* contiene además a *ribD*, *ribE* flanqueados por los genes reguladores *nrdR* y *nusB* en los extremos 5' y 3', respectivamente (Figura 1-5). En *E. coli*, *NrdR* está caracterizado como un represor transcripcional de los genes que codifican las ribonucleótido reductasas, mientras que *NusB* es un antiterminador de la transcripción (Rodionov & Gelfand, 2005).

Con esta información de base se inició el estudio de la regulación de *ribH1* mediante el análisis de la organización transcripcional de los genes para la biosíntesis de riboflavina en el cromosoma I. Para abordar este objetivo fue planteado identificar la expresión policistrónica de los genes *nrdR*, *ribD*, *ribE*, *ribH1* y *nusB* mediante la amplificación de las regiones intergénicas. Con referencia a lo mencionado se realizó una RT-PCR a partir de ARN total obtenido a partir de la cepa de *B. abortus* salvaje cultivada en medio rico TSB. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar mediante PCR estos fragmentos intergénicos utilizando como molde el ADNc producto. En la figura 1-3 se observa la posición de los oligonucleótidos diseñados. Los genes *glyA* y *hppA*, que corresponden a una glicina hidroximetiltransferasa y una pirofosfatasa de membrana translocadora de protones respectivamente, se encontrarían fuera del operón *rib* en las posiciones inmediatamente 5' y 3' próximas y son incluidos en el análisis como control. A partir de las observaciones obtenidas, los resultados confirman que los genes *ribD*, *ribE*, *ribH1* junto con los genes reguladores

putativos *nusB* y *nrdR* se encuentran en la misma unidad transcripcional en *B. abortus* (Figura 1-1).

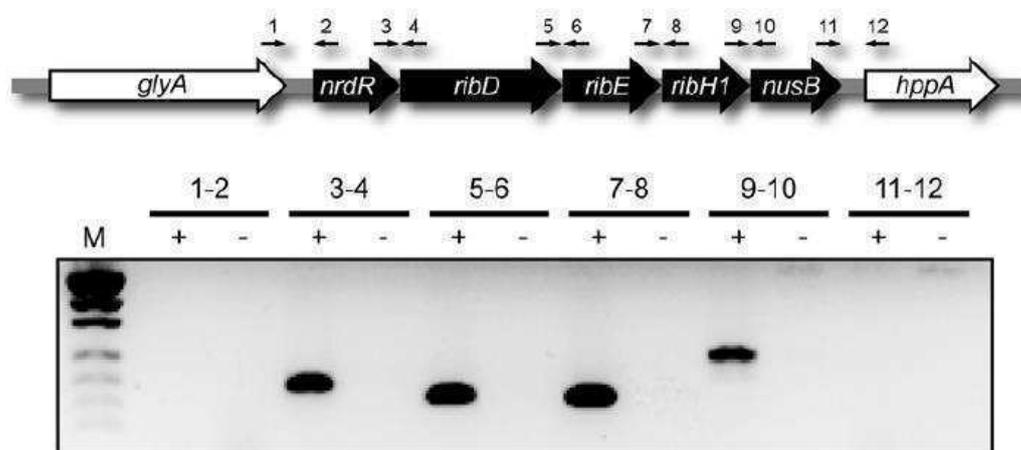


Figura 1-1. Los genes que conforman el operón *rib* en *B. abortus*. Se realizaron 6 RT-PCRs con los juegos de oligonucleótidos que se muestran en la figura amplificando las regiones intergénicas. El templado control sin la RT se incluyó para descartar contaminaciones con ADN genómico.

Regulación del gen *ribH1*

Estudios previos sobre el perfil de expresión y regulación de *ribH2* fueron realizados por el Dr. Hernán Bonomi, integrante del laboratorio del Dr. Fernando Goldbaum, cuyos detalles fueron desarrollados en la Introducción. A partir de esta información se continuó con la investigación de la regulación del gen *ribH1*. El gen *nusB* fue clonado en el plásmido pBBR1MCS de expresión en *Brucella* (pBBR1-*nusB*) bajo el promotor *Plac*. Este plásmido fue transformado en la cepa silvestre de *B. abortus* generando la cepa sobreexpresante de NusB. Recordando que NusB es una proteína que junto a otras proteínas Nus actúa como anti-terminador de la transcripción descrito en *E. coli*, postulamos en base a esta función que la sobreexpresión de NusB podría traer aparejado un aumento en la expresión de RibH1, sin modificar la expresión de RibH2. Para confirmar esta idea se midieron por Western Blot los niveles de las proteínas RibH en ambas cepas de *B. abortus*, silvestre y en la transformada con pBB1-*nusB*. Midiendo la densidad relativa de las bandas en los Western Blots, los resultados obtenidos indicaron que la cepa que sobreexpresa NusB presentó niveles de proteína RibH1 superiores en un 50% a los de cepa control silvestre (Figura 1-2). La expresión de RibH2, sin embargo, no se observó afectada.

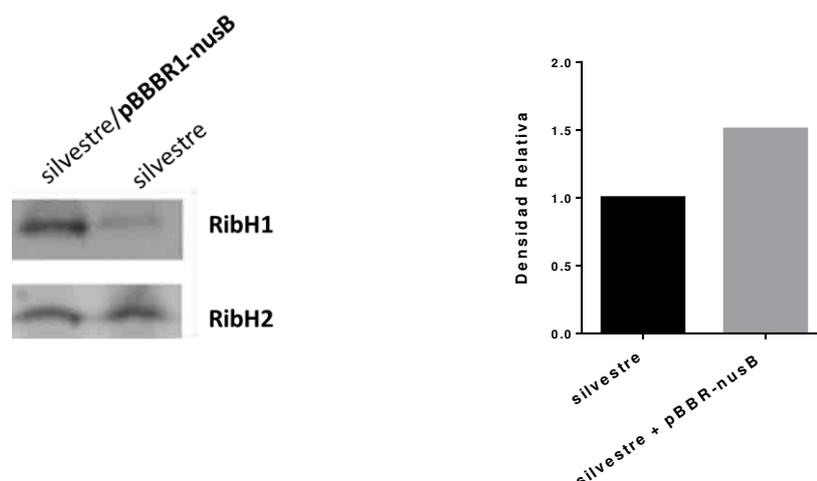


Figura 1-2. Análisis de la expresión de las proteínas RibH ante la sobreexpresión de NusB en *B. abortus*. El gen *nusB* fue introducido en *B. abortus* silvestre y la expresión de las proteínas RibH fue analizada por Western blot (izquierda). Se grafica la densidad de los pixeles correspondiente al área de las bandas medidas con el programa ImageJ 1.43 y relativizadas a los niveles silvestres para RibH1.

Asimismo se evaluó una posible regulación entrelazada mediada por las actividades de las proteínas RibH1 y RibH2. Para ello se trabajó con las cepas de *B. abortus* deficientes y sobreexpresantes de *ribH1* y *ribH2*, y se detectó por Western blot la proteína RibH2. El resultado demostró que el nivel de expresión de RibH2 no se ve afectado por la expresión de su paróloga RibH1. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el Dr. Víctor García Angulo y el Dr. Hernán Bonomi (Figura 1-3)



Figura 1-3. Western blot contra RibH2 de *B. abortus* deficiente ($\Delta ribH1$) y sobreexpresante (pBBR1-*ribH1*) de *ribH1*.

El paso siguiente fue sobreexpresar *NrdR* en *B. abortus*, para lo cual se procedió del mismo modo que lo realizado con el gen *nusB*. El gen completo de *nrdR* fue amplificado y se introdujo en un plásmido replicativo pBBR1MCS-1 en el mismo sentido y bajo el control del promotor *Plac*. Sin embargo, después de varias tentativas y cambios metodológicos no se pudieron obtener bacterias transformantes positivas. En respuesta, suponiendo que el producto de la

clonación podría resultar tóxico para la bacteria, se comenzó a utilizar el medio de cultivo no inductor MDAG, (el cual reduce al mínimo la expresión del gen clonado y resulta ideal para aquellos cuya expresión es altamente tóxica (Studier, 2005)) y otro con menor concentración de sales 2XYT. También se sustituyó el plásmido por dos otras alternativas: pGem-T-Easy y pBluescript II KS; se probaron diferentes cepas competentes (XL1-Blue y Top10) y método de transformación (electroporación y por shock térmico). Pese a todas estas pruebas, no fue posible obtener el clon *nrdR* hasta el momento.

Cepas de *B. abortus* mutantes en *nrdR* y *nusB*

Para estudiar el efecto de *nrdR* y *nusB* sobre la regulación del metabolismo de riboflavina en *B. abortus* se intentó generar las cepas mutantes. Se recurrió a la estrategia de la delección cromosomal de ambos genes ya que éstos están ubicados en un operón, y una delección genera una mutación no polar dejando el resto del operón intacto. Brevemente, dos fragmentos de PCR se generaron a partir de las regiones adyacentes a los ORFs de *nrdR* y *nusB*. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de aproximadamente 0,6 kb incluyendo los primeros 10 codones de ambos genes y otro par de oligonucleótidos distintos para amplificar un fragmento de similar tamaño incluyendo los últimos 10 codones de dichos genes. Ambos fragmentos, los cuales contenían regiones complementarias, fueron ligados por medio de PCR recombinante utilizando el oligonucleótidos forward del primer segmento y el reverse del segundo segmento (ver materiales y métodos para mayor detalle). Los fragmentos resultantes que contenían los alelos delecionados de *nrdR* y *nusB* se clonaron en diversos plásmidos (ver tabla 1-1). Lamentablemente, no se lograron obtener cepas de *B. abortus* recombinantes con ninguna de las construcciones descritas. Una nueva estrategia fue establecida en el caso de *nusB*, generando la cepa mutante por medio de una interrupción de su marco abierto de lectura mediante la inserción de un cassette de resistencia a kanamicina. Esta estrategia fue elegida en base a que el uso de cassettes de resistencia a antibióticos facilita mucho la obtención de mutantes, y teniendo en cuenta que *nusB* se encuentra al final del operón *rib*, una inserción del cassette Km^R no afectaría a los genes involucrados en el metabolismo de flavinas que se encuentran río arriba. No obstante, a pesar de las numerosas estrategias de transformación y recuperación utilizadas, no fue posible obtener las cepas mutantes de *B. abortus*. Asumimos problemas en los plásmidos especializados en la movilización génica dentro en *B. abortus*. Dicho plásmido contenía un gen suicida *sacB*, el cual codifica para la Levansucrasa de *B. subtilis* e induce letalidad frente a la exposición a 5-10% (p/v) sacarosa en el medio de cultivo. Observamos que este gen sufría pérdida de actividad

ante circunstancias que no logramos reconocer. En la Tabla 1-1 se detallan los plásmidos contruidos durante este trabajo.

Construcción	Vector	Resistencia	Origen
pBBR-nusBc	pBBR1MCS-1	Amp	Esta tesis
pBlue-nusBm	pBluescript II KS	Amp	Esta tesis
pBlue-nrdRm	pBluescript II KS	Amp	Esta tesis
pGEM-TSacB-nrdRm	pGEM-T Easy	Amp	Esta tesis
pGEM-TSacB-nusBm:Km ^r	pGEM-T Easy	Amp	Esta tesis
pBlueSacB-nusBm	pBluescript II KS	Amp	Esta tesis
pBlueSacB-nrdRm	pBluescript II KS	Amp	Esta tesis
pK18mobSacB-nusBm	pK18mobSacB	Km	Esta tesis
pK18mobSacB-nrdRm	pK18mobSacB	Km	Esta tesis

Tabla 1-1. Lista de plásmidos utilizados en esta sección.

En resumen, ya contábamos con la información de que la expresión de RibH2 está regulada negativamente por riboflavina y FMN a partir del riboswitch. Sin embargo, la expresión de RibH2 no se ve afectada por estos factores. Por lo tanto sugerimos una regulación diferencial de los genes *ribH*. En función de esto primero nos enfocamos en el operón *rib* descrito a nivel bioinformático, que contiene al gen *ribH1*. Demostramos que los genes contenidos en este módulo genómico: *nrdR*, *ribD*, *ribE*, *ribH* y *nusB*, se expresan en una misma unidad transcripcional formando un verdadero operón (Figura 1-1). Por otro lado, la sobreexpresión de *nusB*, el último gen dentro del operón *rib*, en *B. abortus* provoca un incremento de RibH1, pero no de RibH2 (Figura 1-2). Esto sugiere que NusB estaría actuando como un regulador positivo de la transcripción de *ribH1*. Aún no logramos obtener la cepa sobreexpresante de NrdR, la cual nos daría información acerca de su posible papel como regulador negativo de la transcripción del operón *rib*. Por otro lado, el estudio de la regulación cruzada entre RibH2 y RibH1 demostró que estas enzimas no ejercen un efecto sobre la expresión de la otra (Figura 1-3). Lamentablemente, por dificultades experimentales no fue posible obtener las mutantes para los genes *nrdR* y *nusB*. Dichas construcciones permitirían confirmar concluyentemente su relación con la regulación del operón *rib*.

Capítulo 2

Estudio de inhibidores enzimáticos contra RS y LS

Durante la introducción fue mencionado que *Brucella*, al igual que numerosos microorganismos, carece de un sistema eficiente de captura de riboflavina y es absolutamente dependientes de la biosíntesis endógena. En contraste, la riboflavina es biosintetizada en microorganismos y plantas, pero no en seres humanos y animales, los cuales deben adquirirla a través de su dieta. Por lo tanto, se espera que los inhibidores de la biosíntesis de riboflavina muestren una citotoxicidad selectiva para estos microorganismos patógenos y no para los hospedadores. A esta observación se suma el hecho que la mayoría de las bacterias patógenas no son capaces de adquirir flavinas desde su entorno de manera eficiente, destacando aún más a la vía biosintética de riboflavina como un interesante blanco para el desarrollo de fármacos (Long *et al.*, 2010).

Como se describe en la figura I-3 de la Introducción, los dos últimos pasos de la biosíntesis de riboflavina constituyen un ejemplo claro de reciclaje celular en donde uno de los dos productos de la enzima RS, la 5-amino-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona (compuesto 1), resulta ser el sustrato de la enzima antecesora, la LS. Por lo tanto, un buen candidato como antimetabolito inhibitorio será el que posea la capacidad de inhibir a estas dos enzimas en forma simultánea, disminuyendo la tendencia al desarrollo de resistencia y ganando efectividad.

Inhibidores enzimáticos

En primera instancia, se estableció una colaboración con los grupos del Dr. Markus Fischer del Instituto de Bioquímica y Química de los Alimentos, Universidad de Hamburgo, Alemania y del Dr. Mark S. Cushman del Departamento de Química Medicinal de la Universidad de Purdue, Indiana, Estados Unidos. Ambos investigadores poseen una vasta experiencia en el diseño y síntesis de inhibidores de las enzimas de metabolismo de la riboflavina de forma racional o masiva. Ellos facilitaron a nuestro grupo una mini biblioteca de catorce compuestos de su propiedad que habían sido analizados como inhibidores de LS y RS de distintos microorganismos *in vitro*.

Características de la mini biblioteca de compuestos

Los catorce compuestos fueron clasificados en cuatro grupos. El grupo I es aquel que surge de (i) el diseño y síntesis de halo-derivados análogos del sustrato 5-amino-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona de la reacción de catálisis de LS (compuestos 1, 2 y 3 de la Figura 2-2) (Chen *et al.*, 2004); y (ii) un high throughput screening de una biblioteca comercial de

100.000 compuestos contra la LS de *S. pombe* (Talukdar *et al.*, 2009). De este último ensayo de high throughput screening surgió un compuesto líder (compuesto 4) cuyo principal atractivo fue, nuevamente, su similitud estructural con el sustrato 5-amino-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona de la LS. Sobre éste compuesto líder se realizaron derivatizaciones químicas y se obtuvieron otros compuestos (no incluidos en esta biblioteca) con actividad inhibitoria *in vitro* optimizada sobre LS de *M. tuberculosis*. En conjunto éstos compuestos suscitaron gran interés debido a que resultaban ser simultáneamente análogos de sustrato de LS y de producto de RS. A razón de esto, los derivados químicos de los compuestos pertenecientes a este primer grupo podrían inhibir ambas enzimas. También fue incluido el compuesto más potente de una serie de derivados sulfurados que fueron muy exitosos sobre LS de *B. subtilis*, *S. pombe* y *M. tuberculosis* y RS de *E. coli* y *M. tuberculosis in vitro* (compuesto 5) (Talukdar *et al.*, 2007) (Figura 2-1). El grupo II de compuestos estuvo integrado por moléculas diseñadas como análogos estables del intermediario de reacción hipotético propuesto para la reacción catalizada por LS (Zhang *et al.*, 2007). Estos compuestos fueron sintetizados y demostraron ser extremadamente potentes contra las LS de *M. tuberculosis*, *Magnaporthe grisea*, *Candida albicans*, y *S. pombe*, con constantes de inhibición del orden nanomolar y subnanomolar (Figura 2-2). El grupo III consiste en compuestos diseñados como análogos de la especie intermediaria de reacción que se genera luego de la eliminación del fosfato en la catálisis de LS (Figura 2-3). Estos compuestos fueron sintetizados y evaluados como inhibidores sobre la LS de *M. tuberculosis*, *B. subtilis* y *S. pombe* y también sobre la RS de *E. coli*. Uno de ellos demostró ser considerablemente potente (valor de K_i 1.3 nM) contra RS de *E. coli* (Zhang *et al.*, 2008). Por último, el grupo IV es el resultado de un screening virtual de más de un millón de compuestos cargados en la base de datos ZINC (Irwin & Shoichet, 2005) sobre la estructura cristalina de la LS de *M. tuberculosis* en complejo con un inhibidor (PDB: 1w19). Se identificó un compuesto líder que resultó tener una potencia en el orden micromolar en los ensayos *in vitro*. Dicho compuesto fue optimizado hasta lograr una fórmula química derivada de benzosulfonamida fostato (Talukdar *et al.*, 2010). Los compuestos 13 y 14 de la biblioteca analizada contra RS y LS de *B. abortus in vitro* corresponden a esta última serie (Figura 2-4). Como característica general, los compuestos de la mini biblioteca poseen constantes de inhibición $-K_i-$ en el orden de 10^{-6} a 10^{-9} M. A esta biblioteca se le adicionaron tres compuestos ya presentes en el laboratorio, que habían resultado de interés en investigaciones previas con LS: (i) 5-nitroso-6-pirimidina-2,4-diona (NORP), el cual es un derivado del sustrato 1 (figura I-5) de la reacción catalizada por LS; (ii) el compuesto Daunomicina, una droga comercial que posee actividad anticancerígena y presenta similitud estructural a la riboflavina; y (iii) la roseoflavina que es el único análogo natural de FMN y

riboflavina que posee actividad antimicrobiana. Es sintetizado por la bacteria del suelo *S. davawensis* (Figura 2-5). En la Tabla 2-1 se detalla la lista de compuestos que constituyen la mini librería y un resumen de sus características químicas.

N°	Nombre	Fórmula Molecular	Masa Molecular (Da)	RoF violadas
1	(E)-6-(2-Hidroxistiril)-5-nitropirimidina-2,4-(1H,3H)-diona	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₅	275,22	0
2	(E)-6-(2-Fluorostiril)-5-nitropirimidina-2,4-(1H,3H)-diona	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₅	277,21	0
3	(E)-6-(4-Nitrostiril)-5-nitropirimidina-2,4-(1H,3H)-diona	C ₁₂ H ₈ N ₄ O ₆	304.22	0
4	5-nitro-6-(((2S,3S,4R)-2,3,4,5- tetra hidroxipentil) amino)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona	C ₉ H ₁₄ N ₄ O ₈	306.08	1
5	5-nitro-4-D-ribitiltiopirimidina-2,6-diona	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₈ S	323,28	1
6	Ácido fosfórico mono-(5-(2,6,8-trioxo-9-(2,3,4,5-tetrahidroxipentil)-1,2,3,6,8,9-hexahidro-purin-7-il)-pentil) ester.	C ₁₅ H ₂₅ N ₄ O ₁₁ P	468.35	2
7	4-(2,6,8-trioxo-9-((2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)-2,3,8,9-tetrahidro-1H-purin-7(6H)-il)butildihidrógenofosfato	C ₁₄ H ₂₃ N ₄ O ₁₁ P	454,1	2
8	3-(2,6,8-trioxo-9-((2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)-2,3,8,9-tetrahidro-1H-purin-7(6H)-il)propildihidrógenofosfato	C ₁₃ H ₂₁ N ₄ O ₁₁ P	440,09	2
9	3-(4,6-dioxo-1-((2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)-4,5,6,7-tetrahidro-1H-pirazolo(3,4-d)pirimidina-3-il)propilhidrógenofosfato	C ₁₃ H ₂₁ N ₄ O ₁₀ P	424,1	2
10	5-((6-cloro-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)amino)-5-oxopentildihidrógenofosfato.	C ₉ H ₁₃ ClN ₃ O ₇ P	341.02	0
11	2-cloro-N-(2,4-dioxo-6-((2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentilamino)-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)acetamida	C ₁₁ H ₁₇ ClN ₄ O ₇	352,08	1
12	N-(2,4-dioxo-6-(((2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)propionamida	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₇	332,13	1
13	3-(2-Oxo-1,2-dihidrobencod)indole-6-sulfonamida)propildihidrógenofosfato.	C ₁₄ H ₁₅ N ₂ O ₇ PS	386.3	0

14	4-(2-Oxo-1,2-dihidrobenzo (cd)indol-6-sulfonamido)butildihidrógenofosfato	$C_{15}H_{17}N_2O_7PS$	400,3	0
15	Roseoflavina	$C_{18}H_{23}N_5O_6$	405,4	2
16	Daunomicina	$C_{27}H_{29}NO_{10}$	527,5	2
17	5-nitroso-6-(((2S,3S,4R)-2,3,4,5-tetrahidroxipentil)amino)pirimidina-2,4(1H,3H)-diona (NORP).	$C_9H_{14}N_4O_7$	290.08	1

Tabla 2-1. Mini biblioteca de compuestos. Se detallan la fórmula química, fórmula molecular, peso molecular y el número de reglas de Lipinski violadas (RoF violadas) por los compuestos.

Analizando las características biofísicas de los compuestos podemos reconocer que la mayoría de ellos cumplen con las reglas de Lipinski, o comúnmente denominado propiedades “drug-like”. Éste último término captura el concepto de que ciertas propiedades de los compuestos son más ventajosas para que se conviertan en productos farmacológicos exitosos. El término se utiliza comúnmente siguiendo el trabajo fundamental de Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001) que fue desarrollado en la Introducción. A partir de ese artículo, el término “drug-like” o “propiedades similares a las drogas” se ha ampliado y ha sido relacionado con todas las propiedades que afectan la absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADME/tox) de moléculas candidatas a fármacos. Las propiedades similares a las drogas son propiedades intrínsecas de las moléculas y es responsabilidad de los químicos medicinales optimizar dichas propiedades farmacológicas.

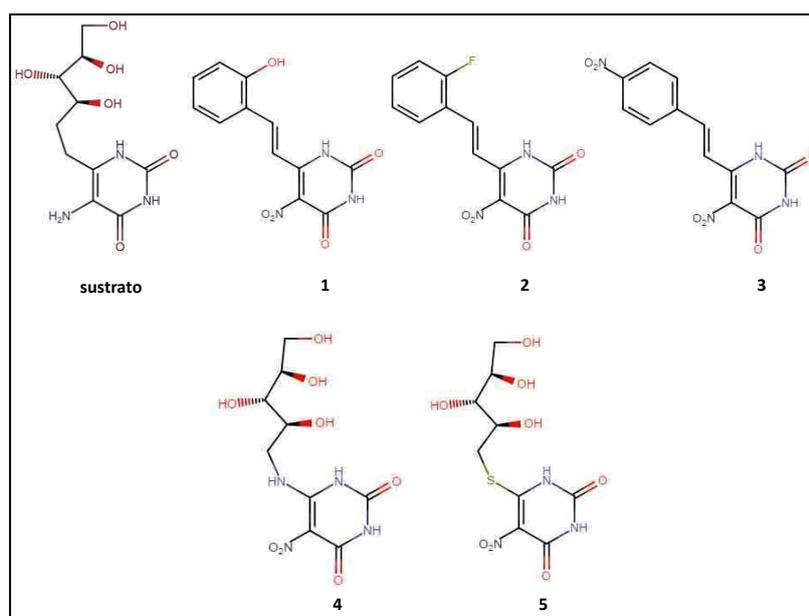


Figura 2-1. Compuestos análogos al sustrato 5-amino-6-(D-ribitilamino) 2,4(1H,3H) pirimidinadi-ona de LS. La numeración corresponde al orden de descripción de los compuestos en la tabla 2-1.

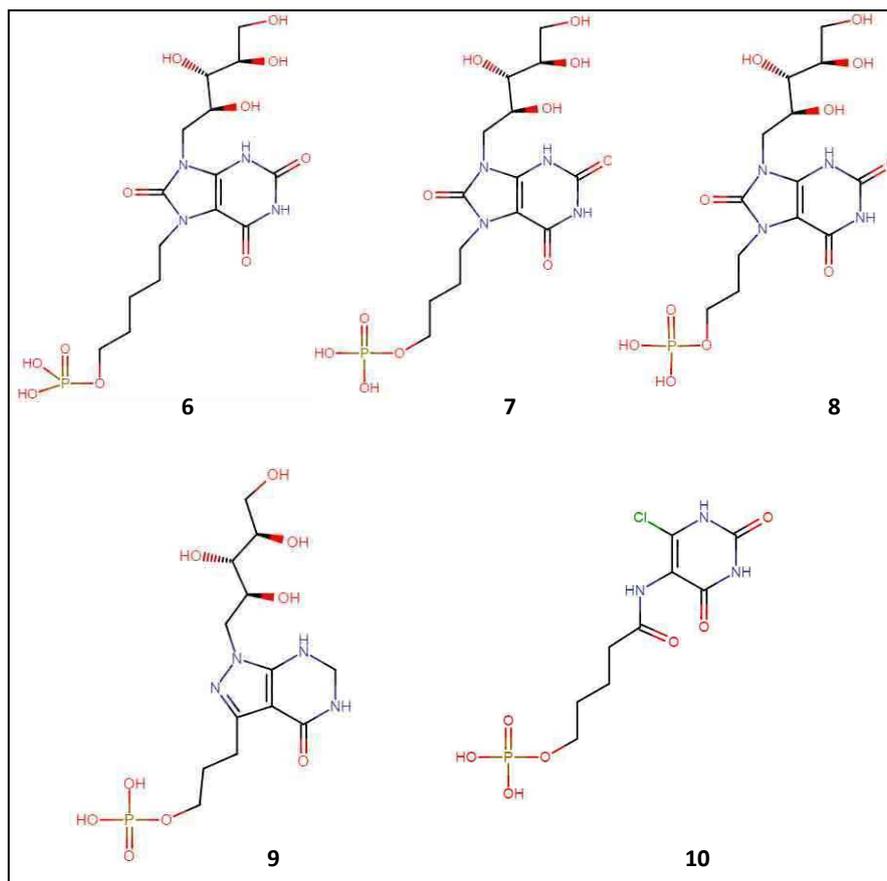


Figura 2-2. Compuestos análogos al estado intermediario de LS. La numeración corresponde al orden de descripción de los compuestos en la tabla 2-1.

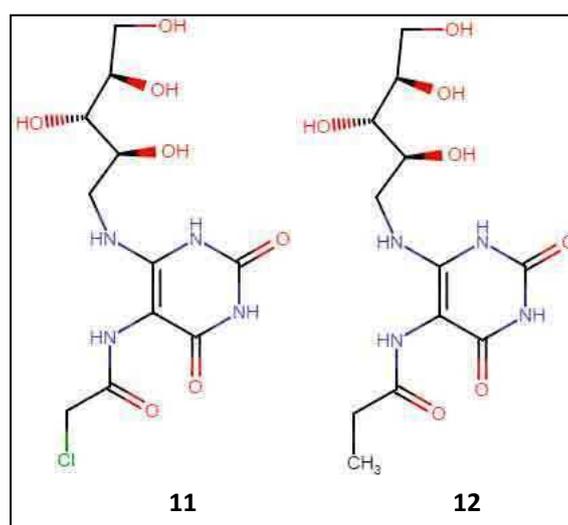


Figura 2-3. Compuestos análogos a la especie intermediaria de LS que se genera luego de la eliminación del fosfato. La numeración corresponde al orden de descripción de los compuestos en la tabla 2-1.

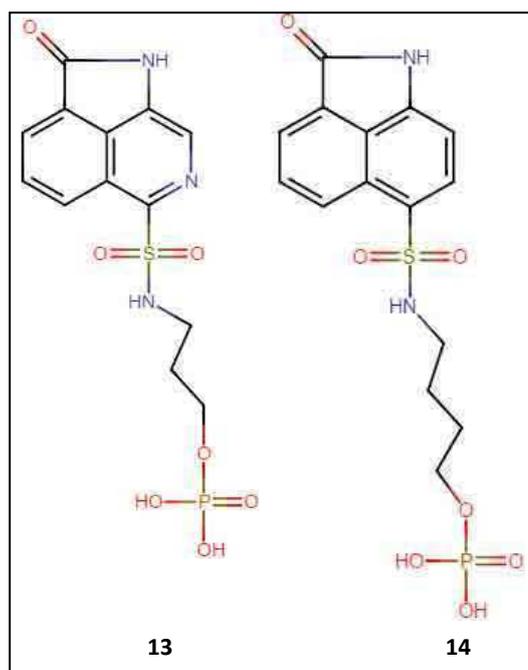


Figura 2-4. Compuestos del tipo dibenzosulfonamida fosfato de 4 átomos de carbono obtenidos de la derivatización de un hit procedente de un ensayo de virtual screening. La numeración corresponde al orden de descripción de los compuestos en la tabla 2-1.

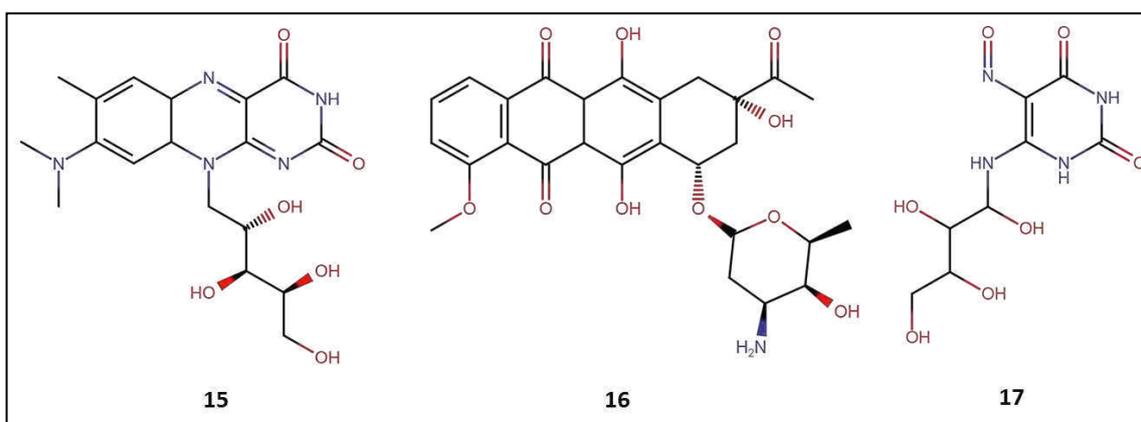


Figura 2-5. Compuestos adicionados a la mini biblioteca de inhibidores de LS y RS de diversos microorganismos. La numeración corresponde al orden de descripción de los compuestos en la tabla 2-1.

Caracterización de la unión de RS de *B. abortus* a riboflavina

En estudios previos en el laboratorio, más precisamente en el trabajo de Tesis de la Dra Vanesa Zylberman: “Estudios estructurales, funcionales y evolutivos de una proteína de *B. abortus* relacionada con la vía biosintética de la riboflavina” se describió en detalle la unión de distintas

moléculas a la LS de *B. abortus*. Entre ellas se encontraban algunos compuestos con potencial inhibitorio y también la riboflavina. El estudio de unión de la riboflavina fue de particular interés puesto que actúa como inhibidor de la RibH2, como fue descrito en el capítulo anterior. Por lo tanto, la riboflavina se comporta como un regulador negativo de su propia biosíntesis. También se había descrito esta unión en *S. pombe* (Chen *et al.*, 2005). Sin embargo, nada se sabía de la naturaleza de la unión de RS con su producto riboflavina. Por esta razón, y como principio necesario para encarar los próximos ensayos de screening, es que se procedió a estudiar el modelo de unión de la RS de *B. abortus* a la riboflavina en solución. Un modo posible de medir y cuantificar la unión de riboflavina a RS es mediante una técnica fluorimétrica. La riboflavina emite fluorescencia a 535 nm cuando es excitada a 470 nm y se espera que su emisión disminuya al interactuar con la proteína. Esta disminución en la señal de fluorescencia es principalmente debida al apagamiento de la emisión producido por la interacción entre el anillo isoaloxazina de la misma y los grupos indol o fenilo de la proteína. Se trabajó con una solución de riboflavina (30 μM) a la cual se le adicionaron cantidades crecientes de proteína y se monitoreó la señal de fluorescencia a 535 nm (correspondiente a la riboflavina libre) (Figura 2-6). Las ecuaciones fueron ajustadas a los datos experimentales usando regresión no lineal. Para el ajuste global se utilizó un procedimiento de mínimos cuadrados. Se observó que a medida que la concentración de proteína crecía, la señal iba disminuyendo, demostrando una unión con RS.

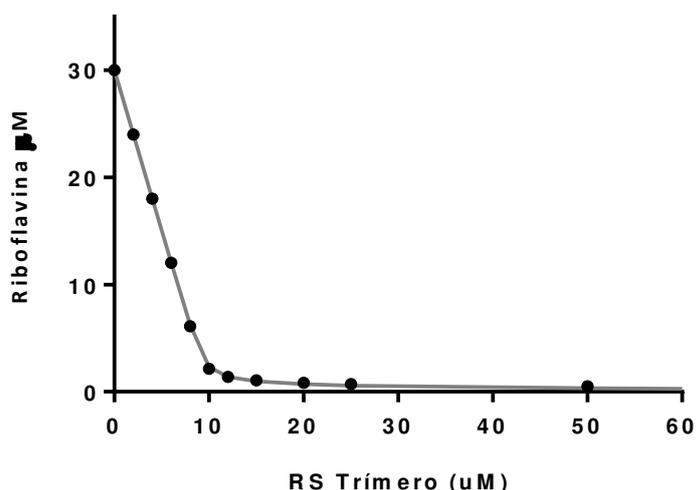


Figura 2-6. Ensayo de unión de la riboflavina a RS. A una muestra de riboflavina (30 μM) se le fue adicionando cantidades crecientes de proteína. Se midió el apagamiento de la señal de emisión de fluorescencia de la riboflavina a 535 nm, utilizando una longitud de onda de excitación de 470 nm.

A partir de los datos experimentales planteamos un modelo de 3 sitios de unión por trímero. El modelo responde a la siguiente fórmula:

$$[R] = Rt - Et \frac{K_{s2} K_{s3} [R] + 2 K_{s3} [R]^2 + 3 [R]^3}{K_s K_{s2} K_{s3} + K_{s2} K_{s3} [R] + K_{s3} [R]^2 + [R]^3} \quad (2.1)$$

Donde [R] representa la concentración de riboflavina libre, Rt y Et representan, respectivamente, las concentraciones totales de riboflavina y de enzima, y K_s, K_{s2} y K_{s3} son las constantes de equilibrio para la disociación de una, dos o tres molécula de riboflavina de los complejos, respectivamente. Los valores de las constantes de equilibrio se detallan en la Tabla 2-2. La obtención del valor de las constantes requiere calcular [R] a partir de la ecuación (2.1), lo cual se hizo a través de un algoritmo iterativo provisto por el programa Solver©, incluido en la planilla de cálculo MS Excel©.

	Valor	Error
K _s (μM)	0.49	2.3 10 ⁻⁵
K _{s2} (μM)	22.9	3.0 10 ⁻³
K _{s3} (μM)	0.22	3.5 10 ⁻⁷

Tabla 2-2. Constantes cinéticas calculadas para el modelo de unión de riboflavina a la RS.

Screening de la mini biblioteca frente a RS y LS *in vitro*

Luego se estudió la capacidad de los compuestos de la mini librería a unirse al sitio catalítico de LS y RS. Para ello los complejos LS-riboflavina y RS-riboflavina fueron formados. Con dichos complejos se emprendieron los ensayos de análisis de unión al sitio activo *in vitro* mediante un *screening* en placa de 96 pocillos con la biblioteca de inhibidores frente a estas dos enzimas. Se utilizó nuevamente una técnica fluorimétrica basada en el principio que la riboflavina libre es fluorescente, sin embargo es “quencheada” al encontrarse unida a la proteína, como fue descrito previamente. Por tanto, aquellos compuestos capaces de unirse competitivamente al sitio activo y desplazar a la riboflavina del mismo causan un incremento de la fluorescencia. Luego de incubar los compuestos con los complejos, este cambio de fluorescencia es el parámetro de medición a tiempo final para identificar moléculas con posible acción inhibitoria sobre la actividad enzimática de RS y LS de *B. abortus*. Los resultados obtenidos pueden observarse en la figura 2-7.

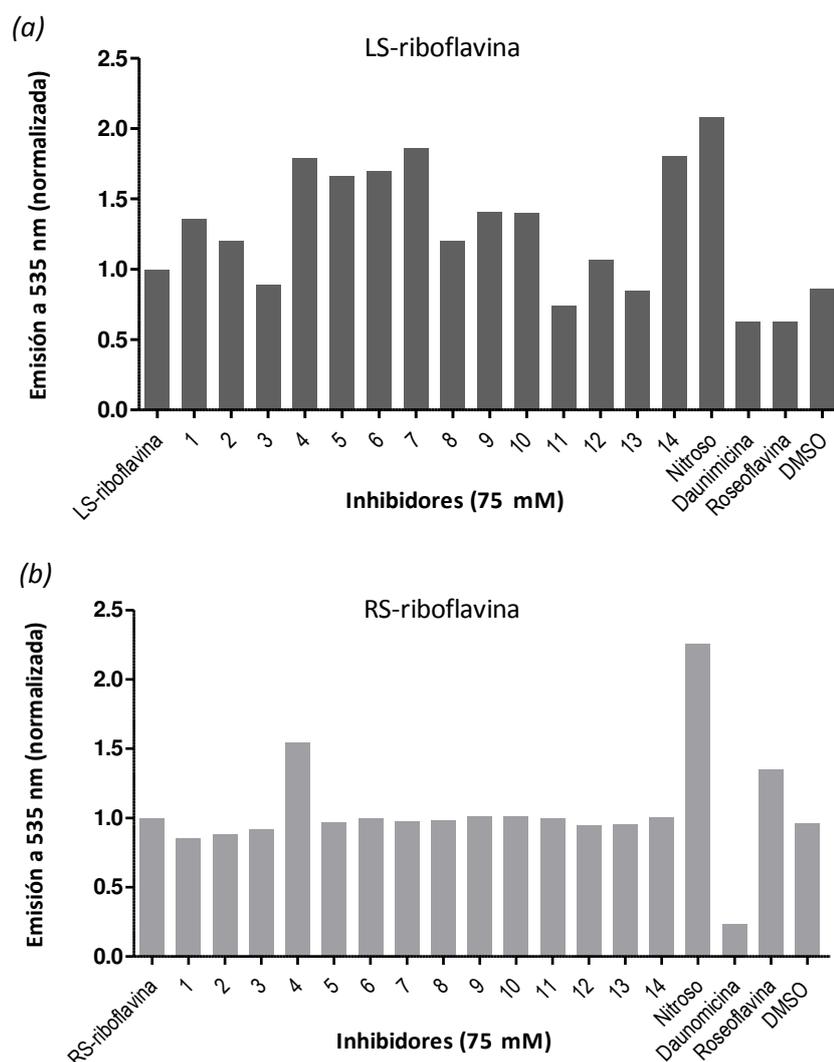


Figura 2-7. Screening de la mini biblioteca de inhibidores sobre los correspondientes complejos LS/RS-riboflavina de *B. abortus*. (a) Se formó el complejo LS-riboflavina y se lo mezcló con soluciones de los diecisiete compuestos de la mini librería. (b) Del mismo modo se realizó el ensayo sobre el complejo RS-riboflavina. Se midió el incremento de la señal de emisión de riboflavina (535 nm, excitación 485 nm).

Advertimos que dos compuestos: el 4 (NRP, 5-nitro-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona) y el NORP (5-nitroso-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona) (Figura 2-8) produjeron incremento de la fluorescencia con ambos complejos enzimáticos, es decir, que habrían sido capaces de desplazar riboflavina del sitio activo. Curiosamente, ambos compuestos resultan familiares para nuestro grupo de investigación, puesto que ya había sido analizada su unión a LS en el trabajo de Tesis de la Dra. Vanesa Zylberman. Éstos compuestos demostraron que efectivamente se unían al sitio activo de LS. Sin embargo, es la primera vez que NRP y NORP son estudiados contra RS. Estos compuestos fueron entonces seleccionados para confirmar su unión al sitio activo de RS y LS mediante ensayos individuales de unión

competitiva. El ensayo se basó en adicionar concentraciones crecientes de estos compuestos al complejo RS y LS-riboflavina y detectar un aumento gradual de fluorescencia a medida que la riboflavina es desplazada utilizando un espectrofluorímetro.

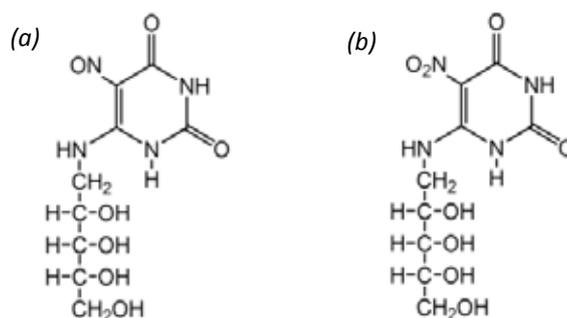


Figura 2-8. Estructura de los compuestos seleccionados del Screening de la mini biblioteca de inhibidores de LS y RS. (a) 5-nitroso-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona (NORP). (b) 5-nitro-6-(D-ribitilamino)-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona (NRP). Ambos corresponden a análogos de sustrato de LS y de producto de RS. La única diferencia entre ambos compuestos es el reemplazo del grupo 5-amino en el sustrato original por un grupo 5-nitroso en *a* y un grupo 5-nitro en *b*.

Observamos que efectivamente la fluorescencia se fue incrementando a medida que los compuestos NRP y NORP no fluorescentes fueron gradualmente agregados a la solución del complejo enzima-riboflavina (Figura 2-9).

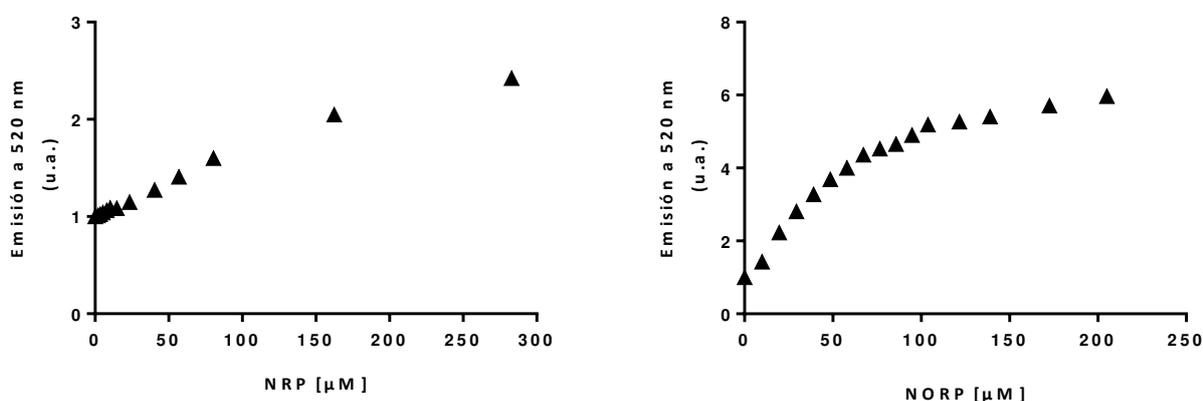


Figura 2-9. Desplazamiento de la unión LS-riboflavina y RS-riboflavina producido por los inhibidores NORP y NRP. Se formaron los complejos LS-riboflavina y RS-riboflavina y luego fueron adicionados los inhibidores en cantidades crecientes. Se midió el aumento de la señal de emisión de riboflavina (520 nm, excitación 445nm) causado por su desplazamiento del sitio activo inducido por la unión competitiva del inhibidor.

Esto demostró que los compuestos desplazaron a la riboflavina del sitio activo. Haciendo un análisis de los resultados obtenidos, los datos fueron interpretados a partir de un modelo

mínimo en el que la enzima une hasta tres moléculas de riboflavina (indicadas como R) y hasta dos moléculas de ligando (L = NRP o NORP), pero donde la suma de las moléculas de riboflavina y de ligando unidas no puede ser mayor que tres. Esto corresponde al siguiente esquema:

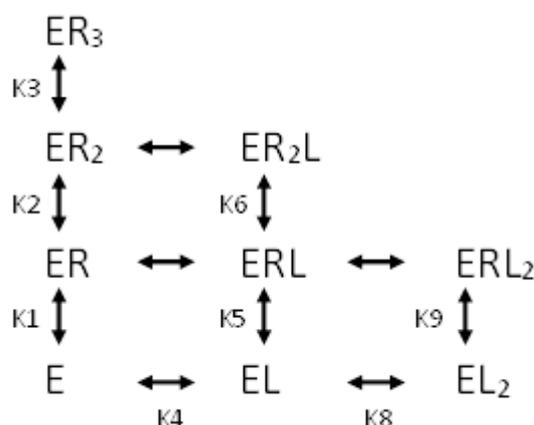


Figura 2-10. Esquema de unión utilizado para los cálculos del modelo de unión en solución del NRP y NORP a la RS de *B. abortus*.

En el esquema, E corresponde a la enzima libre; ER, ER₂ y ER₃ representan las especies sin ligando con una, dos y tres moléculas de riboflavina. Por otro lado, los complejos sólo con ligando como EL y EL₂ que corresponden a la enzima con una y dos moléculas de NRP o NORP, respectivamente. Por último, las especies mixtas ERL y ERL₂ (una molécula de riboflavina + una y dos de ligando), y ER₂L (dos moléculas de riboflavina + una de ligando). Para determinar los valores de las constantes de disociación incluidos en el esquema se requirió la utilización de un algoritmo iterativo en el que se calculó la concentración de cada una de las especies presentes en el equilibrio como:

$$[ER_iL_j] = Et \frac{D_{ij}[R]^i[L]^j}{\sum_{i=0}^3 \sum_{j=0}^2 D_{ij}[R]^i[L]^j}$$

donde [R] es la concentración de riboflavina, [L] la concentración de NRP o NORP, *i* y *j* corresponden respectivamente al número de moléculas de R y L que forman el complejo con la enzima, y los coeficientes *D_{ij}* son la inversa del producto entre constantes de equilibrio de disociación que aparecen en el modelo de la figura 2-10. Cabe aclarar que, si bien las especies ER₃L, ER₂L₂ y ER₃L₂ fueron incluidas en los primeros cálculos, el ajuste obtenido tendió a anular los correspondientes coeficientes, *D₃₁*, *D₂₂* y *D₃₂*, lo cual llevó a despreciar la contribución de

dichas especies y a excluirlas del esquema de la Figura 2-10. Los valores de las constantes de disociación se pueden observar en la tabla 2-3.

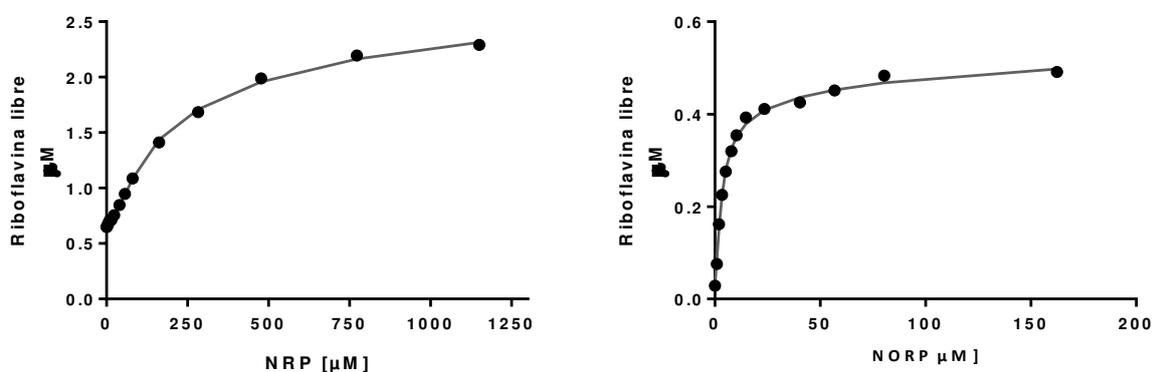


Figura 2-11. Unión del NRP y NORP a la RS de *B. abortus*. Al complejo RS-riboflavina se le adicionaron concentraciones crecientes de NRP o NORP y se midió la riboflavina desplazada por su señal de fluorescencia a 535 nm (excitación 470 nm). La línea continua representa el ajuste por regresión no lineal del modelo de unión de la figura 2-10.

	Valor	Error
NRP		
K_1 (μM)	0.75	0.2
K_2 (μM)	26.7	8.8
K_3 (μM)	0.03	$4.5 \cdot 10^{-3}$
K_4 (μM)	0.03	$2.0 \cdot 10^{-3}$
K_5 (μM)	4656.6	442
K_6 (μM)	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$1.3 \cdot 10^{-5}$
K_8 (μM)	37.4	20.6
K_9 (μM)	0.26	0.1
NORP		
K_1 (μM)	1.0	0.07
K_2 (μM)	$1.9 \cdot 10^{-3}$	$1.4 \cdot 10^{-4}$
K_3 (μM)	352.3	133.7
K_4 (μM)	$3.9 \cdot 10^{-2}$	$2.0 \cdot 10^{-3}$
K_5 (μM)	106.3	13.8
K_6 (μM)	$1.4 \cdot 10^{-3}$	$2.0 \cdot 10^{-4}$
K_8 (μM)	41.5	4.45
K_9 (μM)	0.02	$3.1 \cdot 10^{-3}$

Tabla 2-3. Constantes cinéticas calculadas para el modelo de unión de los ligandos NRP y NORP a la RS, presentado en el modelo de la figura 2-10.

Determinación de la actividad inhibitoria de NRP

Evaluamos la capacidad inhibitoria de NRP sobre la actividad de RS mediante ensayos dosis-respuesta. El ensayo consistió en medir la modificación de la actividad enzimática de RS ante distintas concentraciones de NRP. A partir de este ensayo se calculó su correspondiente CI_{50} (concentración del compuesto que inhibe el 50% de la actividad enzimática). Se utilizó la tecnología LabChip3000 Drug Discovery System (Caliper Life Sciences, Hopkinton, EEUU) cuya descripción metodológica se desarrollará con más detalle en el capítulo 4. Brevemente, la reacción se llevó a cabo en placas de 384 pocillos en los cuales se colocó una mezcla de RS, su sustrato 6,7-dimetil-8-ribitillumazina y concentraciones crecientes de NRP en un rango desde 150 nM a 320 μ M. La reacción se incubó durante 1h a T° y humedad controlada y luego se analizó en el LabChip3000. Se midió la concentración del producto riboflavina y la del sustrato remanente, siguiendo su fluorescencia intrínseca durante la separación electroforética; y se analizó cómo había sido afectada la actividad enzimática de RS por la presencia de NRP en la mezcla de reacción. La actividad enzimática de RS fue inhibida por NRP y la concentración a la cual logró un 50% de inhibición (CI_{50}) fue determinado en $23.8 \pm 1.17 \mu$ M (Figura 2-12).

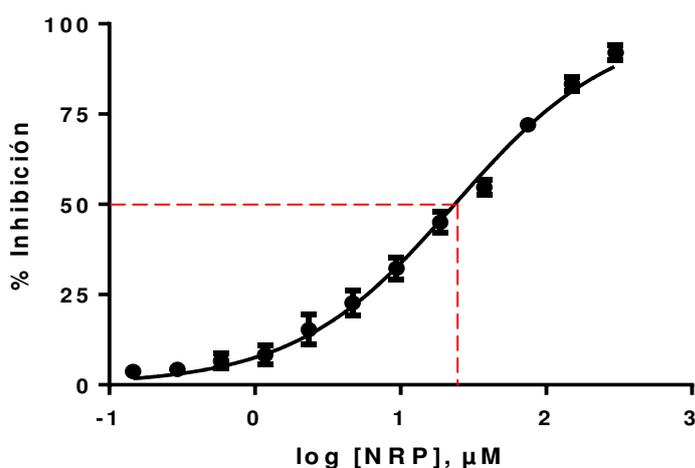


Figura 2-12. Ensayo dosis-respuesta de NRP. Inhibición (%) de formación de riboflavina frente a diferentes concentraciones de NRP. El mix de reacción contenía RS, 6,7-dimetil-8-ribitillumazina, Buffer de Reacción (pH 7.0) y concentraciones variables de NRP en una placa de 384 pocillos. Se midió a punto final por electroforesis microfluídica en LabChip 3000.

En conjunto, estos resultados nos demuestran que NRP es un robusto candidato para continuar con las siguientes etapas de optimización de su estructura química para mejorar sus características “drug-like”.

Screening de la mini biblioteca frente a RS y LS in vivo: ensayo de sensibilidad a las drogas

A continuación se estudió la eficacia de esta mini biblioteca de compuestos sobre el crecimiento de *B. abortus* silvestre, y sobre las cepas mutantes en RibH1 y RibH2. Estas últimas dos cepas se utilizaron para evaluar específicamente cuál de las dos LSs podría ser la afectada. El análisis de un posible efecto citotóxico de la biblioteca de compuestos sobre *B. abortus* fue evaluado a través de un ensayo de difusión en disco. La difusión en disco hace referencia a la difusión que experimenta el agente antimicrobiano bajo análisis a partir de discos que se depositan en un medio de cultivo sólido que ha sido sembrado con *B. abortus*. El método de difusión en disco se basa en la determinación de una zona de inhibición del crecimiento que es proporcional a la sensibilidad de la bacteria frente al antimicrobiano presente en el disco. La difusión de un antimicrobiano en un medio de cultivo inoculado crea un gradiente de la sustancia antimicrobiana. Cuando su concentración llega a ser tan diluida que no logra inhibir el crecimiento de la bacteria, termina la zona de inhibición. Este método es sólo cualitativo y el análisis consistió en inocular sobre placas de TSA una cantidad estandarizada de *B. abortus* silvestre, y las cepas mutantes en RibH1 (μ ribH1) y RibH2 (μ ribH2) de forma uniforme del cual obtuvimos luego de la inoculación un “césped” bacteriano. Posteriormente se colocaron los discos de papel de filtro impregnados con una concentración conocida de los diferentes compuestos. Luego de una incubación de 72h a 28°C no observamos halos de inhibición en ninguna de las cepas ante ninguno de los compuestos (Figura 2-13).



Figura 2-13. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. Se intentó medir el halo de inhibición del crecimiento. Se ensayaron 17 compuestos sobre las cepas silvestre, μ ribH1 y μ ribH2 de *B. abortus*; en TSA y medio mínimo. La concentración final de los inhibidores fue de 1 mM.

Dentro de las posibilidades que podrían contarse como causa del resultado negativo están: que la densidad del inóculo o el medio de cultivo no hayan sido los correctos, problemas con el tiempo o temperatura de incubación, sequedad excesiva del medio de cultivo que

puede conducir a un crecimiento pobre, muy baja capacidad de difusión de los compuestos o que sí se haya producido un halo de inhibición pero demasiado pequeño para ser discriminado. Precisamente para desestimar algunas de estas posibles razones, se realizaron nuevos ensayos de inhibición del crecimiento sobre las cepas mencionadas anteriormente, pero esta vez en medio líquido rico (TSB) y mínimo (GW), donde la superficie de contacto de los compuestos con la bacteria es mucho mayor. El criterio de selección de los compuestos estuvo orientado a analizar aquellos con mayor carácter hidrofóbico, los cuales, en consecuencia presentarían mayor capacidad de penetrar la membrana celular bacteriana. Como resultado seleccionamos 6 compuestos:

- 1: 1-(E)-6-(2-Hidroxistyril)-5-nitropirimidina-2,4-(1H,3H)-diona,
- 2: (E)-6-(2-Fluorostyril)-5-nitropirimidina-2,4-(1H,3H)-diona,
- 3: (E)-6-(4-Nitrostyril)-5-nitropirimidina-2,4-(1H,3H)-diona,
- 13: 3-(2-Oxo-1,2-dihidrobenzo(cd)índole-6-sulfonamido)propildihidrogenfosfato,
- 14: 4-(2-Oxo-1,2-dihidrobenzo(cd)índole-6-sulfonamido)butildihidrogenfosfato,
- 6: Daunomicina.

El experimento procedió a T° controlada y se tomaron muestras del cultivo para medir la DO a las 24 y 48h (Figura 2-14). Lamentablemente, en una primera observación se registraron efectos inhibitorios promisorios pero fue imposible reproducir dichos resultados en los experimentos consecutivos. Variables como la composición de vitaminas y sales del medio de cultivo, el volumen de cultivo y su grado de aireación en base al tamaño del tubo de crecimiento, el agregado o no de Ácido Nalidíxico, la temperatura de incubación, los clones de *Brucella*, la densidad del inóculo inicial, fueron modificadas, entre otros. Sin embargo, los resultados no fueron satisfactorios.

En resumen, utilizamos una mini biblioteca de 17 compuestos de los cuales sólo dos tuvieron la capacidad de ingresar al sitio activo de LS y RS, observado en ensayos de desplazamiento competitivo de la riboflavina *in vitro*. Los 14 compuestos también fueron analizados contra la bacteria completa en difusión en agar, pero no tuvieron efecto. Luego, seis compuestos representativos de la mini biblioteca de mayor hidrofobicidad fueron estudiados *in vivo* en medio de cultivo de *B. abortus*, pero tampoco mostraron actividad.

Como conclusión podemos decir que la mayoría de los compuestos de la mini librería que obtuvimos provenían de screening sobre LS de otros microorganismos, con diversos orígenes tales como screening virtual, diseño racional o screening de compuestos comerciales. Sin embargo, no todos tuvieron efecto sobre la LS de *B. abortus*, y tan sólo dos fueron capaces de ingresar también al sitio activo de RS.

Curiosamente ninguno de los compuestos de la mini librería presentó actividad *in vivo*. Esto ya había sido reportado por los Drs. Fischer y Cushman, proveedores de la mini librería, en sus ensayos *in vivo* sobre otros microorganismos como *B. subtilis*, *E. coli*, *S. pombe* y *M. tuberculosis*. Probablemente esto se deba a que las propiedades fisicoquímicas de los compuestos no tienen características ideales de “drug like” y sean incapaces de atravesar la membrana bacteriana.

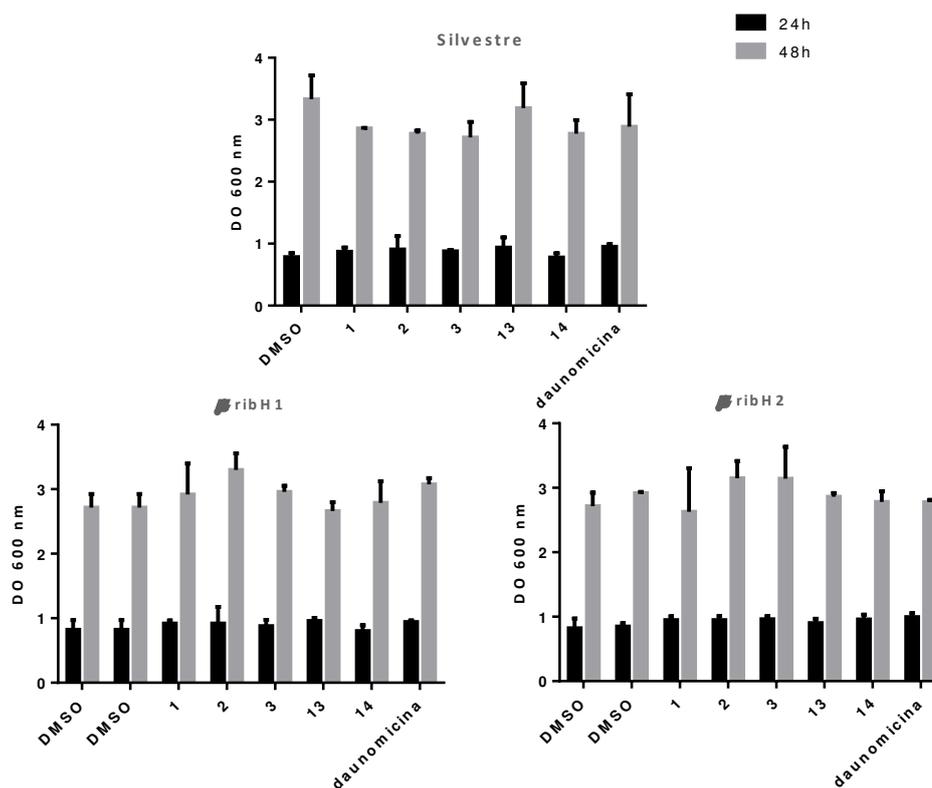


Figura 2-14. Ensayo de inhibición del crecimiento en medio líquido rico de *B. abortus*. Se utilizaron las cepas Silvestre, μ ribH1 y μ ribH2, con una DO inicial de 0,05. La concentración final del inhibidor fue de 150 μ M. Las observaciones se realizaron a las 24 y 48h.

Capítulo 3

Estudio estructural y cinético de RS

Las enzimas de la ruta biosintética de riboflavina en *B. abortus* suscitan un considerable interés como dianas contra la brucelosis (Bonomi *et al.*, 2010). Sus dos enzimas Lumazina Sintasa, nombradas LS y RibH2 en varios trabajos de nuestra grupo, son candidatas importante para el desarrollo de una vacuna recombinante de subunidad contra la brucelosis (Laplagne *et al.*, 2004, Craig *et al.*, 2005) y han sido descritas en detalle desde un punto de vista estructural (Zylberman *et al.*, 2004, Klinke *et al.*, 2005). Por otro lado, RS ha sido propuesta recientemente como un candidato inmunogénico importante también para el desarrollo de una vacuna recombinante de subunidad para esta enfermedad (Yang *et al.*, 2011), pero la información estructural era desconocida hasta el momento.

En consecuencia, los modelos cristalinos presentados en esta tesis corresponden a la segunda vez que una RS trimérica ha sido cristalizada conservando su organización cuaternaria, y la primera vez que un trímero de RS intacto ha sido resuelto en la presencia de ligandos unidos. Los modelos corroboran la flexibilidad existente en la proteína y también se destaca el papel de los ligandos unidos en el ensamblaje del único sitio activo del trímero. Para complementar estos resultados, también se realizaron estudios de binding y cinéticos sobre la enzima.

En general, la información estructural presentada aquí puede ser considerada como un excelente punto de partida para el diseño de inhibidores potentes contra la brucelosis.

Calidad de los modelos cristalográficos

En esta tesis se resolvió la estructura de cuatro variantes de la enzima RS de *B. abortus* por cristalografía de rayos X: (i) proteína apo (RS-APO), y la proteína unida a (ii) el producto de reacción riboflavina (RS-RBF), (iii) el análogo de producto roseoflavina (RS-ROS) y (iv) el análogo de producto NRP (RS-NRP). Todas las estructuras fueron resueltas por el método de reemplazo molecular en el grupo espacial $P2_12_12_1$ como se describe en Materiales y Métodos. Los modelos refinados finales muestran muy buena estereoquímica, con más del 96% de los residuos en la región favorecida del diagrama de Ramachandran (Tabla 1 en Materiales y Métodos).

Las cuatro estructuras son isomorfas y presentan parámetros similares para sus celdas unitarias, mostrando un trímero en sus unidades asimétricas. Los últimos 5-13 residuos C-terminales carecen de densidad electrónica y fueron excluidos de los modelos. Es importante mencionar que las construcciones cristalinas contienen dos residuos artefactuales por clonado y un tag de 6 histidinas en el extremo C-terminal. Con excepción de los rangos anteriormente mencionados, las estructuras RS-RBF y RS-NRP muestran una densidad continua en sus cadenas polipeptídicas sin cortes. Por su parte, el complejo RS-ROS también carece de

densidad en el loop 55-58 de la cadena B, el cual se encuentra expuesto al solvente. Finalmente, la estructura RS-APO presenta regiones desordenadas adicionales: los residuos 55-60 de la cadena A y residuos 16-20, 51-68, 80-85 y 119-121 de la cadena B, que fueron excluidos del modelo cristalográfico. Esto último podría ser causado por una mayor movilidad debido a la ausencia de ligandos unidos. Además de la falta de residuos de la cadena principal, varias cadenas laterales (la mayoría de ellas correspondientes a residuos polares expuestos) no pudieron ser localizadas en la densidad electrónica en ninguna de las cuatro estructuras. En estos casos, los residuos fueron modelados solamente hasta el carbono β . En los modelos complejados se observó densidad electrónica para todas las moléculas de ligando, lo que permitió su modelado en la posición y conformación correctas. Curiosamente, un número diferente de moléculas de ligando se encontró en cada caso. Específicamente, una sola molécula de riboflavina se encontró en el trímero RS-RBF, mientras que cuatro moléculas de roseoflavina fueron modeladas en RS-ROS y seis moléculas de NRP en el complejo RS-NRP. Cuando se superponen entre ellas las 3 estructuras triméricas unidas a ligandos, se observan valores de r.m.s.d (error cuadrático medio) entre 0,34 y 0,65 Å para aproximadamente 600 C $^{\alpha}$ alineados, lo que demuestra el alto nivel de similitud entre los complejos. Sin embargo, estos valores se elevan a un promedio de 1.30 Å cuando se superponen las estructuras con ligando contra la estructura RS-APO. Esto es consecuencia de la orientación ligeramente distinta de la cadena A en la estructura apo, como se explica en detalle a continuación.

Descripción estructural de RS

RS de *B. abortus* se dispone como un trímero asimétrico con dimensiones aproximadas de 70 x 65 x 65 Å (Figura 3-2a). La estructura cuaternaria observada en los cristales coincide con la que se observa en solución. En este sentido, el peso molecular calculado a través de dispersión de luz estática dio un valor de 66 ± 4 kDa tanto en presencia como en ausencia de ligandos unidos. Este valor concuerda satisfactoriamente con el valor de 69,8 kDa ($3 \times 23,3$ kDa) calculado a partir de su secuencia. La forma general de la partícula se asemeja a la RS trimérica de *E. coli* (Liao *et al.*, 2001), sin embargo, hay algunas diferencias en la orientación relativa de sus monómeros y en la estructura del extremo C-terminal.

RS pertenece a la clase de proteínas $\alpha+\beta$, y su monómero muestra los siguientes elementos estructurales: (i) un barril β de seis hebras en el extremo N-terminal (residuos 1-91), (ii) un loop conector (residuos 92-101), (iii) un barril β de seis hebras en el extremo C-terminal (residuos 102-187) y (iv) una hélice α C-terminal (residuos 188-202) (Figura 3-2b).

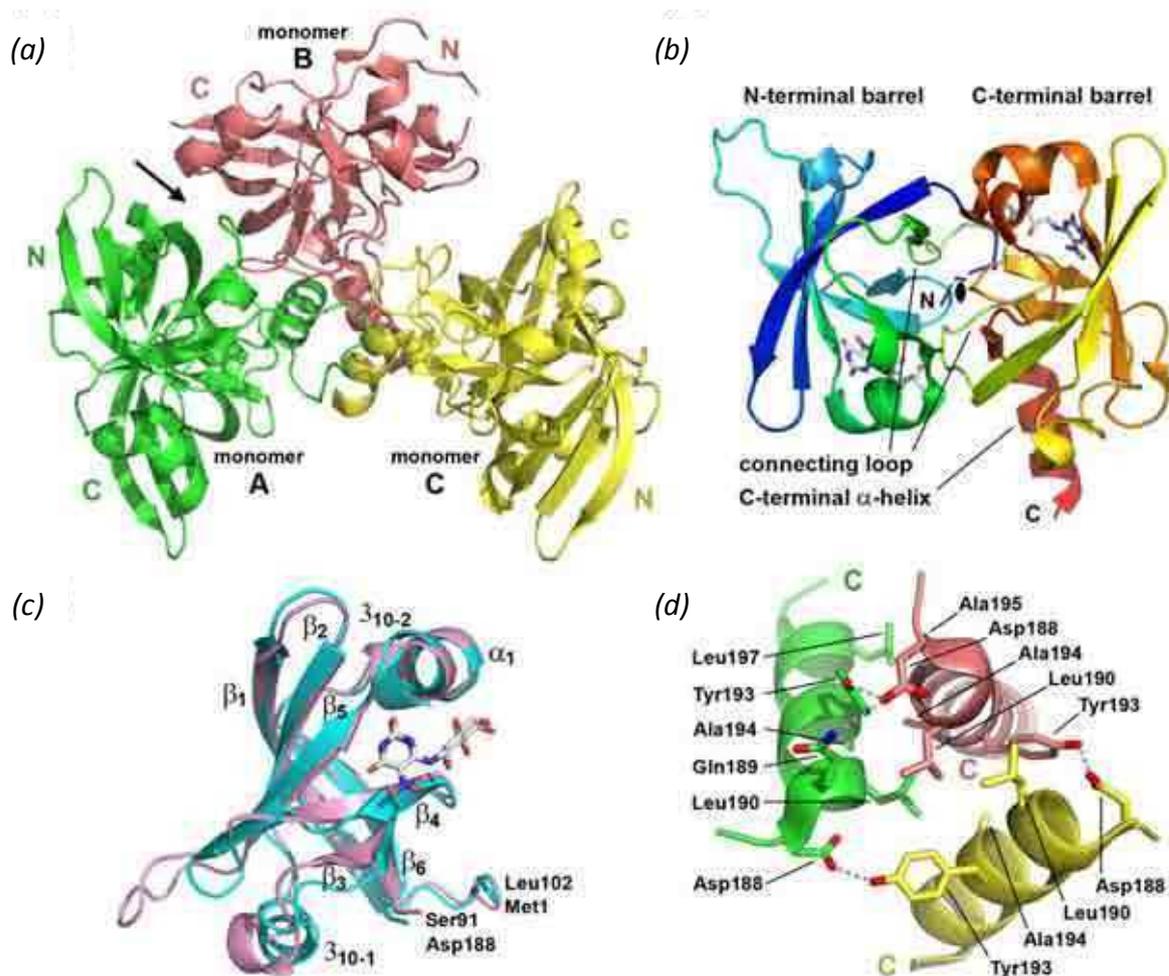


Figura 3-2. (a) Estructura RS-APO. Cada cadena se representa en un color diferente. Los barriles N- y C-terminales están indicados para cada cadena con sus respectivos colores. El ramillete de tres hélices α C-terminal se puede ver claramente en el centro de la molécula. Una flecha marca la ubicación aproximada del único sitio activo de la enzima. (b) Estructura del monómero de RS representado con los colores del arco iris. Se identifican los principales elementos estructurales. La orientación destaca la pseudo-simetría de orden 2 observada entre los barriles β N- y C-terminal. Un óvalo negro cubierto con una tilde marca la ubicación aproximada del eje de rotación de pseudo orden 2, que es perpendicular al plano del papel. El monómero representado aquí corresponde a la cadena A del complejo RS-NRP, que tiene unidas dos moléculas del ligando NRP, como se explica en el texto. (c) Superposición de los barriles β N- y C-terminales. Se muestran los residuos 1-91 (barril β N-terminal, rosado) y 102-188 (barril β C-terminal, celeste) que pertenecen a la cadena A del complejo de RS-NRP. Se indican los elementos de estructura secundaria y los residuos terminales. También se representan los ligandos unidos. (d) Interacciones entre cadenas en el ramillete de 3 hélices α C-terminal. Se indican las cadenas laterales de los residuos que interactúan. Los enlaces de hidrógeno están marcados con líneas de puntos. Los colores para cada cadena son los mismos que en (a), pero la orientación de la figura se ha desplazado ligeramente para mayor claridad.

Ambos barriles β están rodeados por dos hélices 3_{10} y una hélice α , y adoptan un plegamiento casi idéntico (Figura 3-2c), con un r.m.s.d medio de 1,20 Å para 83 C^α alineados. Una situación similar se presenta en las estructuras de RS de *E. coli* (Liao *et al.*, 2001) y de *S. pombe* (Gerhardt, Schott, *et al.*, 2002). La homología estructural entre los dos barriles β también se

refleja a nivel de secuencia, con 19 residuos idénticos (23%) y 17 residuos similares (20%), como se muestra en la Figura 3-3. Curiosamente, los barriles β que pertenecen a la misma cadena están relacionados por pseudo-simetría de orden 2, con un ángulo medio de giro de 177° entre cada uno. Asimismo, está presente una simetría rotacional de tipo “pseudo- C_2 ” adicional que vincula al barril β N-terminal de la cadena A con el barril β C-terminal de la cadena B y que da lugar al sitio activo del trímero, como se describe en detalle a continuación. Por último, cuando se superponen los monómeros individuales de RS, se observan valores de r.m.s.d. que van de 0,66 hasta 1,23 Å (165-200 C^α alineados). Los elementos estructurales están muy bien conservados entre las cadenas. Sin embargo, en las cuatro estructuras se advierte una conformación bastante diferente en el intervalo de residuos 96-101A que pertenece al bucle central que conecta, así como una desviación de aproximadamente 20° en la orientación de la hélice α C-terminal de la cadena de C. Además, no se observan reordenamientos significativos dentro de la misma cadena cuando la estructura apo y aquella con ligando se superponen. Esto revela que la unión del ligando no genera efectos considerable en la arquitectura de las subunidades individuales.

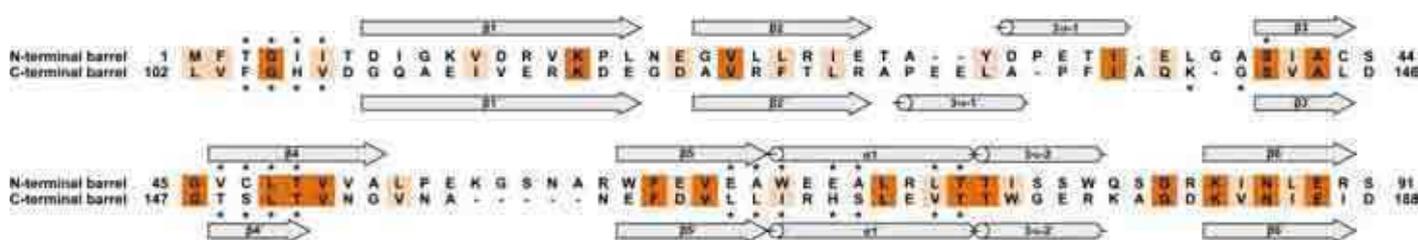


Figura 3-3. Alineamiento de secuencias de los barriles β N- y C-terminal. Los elementos de estructura secundaria están indicados. Los pares de residuos idénticos y similares están resaltados en naranja oscuro y claro, respectivamente. Los residuos en contacto directo con la molécula de ligando están marcados con una estrella. Los residuos Gly99 e His101, los cuales pertenecen al bucle central, conectan ambos barriles β y están involucrados en la unión del ligando, no están presentes en el alineamiento.

Comparación a nivel monomérico con otras RS conocidas

El monómero de RS de *B. abortus* puede superponerse con las RSs de *E. coli* (Liao *et al.*, 2001) y *S. pombe* (Gerhardt, Schott, *et al.*, 2002) con valores promedio de r.m.s.d. de 1,48 y 1,09 Å con más de 180 átomos de C^α alineados, respectivamente (Figura 3-4). Estos pequeños valores destacan la similitud estructural existente, que se extiende a lo largo de toda la cadena polipeptídica, con moderadas divergencias en los loops que unen ambos dominios y en las α hélices C-terminales. Cuando las secuencias correspondientes son alineadas, un total de 43 residuos (21%) coinciden en las tres especies y 79 (39%) en dos.

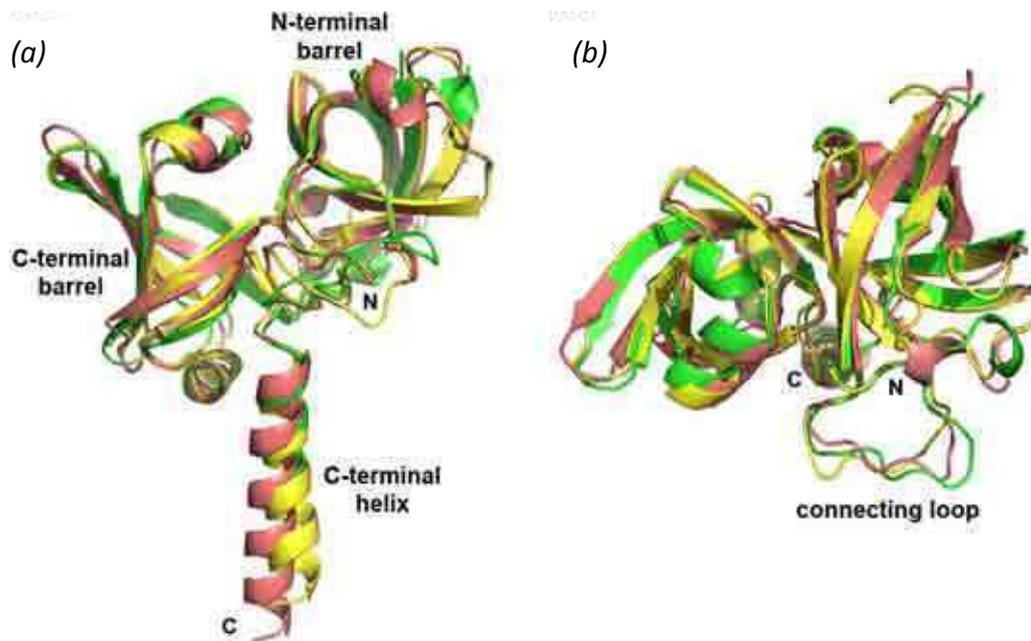


Figura 3-4. Superposición de los monómeros de RS de *B. abortus* (cadena A de RS-APO, verde), *E. coli* (cadena A del PDB 1I8D, rosado) y *S. pombe* (única cadena del PDB 1KZL, amarillo). Los extremos N- and C-terminales están indicados, así también los elementos estructurales principales. (a) Vista frontal. (b) Vista superior.

La secuencia N-terminal altamente conservada *MFTG*, que se sabe es crítica para la estabilidad de la arquitectura del sitio catalítico (Illarionov, Kemter, *et al.*, 2001, Liao *et al.*, 2001), también se encuentra presente en la RS de *Brucella*.

El ensamblado de RS como trímero asimétrico

Las principales interacciones entre cadenas que son responsables de la organización trimérica de RS de *B. abortus* pueden ser clasificadas en cuatro grupos diferentes. El primer grupo de interacción une el barril β N-terminal de la cadena A con el barril β C-terminal de la cadena B (ocho y siete residuos dentro de una distancia de 3,5 Å, respectivamente). La mayoría de los contactos observados son polares, con la presencia de dos puentes salinos: Glu66A–Arg166B y Glu70A–Lys140B. Curiosamente, las interacciones entre estos dos barriles β sólo se observan en las estructuras con ligandos, y están ausentes en la estructura RS-APO. Estas observaciones se deben al efecto de ensamblado que originan los ligandos unidos. El próximo grupo de interacción involucra residuos de los loops conectores centrales. Explícitamente, los residuos 92-94 de la cadena A interactúan con los residuos 95-98 de la cadena B, y del mismo modo lo hacen los residuos 93-94 de la cadena B con los residuos 95-96 de la cadena C. Estos contactos incluyen interacciones hidrofóbicas, numerosos puentes de hidrógeno y el puente salino Lys93A–Glu97B. Otro grupo importante de contactos es aquel presente en las 3 hélices α C-terminales, los cuales dan lugar a un ramillete de 3 hélices localizado en la región central de la

proteína (Figura 3-2a). Cada hélice α está en contacto con sus 2 vecinas, mediante interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas (Figura 3-2d). El contacto polar más relevante es el puente de hidrógeno entre los residuos Asp188–Tyr193, que está presente en todas las cadenas. Además, hay otro enlace de hidrógeno entre los residuos Gln189A y Asp188B. Las interacciones no polares se forman entre las cadenas laterales de los residuos Leu190, Ala194, Ala195 y Leu197. Es importante destacar que este grupo de interacciones está muy conservado entre las 4 estructuras resueltas en esta tesis, incluso en el caso de RS-APO. La RS trimérica de *E. coli* también presenta un arreglo análogo de ramillete de 3 hélices α , la cual es más larga que la de *Brucella* (61 vs. 41 residuos, respectivamente) y este presenta no sólo contactos hidrofóbicos, sino además 3 puentes salinos ausentes en las estructuras resueltas en este trabajo. En este sentido es importante mencionar que la secuencia C-terminal de las RS está altamente variable entre especies. Finalmente, el último grupo de interacciones son aquellas observadas entre el ramillete de 3 hélices α y otros elementos estructurales del trímero. Específicamente, numerosos residuos C-terminales de la cadena A están en contacto con el barril β de la cadena B, principalmente a través de uniones hidrógeno; los residuos C-terminales de la cadena B hacen los mismos contactos con el barril β C-terminal de la cadena C, y los residuos C-terminales de la cadena C están ligados con los residuos del loop central de la cadena A a través de contactos polares e hidrofóbicos.

Al igual que en la enzima de *E. coli*, la RS de *B. abortus* es un homotrímero carente de simetría trigonal, cuyos monómeros se ordenan en la partícula con ángulos de rotación que son diferentes a la simetría teórica de 120° entre cadenas. Curiosamente, los ángulos entre cadenas no sólo difieren entre especies sino también entre las 4 estructuras resueltas en este trabajo. Los complejos RS-ROS, RS-RBF y RS-NRP poseen aproximadamente el mismo triplete de ángulos rotacionales. Sin embargo, cuando los ligandos están ausentes, el ángulo rotacional entre la cadena A y la B se incrementa unos 7° (de 86° a 93°). Esto está acompañado de una disminución de 6° en el ángulo de rotación entre la cadena C y la A (de 163° a 157°). Puesto que el ángulo de rotación entre la cadena B y la C permanece similar en los 4 casos ($\sim 110^\circ$) esto demuestra un claro desplazamiento del monómero A hacia el C en ausencia de ligando (Figura 3-5). Esta apertura molecular, la cual refleja la flexibilidad intrínseca del trímero y podría ser consecuencia de la optimización del empaquetamiento cristalino, causa una reducción en el área de la interfaz entre las cadena A y B desde un promedio de 1650 \AA^2 en las estructuras complejadas a 1200 \AA^2 en RS-APO. Se puede destacar que el área de la interfaz entre los monómeros B-C y C-A permanece relativamente constante in todas las estructuras, con valores promedio de 1050 y 450 \AA^2 , respectivamente. Al mismo tiempo todos los contactos entre el barril β N-terminal de la cadena A y el barril β C-terminal de la cadena B se pierden, como fue

mencionado previamente. El resto de los contactos hechos por el monómero A (principalmente a través de su hélice α C-terminal y su loop conector) se conservan en las 4 estructuras, lo que identifica a los dos barriles β de la cadena A como los elementos de mayor movilidad en los triméros. Debido a las limitaciones del empaquetamiento cristalino, no podemos descartar si los otros dos barriles β pertenecientes a las otras 2 cadenas podrían también experimentar el mismo comportamiento en solución. Desde un punto de vista opuesto, se puede proponer que la unión a RS de cualquiera de los ligandos estudiados en este trabajo promueve la formación de una interfaz estable entre el barril β N-terminal de la cadena A y el barril β C-terminal de la cadena B. Como se describirá a continuación, esta interfaz contiene el único sitio activo del trímero, donde dos moléculas de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina se unen de manera antiparalela. A modo de conclusión preliminar, los ligandos actúan como el cemento necesario para ensamblar el sitio activo de RS.

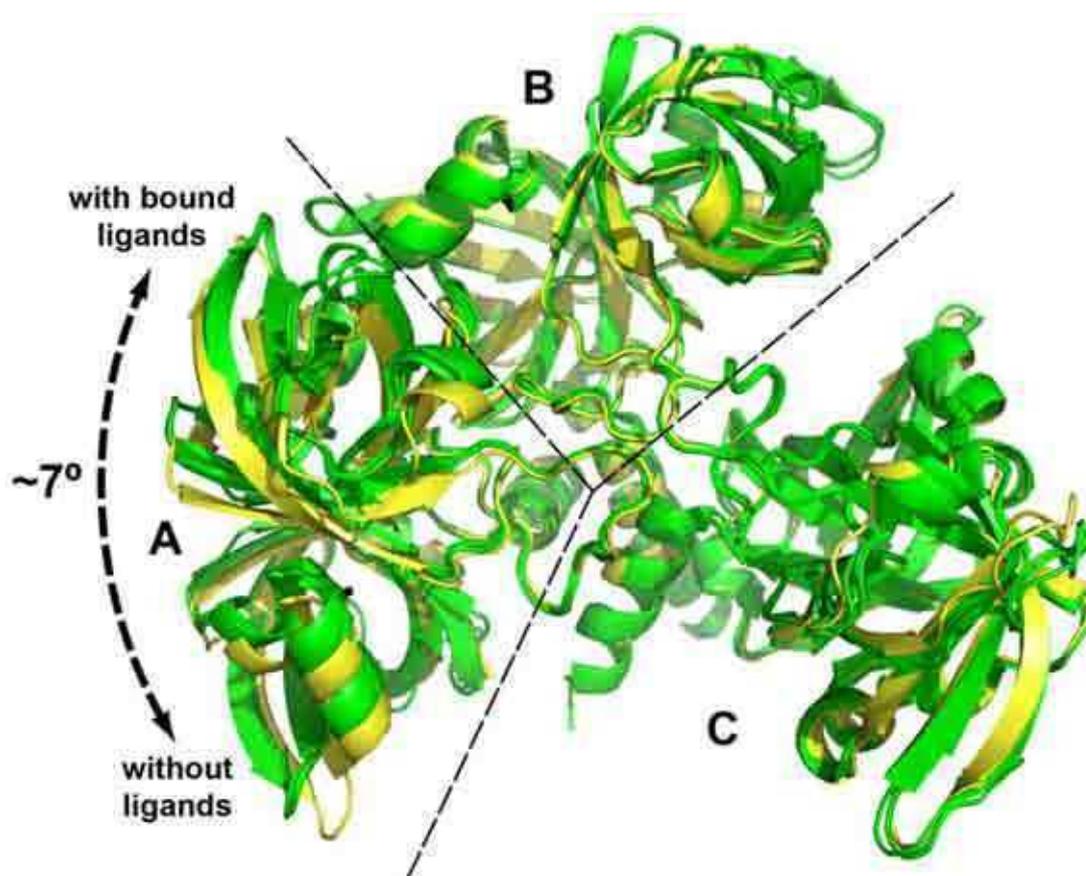


Figura 3-5. Superposición de las estructuras RS-RBF, RS-ROS y RS-NRP (verde) con RS-APO (amarillo). Sólo las cadenas B y C son usadas para el alineamiento estructural con el objetivo de resaltar el desplazamiento observado en la cadena A de RS-APO (aproximadamente 7°). La orientación relativa de las cadenas B y C es similar en las 4 estructuras. Los valores de r.m.s.d. calculados con respecto a RS-APO considerando estas dos cadenas juntas (366 C^α superpuestos) son 0.73, 0.92 y 0.70 Å para RS-RBF, RS-ROS y RS-NRP, respectivamente. Los ligandos unidos no se incluyen para mayor claridad de la figura.

Sitios de unión al sustrato y el único sitio activo

A pesar de no existir ninguna estructura resuelta de una RS trimérica en presencia de ligandos unidos antes de esta tesis, un conjunto de estudios estructurales previos (Liao *et al.*, 2001, Truffault *et al.*, 2001, Gerhardt, Haase, *et al.*, 2002, Meining *et al.*, 2003) habían identificado y descrito los sitios de unión al sustrato con cierto detalle. Se conocía que cada dominio barril β es capaz de unir una molécula de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina originando dos sitios de unión por monómero y un total de 6 sitios de unión por trímero. El sitio de unión de cada uno de los barriles β involucra residuos diferentes pero su estructura es esencialmente es la misma, correspondiendo a una cavidad poco profunda localizada adyacente al barril β entre la hélice α_1 y las hebras β_4 y β_5 (ver Figura 3-2b y 3-2c para la ubicación la molécula de NRP la cual ocupa todos los sitios de unión de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina). Para que la reacción de dismutación ocurra, es obligatorio que dos sitios de unión se encuentren adyacentes. En la conformación observada en el cristal, esta situación sólo puede suceder en la interfaz entre las cadenas A y B, generando un único sitio activo en todo el trímero (Figura 3-2a). Además de los dos sitios de unión que construyen el sitio catalítico de RS, los otros cuatro sitios (uno de la cadena A, uno de la cadena B y dos de la cadena C) se encuentran expuestos al solvente y por lo tanto no son competentes para la reacción de dismutación, al menos en la conformación observada en el modelo cristalino.

Como se mencionó previamente, la formación del sitio activo genera un eje de rotación de pseudo-simetría de orden dos que relaciona el barril β N-terminal de la cadena A con el barril β C-terminal de la cadena B. Este elemento de simetría, que no está relacionado con el eje de rotación de pseudo-simetría de orden 2 entre barriles β de la misma cadena, se observa particularmente en las estructuras resueltas con ligando de este trabajo. En estos casos, se observa un ángulo de rotación de unos 175° entre los dos barriles β que forman el sitio activo, pero este valor disminuye a 171° en RS-APO debido al desplazamiento experimentado por la cadena A alterando la arquitectura del sitio activo e impidiendo la reacción de dismutación, como se mostrará en detalle luego. Curiosamente, el valor para el mismo ángulo en la estructura sin ligando de *E. coli* es de 178° , destacado nuevamente que esta enzima es capaz de ensamblar un sitio activo competente en el modelo cristalino incluso sin ligando unido.

La siguiente sección describirá la interacción molecular entre RS de *B. abortus* y los ligandos introducidos. Es importante reiterar que la unión de estas moléculas no modifica la estructura de los monómeros significativamente, sino que altera la estructura del trímero por desplazamiento de la ubicación relativa de la cadena A en los cristales.

Unión del producto de reacción riboflavina

La estructura RS-RBF resuelta en este trabajo posee una sola molécula de riboflavina, la cual está localizada en el sitio de unión N-terminal del barril β de la cadena A (Figura 3-6a y 3-7a) involucrando (i) los grupos amida de los residuos Thr49A, Trp68A y Val107A, (ii) el grupo carbonilo de los residuos Cys47A, Glu66A, Gly105A y Val107A, y (iii) las cadenas laterales polares de los residuos Thr49A and Lys140B. Además, los residuos Gly99B and Thr151B están a una distancia de van der Waals de la molécula de riboflavina, y las cadenas laterales de los residuos Leu48A and Ile165B están localizados a ambos lados del anillo de pirimidinadiona de ligando, dando un ambiente hidrofóbico estabilizante

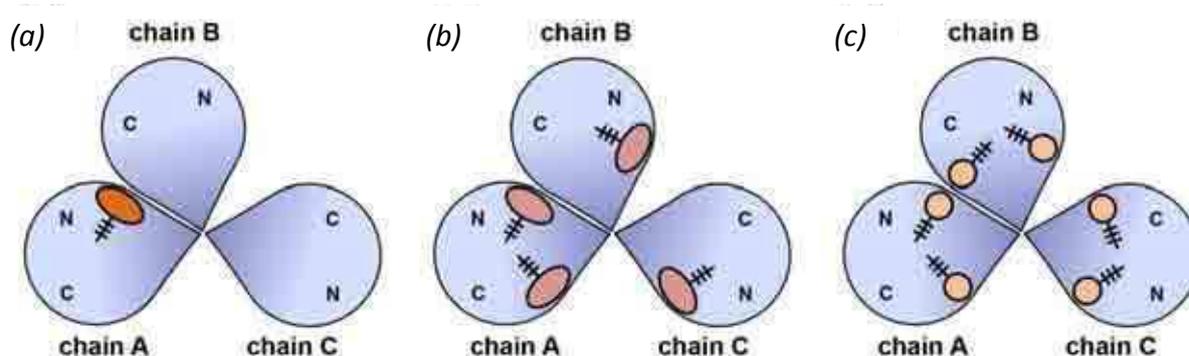


Figura 3-6. Representación de las estructuras de RS destacando la diferencia en la estequiometría de unión de los diferentes ligandos. Cada monómero es representado como una gota violeta. Los barriles β N y C-terminales están identificados dentro del monómero con las letras N y C, respectivamente. Las cadenas individuales se indican fuera de las gotas. Los ligandos se representan con su grupo aromático en naranja (riboflavina), rosado (roseoflavina) y amarillo (NRP). Las cadenas ribitilo son representadas como cruces. (a) RS-RBF. (b) RS-ROS. (c) RS-NRP.

El reconocimiento del ligando unido ocurre principalmente a través de uniones hidrógeno. El hecho de que cuatro residuos de la cadena vecina B estén involucrados en la unión de la riboflavina indica claramente que esta molécula interviene en la formación de la ceñida interfaz entre el barril β N-terminal de la cadena A y el barril β C-terminal de la cadena B, construyendo el único sitio activo.

El complejo RS-RBF constituye la primera RS trimérica cristalizada en presencia de ligandos unidos. Sin embargo, cuando se modela una molécula de riboflavina en el sitio activo de la RS trimérica de *E. coli* usando la RS monomérica de *S. pombe* unida a 6-carboxymethyl-7-oxo-8-ribityllumazina como modelo (Gerhardt, Schott, *et al.*, 2002), se puede ver claramente que los contactos que establece la riboflavina están muy bien conservados a través de estas especies. Sólo una cadena lateral involucrada en un puente de hidrógeno con el anillo de

pirimidinadiona del ligando en *S. pombe* y *E. coli* (Ser67 y Thr67, respectivamente) es reemplazada en la RS de *Brucella* por una alanina (Ala71), por lo tanto este contacto se pierde. Es importante mencionar que las interacciones de riboflavina con la cadena vecina B están también muy bien conservadas entre estas 3 especies. Durante el transcurso de la reacción se ha propuesto que el sustrato que actúa como un dador de 4 átomos de C debiese ser el que se une al barril β C-terminal de la cadena B, mientras que la molécula de sustrato aceptora (la cual es convertida en última instancia en riboflavina) debe ser la que se une al barril β N-terminal de la cadena A.

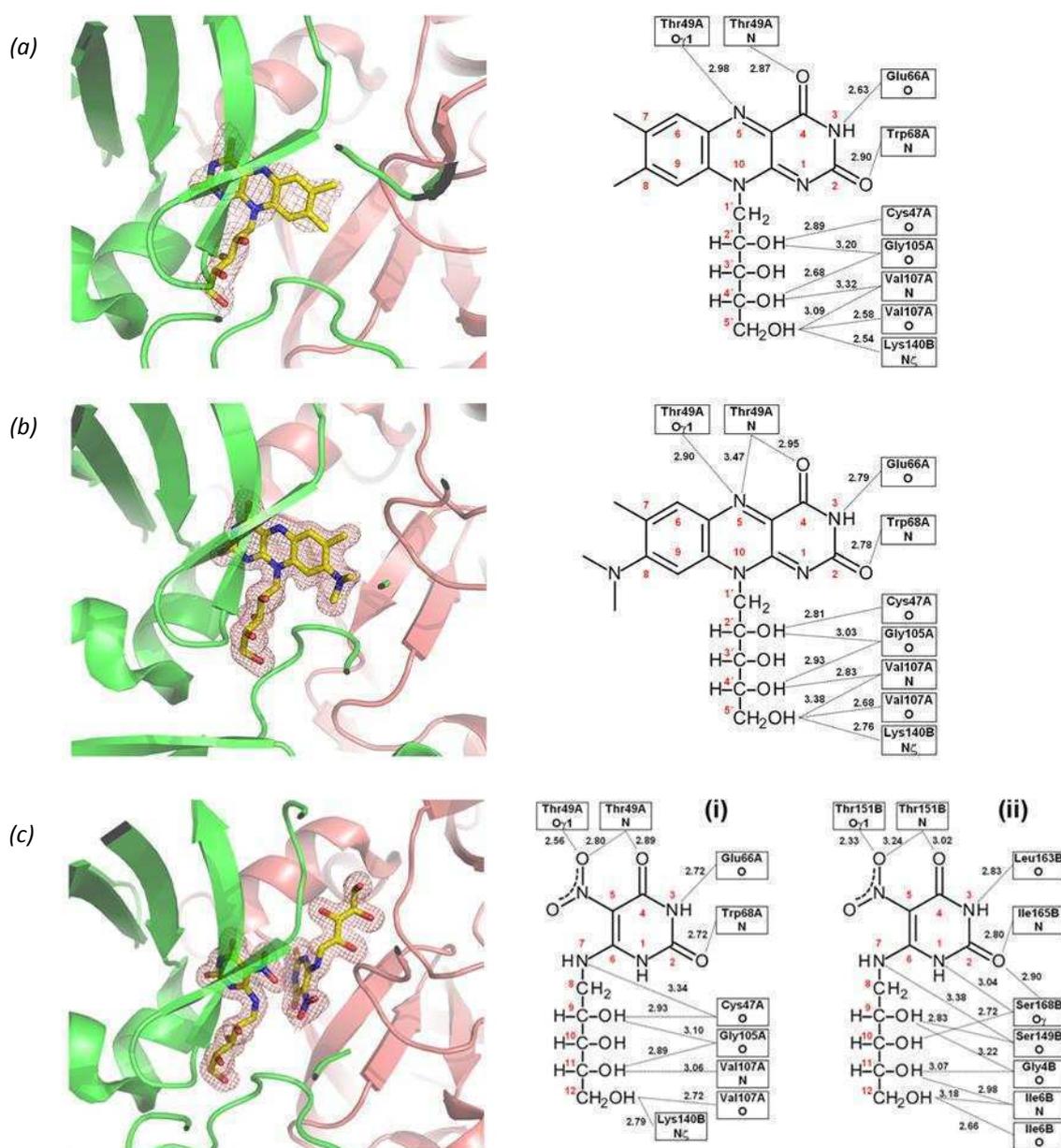


Figura 3-7. Representación de la unión de ligandos a los sitios de binding de RS. El panel izquierdo muestra la localización de las moléculas de ligando junto con los residuos más representativos involucrados en la unión (dibujado en bastones). Los monómeros A y B están representados en verde y rosado, respectivamente. Los mapas de Fourier $2mF_0-DFc$ se representan a nivel 1.0σ . El panel derecho resume las uniones hidrógeno entre los ligandos

y la enzima, indicando números y átomos, distancias (en Å con un valor máximo de 3.5) y el número de átomo del ligando. (a) RS-RBF. (b) RS-ROS (molécula de roseoflavina unida al barril β N-terminal de la cadena A). (c) RS-NRP [par de moléculas de NRP unidas al barril β N-terminal de la cadena A (i) y al barril β C-terminal de la cadena B (ii)].

Sin embargo, no existía evidencia estructural para afirmarlo. En este estudio, la única molécula de riboflavina unida en el complejo RS-RBF, la cual se halla unida al barril β N-terminal de la cadena A, corrobora esta hipótesis. En principio, y debido a la similitud entre el producto riboflavina y el sustrato 6,7-dimetil-8-ribitillumazina, se podrían unir al trímero hasta 6 moléculas de riboflavina simultáneamente (dos por cadena). Sin embargo, cuando se modelan moléculas de riboflavina en todos los sitios de unión, sólo 4 sitios pueden ser ocupados sin sufrir choques estéricos: los 3 sitios asociados con los barriles β N-terminales más el correspondiente al barril β C-terminal de la cadena A. El barril C-terminal de la cadena B (el cual constituye la segunda mitad del sitio activo) es incapaz de unir riboflavina puesto que el grupo metilo asociado al C8 de la riboflavina chocaría con los residuos Gly99 y Gly100 de la misma cadena, los cuales son parte del loop conector central entre barriles β . Además, el anillo xileno de esta segunda molécula estaría en conflicto estérico con la molécula de riboflavina ya unida en el sitio activo. Luego, la unión hipotética de riboflavina al barril β C-terminal de la cadena C (el cual está expuesto al solvente) resultaría en la misma clase de choques con los residuos Gly99 y Gly100 de la misma cadena. Curiosamente, el barril β C-terminal de la cadena A (el cual también está expuesto al solvente) podría ser capaz de unir riboflavina ya que el bucle formado por los residuos 98-101 en la cadena A está desplazado unos 5Å por fuera del sitio de unión al sustrato en comparación con las otras dos cadenas. Este análisis sugiere que hasta 4 moléculas de riboflavina pueden ser unidas simultáneamente en el trímero de RS. Esta observación contrasta con reportes previos de RS de *B. subtilis* (Otto & Bacher, 1981) y *A. thaliana* (Fischer *et al.*, 2005) donde los estudios de binding indicaron la presencia de un máximo de 3 moléculas por trímero.

Es importante destacar que el complejo RS-RBF no fue obtenido por cocrystalización ni soaking, sino por la adición de riboflavina sólida al medio de cultivo. Al final del proceso de purificación, la estructura cristalina reveló que sólo una molécula de ligando se mantenía unida al trímero de RS, demostrando que el sitio aceptor de la cadena A (barril β N-terminal) corresponde al sitio con la mayor afinidad para riboflavina.

Unión del análogo de producto Roseoflavina

La estructura RS-ROS muestra la presencia de 4 moléculas de roseoflavina unidas, las cuales se encuentran localizadas en los sitios de riboflavina predichos en la sección anterior, es decir, los

tres sitios de unión asociados a los barriles β N-terminal más el sitio asociado con el barril β C-terminal de la cadena A (Figura 3-6b). En este caso la estructura fue obtenida por cocrystalización, agregando un exceso de ligando, y así llenando todos los sitios de unión posibles que no generen choques estéricos. El grupo 8-dimetilamino en la roseoflavina, que reemplaza el grupo 8-metilo de la riboflavina, no está involucrado en contactos con la proteína, y por esta razón la roseoflavina puede ser considerada en este análisis similar a la riboflavina desde un punto de vista estructural. Como conclusión preliminar, estas observaciones nuevamente apoyan la hipótesis de que RS de *B. abortus* puede unir hasta 4 moléculas de riboflavina por trímero. Los contactos y el modo de unión de roseoflavina en los barriles β N-terminal son esencialmente similares a los de riboflavina en el complejo RS-RBF (Figura 3-6b y 3-7b). La única roseoflavina unida en el barril β C-terminal exhibe un modo de unión comparable a aquellas unidas en los barriles β N-terminal. Específicamente, hay una serie de enlaces de hidrógeno que involucran (i) el grupo amida de los residuos Ile6A, Thr151A e Ile165A, (ii) el grupo carbonilo de los residuos Gly4A, Ile6A, Ser149A y Leu163A, y (iii) la cadena lateral polar de los residuos Thr151A y Ser168A. Además, la cadena lateral de Leu150A se orienta hacia la pirimidinadiona del ligando. Ya que el sitio de unión está expuesto al solvente, no hay ningún contacto entre la única molécula de roseoflavina unida al barril β C-terminal de la cadena A con la cadena vecina. Finalmente, el modelado de roseoflavina en los dos sitios de unión vacíos resulta en severos choques de su grupo xileno de un modo similar a lo observado para RS-RBF.

Unión del análogo de producto NRP

El compuesto NRP difiere químicamente del subproducto 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona sólo en un grupo nitro en la posición 5. Este compuesto es de gran importancia porque también es un análogo de sustrato inhibidor de LS y numerosas estructuras publicadas describen su unión a LS con detalle (Ritsert *et al.*, 1995, Gerhardt, Haase, *et al.*, 2002, Klinke *et al.*, 2007, Klinke *et al.*, 2005). La estructura RS-NRP fue obtenida por soaking de cristales de RS en presencia de un exceso de NRP. El modelo cristalino revela que los 6 sitios de unión de sustrato son ocupados por el NRP (Figura 3-6c y 3-7c). Esta observación era esperable ya que NRP es un análogo estructural de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina el cual posee un sistema heteroaromático comparable y más pequeño. La serie de contactos entre esta molécula y la enzima están resumidos en la figura 3-6c y son esencialmente equivalentes a los observados para los ligandos descritos previamente. Resulta interesante que RS-NRP es la única estructura en este trabajo en la cual el sitio de unión

asociado al barril β C-terminal de la cadena B posee un ligando unido, completando de este modo el sitio activo. Esta molécula particular de NRP prácticamente no interactúa con la cadena vecina A. Sólo los residuos His106A y Thr49A están localizados a unos 4Å de distancia del ligando y no se observan uniones hidrógeno. Esto nos lleva a proponer que la única molécula de NRP que favorece el ensamble del único sitio activo del trímero es aquella que está unida al barril β N-terminal de la cadena A. La figura 3-7c también revela que las cadenas ribitilo de ambas moléculas de NRP se unen al sitio activo adoptando una orientación antiparalela, resultado de la pseudo-simetría de orden 2 observada entre los dos barriles β que dan lugar al sitio activo.

En base a la localización de las moléculas de ligando, la estructura RS-NRP permite el modelado del sustrato 6,7-dimetil-8-ribitillumazina dentro del sitio activo (Figura 3-8a). Las dos moléculas de sustrato están orientadas correctamente para la reacción de dismutación, con un ángulo de rotación de aproximadamente 40° entre los planos que contienen los sistemas aromáticos. De acuerdo con el mecanismo de reacción aceptado (Kim *et al.*, 2010), uno de los pasos claves corresponde a la ciclo-adición que involucra los dos grupos metil-xileno de la molécula aceptora y los átomos C6 y C7 de la donora. Las distancias modeladas entre este par de moléculas reactivas son de 2.5 y 2.6 Å, confirmando el arreglo geométrico favorable de ambas moléculas. Curiosamente, cuando se repite este modelado con la estructura RS-APO (Figura 3-8b) se observan distancias mucho mayores entre los átomos reactivos (4.5 y 3.6 Å) debido al desplazamiento de la cadena A hacia la cadena C en la estructura sin ligandos (Figura 3-5). Estas distancias mayores impedirían la reacción de dismutación, apoyando nuevamente el hecho de que la ausencia de ligandos puede evitar el ensamblado de un sitio activo competente en el modelo cristalino RS-APO.

Cinética y estudios de binding

Con el fin de complementar los estudios estructurales de RS se realizaron estudios cinéticos detallados de esta enzima. La RS recombinante muestra clara actividad *in vitro*, con una tasa de conversión de 1.02 min⁻¹ a 20°C y pH 7.0. La figura 3-9 presenta un análisis de las velocidades catalíticas iniciales para un amplio rango de concentración de sustrato.

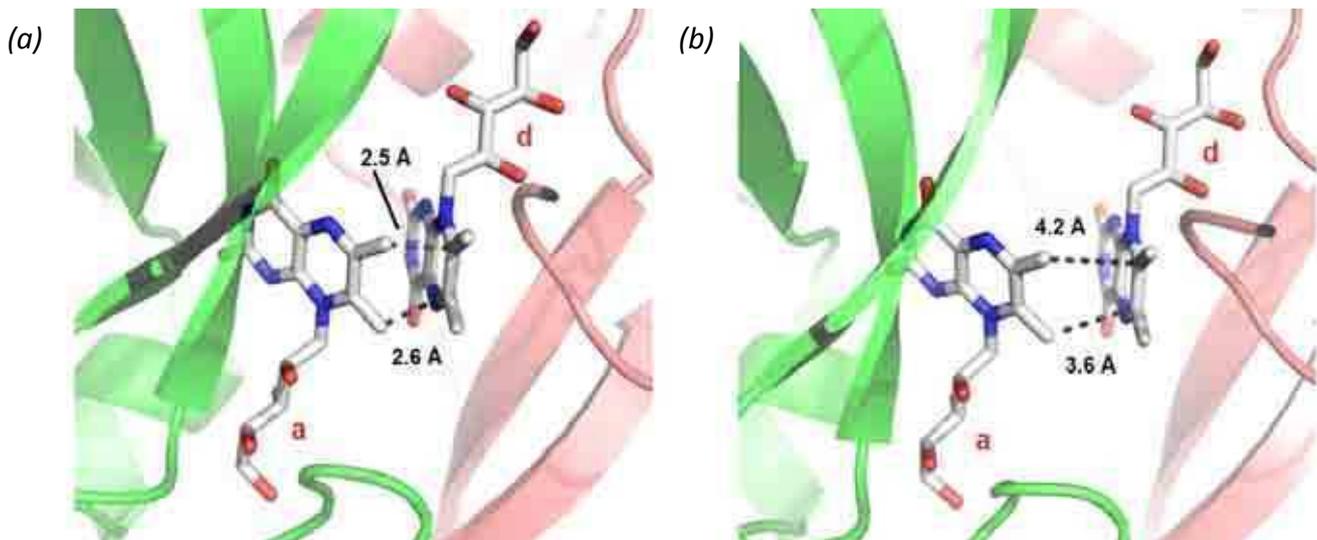


Figura 3-8. Modelado de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina en sitio activo de RS-NRP (a) y RS-APO (b). Los monómeros están representados en verde (cadena A) y en rosado (cadena B). Las moléculas de sustrato están identificadas con las letras a y d, que corresponden a la molécula aceptora y donora, respectivamente. La línea de puntos representa la distancia entre el grupo metilo del C6 de la molécula aceptora y el C7 de la donora (a) y entre el grupo metilo del C7 de la aceptora y el C6 de la donora. Las moléculas de sustrato fueron colocadas por superposición teniendo en cuenta la localización de los sistemas aromáticos y las cadenas ribitilo de los ligandos en RS-NRP. Para (b), las subunidades individuales de RS-APO fueron superpuestas primero sobre la estructura de RS-NRP.

Puede observarse que RS no sigue un simple modelo de Michaelis-Menten (curva punteada). En contraste, la actividad enzimática decae progresivamente a medida que la concentración de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina se incrementa (curva sólida). Un comportamiento similar ha sido reportado para la RS de *A. thaliana* (Fischer *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que el modelo de Michaelis-Menten no ajusta a la curva experimental y que, por lo tanto, las constantes determinadas para este modelo son inadecuadas para describir la naturaleza catalítica de la enzima, propusimos un modelo de inhibición por sustrato (Figura 3-10) que describe la cinética de RS. Este modelo, derivado de la ecuación de Haldane (Haldane, 1930), es el que mejor se ajusta a los datos experimentales. Brevemente, este modelo asume que RS posee un sitio catalítico que une dos moléculas de sustrato S para generar una molécula de producto P, y dos sitios no catalíticos (o alostéricos) que no generan producto y reducen la tasa de conversión de la enzima E. La especie enzimática que posee dos sustratos unidos al sitio catalítico y que puede generar producto es indicada como ES_2 . Asimismo, las especies con uno y dos sustratos unidos a los sitios no catalíticos en simultáneo con las otras dos moléculas en el sitio activo, son indicadas como SES_2 y SSE_2 , respectivamente.

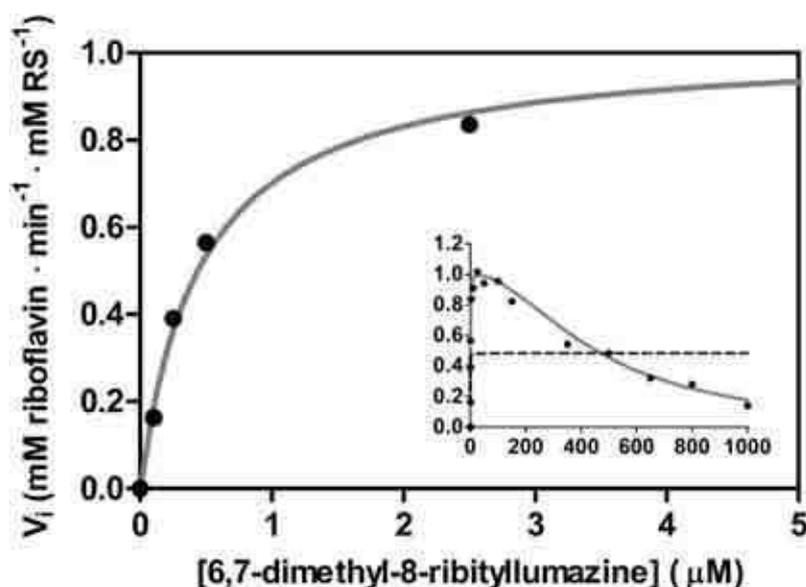


Figura 3-9. Estudio cinético de RS. Las velocidades iniciales de la formación de riboflavina (V_i) para diferentes concentraciones de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina se representan con una curva sólida. El recuadro destaca la inhibición observada a altas concentraciones de sustrato. Por comparación, se dibuja la curva representando el modelo clásico de Michaelis-Menten en línea punteada.

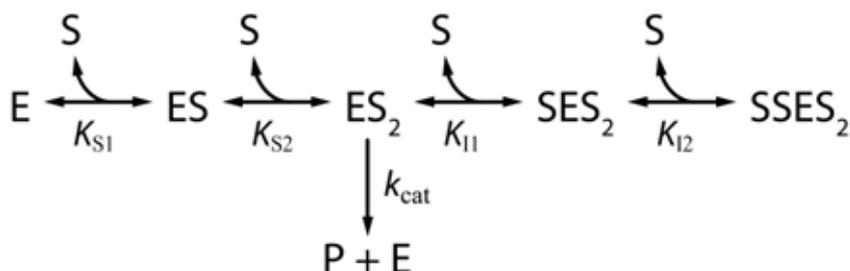


Figura 3-10. Esquema cinético usado para el cálculo del modelo de inhibición por sustrato. E, enzima; S, sustrato; P, producto (riboflavina).

En este modelo de inhibición, hipotetizamos que las moléculas de sustrato se unen primero al sitio catalítico y luego, a medida que la concentración de sustrato aumenta, el mismo ocupa el resto de los sitios de unión, por los cuales su afinidad es menor. También asumimos que los complejos intermedios SES_2 and $SSES_2$ no son capaces de generar producto. Entonces, considerando un equilibrio rápido, derivamos la siguiente ecuación cinética:

$$\frac{V_i}{[E]_0} = \frac{k_{cat} [S]}{K_m + [S] + \frac{S^2}{K_{I1}} + \frac{S^3}{K_{I1} K_{I2}}} \quad (3.1)$$

donde $[S]$ se refiere a la concentración de sustrato, V_i es la velocidad inicial de reacción, $[E]_0$ es la concentración total de enzima, k_{cat} es la tasa de conversión o turnover number, K_m es la constante clásica de Michaelis-Menten (la cual es aproximadamente igual a K_{S2} de la figura 3-10 considerando que k_{cat} es significativamente más pequeña que la constante de disociación del sustrato) y K_{i1} and K_{i2} son las constantes de disociación para la reacción de unión de una molécula de sustrato a un sitio distinto al sitio catalítico. La Tabla 3-1 muestra los parámetros cinéticos calculados por el ajuste de los datos experimentales a (3.1) aplicando un método de regresión no lineal. Como se observa en la figura 3-9, la curva de velocidad alcanza un máximo y luego decrece hacia cero a mayores concentraciones de sustrato. Esto se debe a una cantidad creciente de enzima que es retenida en forma de especies no catalíticas SES_2 y $SSES_2$. Curiosamente, en la curva de actividad se debería observar una respuesta sigmoidea ya que se requiere la unión de dos moléculas para la catálisis. Sin embargo, la curva muestra una respuesta Michaeliana a bajas concentraciones de sustrato ($< 5mM$). Este comportamiento se puede deber al hecho de que la primera molécula de sustrato se une a la enzima con una afinidad muy alta y el incremento de la velocidad puede ser causado solamente por la unión de la segunda molécula. Esto implica que $K_{S1} \ll K_{S2}$ y, por lo tanto, K_{S1} puede ser excluido de los cálculos en el modelo cinético.

	Valor	Error
k_{cat} (min ⁻¹)	1.02	0.02
K_D (μM)	20.6	1.0
K_{S2} (μM)	0.459	0.011
K_{i1} (μM)	3780	70
K_{i2} (μM)	59.7	1.3

Tabla 3-1. Constantes cinéticas calculadas para el modelo de inhibición por sustrato presentado en la Figura 3-11.

El modelo de inhibición por sustrato en el cual la actividad enzimática es inhibida por dos moléculas de sustratos unidas a los sitios no catalíticos representa el mejor ajuste a nuestros datos experimentales (Figura 3-11) de acuerdo al criterio de información de Akaike (Akaike, 1974). Sin embargo, un mayor número de sitios de inhibición podrían estar involucrados. El modelo podría subestimar el número de dichos sitios debido a dos posibles razones: (i) una falta de precisión en las mediciones en la zona de inhibición y (ii) una diferencia insuficiente entre los valores de K_i que podrían ocultar un mayor número de moléculas de sustrato involucrados en la inhibición.

Recordando el análisis de unión de RS a la riboflavina en solución en el capítulo 2, observamos que los datos sugerían una unión de 3 a 4 moléculas por trímero (Figura 2-6). Esta diferencia podría ser explicada considerando que el cuarto sitio de unión podría ser ocupado sólo después de la adición de un exceso de ligando. De este modo se estaría probando el análisis estructural presentado previamente, en donde hasta cuatro moléculas de roseoflavina fueron propuestas para unirse simultáneamente al trímero de RS ante un exceso de ligando adicionado a la gota de cocrystalización.

Finalmente, estudiamos el efecto de riboflavina en la actividad catalítica. En forma similar a la RS de *A. thaliana* (Fischer *et al.*, 2005), las velocidades iniciales decaen a medida que la concentración de riboflavina aumenta (Figura 3-13), indicando un mecanismo de inhibición por producto también. Asumiendo que la concentración de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina es menor que la de riboflavina y teniendo en cuenta que RS exhibe una inusual alta afinidad por su producto, es probable que la inhibición por producto sea el principal mecanismo por el cual RS regula la actividad enzimática *in vivo*. Además, la inhibición por sustrato se observa solo a concentraciones de sustrato altas, las cuales no se corresponden a una situación fisiológica.

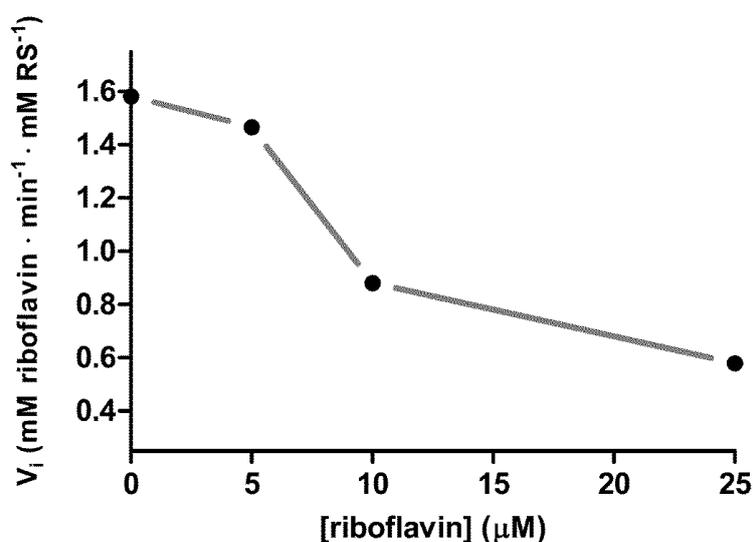


Figura 3-13. Inhibición por producto. Las velocidades iniciales de la formación de riboflavina (V_i) se determinaron a diferentes concentraciones de riboflavina usando una concentración fija de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina (véase Materiales y Métodos para más detalles).

En resumen la estructura resuelta de RS de *B. abortus* en este trabajo la revela como un trímero asimétrico perteneciente a una clase de proteína $\alpha+\beta$. Los monómeros presentan un dominio N-terminal y C-terminal de plegamiento casi idéntico. La correlación no sólo es estructural sino también a nivel de secuencia con un 23% de residuos idénticos y 20% de residuos similares. Esta es la primera estructura de RS trimérica resuelta con ligandos unidos.

Los barriles β de cada cadena tienen la capacidad de unir una molécula de sustrato en forma antiparalela, dando dos sitios de unión por monómero, y un total de seis por trímero. Los aminoácidos involucrados en la unión a los ligandos son distintos para cada dominio, pero la arquitectura es en esencia la misma. La condición para que la reacción de dismutación ocurra es la cercanía entre los sustratos, por lo tanto, sólo existe un posible sitio catalizador entre las cadenas A y el B de RS. Los otros cuatro sitios de unión a ligandos se encuentran expuestos al solvente.

Fueron resueltas tres estructuras con ligandos: (i) RS-NRP, ligando de gran interés por ser inhibidor análogo de sustrato de la LS y su unión ya había sido estudiada, (ii) RS-roseoflavina, análogo de riboflavina, la cual se diferencia en un grupo dimetilo que no interfiere en los contactos proteína-ligando y por lo tanto puede considerarse similar al producto riboflavina desde un punto estructural), y (iii) RS-riboflavina.

También el trímero sugiere una flexibilidad intrínseca cuando se encuentra libre o unido a un ligando. Cuando la estructura está libre de ligando, el trímero se abre, es decir, la cadena A se desplaza 7° hacia la cadena C. Se pierde el contacto entre el dominio N-terminal de la cadena A con el C-terminal de la cadena B. El resto de los contactos permanecen conservados. Esto demuestra que la unión de un ligando promueve un empaquetamiento más estrecho entre el dominio N-terminal de la cadena A con el C-terminal de la B, el cual determina el único sitio activo de la enzima, donde los sustratos se posicionan en forma antiparalela.

A nivel cinético, RS mostró una inhibición por sustrato, a altas concentraciones de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina. En este modelo consideramos que los sustratos se unen primero al sitio catalítico y que luego, en consecuencia al aumento de su concentración, comienzan a unirse al resto de los sitios. A medida que la proteína va siendo ocupada, los complejos intermediarios no generan producto. También se observó inhibición por su producto riboflavina.

High Throughput screening contra RS y ensayos sobre *B. abortus*

Como se mencionó con anterioridad, la vía biosintética de flavinas es esencial para la supervivencia, tráfico intracelular y persistencia de *B. abortus* (Bonomi *et al.*, 2010). Así, RS, como el resto de las enzimas que conforman este camino metabólico, resultan interesantes blancos para el desarrollo de antimicrobianos contra la brucelosis.

En consecuencia, una vez resueltas las estructuras cristalinas, y con el extenso conocimiento del sitio activo y la descripción de las propiedades cinéticas de RS, se planteó la realización de una búsqueda y mejoramiento de inhibidores a través de high-throughput screening y diseño racional, respectivamente. Para ello, se trabajó en colaboración con la empresa Novartis, más precisamente con el departamento Center for Proteomic Chemistry, Basilea, Suiza y Global Discovery Chemistry, Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos.

Biblioteca de compuestos

Se utilizó una biblioteca de 44.000 compuestos denominada NDDI, la cual fue un aporte del departamento de Hit Finding de la empresa Novartis, Suiza. Para llevar a cabo con eficacia un programa de descubrimiento de fármacos, esta biblioteca fue diseñada para contener compuestos que mostraran propiedades físicoquímicas y estructurales deseadas para facilitar el camino a los productos finales. Los compuestos que conformaron la biblioteca correspondieron a pequeñas moléculas comercialmente disponibles, no propiedad de Novartis, las cuales en conjunto presentaban una gran diversidad química.

Screening de biblioteca contra RS

El High Throughput Screening se realizó en un equipo LabChip3000 Drug Discovery System (Caliper Technologies Corp., Mountain View, CA, USA) (Figura 4-1a), el cual trabaja con tecnología de última generación en sistemas de microfluidos conocida como “Lab-On-a-Chip”. Esta tecnología ofrece la miniaturización de sistemas analíticos, permitiendo llevar a cabo una gran cantidad de ensayos en una única plataforma integrada. La biblioteca de 44.000 compuestos fue evaluada contra RS de *B. abortus* en una concentración única de 30 μM . Comúnmente, los compuestos hallados por esta técnica se designan “hits” y poseen constantes de inhibición del orden de μM , sirviendo como punto de partida para su mejoramiento por modificación química en una segunda etapa. Para este caso particular se utilizó un tipo de ensayo novedoso aún no reportado en la literatura. Puesto que todos los volúmenes agregados estuvieron en el rango de los microlitros, fue muy importante para la

automatización del ensayo utilizar el dispositivo Nanodrop de alta precisión para el pipeteado. Este dispositivo asumió todos los pasos de pipeteado a lo largo del ensayo.

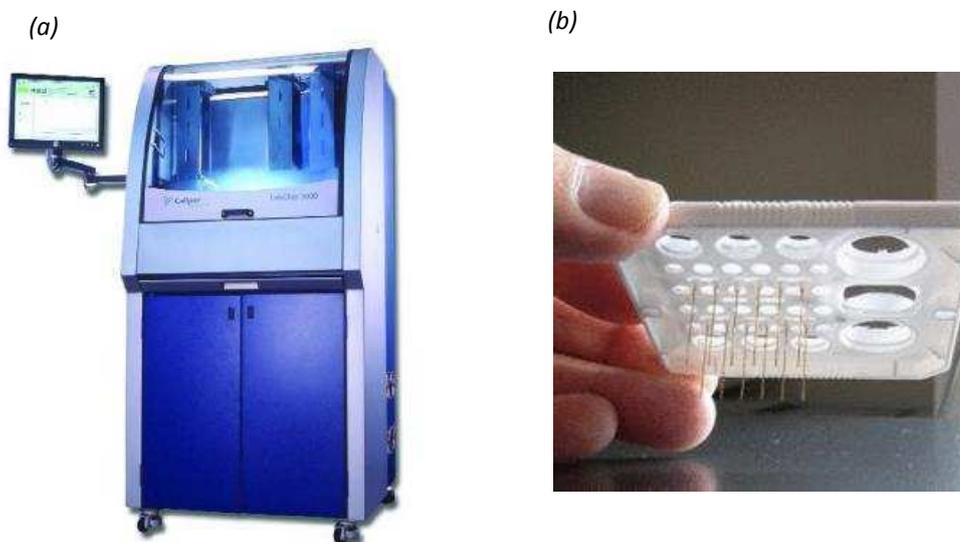


Figura 4-1. (a) LabChip3000 Drug Discovery System. (b). Chip de 12 cánulas para High Throughput Screening. La precisión y robustez del sistema permite detectar interacciones débiles entre drogas candidatas y sus blancos terapéuticos, identificando así inhibidores que las técnicas convencionales pasarían por alto

El principio del ensayo fue separación y cuantificación del sustrato 6,7-dimetil-8-ribitillumazina y del producto riboflavina en un campo eléctrico en función de sus cargas intrínsecas. Esta separación se llevó a cabo dentro de un chip que contiene un complejo sistema capilar para el análisis simultáneo de doce muestras denominado "chips 12-sorber" (Figura 4-1b). Los picos de producto y sustrato fueron excitados por un láser y la señal de fluorescencia intrínseca de cada compuesto fue capturada y cuantificada (Figura 4-2).

Se trabajó en un modo especial llamado "off-chip" en el cual la reacción enzimática ocurrió fuera del chip en placas de 384 pocillos. Cada pocillo contenía el sustrato, la enzima, un compuesto de la biblioteca y buffer de reacción. Transcurrida una hora de incubación, pequeñas muestras de la mezcla de reacción fueron absorbidas dentro del chip, donde el sustrato 6,7-dimetil-8-ribitillumazina y el producto riboflavina fueron separados y cuantificados como fue descrito anteriormente.

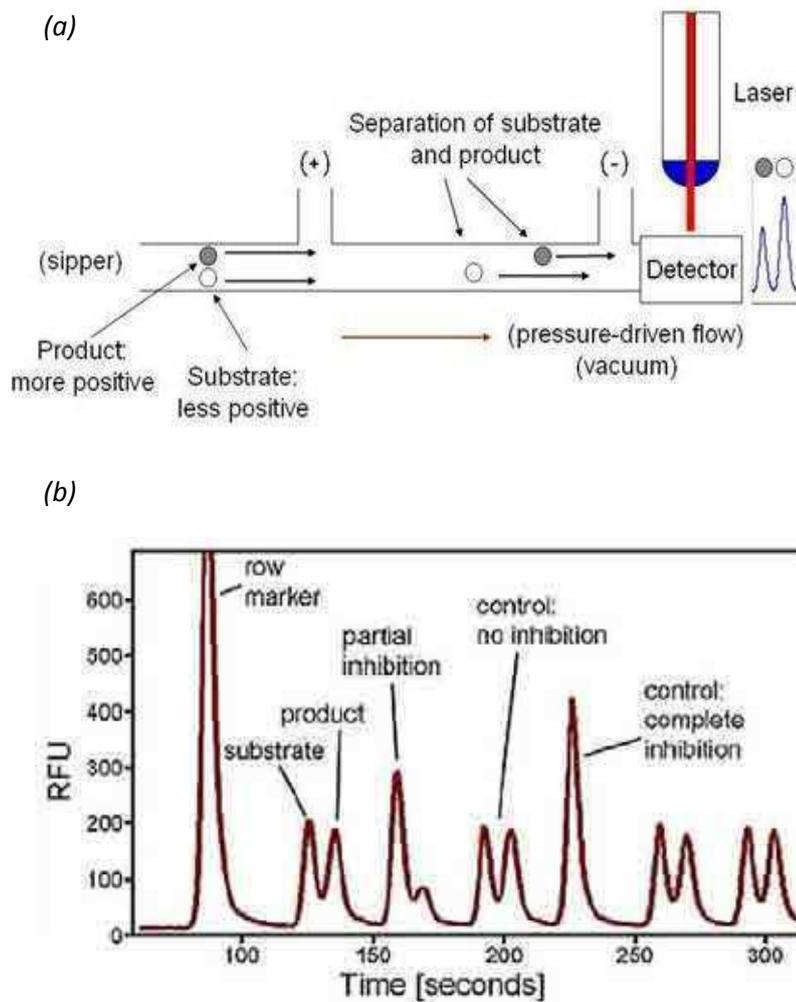


Figura 4-2. (a) Principio esquemático del ensayo de electroforesis microfluídica. Existen dos fenómenos que impulsan el movimiento del sustrato y del producto hacia la ventana de detección: el flujo hidrodinámico impulsado por la presión y el flujo impulsado por el voltaje que corresponde a la suma de electroósmosis y electroforesis. (b) Ejemplo de resultado obtenido en un ensayo de inhibición. El sustrato y el producto difieren en su movilidad en el campo eléctrico y por lo tanto aparecen en diferentes momentos en la ventana de detección. Ante la presencia de un inhibidor potente desaparece el pico correspondiente al producto. La electroforesis microfluídica es sumamente robusta y no requiere duplicados, siendo los resultados reproducibles al extremo.

El equipo LabChip 3000 workstation arroja en tiempo real la imagen de los picos de producto y sustrato que van siendo leídos por el detector. Como fue detallado previamente, el chip contiene doce cánulas de medición con las cuales cubre la lectura de los 384 pocillos realizando unas treinta y dos mediciones por cánula. Las doce cánulas trabajan en simultáneo, alternando sus medidas cada 6 s aproximadamente, logrando completar el ciclo de las treinta y dos lecturas en 2250 s. Esto determina que una placa completa sea leída en 37,5 min (Figura 4-3).

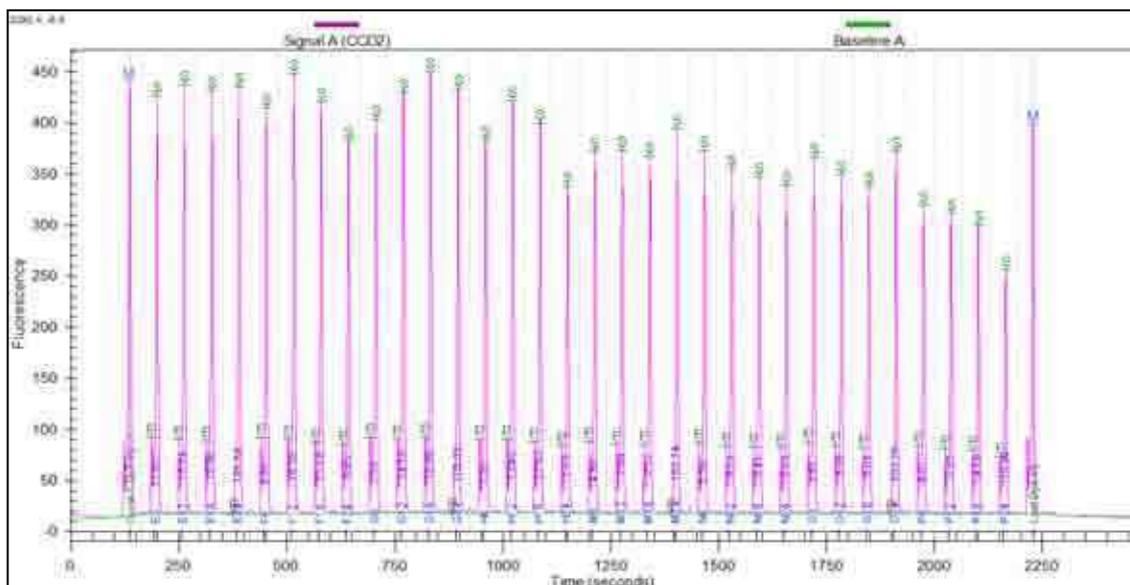


Figura 4-3. Aspecto general de la lectura de picos de sustrato y producto realizado por una única cánula del chip durante todo el proceso de medición. En una situación donde la reacción enzimática transcurre sin inhibición la imagen se interpreta de la siguiente manera: los picos más altos corresponden al sustrato (S), los más pequeños corresponden al producto (P) los cuales equivalen a una conversión del 12%. Por otro lado, en aquellos puntos donde el pico del producto se ve disminuido se relaciona a (i) un control negativo de actividad enzimática (inhibición completa) o (ii) un compuesto con efecto inhibitorio.

Los datos arrojados por el LabChip 3000 fueron analizados con el programa HELIOS, un software de análisis de screening y perfiles (Novartis Pharma AG). Las medidas para cada pocillo fueron comparadas con los pocillos control en la misma placa. HELIOS arrojó diagramas estilo 'heat map' para ilustrar el porcentaje de inhibición y de conversión. Ambos se ilustran con esquemas de colores cuyas escalas van del blanco/amarillo (no inhibición/conversión) al rojo (inhibición/conversión total) (Figura 4-4). El porcentaje de conversión fue establecido en 12% como valor máximo deseado.

De éste análisis se observó que la mayoría de los compuestos exhibieron poca o ninguna inhibición y algunos exhibieron bajos niveles entre el 20 al 30% (Figura 4-5). Todo compuesto que exhibió más del 30% de inhibición, siguiendo reglas generales de la técnica, justificó una mayor investigación y se procedió a trabajar en un formato de dosis-respuesta.

En función de esto último, 163 hits fueron identificados, los cuales exhibieron una disminución en la actividad enzimática en un rango del 30% al 70% sobre el control negativo. Los compuestos seleccionados presentaban una amplia diversidad en su estructura química por lo que fue difícil analizar su relación estructura-función en esta instancia.

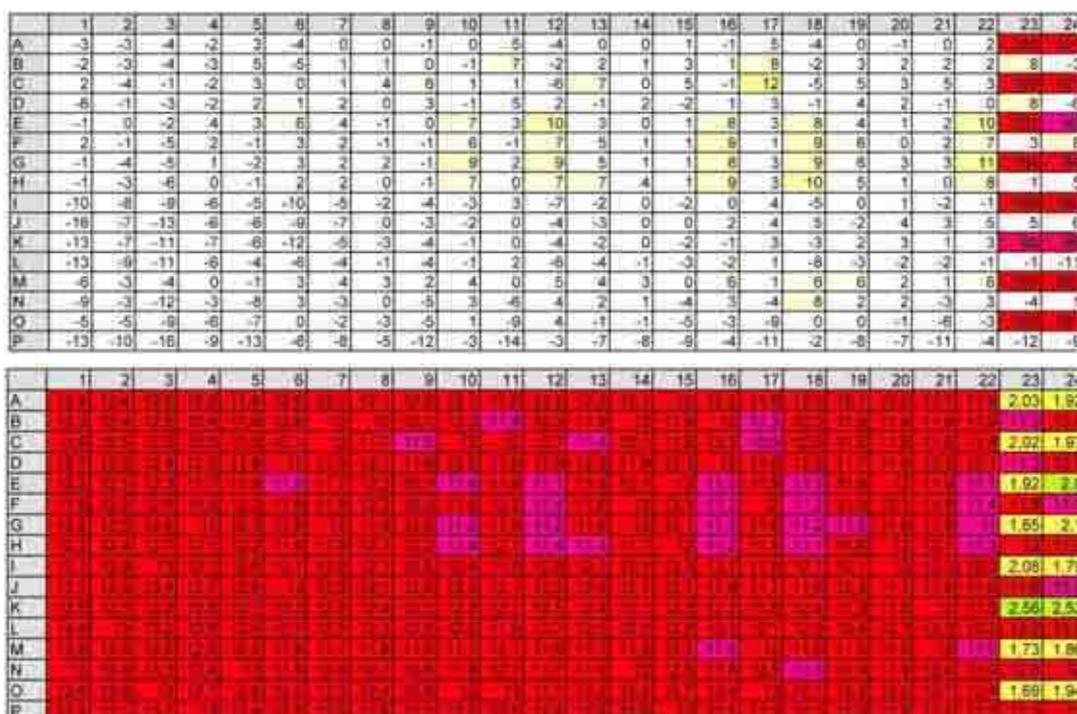


Figura 4-4. Análisis de compuestos que inhiben la actividad de RS de *B. abortus* en mapas de colores. En la imagen se observan dos placas de 384 pocillos, el cual cada pocillo se asigna a un compuesto distinto analizado. Las últimas dos columnas de la derecha corresponden a los controles positivos y negativos. Arriba: mapa de inhibición (%) cuyos colores indican compuestos activos en rojo e inactivos en blanco. Abajo: Los valores se refieren al grado de conversión (%), el cual fue establecido en un valor óptimo del 12%. El color rojo corresponde a la mayor conversión y amarillo a la menor.

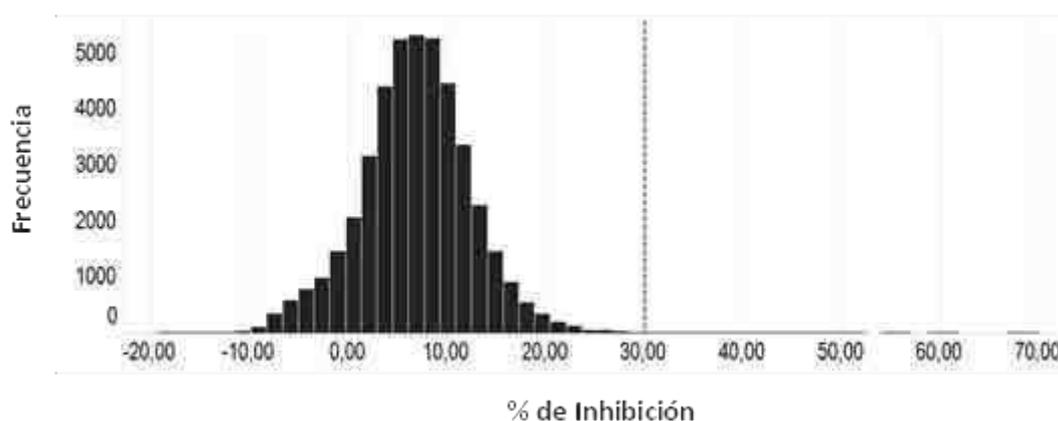


Figura 4-5. Distribución del porcentaje de inhibición de los compuestos de la librería NDDI contra RS de *B. abortus*. Los compuestos exhiben un patrón de distribución consistente con un screening primario usando grandes bibliotecas a concentración única. Un Cut off del 30% fue utilizado para identificar compuestos que serán analizados en formato dosis-respuesta (línea punteada).

Ensayos de dosis-respuesta

Los ensayos de dosis-respuesta fueron realizados para descartar falsos positivos entre los hits obtenidos en el primer screening a concentración única, y estudiar la eficacia de aquellos verdaderos inhibidores analizando su correspondencia entre su concentración y la magnitud del efecto inhibitorio. Para cada uno de los compuestos se examinó su correspondiente CI_{50} que indica la concentración del compuesto que inhibe el 50% de la actividad enzimática. Nuevamente se utilizó la tecnología del LabChip 3000 y se reprodujo el mismo protocolo que se utilizó para el screening de la biblioteca. Brevemente, la curva dosis respuesta fue generada usando duplicados de 8 puntos con diluciones seriadas 1:2 de los 163 hits obtenidos en el screening primario. Se midió la concentración del sustrato 6,7-dimetil-8-ribitillumazina y el producto riboflavina por su fluorescencia intrínseca luego de ser separados por electroforesis microfluídica. De los 163 compuestos que fueron analizados, los diez más potentes fueron seleccionados para continuar con ensayos en cultivo bacteriano y los primeros cuatro fueron seleccionados para continuar con análisis cristalográficos (Figura 4-6). Éstos diez primeros compuestos en potencia mostraron un CI_{50} en un rango entre 2 μM y 31.8 μM . El más potente fue BMP142 con un CI_{50} = 2,4 μM . El siguiente en la lista presentó una potencia aproximadamente 10 veces menor. En la tabla 4-1 se muestra la lista de compuesto en orden ascendente de CI_{50} . Cabe destacar que BMP142 también presentó la mayor potencia en el screening primario.

	Compuesto	CI_{50} (μM)
1	BMP142	2,4
2	BMF205	19,1
3	BMH037	19,2
4	BNG508	25,6
5	BNG453	26,4
6	BNG504	27,8
7	BNQ176	29,6
8	BNN966	30,5
9	BNG452	31,2
10	BNG414	31,9

Tabla 4-1. Lista de compuestos y su correspondiente valor de CI_{50}

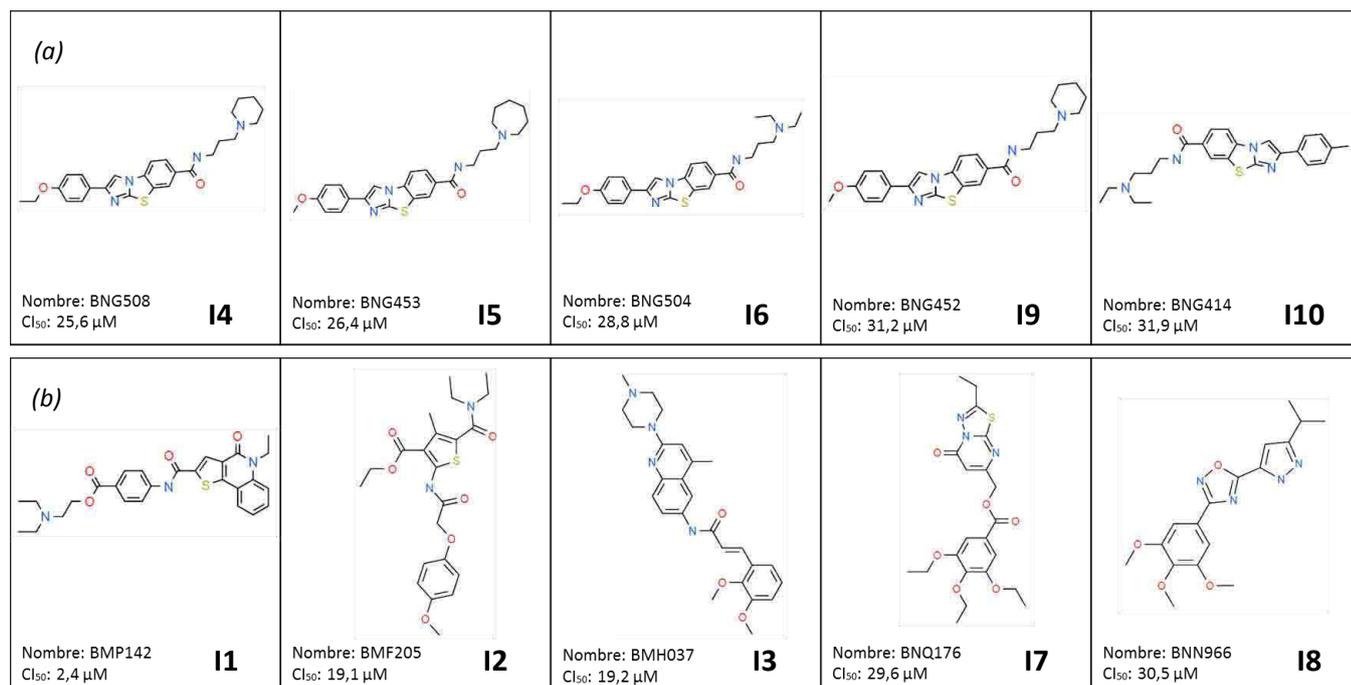
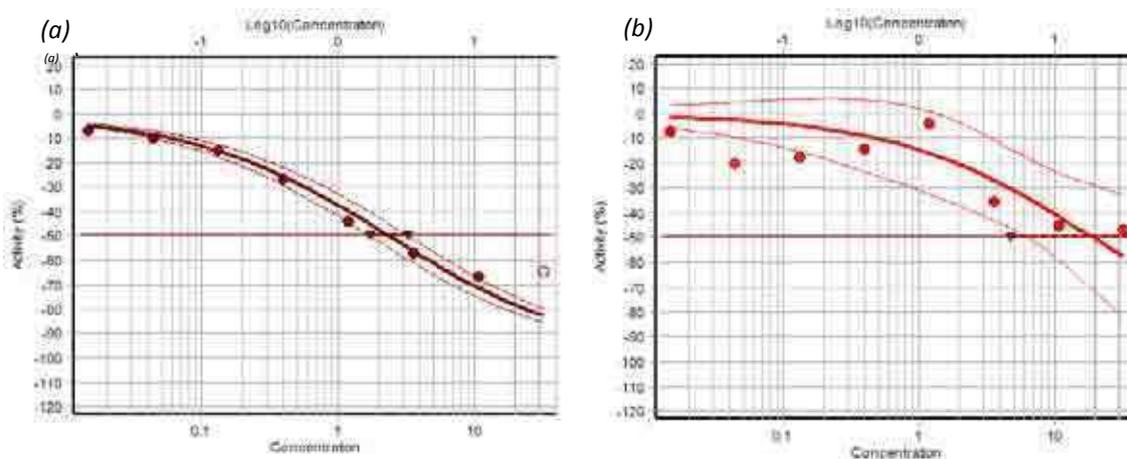


Figura 4-6. Estructura de los diez compuestos más potentes seleccionados en el ensayo dosis-respuesta de los 164 hits obtenidos del screening primario contra RS de *B. abortus*. Los compuestos fueron agrupados en dos conjuntos: (a) compuestos que comparten el mismo *core* estructural. En el grupo (b) se encuentran el resto de los compuestos, incluido BMP142, el más potente de la serie *in vitro*.

La curva de Cl₅₀ de los diez compuestos seleccionados se puede observar en la figura 4-7 en un orden decreciente de potencia.



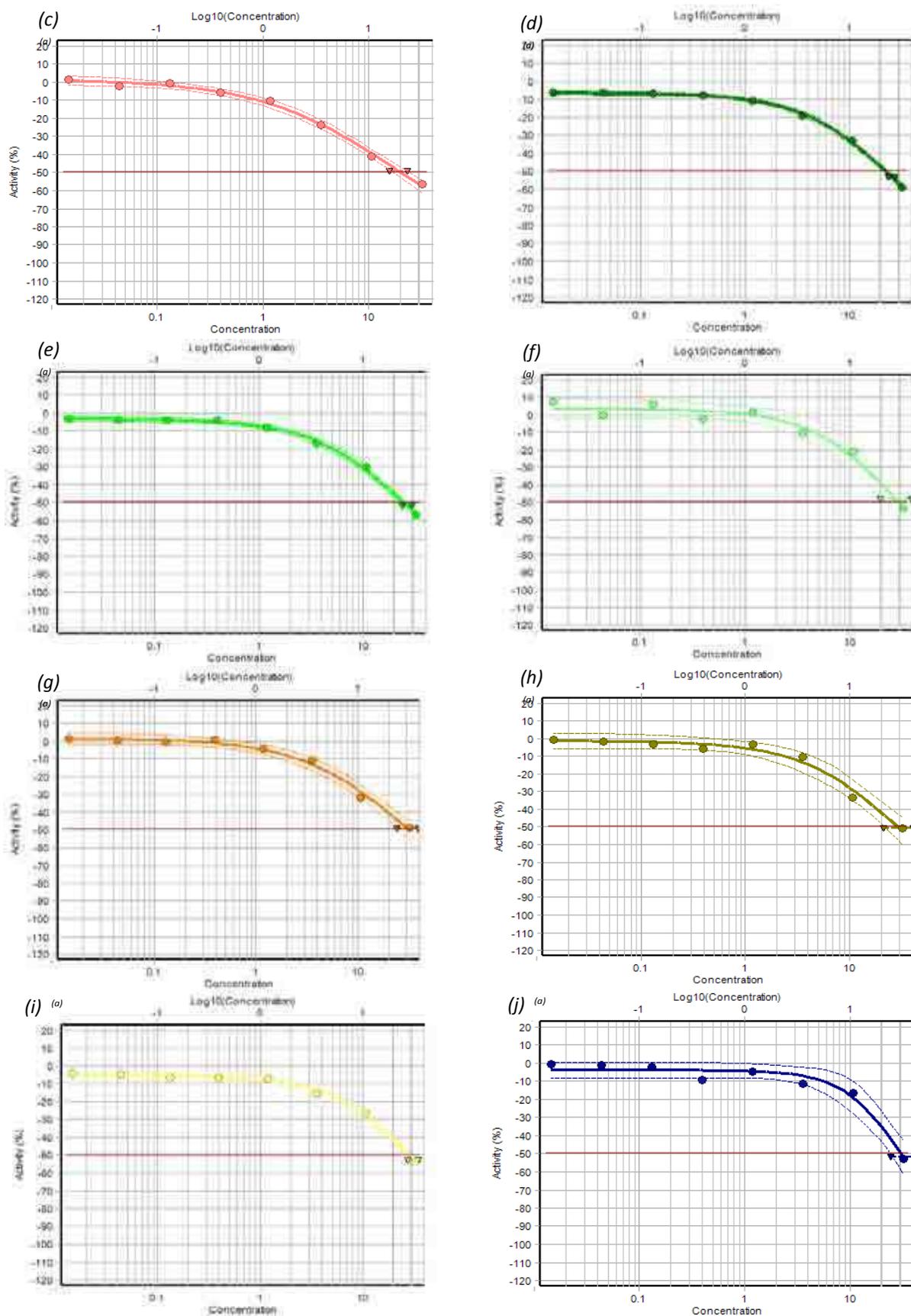


Figura 4-7. Curvas dosis-respuesta de los compuestos seleccionados contra RS de *B. abortus*. La actividad enzimática fue medida como se describe en Materiales y Métodos, ante la presencia de diferentes concentraciones

de los compuestos. (a) BMP142, (b) BMF205, (c) BMH037, (d) BNG508, (e) BNG453, (f) BNG504, (g) BNQ176, (h) BNN966, (h) BNG452, (i) BNG414. Curvas obtenidas en el programa HELIOS.

Análisis estructural de los compuestos

Observando la estructura química de los diez compuestos con mayor Cl_{50} obtenidos en el ensayo de dosis-respuesta (Figura 4-7) se logró apreciar que ninguno de ellos comparte similitudes a nivel estructural con los sustratos o productos de la reacción catalizada por RS. La mayoría de los compuestos en la biblioteca se comportan como “singleton”, es decir, como especies únicas dentro de la selección. Justamente el compuesto de mayor potencia, BMP142 entra en este conjunto. Comparando este compuesto con el resto de la biblioteca y estudiando la similitud química se pudo determinar que sólo se encontró una similitud menor al 84%, de modo que resulta difícil establecer una relación estructura-función. Sin embargo, ampliando la observación al resto de los diez compuestos, fue destacado notar que cinco de ellos compartían el mismo “core” estructural. Este core constituye un sistema heteroaromático de tres anillos con un grupo fenilo y dos sustituyentes principales: (R_1) un radical alquilo o etóxido y (R_2) una cadena alifática larga con una amina terciaria en el extremo (Figura 4-8). Este dato resultará relevante en los experimentos en cultivo bacteriano que se describen más adelante.

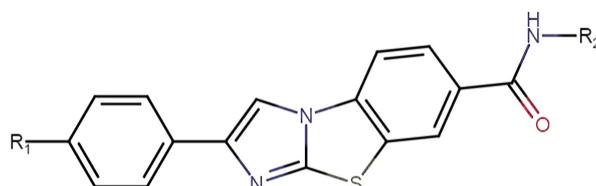


Figura 4-8. 2-fenilimidazol[2,1-b][1,3]benzotiazol corresponde al core estructural común a cinco de los diez compuestos con mayor potencia de inhibición *in vitro* contra RS de *B. abortus*. Los sustituyentes en R_1 corresponden a radicales alquilo o etóxido y en R_2 a radical alquilo con una amina terciaria en el extremo.

Luego se procedió a analizar las características moleculares de estos diez compuestos (Tabla 4-2) y se focalizó en las propiedades fisicoquímicas necesarias según Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001), las cuales indicarían una aceptable solubilidad y permeabilidad celular (ver detalles de la “regla de 5” de Lipinski en la Introducción). Recordemos que la biblioteca fue armada con compuesto “drug-like”. Si dos o más de los parámetros establecidos se encuentran fuera del

Propiedades	BMP142 (I1)	BMF205 (I2)	BMH037 (I3)	BNG508 (I4)	BNG453 (I5)	BNG504 (I6)	BNQ176 (I7)	BNN966 (I8)	BNG452 (I9)	BNG414 (I10)
Fórmula Molecular	<chem>C27H29N3O4S</chem>	<chem>C22H28N2O6S</chem>	<chem>C26H30N4O3</chem>	<chem>C26H30N4O2S</chem>	<chem>C26H30N4O2S</chem>	<chem>C25H30N4O2S</chem>	<chem>C21H25N3O6S</chem>	<chem>C16H18N4O4</chem>	<chem>C25H28N4O2S</chem>	<chem>C24H28N4OS</chem>
Peso Molecular (Da)	491.6	448.53	446.54	462.61	462.61	450.6	447.5	330.3	448.58	420.57
logP	4.57	3.53	3.95	4.71	4.68	4.94	3.72	3.24	4.37	4.73
Área de superficie polar (Å ²)	107.19	122.41	66.93	87.11	87.11	87.11	124.32	95.31	87.11	77.88
Aceptor de enlaces de hidrógeno	5	6	6	4	4	4	9	1	4	3
Dador de enlaces de hidrógeno	1	1	1	1	1	1	0	7	1	1
#Enlaces rotables	10	11	6	8	7	10	11	6	7	8
RoF Vio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QED	0.42	0.53	0.57	0.39	0.41	0.37	0,47	0,72	0.43	0.43
Fase clínica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 4-2. Propiedades moleculares que influyen en la biodisponibilidad oral de los compuestos candidatos a drogas seleccionados del ensayo dosis-respuesta. logP: Coeficiente de partición octanol-agua. QEP (por su nombre en inglés Quantitative Estimate of Druglikeness): Estimación cuantitativa de la calidad de una droga para convertirse en un fármaco exitoso. RoF Vio (por su nombre en inglés Rule of Five Violation): Violaciones a la “Regla de los 5” de Lipinski. Fuente: ChEMBL.

rango determinado, es muy probable que el compuesto presente o bien escasa solubilidad (cuando excede los valores críticos de coeficiente de partición o peso molecular) o bien una pobre absorción y permeabilidad (cuando excede los valores críticos correspondientes a número de donores y aceptores de hidrógeno). Juzgando en función de estas reglas, los diez compuestos seleccionados para este análisis cumplen con los requisitos expuestos y no violan ninguno de los criterios de Lipinski.

Así mismo, aspectos pertinentes a las reglas de Veber (Veber, 2002) fueron analizados, las cuales fueron descritos en la Introducción. Así, los criterios de número de enlaces rotables y el PSA también permanecieron dentro de los márgenes considerados óptimos para una potencial permeabilidad por difusión pasiva de membranas. Sin embargo, la evaluación de la potencialidad de una droga (o drug-likeness) en términos absolutos no refleja adecuadamente todo el espectro de calidad compuesto. A razón de ello, se ha propuesto una nueva medida de drug-likeness denominado Estimación Cuantitativa de Drug-likeness (QED) fundado en una optimización multicriterial en donde la calidad de un compuesto es cuantificado aplicando el concepto de cuán “deseado” es (Bickerton *et al.*, 2012). El rango de valores va entre cero (todas las propiedades desfavorables) hasta uno (todas las propiedades favorables). Observamos que los diez compuestos analizados poseen valores en un rango entre 0,37 a 0,72 de QED.

Ensayos de inhibición con los compuestos en cultivo bacteriano

El estudio se focalizó en estudiar si los diez compuestos que presentaban mayor inhibición *in vitro* sobre RS purificada eran capaces de tener el mismo efecto en cultivos bacterianos. Para esto, los estudios de su actividad biológica se llevaron a cabo en cultivo líquido de *B. abortus* 2308 silvestre. Se tomaron una serie de tubos de microbiología y se creció *B. abortus* junto a los compuestos a una concentración fija y luego se incubó a 37°C. Se tomaron muestras de su densidad óptica a 600 nm a las 20 y 48h post inoculación. La concentración inicial de los compuestos fue de 150 µM. Los resultados se exponen en la figura 4-9.

Cuatro compuestos analizados demostraron actividad contra *B. abortus*. Se trató de los inhibidores BNG508, BNG04, BNG452 y BNG414 (de ahora en más, indicados como inhibidor 4, 6, 9 y 10 respectivamente). Curiosamente estos compuestos mostraron una actividad al menos diez veces menos potente en los ensayos *in vitro* respecto al primer compuesto de la serie BMP142. Estos valores de CI_{50} se encontraron en el margen de 25,6 a 31,9 µM. Los cuatro compuestos demostraron afectar significativamente el crecimiento del cultivo bacteriano a los dos tiempos en que fueron tomadas las muestras. El compuesto 5 mostró un efecto parcial

respecto al cultivo control sin inhibidor. Cabe destacar que este compuesto demostró ser poco soluble en las condiciones de trabajo, por lo que su efecto parcial de inhibición podría deberse su menor disponibilidad en el medio de cultivo.

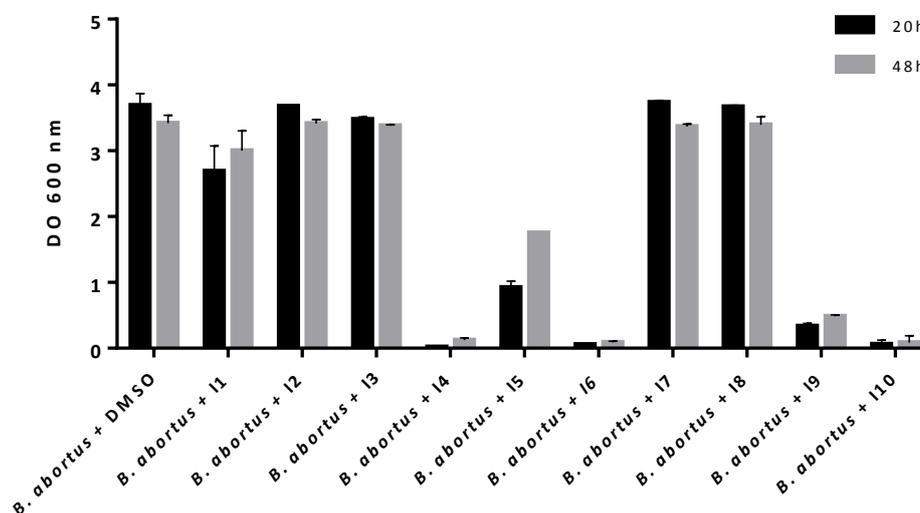


Figura 4-9. Ensayo de inhibición del crecimiento de *B. abortus* en medio líquido. Se analizaron los diez compuestos con mayor potencia *in vitro* contra RS, cuyos Cl_{50} se detallan en la Tabla 4-1.

Resulta llamativo que los cuatro compuestos que mostraron ser activos contra *B. abortus*, los inhibidores 4, 6, 9 y 10, comparten el *core* estructural mostrado en la figura 4-8. Asimismo, el inhibidor 5 también exhibe este arreglo estructural. Este dato apoya aún más la especulación de considerar su efecto inhibitorio parcial sobre el crecimiento de *B. abortus* como consecuencia de su solubilidad parcial en el medio de cultivo.

Luego se procedió a estudiar si el efecto de estos compuestos se debía a su acción en concreto sobre la vía biosintética de riboflavina o si un blanco diferente estaba siendo afectado (efecto off target). Para ello, se procedió del mismo modo que fue detallado el experimento de inhibición, pero adicionando riboflavina al medio de cultivo. Se partió de la premisa que si el blanco atacado pertenecía al conjunto de enzimas de la biosíntesis de riboflavina, y la bacteria detenía su crecimiento por la incapacidad de generar riboflavina endógena, entonces al suministrarle riboflavina exógena debieran recuperarse los índices de crecimiento normal. Efectivamente se observó que todos los cultivos bacterianos crecían un poco más lento que el control sin inhibidor a las 24h, pero que en general se orientaban hacia una recuperación del crecimiento normal a las 48h (Figura 4-10a).

Por otro lado, se procedió a analizar si era la RS la enzima afectada por estos compuestos. Se adicionó 6,7-dimetil-8-ribitillumazina en reemplazo de riboflavina al medio de cultivo sumado a los cinco inhibidores. En este caso el fundamento fue el siguiente: la 6,7-dimetil-8-ribitillumazina es el sustrato de la RS, y por lo tanto, si la RS está siendo afectada por los

compuestos, el suministro exógeno de este sustrato no podrá ser utilizado por la RS y el crecimiento de los cultivos continuará afectado. Los resultados mostraron comportamientos parciales o totales, pero en general una tendencia hacia la recuperación en todos los cultivos ante los distintos compuestos (Figura 4-10b). Éste efecto combinado de resultados podría deberse a múltiples razones tales como (i) RS sí es la enzima afectada pero el exceso de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina esté compitiendo con los inhibidores y logra desplazarlos lentamente, (ii) RS sí es la enzima afectada pero las moléculas de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina reaccionan espontáneamente generando riboflavina a pesar de la RS inhibida o (iii) RS no es la enzima afectada pero la 6,7-dimetil-8-ribitillumazina no está logrando ingresar fácilmente a la bacteria por lo que no alcanza recuperar completamente el nivel de crecimiento normal.

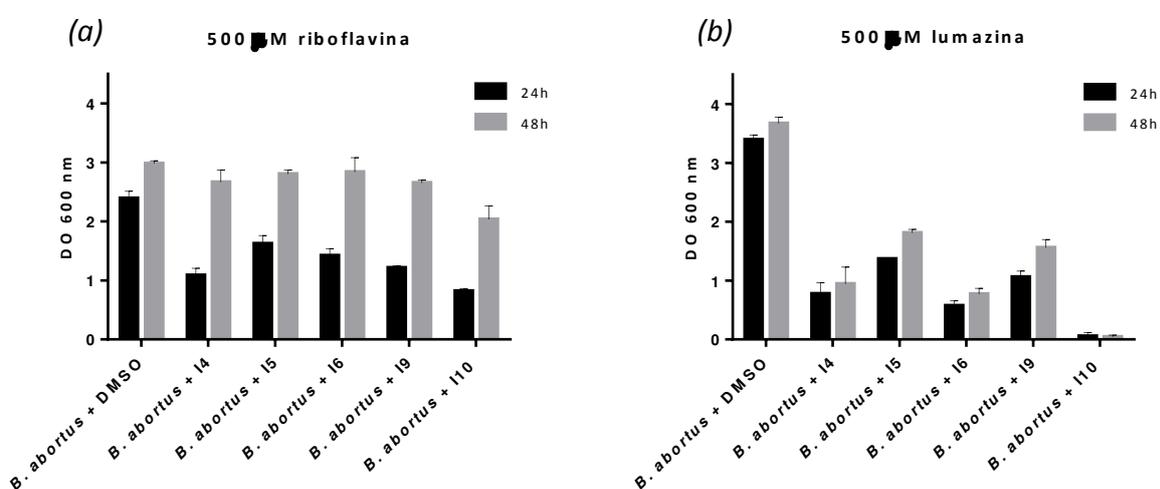


Figura 4-10. Ensayo de inhibición del crecimiento de *B. abortus* en cultivo líquido complementado con riboflavina y 6,7-dimetil-8-ribitillumazina. Se trabajó con los compuestos 4, 5, 6, 9 y 10 que resultaron activos en experimentos previos, en una concentración final de 150 μM. En el panel (a) se adicionaron 500 μM de riboflavina al medio de cultivo. (b) Se realizó el mismo ensayo que en a, pero en este caso se adicionaron 500 μM de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina, el sustrato de RS.

Por último se analizó si la actividad de inhibición del crecimiento de los inhibidores 4, 5, 6, 9 y 10 sobre la bacteria se correlacionaba con su concentración. De este modo se inocularon distintas concentraciones de estos compuestos en cultivos bacterianos y se procedió a medir el crecimiento bacteriano a las 24, 48 y 72h. Efectivamente el efecto inhibitorio de los inhibidores 4, 6 y 10 depende de su concentración (Figura 4-11a). Sin embargo, los cultivos con los compuestos 5 y 9, a pesar de mostrar una disminución en el crecimiento a las 24h, lograron valores de DO equivalentes al cultivo sin inhibidor al cabo de 72h.

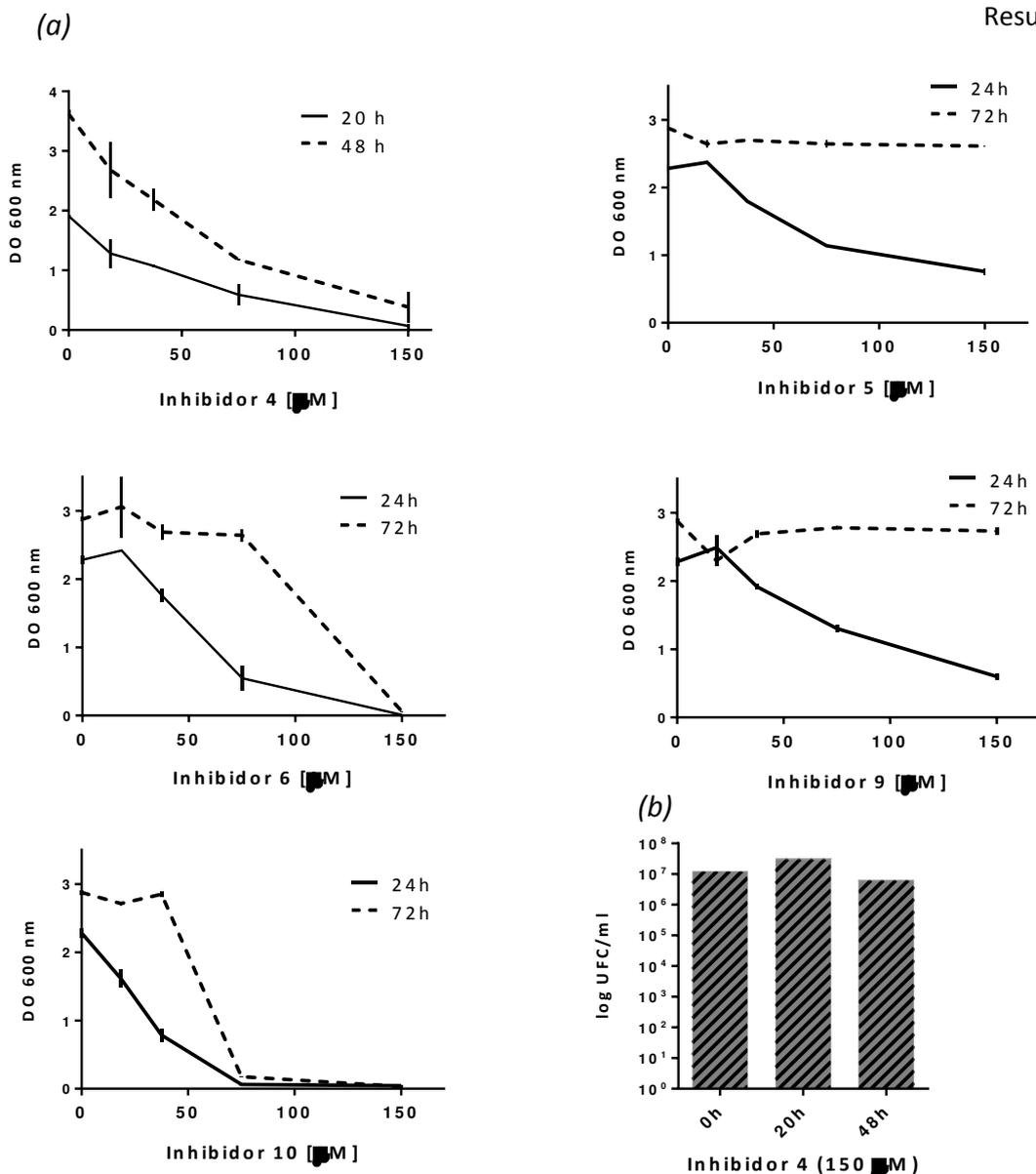


Figura 4-11. Ensayo dosis-respuesta de inhibidores en cultivo líquido bacteriano de *B. abortus*. (a) Se midió el crecimiento de *B. abortus* silvestre en cultivo líquido con distintas concentraciones de los inhibidores 4, 5, 6, 9 y 10 a 24, 48 y 72h. (b) Recuento de las bacterias viables (UFC) de cultivos con 150 μ M del inhibidor 4. Los valores son expresados como media y las barras indican la diferencia entre duplicados.

Además se analizó si el efecto ejercido por el compuesto 4 era sólo bacteriostático o si se estaba en presencia de un compuesto bactericida. Para ello se realizó el recuento de células viables inoculando en placas de TSA muestras a tiempo 0, 20 y 48h en presencia de 150 μ M del inhibidor 4. Los resultados indican que éste compuesto es bacteriostático, ya que no se demuestra un crecimiento ni disminución de la población a tiempos mayores (Figura 4-11b).

Análisis funcional de los compuestos con actividad biológica contra *B. abortus*

Pese a que en análisis previos los diez compuestos demostraron ser óptimos a nivel físicoquímico y en consecuencia considerablemente prometedores para convertirse en líderes

en el proceso de desarrollo de drogas teniendo en cuenta las reglas generales de drug-likeness, observamos que ninguno de ellos posee antecedentes de haber sido parte aún de un estudio en fase clínica. Mucho menos ser considerados antibióticos.

A continuación se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva de las propiedades biológicas de los cinco compuestos que mostraron ser activos contra *B. abortus* en cultivo líquido (inhibidores 4, 5, 6, 9 y 10) y el compuesto con mayor potencia *in vitro* (inhibidor 1). La mayoría de los ensayos biológicos a los que fueron referidos pertenecían a screenings funcionales contra una gran diversidad de dianas. En algunas referencias, los distintos compuestos fueron utilizados contra la misma diana. Con más detalle se pueden mencionar tres blancos moduladores del sistema nervioso asociados a enfermedades neurodegenerativas como lo son MAPT asociada a Alzheimer (Shin *et al.*, 1991) y Parkinson (Lei *et al.*, 2010), la proteína TDP1 asociado a ataxia espinocerebral (Takashima *et al.*, 2002) y Ataxin-2 conectada con la esclerosis lateral amiotrófica y ataxia espinocerebelar (Elden *et al.*, 2010). Por otro lado, también se encontró la proteína SMAD como blanco oncogénico, cuya función es la regulación de genes importantes para el destino celular, como lo es la diferenciación, el crecimiento y la muerte celular. También se destacan la proteína DNA Pol η involucrada en la reparación del ADN cuya patología es la Xerodermia pigmentosa (Stary & Sarasin, 2002) y la proteína GLP1R asociada a una enfermedad no transmisible como diabetes (Holst, 2004) así como también a la enfermedad de Huntington (Martin, Golden, *et al.*, 2009). En la lista además aparece la proteína Histona Lisina Metiltransferasa G9a que se trata de un regulador epigenético. Respecto a blancos relacionados a infecciones, sólo unos pocos se presentan en la lista: (i) blancos celulares no determinados que bloquean el ingreso del virus Lassa en líneas celulares HEK293, o que inhiben al Ortopoxvirus Vaccinia en etapas específicas de la infección, (ii) la proteína APOBEC-3F, una citidina desaminasa humana que actúa como inhibidora de la replicación de retrovirus (Holmes *et al.*, 2007) y (iii) la cruzipaina de *Trypanozoma cruzi*, el único blanco no humano, que está involucrada en el daño tisular al hospedador y representa una diana muy interesante para el desarrollo de drogas y vacunas (Duschak & Couto, 2009) (Tabla 4-3). Por último también fueron encontrados algunos blancos asociados a enfermedades raras o huérfanas como lo es el receptor 1 de la hormona paratiroidea (PTH1R), cuya patología afecta al sistema óseo generando Condrosdisplasia Blomstrand (Hoogendam J, 2007) y Síndrome de Eiken (Eiken M, 1984). En la figura 4-13 se puede ver una clasificación general de los blancos moleculares. Cabe destacar que luego de esta intensa búsqueda no se identificó ningún blanco bacteriano.

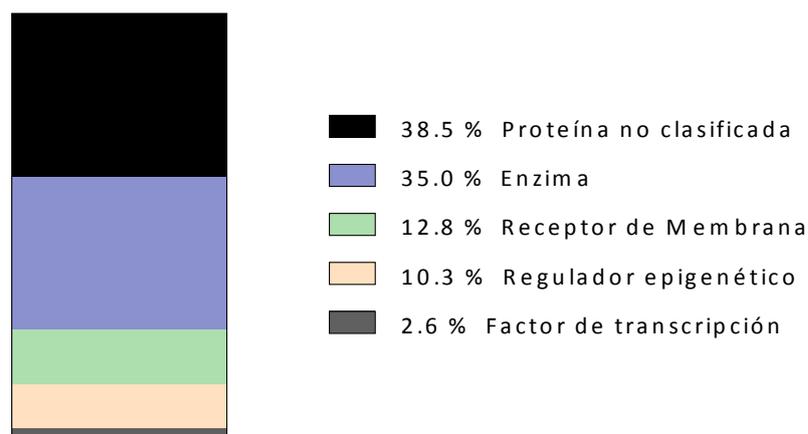


Figura 4-13. Clase de proteínas blanco de los 4 compuestos estudiados.

Ensayo	Diana	BMP142 (I1)	BNG508 (I4)	BNG453 (I5)	BNG504 (I6)	BNG452 (I9)	BNG444 (I10)
qHTS para inhibidores de TGF- β	Madres contra homólogo decapentaplégico 3 (SMAD)		✓	✓	✓	✓	✓
qHTS para inhibidores de tirosil-DNA fosfodiesterasa 1 humana (TDP1)	Sin comprobar	✓	✓	✓	✓	✓	✓
qHTS de inhibidores de Polimerasa Eta.	DNA polimerasa eta		✓	✓	✓	✓	✓
qHTS de inhibidores de interacciones Vif-A3F	DNA dC->dU- enzima editora APOBEC-3F		✓	✓	✓		✓
qHTS de agonistas inversos del receptor GLP-1	Receptor del Péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP1R)		✓	✓	✓		✓
qHTS para inhibidores específicos de etapa de Ortopoxvirus Vaccinia.	Sin comprobar			✓	✓	✓	✓
qHTS de inhibidores de TDP-43	TDP-43			✓		✓	✓
qHTS de inhibidores de la formación de fibrillas Tau	Proteína asociada a microtúbulo Tau (MAPT)	✓	✓			✓	✓
qHTS de inhibidores de la expresión de ATXN.	Ataxin-2		✓		✓		
qHTS de inhibidores de FEN1	Flap endonucleasa específica de estructura 1 (FEN1)			✓		✓	
qHTS de inhibidores promiscuos y específicos de Cruzaina	Cruzipaina (<i>T. cruzi</i>)		✓			✓	
qHTS de activadores de ClpP	Subunidad proteolítica de la				✓	✓	

	proteasa Clp dependiente de ATP						
Histona Lisina Metiltransferasa G9a.	Histona lisina-N-metiltransferasa H3 lisina-9 specific 3 (EHMT2)	✓					✓
Counterscreen de fluorescencia total de inhibidores de la interacción del receptor de la hormona Tiroidea y el co-regulador del receptor de esteroide 2.	Receptor β 1 de la hormona tiroidea (THRB)	✓				✓	
qHTS de inhibidores de la Polimerasa Kappa	Polimerasa Kappa			✓			
Screening primario de inhibidores de USP1/UAF1	Heterodímero enzima desconjugante ubiquitin-específica USP1/UAF1			✓			
Inhibidores de la entrada del virus Lassa en la línea celular HEK293		✓			✓		
qHTS de inhibidores de selenoproteína tiorredoxina reductasa-1 (TrxR1)	Selenoproteína tiorredoxina reductasa-1 (TrxR1)				✓		
qHTS para la identificación de un anestésico general nuevo	Cadena liviana de ferritina (FTL)						✓
qHTS de inhibidores de dominio Tudor de la desmetilasa JMJD2A	Desmetilasa lisina específica 4A						✓
qHTS de inhibidores de BAZ2B	Proteína de bromodominio adyacente a dominio dedos de Zinc 2B						✓
qHTS de inhibidores de PTHR	receptor 1 de la hormona paratiroidea (PTH1R)	✓					

Tabla 4-3. Propiedades bioactivas de los compuestos activos contra cultivo líquido de *B. abortus*.

Análisis de docking de los compuestos

En conjunto con el equipo de investigadores del departamento de Global Discovery Chemistry de Novartis, en Cambridge, Massachussets, Estados Unidos, fue realizado el análisis *in silico* del compuesto BMP142, el de mayor potencia *in vitro* contra RS de *B. abortus*. Una vez obtenidos los datos de Cl_{50} , se procedió a buscar bibliografía acerca de los inhibidores de RS ya publicados en la literatura para evaluar si existía algún tipo de similitud estructural con nuestro candidato. La figura 4-14 muestra los resultados de esta búsqueda. Como puede notarse, ninguno de los compuestos se asemeja al BMP142. Muchos de ellos fueron incluidos en la

primera mini biblioteca analizada como se detalla en el capítulo 2. Los compuestos publicados son análogos del producto 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1*H*,3*H*)-pirimidinadiona, análogos del sustrato 6,7-dimetil-8-ribitillumazina y análogos del estado de transición. Lo siguiente fue realizar una comparación de la forma de BMP142 con los ligandos naturales de RS, basado en la idea que las moléculas tienen forma similar si sus volúmenes se superponen bien y cualquier desfase de volumen es una medida de disimilitud. Para este propósito se utilizó el software ROCS (OpenEye) y se observó que el sistema heteroaromático de 3 anillos del BMP142 colocalizaba con el anillo de isoaloxacina de la riboflavina, pero el resto de la molécula se encontraba orientada hacia la cola ribitil de la riboflavina de una manera poco superponible, puesto que el tamaño del inhibidor es mucho mayor que el de la riboflavina. En consecuencia, resultó imposible encontrar y posicionar grupos reactivos del BMP142 que generen interacciones ligando-proteína y reemplacen a aquellos múltiples enlaces de hidrógeno y empaquetamiento aromático que establece la riboflavina en el pocket del sitio activo. Esto generó duda al considerar qué tan competitivo podía resultar el BMP142 ante un ligando natural y desplazarlo del sitio activo de RS. Luego procedimos a realizar el docking. En principio delimitamos el sitio de docking en la interfaz entre el extremo N-terminal de la cadena A y el C-terminal de la cadena B de la estructura de RS-RBF (PDB 4e0f). El conformero más favorecido energéticamente muestra un modo de unión que genera muchos choques estéricos con los residuos que conforman el sitio activo de RS (Figura 4-15). Esto se podía suponer inicialmente, debido a que el tamaño del pocket que genera el sitio activo en las estructuras con ligando unido (RS-ROS, RS-RBF y RS-NRP) es muy compacto y el ligando natural de mayor tamaño, la riboflavina, se acomoda ajustadamente. Por lo tanto, los resultados del docking de BMP142 en el sitio activo de la estructura RS-RBF muestran pocas chances de que efectivamente este compuesto ingrese a la interfaz de la cadena A y B al observarse numerosos choques, torsiones improbables y ausencia de interacciones intermoleculares con la proteína. El paso siguiente fue intentar el mismo procedimiento con la serie de compuestos activos contra la bacteria en cultivo. Este trabajo se realizó en colaboración con el Lic. Elías López, perteneciente al grupo de investigación de Bioinformática estructural dirigido por el Dr. Adrián Turjanski. A diferencia del estudio anterior donde se trabajó con la interfaz de la cadena A y B de la estructura con riboflavina, en este análisis se tomó como referencia sólo la cadena A como receptor de ligandos de la estructura con roseoflavina (RS-ROS, pdb 4G6I).

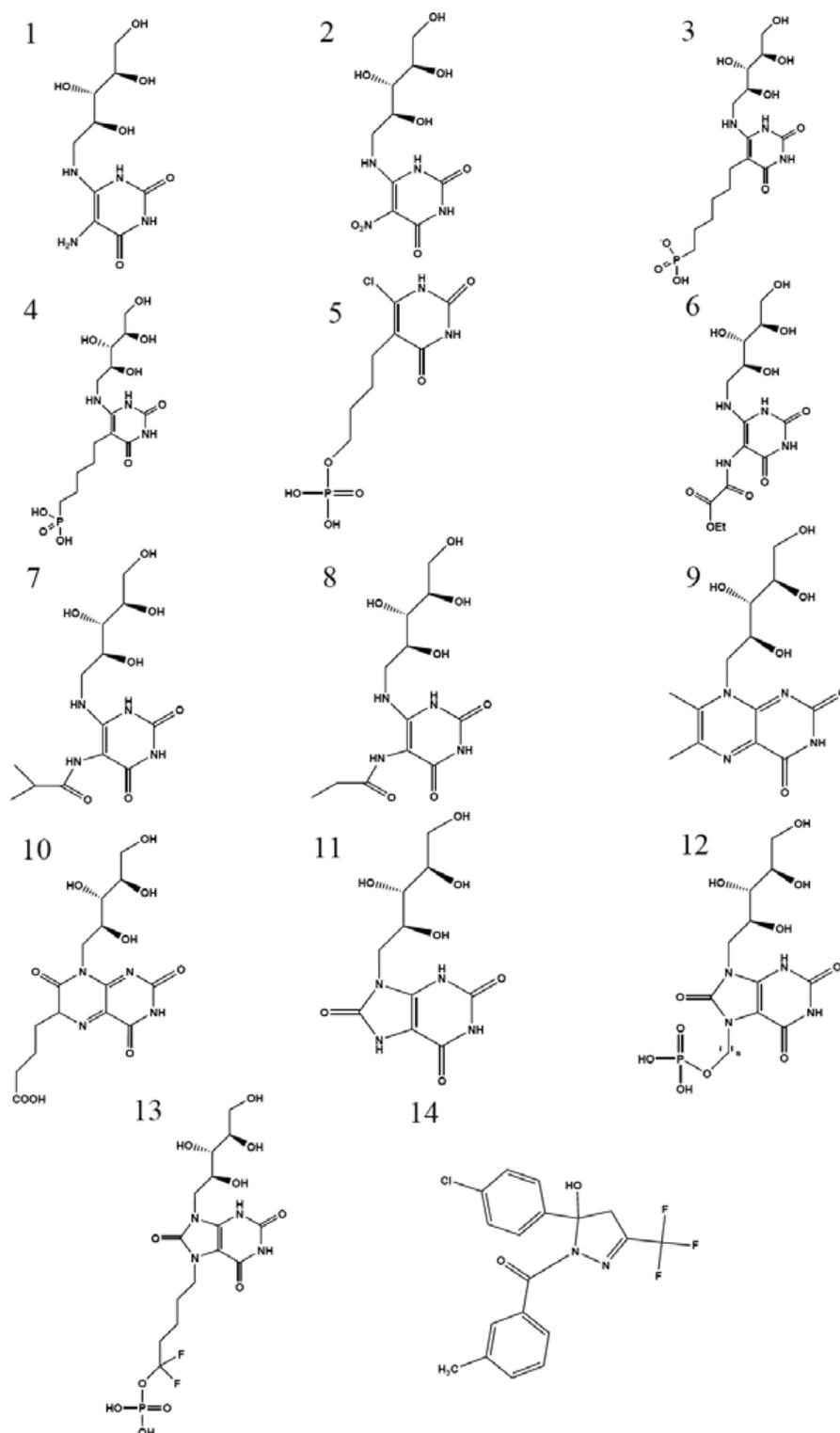


Figura 4-14: Inhibidores de RS. El sustrato (compuesto 9) y el producto (compuesto 1) también son mostrados en la figura. 1: 5-amino-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona; 2 :5-nitro-6-(D-ribilamino)-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona; 3: ácido 6-(6-D-ribitilamino-2,4dihidroxipirimidin-5-il)-1-hexilfosfónico; 4: ácido 5-(6-D-ribitilamino-2,4-dihidroxipirimidina-5-il)-1-pentilfosfónico; 5: ((4-(6-cloro-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-il)butil)1-fosfato; 6, 7, 8: Derivados del ácido N-(2,4-Dioxo-6-d-ribitilamino-1,2,3,4-tetra-hidropirimidin-5-il)oxalámico; 9: 6,7-dimetil-8-ribitillumazina; 10: 6-carboxietil-7-oxo-8-ribitillumazina; 11: 9-D-ribitol-1,3,7-trihidro-2,6,8-purinatriona; 12: 9-D-Ribitilamino-1,3,7, 9-tetrahidro-2,6,8-purinatrionas portando alquilfosfato; 13: 5-(1,3,7-trihidro-9-D-ribitol -2,4,8-

purinatriona-7-il)1,1-difluoropentano1-fosfato; 14: (5-(4-clorofenil)-5-hidroxi-3-(trifluorometil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-il)(m-olil)metanona. LONG!!! .

Las razones de esta elección fueron (i) la estructura RS-ROS posee un archivo pdb completo, con ambos sitios de unión de la cadena A llenos, y (ii) la cadena A es suficiente para el docking, puesto que las otras cadenas sólo agregan restricciones topológicas adicionales dependiendo del grado de separación entre ellas, es decir, estarían actuando como una tapa. Los dominios N- y C- terminal se denominaron sitio 1 y 2 respectivamente. Luego se estudió la ocupación de los sitios por los anillos aromáticos tanto del ligando natural como por la droga en análisis; y se determinó que hay tres bolsillos posibles para acomodar estos anillos. El docking se realizó con Autodock 4 en el sitio 1 (dominio N-terminal de la cadena A). Con el fin de disminuir los grados de libertad (torsiones) de la molécula y facilitarle al programa que rápidamente alcance convergencia en cuanto a la cantidad de confómeros y poblaciones, sólo se dockeó el *core* de la droga, de ahora en más llamado BNG* (Figura 4-16a).

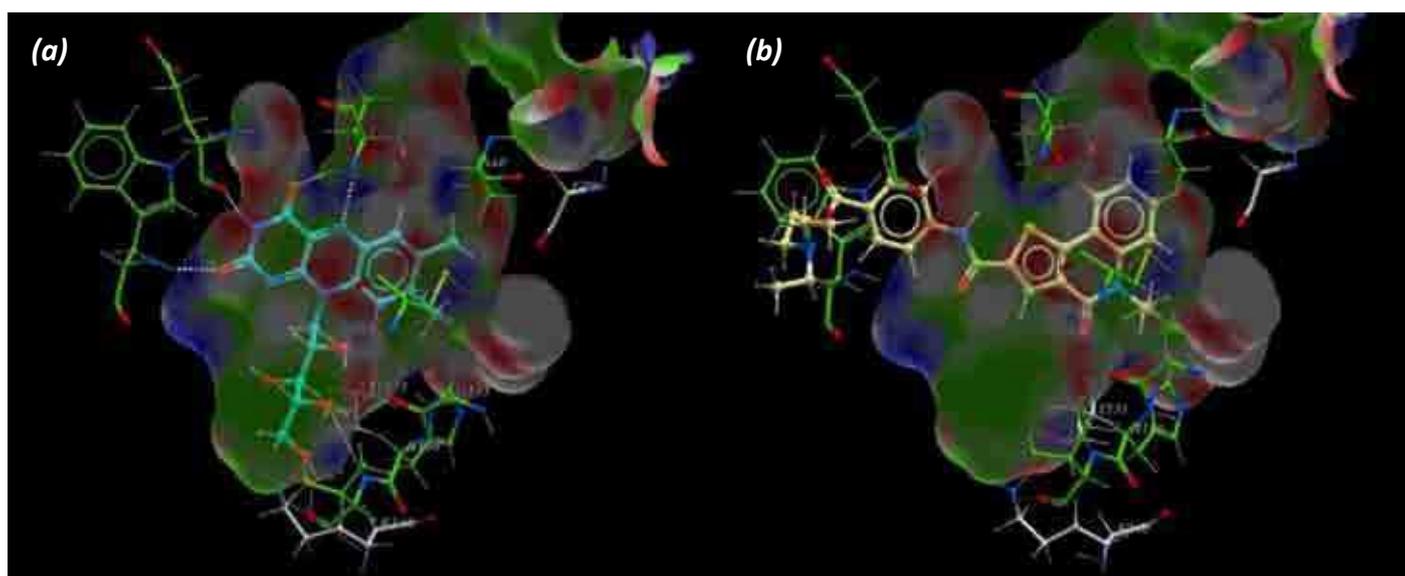


Figura 4-15. Sitio de docking del compuesto BMP142 en el pocket del sitio activo de RS de *B. abortus* en la interfaz entre el extremo N-terminal de la cadena A y el C-terminal de la cadena B. El sitio activo se muestra en colores según el tipo de residuos: blanco (hidrofóbico), verde (hidrofilico), azul (carga positiva) y rojo (carga negativa). (a) El ligando de referencia (celeste) es la riboflavina, y se encuentra representado en bolas y bastones. (b) Modo de unión del compuesto BMP142, representado en bolas y bastones (amarillo).

El *core* BNG* muestra 4 grupos poblacionales (A, B, C y D), pero sólo dos de ellos presentan una población significativa (A y B). Curiosamente, uno de estos dos grupos poblacionales, más precisamente el B, los anillos de la droga coinciden con la posición que ocuparía el primer anillo heterocíclico del ligando de referencia (roseoflavina) (Figura 4-16).

Cuando realizamos el docking de las drogas completas (BNG508, BNG453, BNG504, BNG452 y BNG414 ordenados de mayor a menor potencia *in vitro* contra la RS) sobre el sitio 1 observamos que la población relativa de las diferentes conformaciones cambia para cada droga, así como también su posición energética (Figura 4-17). Sin embargo, se puede destacar que los mismos dos conformeros más poblados aparecen en todas las drogas completas analizadas. El mismo estudio se realizó sobre el sitio 2 (domino C-terminal de la cadena A) obteniéndose un número bajo de conformeros (Figura 4-18). Resulta interesante que cuando realizamos el docking de las drogas enteras en este sitio 2, aparece una conformación nueva que presenta mejor energía y que no se corresponde con las poblaciones anteriormente observadas en el docking del *core* BNG. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que el sitio 2 o C-terminal de la cadena A es más “profundo” en términos estéricos y la droga tiene la libertad de adoptar nuevas conformaciones con menos impedimentos. Curiosamente, esta nueva posición no registra ningún reemplazo de los anillos del ligando de referencia, la roseoflavina. Por lo tanto, para encontrar las razones estructurales que determinan la estabilización de este nuevo conformero de la droga, evaluamos los residuos que interactúan con ella. Se observó que la Gln139 en el C-terminal (correspondiente a la Leu37 del N-terminal) hace un puente de hidrógeno con el oxígeno del O-etilo de la droga (Figura 4-19).

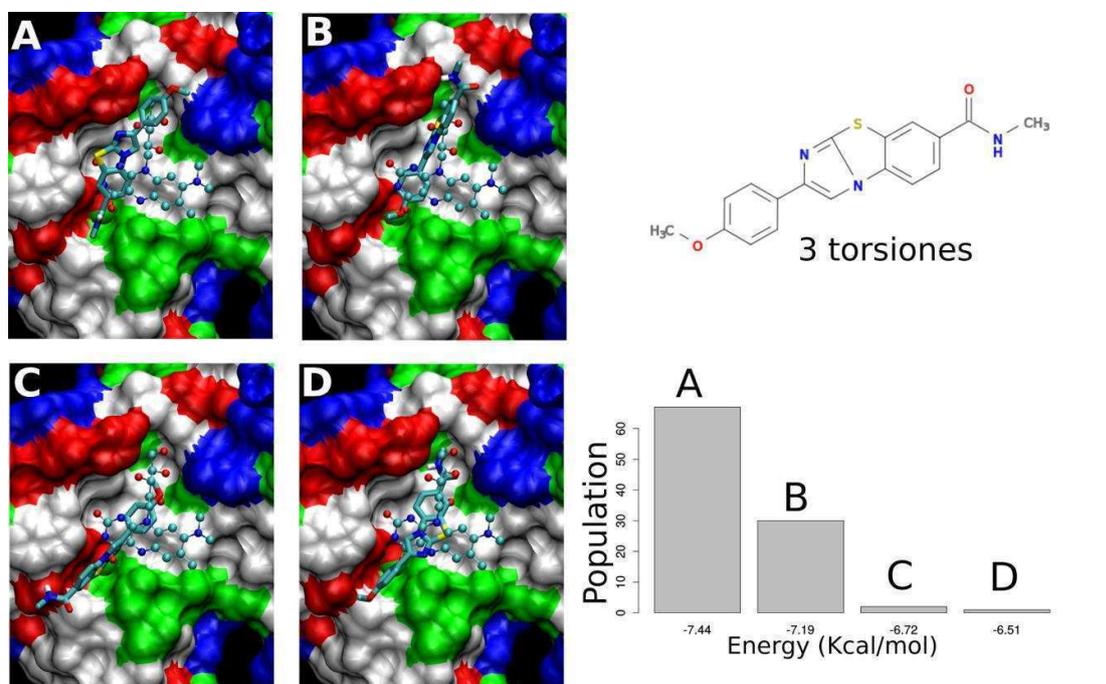


Figura 4-16. Docking del *core* BNG* dentro del sitio 1 (N-terminal) de la cadena A de la estructura 4g6l. Se muestra el ligando de referencia roseoflavina como bolas y bastones y al *core* BNG* como líneas. (a). *core* BNG*. (b). Descripción del sitio de unión coloreado en función del tipo de residuo: hidrofóbico (blanco), hidrofílico (verde), positivo (azul), negativo (rojo). Los cuatro cuadrantes muestran las cuatro poblaciones mayoritarias de conformeros

que arrojó el docking. (c). Diagrama de energía de las poblaciones de confórmeros. Las de menor energía son las más favorecidas.

Luego realizamos un docking sesgado que favorecía los confórmeros de la droga que se posicionan sobre el anillo de la roseoflavina en los sitios 1 y 2. Observamos para el sitio 1 dos poblaciones mayoritarias de menor energía (Figura 4-20) y tres en el caso del sitio 2 (figura 4-21). Estas poblaciones son importantes desde el punto de vista práctico debido a que representarían las conformaciones más probables en el caso de que las drogas efectivamente ingresen a los sitios de unión de RS.

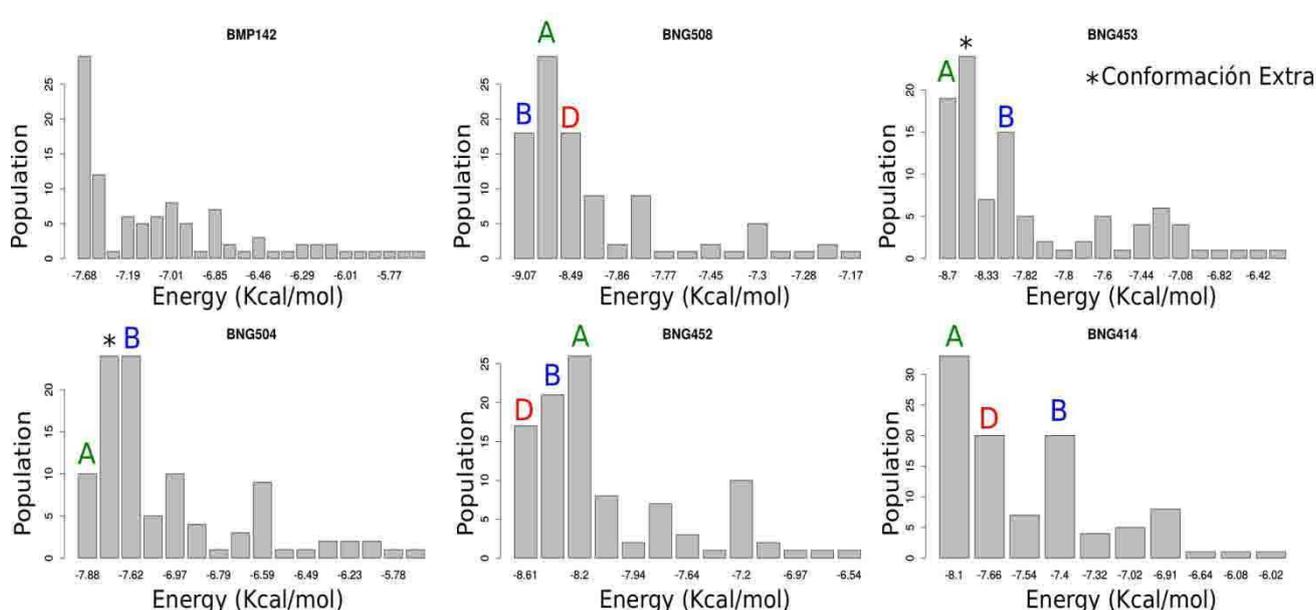


Figura 4-17. Distribución de energía de las poblaciones o conformaciones de los inhibidores 1, 4, 5, 6, 9 y 10 en el sitio 1 de la cadena A de RS-ROS.

En función de estos resultados procedimos a determinar cuál de las dos poblaciones mayoritarias de la droga BNG508 observadas en el sitio 1 (N-terminal), A o B, sería favorecida. Para ellos realizamos dinámica molecular (DM) con la droga BNG508 sobre el modelo del monómero y del trímero, y se evaluó su estabilidad conformacional en términos de r.m.s.d. y la energía de interacción con métodos de cálculo de energía libre post procesamiento como es MMPBSA. Observamos que el confórmero A se aleja de la posición y el confórmero B se mantiene estable en el tiempo, reflejado en la poca variación del r.m.s.d. respecto a la posición propuesta por el análisis de docking (Figura 4-22). En esta posición, la droga BNG508 muestra tres interacciones principales: (i) la amina terciaria con el Asp108, (ii) empaquetamiento aromático π en el anillo aromático y (iii) interacción del O-etilo de la droga con el Glu66. Estos resultados se correlacionan tanto en el monómero como en el trímero.

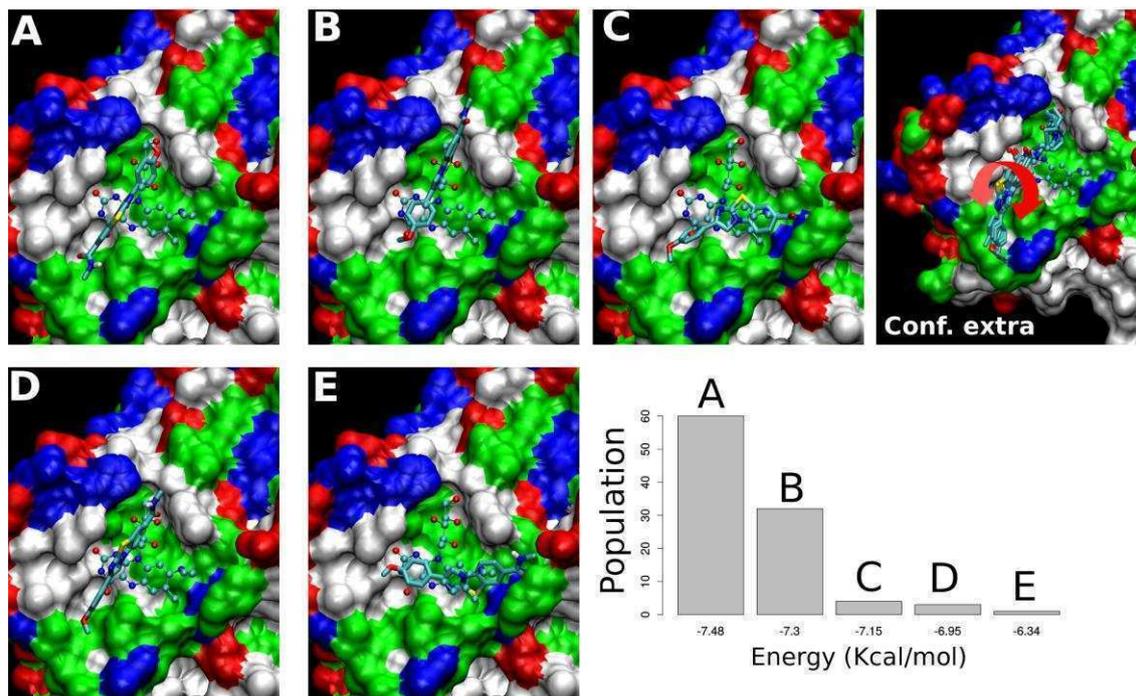


Figura 4-18. Docking del *core* BNG* dentro del sitio 2. El ligando de referencia, roseoflavina, está representado como bolas y bastones y el BNG* con bastones sólidos.

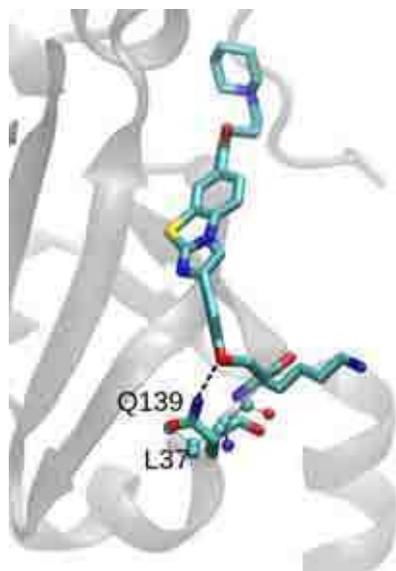


Figura 4-19. Conformación extra de la droga BNG508 para el sitio 2 (C- terminal) de la cadena A de RS-ROS. El residuo Gln139 (Leu37 en el sitio 1) estabiliza el O-etilo de la droga.

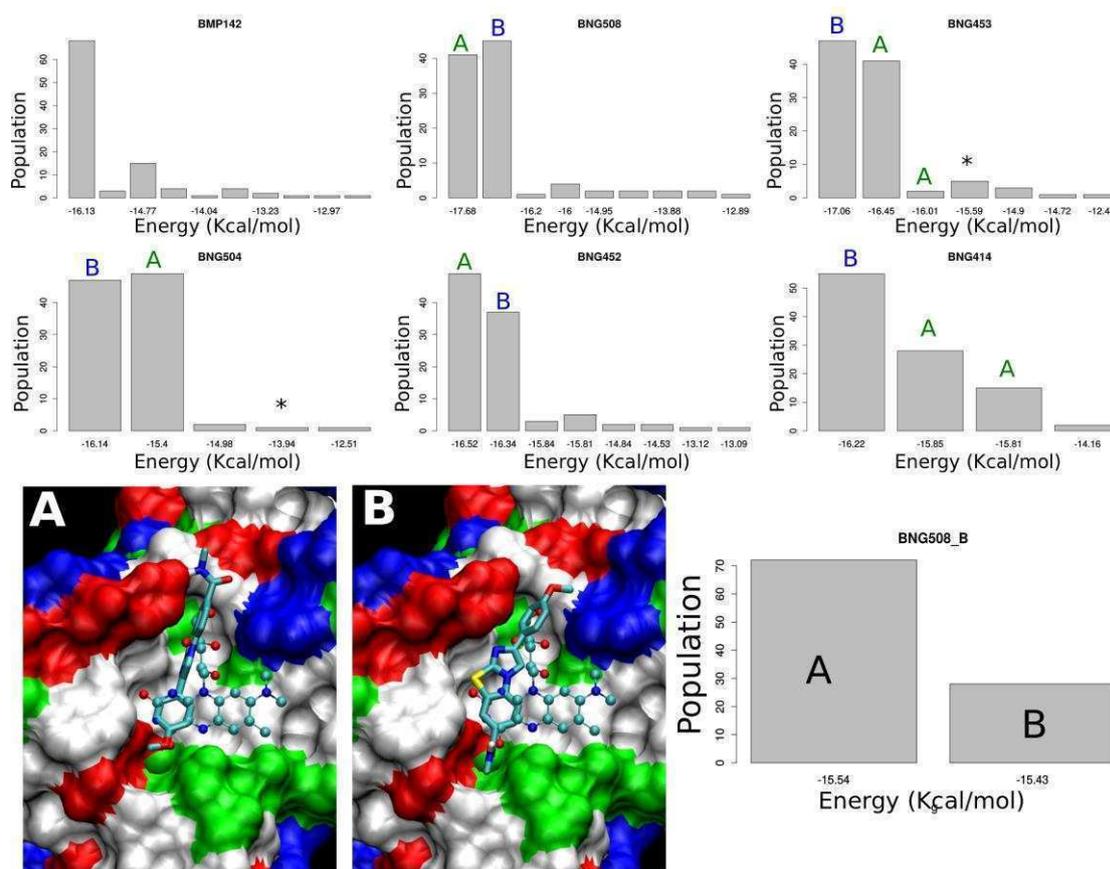


Figura 4-20. Docking sesgado del core BNG* dentro del sitio 1 (N-terminal) de la cadena A de RS. Se representan el ligando de referencia roseoflavina (bolas y bastones) y el core BNG* (bastones sólidos). Arriba se indica la distribución de conformaciones de las drogas estudiadas.

Cristalización de complejos RS-inhibidores.

Como fue mencionado previamente, los cuatro compuestos de mayor potencia *in vitro* contra RS de *B. abortus* fueron seleccionados para realizar los estudios cristalográficos. De este modo fueron incluidos el inhibidor 1 (BMP142) el cual presentó mayor potencia y el inhibidor 4, el cual demostró un contundente efecto sobre cultivo bacteriano y que además comparte el core estructural con los otros cuatro compuestos que mostraron el mismo efecto; por lo tanto resulta de gran interés.

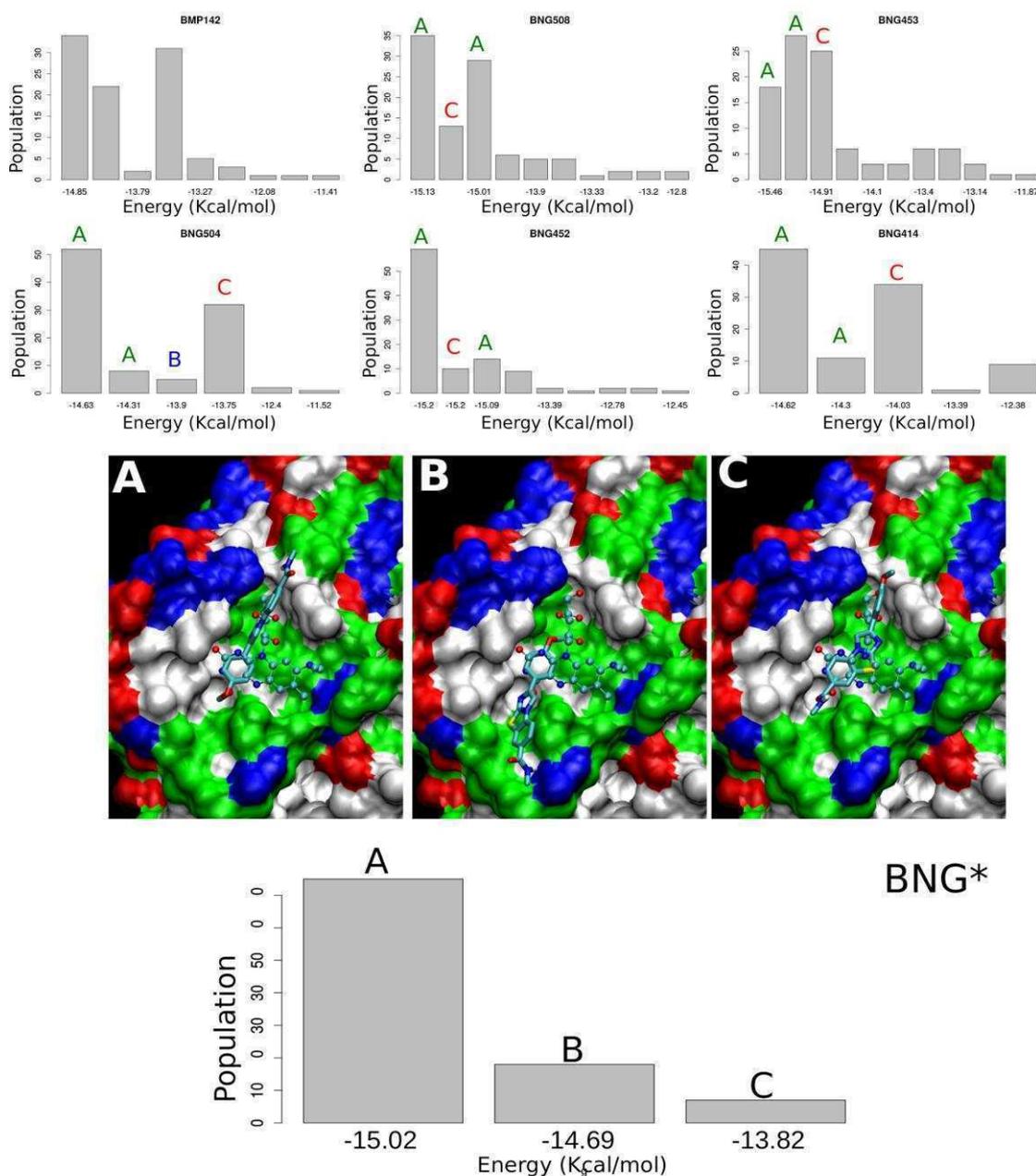


Figura 4-21. Docking sesgado del *core* BNG* dentro del sitio 2 (C-terminal) de la cadena A de RS. Se representan el ligando de referencia roseoflavina (bolas y bastones) y el *core* BNG* (bastones sólidos). Arriba se indica la distribución de conformaciones de las drogas estudiadas.

Los cuatro complejos cristalinos RS-BMP142 (I1), RS-BNG508 (I2), RS-BMF205 (I3) y RS-BMH037 (I4) fueron generados por soaking de la RS en presencia de un exceso de los inhibidores. También se ensayó cocrystalización con el inhibidor 1, pero los cristales sufrieron severos daños, y debieron ser descartados. Los cristales de RS se obtuvieron inicialmente en condiciones de MPD 20-30% y en 12% PEG 8000/10% Glicerol/ 0,5 M KCl. Estos presentaron

forma de gota grande y agujas respectivamente. A partir de estos cristales iniciales se realizó seeding para mejorar su calidad y luego se procedió con el soaking.

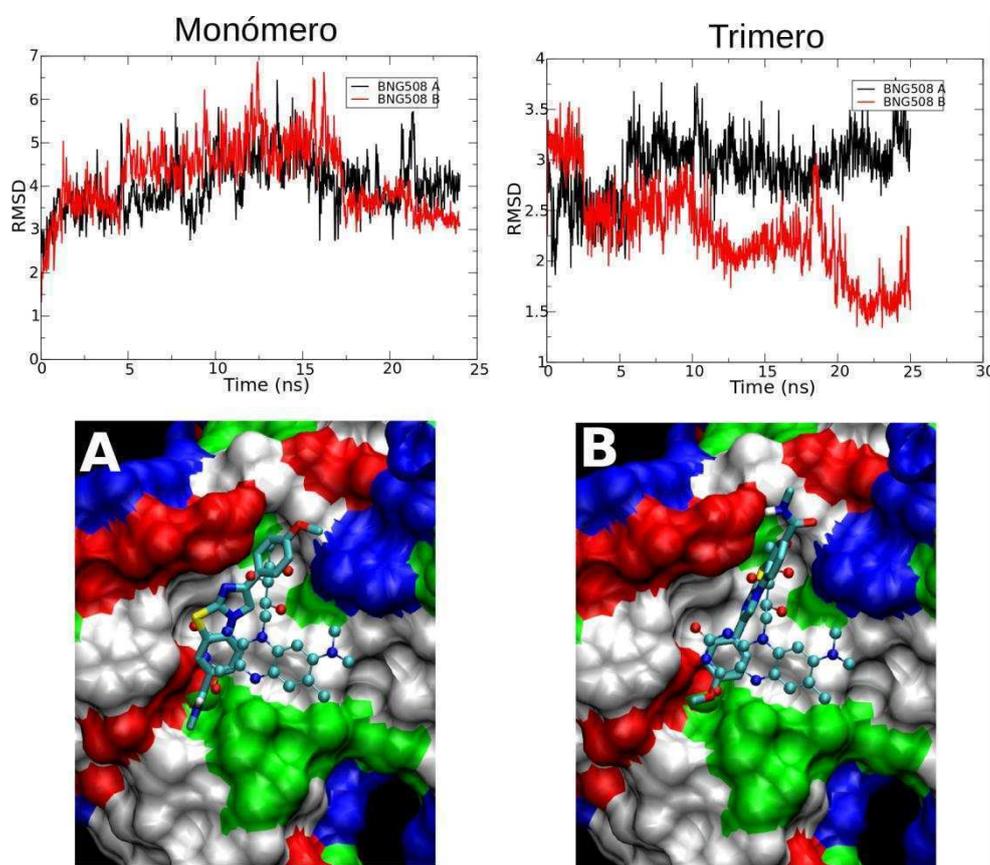


Figura 4-22. RMSD de BNG508 en el sitio 1 (N-terminal) para las dos conformaciones de mayor población (ver figura 4-20). También se detalla el cálculo de Energía de interacción.

Los inhibidores se adicionaron en un exceso de 2.5 a 10x respecto a la concentración de RS inicial. Los cristales de los cuatro complejos se enviaron al sincrotrón de SOLEIL (Paris, Francia) donde se colectaron 64 set de datos en las dos condiciones descritas al inicio, con límites de resolución entre 1.80 y 3.20 Å. Para encontrar la posición de los ligandos en la estructura se realizó un análisis manual del mapa de densidad electrónica, y para re-examinar esta observación se utilizó luego un algoritmo de análisis de densidad electrónica de estructuras sin modelar. No se encontró ligando en ninguna de los datos observados. Estos resultados formaron parte del primer intento de cristalización de complejos. Las condiciones serán optimizadas en función de los datos de dinámica molecular obtenidos, donde se demostró que la proteína “cerrada” o en estado de empaquetamiento cristalino no es capaz de acomodar ligandos.

En resumen, realizamos un novedoso ensayo funcional de HTS contra RS utilizando una tecnología de electroforesis microfluídica. Se analizó una biblioteca de 44.000 compuestos comerciales con características drug-like. El ensayo funcionó correctamente. Luego de un screening secundario de dosis-respuesta se identificaron diez compuestos con un CI_{50} menor a $30\mu M$. de estos diez compuesto, el más potente mostraba una potencia unas 15 veces mayor que el resto, sin embargo en los ensayos contra *B. abortus* en cultivo no fue activo. En estos ensayos identificamos cinco compuestos de una potencia de CI_{50} de entre 40 y $100\mu M$ a las 24h. Estos compuestos presentaban todos el mismo *core* estructural y fueron estudiados por docking en RS. Los resultados de docking, junto con los de dinámica molecular, arrojaron la presencia de una población mayoritaria de un confórmero en una determinada posición consistente para todas las drogas de la serie analizadas. El sitio donde interaccionaría mejor es el dominio C-terminal de la cadena A de RS. Los ensayos de cristalografía para obtener los complejos con estas drogas no dieron resultados hasta el momento.

Discusión y Perspectivas

La brucelosis es considerada por la OMS como una de las siete zoonosis endémicas desatendidas. Reducir los riesgos en la salud pública generados por las zoonosis y por otras amenazas para la salud en el contexto de la interacción animales-humano-ecosistema, que incluyen zoonosis emergentes y la resistencia a los antimicrobianos, no es una tarea sencilla. Las opciones de tratamiento con antibióticos para infecciones bacterianas ya existentes o bacterias emergentes resistentes a múltiples fármacos difíciles de tratar son limitadas, lo que resulta en una alta morbilidad y mortalidad. Aunque hay algunas alternativas potenciales al tratamiento con antibióticos tales como la inmunización pasiva (Keller & Stiehm, 2000) o la terapia de fagos (Levin & Bull, 2004), el enfoque de la corriente principal se basa en el descubrimiento y desarrollo de antibióticos nuevos y más eficientes. La gran mayoría de los antibióticos actuales, incluso con drásticas modificaciones, se dirigen a los mismos procesos celulares que sus predecesores naturales o sintéticos. La gama de estas dianas está limitada a los componentes de la maquinaria de traducción, la biosíntesis de la pared celular, metabolismo del ADN/ARN y algunos otros procesos celulares. Con la amplia gama de genomas secuenciados, se hace posible implementar la idea de una fórmula mágica “ideal”, con blancos esenciales definidos con mucha mayor precisión a nivel molecular. Esto debe complementarse con la disponibilidad de colecciones de compuestos químicamente diversos para detectar la precisa combinación blanco/droga (Payne *et al.*, 2007). El nuevo paradigma de terapia antimicrobiana orientada a la virulencia es comparar las vías metabólicas de los hospedadores y las bacterias patógenas, y así encontrar nuevos blancos patogénicos específicos. Es por esta razón que el metabolismo de flavinas, presente en bacterias patogénicas pero ausente en los mamíferos hospedadores, es considerado un importante blanco terapéutico.

Así este trabajo de Tesis exploró el metabolismo de flavinas de *B. abortus*, definiendo la organización genómica de los genes involucrados en la vía biosintética de riboflavina, y demostrando la presencia de un regulador positivo del operón, NusB. Además se hizo foco en la enzima RS, la última enzima en la cadena de biosíntesis de riboflavina, la cual representa un importante blanco quimioterapéutico en la búsqueda de antimicrobianos contra la brucelosis. Se logró la caracterización estructural y cinética de la misma y mediante un ensayo de high throughput screening contra la enzima, se han obtenido una serie de cinco compuestos activos contra cultivos de *B. abortus* silvestre.

Regulación y organización cromosómica de los genes *ribH*

Los genes que conforman la vía biosintética de flavinas resultan esenciales para *B. abortus* (Bonomi *et al.*, 2010) y son considerados blancos de drogas muy prometedores debido a su ausencia en el genoma de los hospedadores. Estudios previos en el laboratorio demostraron que el gen *ribH2*, el cual se encuentra en el cromosoma I, tiene un riboswitch en la región 5' no codificante y este elemento en presencia de FMN y riboflavina *in vivo* regula negativamente los niveles de RibH2 mediante la atenuación traduccional. Sin embargo RibH1, cuyo gen se encuentra en el cromosoma II, no se ve afectada. En base a esto estudié la regulación diferencial de RibH1 en *B. abortus*. En principio se demostró que los genes involucrados en el metabolismo de flavinas se expresan en una misma unidad transcripcional formando un operón denominado operón *rib* (Figura 1-2). Los genes que constituyen este operón *rib* son *nrdR*, *ribD*, *ribE*, *ribH* y *nusB* (Figura 1-2). Luego se indagó en los genes *nrdR* y *nusB* los cuales se encuentran en los extremos del operón *rib* y podrían ejercer un rol regulatorio. Como fue mencionado en la introducción, en la literatura no hay evidencias de la asociación de los genes *nusB* y *nrdR* con la regulación del operón *rib*. Sin embargo, los resultados presentados en esta Tesis muestran que la sobreexpresión de *nusB* en *B. abortus* provoca un aumento en la cantidad de RibH1, pero no de RibH2. Esto sugiere que, en *B. abortus*, NusB estaría actuando sobre la regulación del operón *rib*, más precisamente como un regulador positivo. Esto se condice con la información que se tiene en *E. coli* sobre la función de NusB, en la cual ésta proteína participa en la anti-terminación de la transcripción del operón ribosomal (Luttgen *et al.*, 2002). De este modo tenemos más evidencias para afirmar que los genes que codifican a RibH1 y RibH2 efectivamente presentan una regulación diferencial. Además, NrdR, el gen reportado como represor de las RNR en numerosas microorganismos como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptomyces coelicol*, podría jugar el rol de represor transcripcional del operón *rib*. Sin embargo, aún no logramos evidencias experimentales que sustenten esta hipótesis. El próximo objetivo es obtener las cepas mutantes en los genes *nrdR* y *nusB*, las cuales nos permitirán definir el perfil de regulación definitivo de los genes *ribH*.

Con estos resultados logramos ampliar el conocimiento acerca de la regulación del metabolismo de las flavinas. Hasta el momento, el riboswitch FMN es el único elemento regulatorio relacionado al metabolismo de flavinas descrito en bacteria, y también es un importante blanco de antimetabolitos. Cuando el FMN se une al riboswitch, la expresión de los genes río abajo puede apagarse. El FAD también puede inhibir el riboswitch FMN *in vitro* con la capacidad de unirse al centro del sitio de unión del riboswitch luego de adoptar un ligero cambio conformacional (Serganov *et al.*, 2009). Esto sugiere que el riboswitch FMN es flexible, y esta característica lo hace un atractivo blanco de drogas análogas al FMN. El problema indiscutible que surge de estos inhibidores es que podrían potencialmente interferir las

flavoenzimas del hospedador. Un ejemplo de análogo de riboflavina es la roseoflavina, que es incorporada en las células humanas por los transportadores de riboflavina: hRFT1, hRFT2 (ambos responsables de la absorción a nivel intestinal) y hRFT3 (presente células del cerebro) (Yao *et al.*, 2010). De acuerdo a estudios *in vitro* utilizando flavoquinasa humana y FAD sintetasa (isoforma 2) la roseoflavina se convierte eficientemente en los cofactores análogos RoFMN y RoFAD (Pedrolli *et al.*, 2011). En consecuencia, RoFMN y RoFAD podrían combinarse con flavoenzimas FMN o FAD dependientes, reducir su actividad y afectar negativamente el metabolismo humano. Para lograr obtener un análogo de riboflavina como potencial antibiótico hay que tener en cuenta su especificidad. Y esta diferencia de especificidad puede utilizarse para el diseño racional de compuestos altamente específicos. Existen ejemplos de metabolitos que poseen una conformación significativamente distinta luego de unirse al riboswitch o a una proteína eucariota. Uno de ellos es la S-adenosilmetionina (SAM), un cofactor involucrado en la transferencia de metilos, transulfuración y aminopropilación en humanos; y también regula genes del metabolismo del azufre en bacterias Gram-positivas. La S-adenosilmetionina es ampliamente utilizada con fines terapéuticos o como suplemento nutricional, pero en los últimos años se ha impulsado el desarrollo de análogos para su uso como antibiótico (Hickey & Hammond, 2014, Ham *et al.*, 2011). Recientemente fue descrito un nuevo antimetabolito de riboflavina obtenido mediante un screening de fenotipo. Se trata de un compuesto sintético denominado “ribocil”, que mimetiza al FMN, compite con él e inhibe la expresión del gen *ribB* mediada por el riboswitch FMN. El ribocil demuestra un efecto antibacteriano de una manera altamente selectiva contra el blanco. Esta última característica es la principal diferencia con la inespecificidad de la roseoflavina (John A. Howe *et al.*, 2015). Concluyendo, un análogo ideal de la riboflavina o FMN sería el que logra no sólo mimetizar al FMN para unirse al riboswitch y cortar la expresión de los genes río abajo sino que también debería tener buena actividad sobre a la RS por inhibición por producto. Lamentablemente, debido a las dificultades experimentales no pudimos definir claramente en esta etapa a NrdR y NusB como dianas potenciales. Decidimos concentrarnos en las enzimas de la vía de biosíntesis de riboflavina.

Inhibidores enzimáticos

Nuestro trabajo se focalizó específicamente sobre las dos últimas enzimas del proceso, la LS y la RS. La propuesta fue analizar drogas pequeñas sintéticas como inhibidores enzimáticos.

Las moléculas totalmente sintéticas son un componente crucial del actual arsenal de antibióticos: las quinolonas son antibióticos altamente eficaces de amplio espectro, y las

oxazolidinonas son de creciente importancia en el tratamiento contra Gram-positivas. En este trabajo de Tesis analizamos una biblioteca de 17 compuestos sintéticos provistos gentilmente por el grupo colaborador de los Drs. Cushman y Fischer, de la Universidad de la Universidad de Purdue, Indiana, Estados Unidos y Universidad de Hamburgo, Alemania, respectivamente. Los compuestos que constituían dicha biblioteca fueron resultado de síntesis química y diseñados mimetizando al sustrato 5-amino-6-(D-ribitilamino)2,4(1H,3H)pirimidinadiona o especies intermediarias de reacción de LS de diversos microorganismos tales como *S. pombe*, *E. coli* y *M. tuberculosis*. Algunos pocos también habían sido estudiados frente a la RS de dichos microorganismos con resultados favorables *in vitro*. De este modo, representaban antimetabolitos análogos de sustrato de LS y análogos de producto de RS. Curiosamente, estos compuestos muy similares a los ligandos naturales habían sido obtenidos no a partir de diseño racional en base al complejo cristalino proteína-ligando, sino a partir de screening virtual o screening funcionales *in vitro* y posterior derivatización química. De cualquier modo, el resultado fue el mismo, y los compuestos podrían ser indistinguibles de un diseño de drogas basado en la estructura (SBDD, por sus siglas en inglés). En nuestro primer análisis realizamos un screening indirecto de unión de estos compuestos sobre LS y RS de *B. abortus*. Es importante destacar que con esta modalidad de screening además de evitarse el problema asociado con la inestabilidad de los sustratos involucrados en la catálisis de LS, también se simplificó el estudio al trabajar eliminando la variable tiempo. Sin embargo, presentó una limitación clara: aquellos inhibidores que se unieron por fuera del sitio activo y no pudieron ser capaces de desplazar la riboflavina previamente complejada quedaron excluidos de la selección. No obstante, el ensayo fue una buena aproximación para la medición de varios compuestos en simultáneo, y aquellos que dieron resultados positivos fueron sometidos a ensayos de actividad propiamente dichos. Dos compuestos fueron al mismo tiempo capaces de ingresar al sitio activo de ambas enzimas: NRP y NORP. Sin embargo, en los ensayos contra la bacteria, ninguno de los 17 compuestos inhibió el crecimiento de la bacteria, tampoco incluso los seleccionados por ingresar al sitio activo de nuestros blancos enzimáticos. Analizando sus propiedades fisicoquímicas observamos que, según las reglas de Lipinski para mejorar la probabilidad de su biodisponibilidad (descrito en la Introducción), no eran óptimos. Sin embargo, estas reglas muchas veces no son útiles para identificar buenos compuestos antibióticos líderes los cuales necesitan satisfacer requerimientos distintos: su penetración en procariotas. Los Drs Fischer y Cushman ya habían discutido en sus publicaciones que la inactividad *in vivo* de estos compuestos se debería a su alta polaridad, lo cual no les permitiría atravesar la membrana bacteriana. Sin embargo la mayoría de las drogas anti Gram-negativas pueden alcanzar un alto grado de polaridad y tienden a tener un tamaño grande de hasta 600

Da (O'Shea & Moser, 2008). El valor de hidrofobicidad del NRP ($\log P=2,05$) y NORP ($\log P=2,24$) es estándar y su tamaño pequeño (ver Tabla 2-1), por lo que estas dos características podrían ser la causa de su falla. Cabe aclarar que trabajar con bibliotecas libres de filtros “drug-like” no significa que contengan compuestos más prometedores, sino que tal vez, aplicando las reglas de Lipinski podrían removerse compuestos que sí tienen la capacidad de penetrar las membranas bacterianas. No obstante, no debemos olvidar que *Brucella* es una bacteria Gram-negativa intracelular, por lo que, las reglas de Lipinski son útiles y válidas. En función de lo discutido por los Drs. Cushman y Fischer y de nuestros propios resultados consideramos que la falla *in vivo* de los compuestos estudiados podría deberse a que la biblioteca es inadecuada para *Brucella*.

El enorme desafío planteado en este marco es que el compuesto sea capaz de atravesar tanto la membrana eucariota de la célula del hospedador, como la membrana bacteriana.

Estudio estructural de RS

A partir de los resultados negativos que arrojó el uso de la mini biblioteca contra LS y RS, nos abocamos a utilizar una estrategia diferente para continuar con el desarrollo de drogas contra la vía biosintética de riboflavina de *B. abortus*. Una de ellas fue estudiar la estructura cuaternaria de RS. De la proteína LS ya se contaba con extensa información acerca de su arreglo cuaternario, mecanismo y cinética (Klinke *et al.*, 2007, Zylberman *et al.*, 2006, Klinke *et al.*, 2005, Zylberman *et al.*, 2004). Sin embargo, hasta el comienzo del presente trabajo de Tesis en el año 2010, no se tenían registros acerca de la información estructural de RS de *Brucella* spp. Las estructuras conocidas provenían de observaciones en otros microorganismos. En consecuencia, los modelos cristalinos presentados en esta tesis corresponden a la segunda vez que una RS trimérica ha sido cristalizada conservando su organización cuaternaria, y la primera vez que un trímero de RS intacto ha sido resuelto en la presencia de ligandos. La estructura cristalográfica de RS presentada en esta Tesis revela una organización flexible de los monómeros en el trímero, con una mayor movilidad en la región del barril β . El núcleo de tres hélices α centrales mantiene la arquitectura del trímero, tanto en presencia como en ausencia de ligandos, jugando un rol principal en el ensamblaje de la proteína. Desde un punto de vista ilustrativo, RS se comporta como un ramo de tres flores, en el cual los tallos se mantienen unidos pero cada una de las flores es capaz de moverse respecto a las otras. En solución, este movimiento relativo puede ser bastante pronunciado, produciendo el acercamiento de otros pares adyacentes de sitios de unión al sustrato que en el cristal estaban expuestos al solvente, como el barril C-terminal de la cadena A con el N-terminal de la cadena C, o el barril N-terminal

de la cadena B con el C-terminal de la cadena C (Figura 3-6). De cualquier modo, sólo dos de seis sitios de unión al sustrato tienen la capacidad de actuar como sitio catalítico en un determinado momento. El empaquetamiento cristalino puede incluso representar un obstáculo para el movimiento relativo de las cadenas individuales propuesto, por lo que podría limitar su capacidad para ensamblar un sitio activo diferente. Además, en comparación con el estado cristalino, la unión de la riboflavina y los sustratos análogos en solución puede ser más dinámica y la ruptura de un sitio activo para formar otro diferente podría ayudar a la liberación de los productos de la catálisis. Las estructuras resueltas demuestran además que la unión de ligando conduce al ensamblado de un único sitio activo. Más precisamente, la unión de cualquiera de los tres ligandos estudiados en esta Tesis (y como consecuencia también el sustrato 6,7-dimetil-8-ribitillumazina) al barril N-terminal de la cadena A genera nuevos contactos entre estas moléculas y la cadena B, acercando a los dos monómeros.

Los estudios cinéticos de RS mostraron una marcada inhibición por sustrato y producto también observado en la RS de *A. thaliana* (Fischer *et al.*, 2005). La organización trimérica puede ser un factor clave en la organización de la actividad catalítica de las RSs en eubacterias, hongos y plantas. RS, en común con la mayoría de las enzimas involucradas en la biosíntesis de riboflavina, ha evolucionado para ser un catalizador de baja velocidad. Esto podría justificar por qué la evolución ha preservado una enzima que no usa dos tercios de sus sitios catalíticos en un determinado momento, y podría abrir la posibilidad de funciones desconocidas además de la biosíntesis de riboflavina. Respecto a esto, recientemente se ha reportado que la 6,7-dimetil-8-ribitillumazina, así como también derivados reducidos e hidroxilados son activadores específicos y fuertes de las células T invariantes asociadas a mucosa (MAIT por sus siglas en inglés), las cuales juegan un rol clave en la regulación del sistema inmune y en la detección de infecciones por microorganismos (Patel *et al.*, 2013, Kjer-Nielsen *et al.*, 2012). Sin embargo no existe información acerca de los posibles transportadores o reservorios de estas moléculas antes de ser reconocidas por las células MAIT. Nosotros hipotetizamos que RS podría ser un candidato fuerte para cumplir esta función, lo que podría además explicar por qué esta enzima es un inmunógeno potente en brucelosis.

En general, la caracterización estructural de RS resulta muy útil para SBDD, que se fundamenta en la estructura cristalina de una proteína complejada con un ligando. Estos complejos RS-ligando permitieron análisis relacionados a la interacción de los compuestos con la proteína. A partir de este conocimiento pueden diseñarse nuevos compuestos para maximizar la interacción con la proteína e incrementar la selectividad y la potencia. Este método ha sido usado extensamente en la industria farmacéutica para desarrollar nuevas drogas terapéuticas. Sin embargo, las estructuras cristalinas sólo ofrecen una única conformación de la proteína.

Más allá de inferir en base a nuestros modelos que el monómero de RS presenta flexibilidad en el trímero, con una movilidad potenciada en la región del barril β , la información de la dinámica de la proteína es limitada. Las conformaciones también son influenciadas por las condiciones de cristalización: efectos del empaquetamiento en el cristal, el pH y la temperatura pueden alterar la conformación y proporcionar información engañosa para SBDD. Además, la unión del ligando puede inducir un cambio conformacional tanto en la proteína como en el ligando. Esto ocurre de hecho con RS, la cual sufre un cambio conformacional cuando posee ligandos unidos, adoptando un ensamblado más ajustado en la interfaz de las cadenas A y B. Por esta razón, en colaboración con el equipo del Dr. Adrián Turjanski, especialistas en ensayos *in silico* en el área de desarrollo de drogas, incorporamos a nuestro conocimiento nuevos conjuntos de conformaciones de la proteína para simular con mayor precisión el movimiento inherente del sistema. Los resultados demostraron que RS es en efecto bastante flexible y podría albergar drogas de mayor tamaño a sus ligandos naturales en la interfaz entre sus cadenas, a modo de ajuste inducido.

High throughput Screening

Una nueva estrategia para sortear el fallo de la mini biblioteca contra *B. abortus*, fue realizar un ensayo de High Throughput Screening con una biblioteca de 44.000 compuestos comerciales con características drug-like.

Desde la secuenciación de todo el genoma de *Haemophilus influenzae* en 1995, se han empleado aún más enfoques genómicos y bioinformáticos de alto rendimiento (high throughput genomics and bioinformatics) que implican la comparación de más de 100 genomas de patógenos bacterianos importantes, en un intento de identificar blancos de amplio espectro altamente conservadas con poca homología en mamíferos (Payne *et al.*, 2007). Aproximadamente 160 blancos bacterianos esenciales han sido identificados por éstos métodos y sólo una pequeña proporción actualmente son explorados para el desarrollo de drogas. Muchas compañías trataron de identificar nuevos inhibidores para estos blancos esenciales mediante HTS. Sin embargo, el éxito de los HTS en la búsqueda de antibióticos ha sido extremadamente bajo, debido al enorme desafío de generar compuestos que atraviesen la pared celular bacteriana para llegar a las dianas, especialmente en bacterias Gram-negativas. Esto se debe en parte a que los screening de moléculas pequeñas han tenido éxito en otras áreas terapéuticas, tales como cáncer, diabetes y asma (Golebiowski *et al.*, 2001) y en consecuencia las colecciones de compuestos utilizado para HTS contra dianas bacterianas se componen en gran parte de pequeñas moléculas sintéticas adaptadas a las reglas de Lipinski.

Sin embargo los antimicrobianos generalmente no obedecen estas reglas. No obstante, de la misma manera que no hay fármacos absolutamente seguros, tampoco hay mandamientos absolutos sobre cómo encontrarlos. Emprendimos entonces una colaboración con la empresa Novartis y realizamos un screening. Esta biblioteca, a diferencia de la mini biblioteca analizada con anterioridad, poseía compuestos de mayor tamaño, sin embargo permanecía en el rango determinado por las reglas de Lipinski. Si bien estos compuestos son de origen comercial, Novartis organizó la biblioteca con el fin de reunir la mayor diversidad química posible para descubrir regiones nuevas o sub exploradas del espacio químico. Una biblioteca orientada al descubrimiento de antibióticos debiese idealmente estar integrada de compuestos cuyas propiedades estén más adecuadas a la acción antimicrobiana, estableciendo reglas para una penetración bacteriana efectiva, por ejemplo.

Sin embargo, basados en el fracaso de las estrategias anteriores, y con la idea de ampliar el rango de exploración experimental, decidimos encarar una búsqueda por HTS utilizando esta biblioteca.

El experimento se trató de un novedoso método de análisis masivo en simultáneo. La Unidad de Hit Finding del Instituto de Investigación Biomédica de Novartis (NIBR) se especializa en la realización de estos ensayos en forma sistemática en los cuales los blanco moleculares son quinasas. Se trató de un gran desafío de esfuerzos en conjunto, donde con su excepcional experiencia en el campo de los screening junto a nuestro conocimiento estructural y bioquímico de la RS logramos trasladar un trabajo que sólo se realizaba sobre la mesada de un laboratorio de ciencia básica hacia una plataforma de última tecnología de selección masiva miniaturizada y automatizada. Desde la conversión de los volúmenes de mililitros a nanolitros, hasta la puesta en marcha y calibración de la estación de trabajo donde se realizó el screening, todo fue modificado y adaptado al ensayo funcional de RS. El hecho de haberse llevado a cabo un ensayo enzimático es el punto más importante en la técnica, lo que permitió obtener resultados robustos. Esto contrasta con el screening descrito en el capítulo 2 de esta Tesis, cuya mini biblioteca se estudió analizando parámetros biofísicos indirectos que sugerían un putativo candidato de inhibición. En esa instancia no fue posible realizar un ensayo funcional debido a la carencia de sustratos para la reacción enzimática de LS. Y por otro lado, el trabajo en simultáneo con 17 compuestos en un screening funcional implicaba la miniaturización de los volúmenes con el requerimiento de equipos especializados de alta precisión, con los cuales no contamos en nuestras instalaciones. El HTS tampoco se realizó con LS por las mismas razones comentadas previamente, la complejidad de obtener sus sustratos. La ventaja de haber realizado un HTS funcional es en primer lugar, que se trata de un método directo que evalúa el efecto de un compuesto sobre la actividad catalítica de la enzima midiendo la

concentración del producto de la reacción y del sustrato remanente. En segundo lugar, se destaca su estandarización, bajo costo de reactivos, alta sensibilidad, minimización de falsos positivos y corto tiempo de ejecución. El screening funcionó correctamente con RS. Unas pocas decenas de hits fueron luego confirmados en ensayos de dosis respuesta. Coincidió que el hit más potente en el screening primario resultó ser también el más potente en el screening secundario. En función de los cánones de Novartis, este hit fue el único de interés, mostrando una potencia 10 veces mayor que el siguiente compuesto en la lista ($CI_{50} \sim 2$ vs 20-30 μM). Cada compañía tiene sus propios criterios e indicadores específicos para medir el éxito durante el descubrimiento de drogas; persiguen procesos similares para descubrir nuevas drogas sin discriminar objetivo final, el cual en la mayoría de los casos es una diana eucariota. Actualmente, es aceptado que compuestos potentes no resulten necesariamente en buenas drogas, ya que muchas veces la potencia *in vitro* contra el blanco purificado no se condice con la efectividad en un ensayo de célula completa. Esto podría ilustrarse tanto en la fase clínica como pre clínica. Particularmente en el caso de los antibióticos, no sólo debería considerarse la potencia de un hit en las etapas tempranas, sino que a lo largo del proceso de descubrimiento hay que considerar además parámetros cruciales como el tamaño y la polaridad incrementada (tomando como referencia los antibióticos del mercado). A pesar de esto, la potencia en un ensayo en particular es el criterio más usado para evaluar candidatos en las etapas iniciales.

Ensayos en cultivo bacteriano

Nuestro primer candidato BMP142 resultó inactivo sobre la bacteria en cultivo, sin embargo una serie de cinco moléculas (BNG508, BNG453, BNG504, BNG452, BNG414), inicialmente no considerados por los expertos en Novartis, tuvieron una interesante efectividad en estos experimentos. Las constantes de unión de antibióticos para blancos purificados son comparables a los observados con otros fármacos, por lo que era lógico pensar que el compuesto más potente *in vitro* sería el más prometedor contra la bacteria completa, siguiendo el lineamiento de descubrimiento de drogas de la industria farmacéutica en estos últimos años. Sin embargo, los antibióticos no siguen la regla de una droga que actúa contra un blanco eucariota a concentraciones nanomolares, sino que son eficaces a concentraciones micromolares. La principal razón de esta disparidad deriva de la escasa penetración. Las bacterias Gram-negativas, en particular, son altamente eficientes en mantener afuera a los fármacos. Su membrana externa es una barrera para los compuestos anfipáticos, y esencialmente todos los fármacos son anfipáticos, ya que necesitan ser solubles y a la vez capaces de atravesar la membrana citoplasmática. Las bombas de multirresistencia a drogas

(MDR) expulsan cualquier compuesto que se filtra a través de la membrana externa (Li & Nikaido, 2004) y reconocen moléculas químicamente no relacionadas basados principalmente en la polaridad, prefiriendo moléculas anfipáticas. Además la membrana interna restringe la penetración de sustancias hidrofílicas, lo que resulta en una barrera perfecta. El rango de concentraciones de la serie de compuestos BNG que logró inhibir el 50% del crecimiento de la bacteria a las 24h se mantuvo entre 18 y 30 $\mu\text{g/ml}$. Si bien representa un valor elevado para drogas contra blanco eucarióticos, significa un valor interesante para compuestos antimicrobianos.

Al trabajar con un ensayo de bacteria completa, existía la posibilidad de que el efecto inhibitorio de los compuestos BNG se debiese a un efecto off target. Demostramos que efectivamente la vía biosintética de riboflavina es la afectada por estos compuestos. Sin embargo, definir si RS era el blanco concreto dentro de la vía metabólica de riboflavina nos resultó un poco más complicado. En la búsqueda de esta respuesta nos enfrentamos a un resultado con varias posibles interpretaciones como detallamos el capítulo 4 de este trabajo. Una de ellas se refiere a que RS sí es el blanco de los inhibidores pero que la concentración adicionada del sustrato es muy superior a la del inhibidor; así la 6,7-dimetil-8-ribitillumazina por exceso compite con el inhibidor por el sitio activo y logra revertir la inhibición del crecimiento. Para corroborar esto utilizaríamos como herramienta de trabajo una cepa mutante de *B. abortus* que carece de las dos enzimas LS (RibH1 y RibH2) y que además expresa el transportador de flavinas RibN. La ausencia de las dos LSs indica que no habrá 6,7-dimetil-8-ribitillumazina endógeno. Por su parte el transportador RibN, perteneciente a una nueva familia de transportadores de riboflavina conservada entre los miembros de las α -, β - y γ -proteobacterias y que fue caracterizado por integrantes del laboratorio del Dr. Fernando Goldbaum (García Angulo *et al.*, 2013), facilitaría el ingreso selectivo de 6,7-dimetil-8-ribitillumazina exógeno y no sería necesario una concentración excesiva en el medio de cultivo inicialmente necesaria para su difusión pasiva a través de la pared y membrana bacteriana. De este modo, analizaríamos el efecto de los inhibidores a distintas concentraciones de sustrato. Otra de las interpretaciones indicaría que RS sí es el blanco de los inhibidores pero que la 6,7-dimetil-8-ribitillumazina es capaz de auto-convertirse en riboflavina en las condiciones experimentales. El control de esta variable será por medio de la utilización de una cepa de *B. abortus* carente de RS. Esta cepa sólo crece en presencia de riboflavina exógena en el medio de cultivo. Si se reemplaza la riboflavina por 6,7-dimetil-8-ribitillumazina, no se debería observar crecimiento a menos que el sustrato efectivamente sufra auto-conversión en riboflavina. La última interpretación considera el caso opuesto en donde la RS no es la enzima blanco de los inhibidores, sin embargo, el sustrato es incapaz de penetrar eficientemente la

bacteria. Nuevamente, trabajar con la cepa que expresa el transportador RibN controlará esta variable.

En función de la evidencia *in vitro* de los ensayos de dosis-respuesta de los compuestos contra la enzima, esperamos observar que el agregado del 6,7-dimetil-8-ribitillumazina al medio de cultivo no revierta la inhibición del crecimiento bacteriano en los ensayos con la cepa de *B. abortus* mutante en RibH1 y RibH2 y que expresa el transportador RibN, debido a que RS ciertamente es el blanco afectado por los compuestos.

Los estudios posteriores inmediatos se centrarán en trabajar con los inhibidores en un modelo celular de infección de *B. abortus*. En esta instancia pondremos a prueba la capacidad de los compuestos de atravesar la membrana citoplasmática eucariota, así como también la membrana del nicho replicativo de la bacteria: el brucelosoma, y ejercer su actividad antibacteriana. En forma simultánea se podrá estudiar la toxicidad de las drogas.

Análisis estructural de los compuestos BNG

El análisis de los compuestos BNG508, BNG453, BNG504, BNG452, BNG414 mostró un arreglo químico idéntico con pequeñas variables en sus grupos sustituyentes, los cuales también mantienen una cercanía en su identidad química. De modo que estos cinco compuestos corresponden a una serie derivatizada de un *core* estructural principal. Los ensayos de docking mostraron resultados consistentes respecto a una posición en particular que adoptarían estas drogas en el barril β de la cadena A. En función del ajustado empaquetamiento del sitio activo, existen pocas chances de que los compuestos puedan ingresar si ya está ocupado por otro ligando. Recordemos que la unión de un ligando genera acercamiento de las cadenas y el surgimiento de nuevas interacciones intermoleculares. Sin embargo, debido a que RS demostró ser bastante flexible en los ensayos de dinámica molecular y cristalografía, en solución los compuestos podrían unirse a los sitios expuestos al solvente y luego inhabilitar esta posición como futuro sitio activo. De este modo, paso a paso la RS se iría “envenenando” con la presencia de exceso de inhibidores.

Analizando la lista de los primeros 164 hits obtenidos en el screening primario de la biblioteca identificamos compuestos estructuralmente similares a la serie BNG. Por lo tanto, abordaremos la búsqueda de otros similares sobre la biblioteca completa. La similitud estructural ha sido fuertemente explotada, sin embargo la investigación actual muestra que no siempre implica también similitud en la actividad (Martin *et al.*, 2002). Por lo tanto, nuestra búsqueda de similares estructurales será en el marco del estudio de la relación estructura-actividad específica acompañada de una mayor comprensión mecanicista del compuesto en el

blanco. Por consiguiente, en el caso de obtener actividad inhibitoria de los compuestos BNG508, BNG453, BNG504, BNG452 y BNG414 en los ensayos sobre modelo celular de infección, proseguiremos con su modificación química para optimizar dicha actividad. En esta etapa contamos con la colaboración de la Dra. María Julieta Comin, coordinadora de Unidad Técnica Síntesis Orgánica - Productos Naturales y la Dra. Eleonora Elhalem, del Centro de Química, ambos departamentos pertenecientes a INTI.

Por último, abordaremos nuevos procedimientos de cristalografía. Como mencionamos previamente, la dinámica molecular coincidió con la hipótesis de una flexibilidad considerable de las cadenas de RS en solución. Sin embargo, una vez en estado cristalino, la RS ensambla ajustadamente el sitio activo restringiendo el ingreso de moléculas de mayor tamaño a sus ligandos naturales los cuales poseen un tamaño bastante más pequeño que los compuestos a analizar. Por esta razón, asumimos que los primeros intentos de tratar de cristalizar el complejo RS-drogas fallaron a razón de la técnica de soaking utilizada. Una vez ya formado el cristal de la RS, los compuestos podrían haber sido incapaces de ingresar a los sitios de unión sin desestabilizar el cristal. Los próximos estudios se realizarán mediante la técnica de cocrystalización para favorecer la unión de las drogas antes de que el trímero cristalice vacío. Otra opción será lograr mutaciones puntuales que favorezcan el estado monomérico y estudiar las interacciones con la droga, la cual en este caso tendrá acceso libre al sitio de unión.

Una vez resueltas las estructuras RS-compuestos BNG, contaremos con la información necesaria para diseñar una cepa de *B. abortus* que posea una mutación puntual en la RS, la cual impida la unión de la familia de compuestos BNG sin afectar su función de producir riboflavina. De este modo hipotetizamos que ante las mismas condiciones, la adición de la 6,7-dimetil-8-ribitillumazina e inhibidor al medio de cultivo dará como resultado que la cepa con la RS silvestre no sobrevivirá, sin embargo aquella con la RS mutante puntual sí logrará hacerlo debido a que RS es efectivamente el blanco específico de los inhibidores BNG. En este caso, la presencia del transportador RibN y la ausencia de las dos LSs continúa siendo importante para controlar los niveles de concentración endógena y exógena del sustrato.

Conclusiones y perspectivas generales

Los antibióticos derivados de antimetabolitos siguen siendo un área prolífica y dinámica del desarrollo de fármacos inicialmente a partir de las sulfonamidas (análogas del ácido p-aminobenzoico, un nutriente esencial). Para nuevos antibióticos dirigidos a la ruta biosintética de riboflavina, la permeabilidad celular y biodisponibilidad de los candidatos deben ser mejoradas para conciliar la discrepancia entre la eficacia *in vitro* e *in vivo*.

El enfoque teórico-experimental de la tesis fue acertado. Podemos concluir en función de nuestros resultados satisfactorios que trabajar con una biblioteca de compuestos con características drug-like, es decir, siguiendo las reglas de Lipinski, fue la razón del éxito y por contraposición, la razón de la falla de la biblioteca de Cushman y Fischer podría deberse a la falta de este criterio de selección en sus compuestos. Nuevamente remarcamos que la mayoría de los antibióticos en el mercado no cumplen con estas reglas, sin embargo, en el caso de *Brucella* serían necesarias para ser efectivos. Sin embargo, en términos generales de la búsqueda de antibióticos, deberíamos ser muy cautos acerca de continuar con la tendencia actual de las empresas farmacéuticas en usar casi indiscriminadamente las reglas de Lipinski ante dianas bacterianas por la razón destacada arriba: los antibióticos no cumplen la mayoría de ellas. Se está haciendo foco en las moléculas incorrectas y nos estamos privando de encontrar nuevas oportunidades, incluso se reduce el espectro de diversidad química. De acuerdo a la base de datos ZINC, hay más de 3 millones de compuestos comerciales disponibles, y alrededor de 10 millones han sido estudiados por la industria farmacéutica en busca de antibióticos. Sin embargo esto es aún poco comparado con el espacio químico teórico que se compone de moléculas de tamaño y composición comparables a drogas conocidas y se estima que contiene entre 10^{60} moléculas (Bohacek *et al.*, 1996). Pero éste nuevo enfoque necesita un incentivo fuerte para que sea adoptado por el sector privado. Algunas iniciativas para fomentar la inversión en la industria farmacéutica han sido sugeridas, tales como extender el período de exclusividad para ciertos antibióticos (ley GAIN en Estados Unidos: Generando Incentivo para Antibióticos Ahora) y modificar los requisitos reglamentarios para acelerar el acceso a los antibióticos para infecciones graves, para las cuales hay pocas o ninguna alternativa. La Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA), que intenta producir diez nuevos antibióticos sistémicos para el año 2020 (Boucher *et al.*, 2013), o la Iniciativa Europea de Medicina Innovadora (<http://www.imi.europa.eu>), soporta proyectos de investigación entre la industria farmacéutica y la academia, combinando fondos públicos y privados para vigorizar la investigación de fármacos antimicrobianos. Afortunadamente, también hay unas pocas empresas pequeñas y medianas, así como varios grupos de investigación que están invirtiendo en el descubrimiento de fármacos antimicrobianos. Nuestro trabajo, en conjunto con la empresa Novartis, representó un enorme desafío en el campo del desarrollo de drogas contra la brucelosis. A pesar de que recién nos encontramos en las etapas más tempranas del proceso del descubrimiento de antimicrobianos, la serie de compuestos activos contra *B. abortus* identificados en esta Tesis constituyen a una familia de identidad química novedosa, lo cual genera un gran interés en el campo. Estos compuestos incluso podrían ser analizados contra otros patógenos; y teniendo en cuenta que, por

desgracia, el desarrollo de nuevos antibióticos es más lento que aparición de cepas resistentes, consideramos que este proyecto de Tesis es un buen punto de partida para enfrentar este problema.

Firmas

Esta Tesis se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Microbiología Molecular, en la Fundación Instituto Leloir, bajo la dirección del Dr. Fernando Goldbaum.

La misma fue finalizada en Octubre de 2015.

.....
Lic. María Inés Serer
Becaria

.....
Dr. Fernando Goldbaum
Director

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y medios de cultivo

E. coli

Las manipulaciones genéticas fueron llevadas a cabo en *E. coli* DH5 α . Estas cepas fueron crecidas en medio Luria-Bertani (LB, Difco) a 37°C, en agitador a 250 r.p.m, con la adición de los antibióticos correspondientes. *E. coli* BL21(DE3) fue empleada para la expresión y purificación de la proteína recombinante RS, y fue cultivada en LB. *E. coli* S17-1 fue empleada para introducir plásmidos por conjugación en *B. abortus*, también cultivada en LB. En los casos en los cuales se usó antibióticos, los mismos fueron empleados a las siguientes concentraciones finales: ampicilina 100 $\mu\text{g/ml}$, kanamicina 35 $\mu\text{g/ml}$ y estreptomicina 12,5 $\mu\text{g/ml}$.

B. abortus

Todas las cepas vivas de *B. abortus* fueron manipuladas en un BSL-3 en el laboratorio de Bioseguridad de la Fundación Instituto Leloir.

En la presente tesis se realizaron varios estudios utilizando como base una cepa de *B. abortus* 2308 wt, la cual es resistente al ácido nalidíxico (Chain *et al.*, 2005). Las correspondientes cepas transformadas derivan de esta cepa. En los diversos ensayos, *B. abortus* fue cultivada en medio líquido a 37°C en agitación a 250 r.p.m, en medio rico Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) o en medio mínimo MM (medio Gerhardt-Wilson modificado: NH_4SO_4 7,6 mM, KH_2PO_4 33 mM, K_2HPO_4 60,3 mM, citrato de Na 1,7 mM, MgSO_4 1 mM, extracto de levadura 0,1% p/v, glucosa 10 mM, vitamina B6 2 $\mu\text{g/ml}$, vitamina B1 2 $\mu\text{g/ml}$ y biotina 1,22 $\mu\text{g/ml}$, pH 7.0) (Rouot *et al.*, 2003), o en medio sólido en placa en Tryptic Soy Agar (TSA, Difco). Los correspondientes antibióticos fueron empleados a las siguientes concentraciones finales: ampicilina 40-50 $\mu\text{g/ml}$, kanamicina 25 $\mu\text{g/ml}$, gentamicina 5 $\mu\text{g/ml}$ y ácido nalidíxico 5-10 $\mu\text{g/ml}$ para en placas TSA y 5 $\mu\text{g/ml}$ en medio líquido.

Cuando fue necesario, se agregó riboflavina (Sigma-Aldrich; St Louis, Missouri, USA) en una concentración de 500 μM , y se calentó a ebullición por 5 minutos tanto los medios sólidos como los medios líquidos. Esto es porque la riboflavina es muy insoluble a temperatura ambiente, y calentando es posible sobresaturar la solución de manera estable.

Al preparar medios mínimos con riboflavina, el agregado de riboflavina y la posterior ebullición, se realiza antes del agregado de compuestos termosensibles.

Manipulación de ADN

Todas las manipulaciones de ADN fueron realizadas siguiendo técnicas estándares. Las reacciones de PCR en las cuales se empleó ADN genómico de *B. abortus* 2308 como templado

fueron realizadas con Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos amplificados, fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes, y clonados en vectores digeridos con las mismas enzimas. Los clonados fueron corroborados por colony-PCR empleando Taq DNA Polymerase (Invitrogen), miniprep y liberación del fragmento clonado por digestión con enzimas de restricción, y finalmente secuenciación de los clones positivos. Para ello se empleó el sistema de secuenciación del Instituto Leloir o Macrogen Korea. En la tabla M-1 se detalla una lista de los oligonucleótidos. En *E. coli* los plásmidos fueron introducidos por electroporación (200 Ω ; 25 μ F; 2,5 V, en cubetas de electroporación de 2 mm Bio-Rad) o por shock térmico usando bacterias competentes químicas. En *B. abortus* los plásmidos fueron introducidos por electroporación (400 Ω ; 25 μ F; 2,5 V, en cubetas de electroporación den 2 mm Bio-Rad) o por conjugación.

Oligonucleótido	Secuencia 5' 3'	Sitio de restricción
nrdR-P1	AACTCTAGAAGGAATTGAAGTCGCACGG	XbaI
nrdR-P2	GGTCTCGGAATCTTCAGACTGGCAATAGG	
nrdR-P3	TCTGAAGATTCCGAGACCGGCGATAATC	
nrdR-P4	TGTTAAGCTTTTTCGATACCGATCAGGATAA	HindIII
nusB-P1	AAGTCTAGACAAAGCGGGCGACAAGGTCAATATCG	XbaI
nusB-P2	GGATCCGCTTCCGCAGTTCGCGGCAGATTGGGAGTCG	BamHI
nusB-P3	ACTGCGGAAAGCGGATCCCGCGGGGCCAAACCGCGG	BamHI
nusB-P4	GATTAAGCTTGCCCACGATGGCAATCGTTG	HindIII
nrdR-Fw	AATTCTAGAAATGTGGTGGATAACGCC	XhoI
nrdR-Rv	TTTCTCGAGACGGCAATCAAACCGG	XbaI
nusB-Fw	AAACTCGAGACGAGTTCGATGTACTCCTG	XhoI
nusB-Rv	TTTTCTAGATTGAGCGACAACAGATACC	XbaI

Tabla M-1. Lista de oligonucleótidos empleados en esta sección.

Construcción de plásmidos

pBBR-nusBc: Un fragmento de PCR de 1.5 kb conteniendo el gen completo de *nusB* se clonó en un vector pBBR1MSC-1 en los sitios de XhoI y XbaI para generar pBBR-nusBc, donde *nusB* se encuentra en el mismo sentido y bajo el control del promotor *Plac* residente en el plásmido.

pK18mobSacB-nrdRm y pK18mobSacB-nusBm: Las regiones 5' y 3' flanqueantes de los genes BAB1_0788 y BAB1_0792, respectivamente, fueron amplificados por PCR empleando los oligonucleótidos nrdR-Fw, nrdR-Rv, nusB-Fw, nusB-Rv (detallados en la Tabla M-2) a partir de ADN genómico de *B. abortus* 2308, obteniendo fragmentos de entre 400-600 pb cada uno. Ambos fragmentos conteniendo secuencias complementarias fueron ligados por "PCR Recombinante", usando los oligonucleótidos flanqueantes de cada fragmento (Figura M-1). En

ambos casos se empleó la enzima Platimun Pfx DNA Polymerase. El producto de PCR obtenido para la delección de cada gen fue clonado en el plásmido pBluescript II KS (Stratagene) usando las enzimas de restricción XbaI y XhoI, obteniéndose los plásmidos pBlue-nusBm y pBlue-nrdRm. Luego fueron subclonados en el plásmido pk18mobSacB (Schafer *et al.*, 1994) utilizando las mismas enzimas de restricción, obteniendo así los plásmidos pk18mobSacB-nrdR y pk18mobSacB-nusB respectivamente, los cuales no replican en *Brucella* y poseen resistencia a kanamicina.

pGEM-TSacB-nrdRm: los genes delecionados de *nusB* y *nrdR* fueron digeridos del plásmido pBlue-nusBm y pBlue-nrdRm y subclonados con las enzimas ApaI y NotI en el plásmido pGEM-TSacB, el cual posee el gen *sacB* que codifica para la enzima Levansacarasa de *B. subtilis*.

pGEM-TSacB-nusBm:Km^r: el plásmido pGEM-TSacB-nusBm fue digerido con la enzima BamHI que cortó dentro del gen delecionado de *nusB*. Luego el cassette que otorga resistencia a kanamicina fue ligado en dicha posición.

pBlueSacB-nusBm Y pBlueSacB-nusBm: el plásmido pGEM-TSacB fue digerido con la enzima PstI para extraer el gen *sacB*. Luego, este gen fue introducido en el plásmido pBluescript II KS (Stratagene) que había sido digerido con la misma enzima. De este modo se obtuvo la construcción pBlueSacB. Después, los fragmentos de *nusB* y *nrdR* delecionados como se detalló previamente fueron subclonados en pBlueSacB para dar origen a pBlueSacB-nusBm y pBlueSacB-nrdRm.

Intento de construcción de cepas mutante μ nusB y μ nrdR de *B. abortus* 2308

Los plásmidos pGEM-TSacB-nrdRm, pGEM-TSacB-nusBm:Km^r, pBlueSacB-nusBm y pBlueSacB-nusBm se introdujeron en *B. abortus* 2308 por medio de electroporación. El primer evento de recombinación (integración del vector suicida en el cromosoma) se seleccionó por resistencia a al antibiótico propio de cada plásmido en placas de TSA. Luego, clones individuales se cultivaron durante la noche en TSB en ausencia de antibióticos para promover la recombinación. El segundo evento de recombinación, la escisión del plásmido y la generación de la cepa mutante por intercambio alélico, no se logró.

Conjugación biparental

La cepa donora *E. coli* S17-1 fue transformada por electroporación con los plásmidos pBBR1-nusBc, pK18mobSacB-nrdRm y pK18mobSacB-nusBm generando las cepas S17 + pBBR1-nusBc, S17 + pK18mobSacB-nrdRm y S17 + pK18mobSacB-nusBm. Las diferentes cepas S17-1 y *B. abortus* se cultivaron separadamente, las células fueron cosechadas después de la fase de crecimiento exponencial, se centrifugó 1 ml de cultivo de cada cepa, se resuspendió en 1 ml de TSB, se centrifugó de nuevo y se resuspendió en el líquido residual. Los pellets bacterianos se mezclaron y plaquearon juntos en una misma gota en una placa de TSA sin antibióticos. Las placas fueron incubadas a 37°C ON, después la mezcla fue plaqueada en placas TSA-Nal, para seleccionar *Brucella*, y el antibiótico adecuado para seleccionar a las exconjugantes de acuerdo

a la resistencia plasmídica. No aparecieron eventos de doble recombinación.

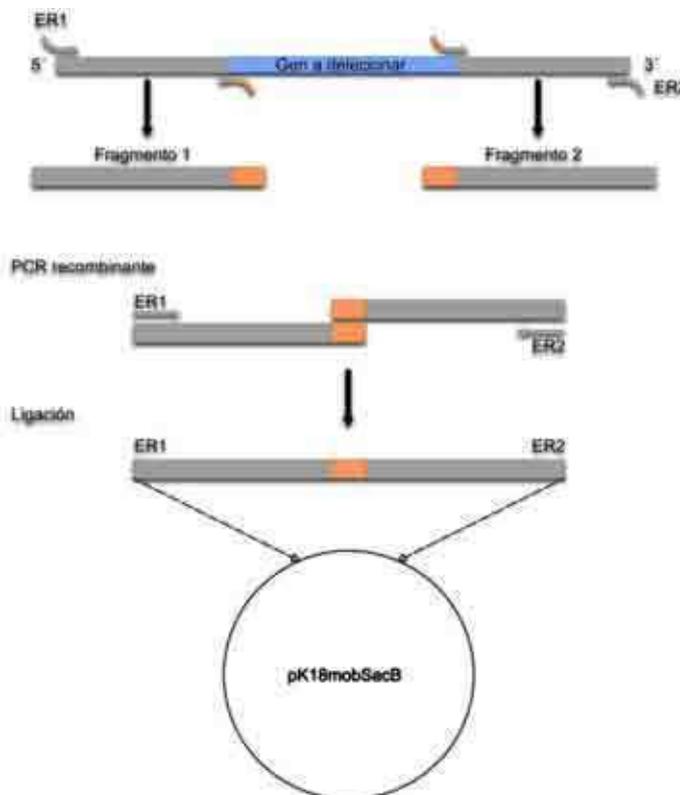


Figura M-1. Esquema de la PCR recombinante. En la primera PCR se amplifican dos fragmentos de ADN, cada uno a ambos lados del gen a eliminar (fragmento 1 a la izquierda; fragmento 2 a la derecha), usando como molde ADN genómico de *B. abortus* 2308. Los dos fragmentos tienen una región de complementariedad de bases, presente en el extremo 3' del primer fragmento y en el extremo 5' del segundo fragmento. En la segunda PCR, se emplean los dos productos de PCR como molde, los cuales luego de un ciclo de desnaturalización y reasociación, se asocian por complementariedad de bases por medio de la región de igual secuencia en ambos fragmentos. Utilizando el oligonucleótido sentido del primer fragmento (el que

contiene la secuencia de corte para la enzima de restricción 1 –ER1) y el oligonucleótido antisentido del segundo fragmento (el que contiene la secuencia de corte para la enzima de restricción 2 – ER2) se logra obtener un producto de PCR que es la suma de los fragmentos 1 y 2. Luego el producto de PCR obtenido se digiere con ER1 y ER2 y se clona en el plásmido de interés (pK18mobSacB en este caso) digerido con las mismas enzimas.

Determinación de la organización genómica del operón *rib*

Para llevar a cabo este objetivo se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla M-2) situados en los extremos de cada gen del operón *rib* con el objetivo de amplificar por PCR los fragmentos intergénicos. Como molde fue utilizado ADNc de *B. abortus* 2308 el cual fue cedido gentilmente por una colega de laboratorio.

Oligonucleótido	Secuencia 5' 3'
gly-nrdR_Fw	GTTTCCCGATGTACGGCTAT
gly-nrdR_Rv	ACTGGCAATAGGGACAAC
nrdR-ribD_Fw	TGTCATCGATGAGCTGAC
nrdR-ribD_Rv	TAATCGTGCCGACCGAAGGAT
ribD-ribE_Fw	CCATATCGCAAGCGAATTC
ribD-ribE_Rv	AGGACGCCTTCATCAAC
ribE-ribH1_Fw	GTTATGCGGCAAGGCTTG
ribE-ribH1_Rv	GCCTCGTGCTTGGACATG
ribH1-nusB_Fw	ACGGTCGAGAATGAAGAGCA
ribH1-nusB_Rv	ATCTGAAAGAGCGCCTGCA
nusB-hppA_Fw	AAACCGCGGCATAAGAGCT
nusB-hppA_Rv	ACTGCCATTCCCATTGTC

Tabla M-2. Oligonucleótidos utilizados en la determinación de la organización genómica del operón *rib*.

Amplificación por PCR

En todos los casos las reacciones de PCR fueron realizadas en microtubos de pared delgada de 0,2 ml. Para la amplificación de ADN donde los errores de la secuencia no era crucial, se empleó la enzima Taq pol (sin proof reading). Se utilizó un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, California, EE.UU.) y constaron de un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C (5 min), 30 ciclos de amplificación a 55 °C (hibridación, 30 seg), 72 °C (extensión, 30 seg), y 94 °C (desnaturalización, 1 min), y un ciclo final de extensión a 72 °C (10 min). La Tabla M-3 muestra la composición de las mezclas de reacción. Los productos finales de PCR se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Componente	Volumen
Oligonucleótido directo (10 μ M)	1 μ l
Oligonucleótido reverso (10 μ M)	1 μ l
ADNc molde (aprox. 200 ng/ μ l)	1 μ l
Enzima Taq (5 U/ μ l)	0,2 μ l
Master mix (0,2 mM dNTPs, buffer 1X, 1,5 mM MgCl ₂ , agua)	21,8 μ l

Tabla M-3. Reactivos y volúmenes empleados en las reacciones de PCR

Análisis Western Blot

Se cultivó *B. abortus* en TSB hasta fase logarítmica, y cantidades iguales de bacterias fueron cosechadas por centrifugación durante 2 min a 10.000 xg. Luego se resuspendieron en buffer de muestra Laemmli 2x, y se inactivó por calentamiento a 100° C durante 20 min. Estas muestras se separaron en un gel de SDS-PAGE 15% y se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa (Millipore). Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios monoclonal anti-RibH2 y antisuero policlonal de conejo anti-RibH1 en PBS-Tween 0,05% y 1% de leche, con

agitación suave a 4°C durante 16h. Las membranas se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con HRP de cabra anti-ratón (Sigma A4416) o conjugado con HRP de cabra anti-conejo (Sigma A6154), con agitación suave a temperatura ambiente durante 1h. Las membranas fueron reveladas con el sustrato Pierce ECL Plus Western Blotting Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. La intensidad de la señal fue determinada con el equipo Storm 840 Molecular Imager (GE Healthcare), y las imágenes fueron cuantificadas con el programa ImageQuant 5.2.

Método de difusión en placa de agar

Se colocaron 5 ml de TSB en un tubo de ensayo. Se tomaron con un ansa bacteriológica tres o cuatro colonias de *B. abortus* silvestre y las cepas μ ribH1 y μ ribH2 y se suspendieron en el tubo. Se incubaron por 24h a 37°C en agitación. Luego de preparado el inóculo bacteriano con las cepas en estudio se introdujo un hisopo estéril en el inóculo bacteriano preparado, de manera de embeberlo completamente. Luego, placas de TSA y medio mínimo GW (medio mínimo Gerhardt-Wilson modificado: NH₄SO₄ 7,6 mM, KH₂PO₄ 33 mM, K₂HPO₄ 60,3 mM, citrato de Na 1,7 mM, MgSO₄ 1 mM, extracto de levadura 0,1% p/v, glucosa 10 mM, vitamina B6 2 μ g/ml, vitamina B1 2 μ g/ml y biotina 1,22 μ g/ml, pH 7,0) (Rouot *et al.*, 2003) fueron sembradas de manera de obtener un crecimiento confluyente, para lo cual se estrió con el hisopo en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de las mismas. Luego se repitió el procedimiento rotando las placas 90° en dos oportunidades más. Se tomó especial cuidado en sembrar las placas de borde a borde. Se procedió a dejar secar de 3 a 5 minutos antes de colocar los discos de papel (Whatman). Los discos fueron distribuidos en forma radial a unos 15 mm del borde de las placas, con pinza estéril y una vez posicionados sobre el agar se ejerció una leve presión sobre ellos para que queden bien adheridos al mismo. Cada disco se embebió con una concentración de 1 mM de los compuestos analizados. Dado que numerosos compuestos se encontraban disueltos en DMSO, un disco con DMSO 100% fue colocado como control. En las placas se colocaron en total 10 discos de 5mm de diámetro. Luego las placas se incubaron a 28°C durante 72 hs. Las placas se colocaron en forma invertida para evitar que el agua condensada cayese sobre el agar, lo que cambiaría las condiciones del medio y por lo tanto no serviría para la lectura de los halos.

Screening de mini biblioteca en placa de 96 pocillos

El ensayo se preparó adicionando 50 μ L de una solución que contenía 50 mM de NaH₂PO₄, pH 7.0, 1 mM de DTT en el caso de la solución con LS y los complejos RS-riboflavina y LS-riboflavina y luego se adicionó la solución de compuestos a analizar en una placa de 96 pocillos

de fondo plano con un volumen final de 100 μM . Las concentraciones finales de los complejos proteicos y los compuestos a analizar fueron de 25 μM y 75 μM (10% DMSO v/v) respectivamente. Las últimas dos columnas de la placa contenían el complejo proteico sin compuestos (para registrar la fluorescencia inicial) y DMSO 10% v/v, respectivamente. Se registró la emisión de fluorescencia por un período de 20 min en un lector de placa (Multimode detector DTX 880, Beckman Coulter) con control de temperatura (25°C) a 535 nm (excitación a 485 nm). El complejo LS con riboflavina se formó incubando la proteína con una concentración equimolar de riboflavina. El complejo RS-riboflavina se elaboró partiendo de 40 μl de una solución de proteína de 60 mg/ml, a la que se le adicionó una pequeña cantidad de riboflavina sólida (punta de espátula) y se incubó o.n a 4°C. Luego se purificó el complejo por exclusión molecular en columna de Sephadex G25 y se eluyó con buffer fosfato pH 7.0.

Screening de mini biblioteca de compuestos sobre el crecimiento de *B. abortus* en medio líquido

Se prepararon tubos de microbiología con 1 ml de medio TSB con un inóculo inicial de *B. abortus* silvestre, μribH1 y μribH2 correspondiente a una $\text{DO}_{600} = 0,05$. Se colocaron luego los compuestos a ser ensayados en una concentración final de 150 μM . También se utilizó DMSO 100% como control debido a que numerosos compuestos de la biblioteca estaban disueltos en él. Los cultivos fueron incubados a 28°C en agitación y se tomaron muestras a las 24, 48 y 72h a las que se le analizó la DO_{600} .

Caracterización de la unión RS y LS con NRP y NORP mediante técnicas fluorimétricas.

Los experimentos de desplazamiento de la riboflavina de su sitio de unión en la RS y LS por el compuesto NRP y NORP se realizaron en un espectrofluorómetro Jasco FP-6500 (Easton, Maryland, EE.UU.) a 25°C. Se trabajó con soluciones madres de 5-nitro-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona (NRP) y 5-nitroso-6-ribitilamino-2,4(1H,3H)-pirimidinadiona (NORP) fueron preparadas frescas previo a cada medición. El complejo RS-riboflavina se formó según fue descrito previamente. A este complejo se le adicionó secuencialmente alícuotas de 5 μM de los compuestos NRP y NORP en 50 mM de buffer fosfato potasio pH 7.0 a 20° C. El desplazamiento de la riboflavina de su sitio de unión en RS fue evidenciada por el aumento de la emisión de fluorescencia a 535 nm (excitación a 470 nm). Los datos de fluorescencia obtenidos fueron ajustados a diversos modelos de unión utilizando un método de regresión no lineal de mínimos cuadrados en Excel 2010 (Microsoft, Redmond, Washington, EE.UU.). La elección del modelo mínimo que ajustó mejor a los datos experimentales se llevó a cabo siguiendo el criterio de Akaike (AIC).

Cristalografía

La roseoflavina fue comprada a Toronto Research Chemicals (North York, Canada). El NRP y el sustrato 6,7-Dimetil-8-ribitillumazina fueron provistos por el Profesor Markus Fischer, Universidad de Hamburg, Alemania.

Clonado de RS

El gen *RibE* que codifica para RS (entrada KEGG BAB1_0790; http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?bmf:BAB1_0790) se amplificó por PCR utilizando como molde ADN cromosómico de la cepa *B. abortus* 2308 y los siguientes oligonucleótidos 5'-TTCATATGTTTACAGGCATAATCACC GAT-3' (forward) y 5'-GCAAGGCTTGCGCAATATCAGAACTCGAGAT-3' (reverse). El producto de PCR resultante fue digerido con NdeI y XhoI, y fue luego ligado en el plásmido pET-22b (Novagen, Billerica, Massachusetts, EE.UU.) el cual había sido tratado previamente con las mismas enzimas de restricción. La construcción final pET-22b-RS, cuya calidad fue verificada por secuenciación, incluye la región codificante para la enzima RS completa (residuos 1-202), dos residuos resultantes de la clonación (Leu203 y Glu204) y un tag de 6 histidinas C-terminal (His205–His210). Se transformaron luego células competentes *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene, La Jolla, California, USA) con el mix de ligación resultante.

Expresión y purificación de proteínas

Las células transformadas con la construcción pET-22b-RS fueron crecidas o.n en 25 ml de medio LB, 150 mg/ml de ampicilina, 37 ° C y con agitación (200 rev min⁻¹). El cultivo se diluyó en 500 ml y se creció hasta una absorbancia de 0,6 (a 600 nm). En este punto se agregó isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido a una concentración final de 1 mM, y el cultivo se incubó durante 2 h a 37°C con agitación (200 rev min⁻¹). Las bacterias se centrifugaron a 5000g durante 10 min a 4°C. El pellet bacteriano se resuspendió y se sonicó en una solución de fosfato de sodio 20 mM, Cloruro de sodio 0,5 M, imidazol 20 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM con un pH final de 7.4 (Buffer A). Después se centrifugó a 160 000 g en ultracentrífuga Beckman Coulter L7-65 (Brea, California, EE.UU.) durante 45 min a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,45 mm y se cargó en una columna HisTrap HP (todas las columnas de GE Healthcare, Little Chalfont, Inglaterra) en un equipo de cromatografía líquida de proteínas (Gilson, Luton, Inglaterra). La elución se realizó con un gradiente lineal del Buffer B (20 mM de fosfato de sodio, 0,5 M cloruro de sodio, 0,5 M imidazol, 1 mM PMSF, 1 mM DTT (pH 7.4)). Se observó un pico

principal en torno a 20% de buffer B. Las fracciones apropiadas de proteína se agruparon y se purificaron adicionalmente por cromatografía de filtración en gel en una columna Superdex 200 16/60 con elución isocrática en PBS con 0,5 M de cloruro de sodio, produciendo un pico principal alrededor de 90 ml. Las fracciones finales fueron concentradas a 20 mg/ml mediante centrifugación en dispositivos Amicon Ultra-4 (Millipore, Billerica, Massachusetts, EE.UU.) y al mismo tiempo se intercambió con buffer de cristalización (10 mM Tris, 25 mM de cloruro de sodio pH 7.4). La proteína se separó en alícuotas y se almacenó a -70°C . La calidad de la preparación final se comprobó por SDS-PAGE (15% gel) y espectrofotometría UV.

Cristalización de la forma apo de RS

Los ensayos de cristalización iniciales se realizaron en placas de 96 pocillos utilizando un robot Hooneybee 963 (Digilab, Marlborough, Massachusetts, EE.UU.) y el kit de cristalización JBScreen Classic (Jena Bioscience, Alemania) en una configuración de difusión del vapor en gota sentada. Después de una semana de equilibrado a temperatura ambiente, diez condiciones de las 240 probadas mostraron cristales preliminares muy prometedores. A continuación, se optimizó el crecimiento de los cristales en varias de estas condiciones, obteniéndose las mejores muestras cristalinas por el método de gota colgante mezclando 2 μl de stock concentrado de proteína con una cantidad igual de solución de cristalización que consistió en 12% (p/v) PEG 8000, 10% (p/v) glicerol y 0,5 M de cloruro de potasio. Luego de dos días de incubación a temperatura ambiente se realizó microseeding, el cual mejoró notoriamente la calidad y el tamaño de los cristales. Usando microseeding se obtuvieron barras largas con dimensiones máximas de 0,5 x 0,1 x 0,1 mm luego de 3 días. Las muestras fueron crio-protegidas en aguas madres con un aumento de la concentración de glicerol a 25% p/v y después se enfrió en nitrógeno líquido en crio-loops (Hampton Research, Aliso Viejo, California, EE.UU.).

Cristalización de RS unida a ligandos

Los cristales de RS unidos al análogo de producto roseoflavina (RS-ROS) fueron crecidos mediante la adición de 1 μl de una solución de roseoflavina en un ligero exceso molar con respecto a los sitios de unión de la mezcla de cristalización mencionada anteriormente. Luego del microseeding se obtuvieron barras de color rosa intenso (Figura M-2). En contraste, la cocrystalización fracasó en el caso del NRP debido a la precipitación de la proteína. En este caso, 1 μl de una solución concentrada de NRP (nuevamente en un ligero exceso molar con respecto a los sitios de unión) se añadió directamente a gotas que contenían cristales de RS frescos. Los cristales de RS unidos a NRP (RS-NRP) se congelaron después de un período de 4

días de soaking, observándose daños menores en las muestras. Finalmente, la riboflavina fue incorporada en los cristales de RS es una manera completamente diferente. Para este propósito, se agregó riboflavina sólida directamente al medio de cultivo LB a una concentración final de 1 mM. A continuación, la enzima se purificó y cristalizó de la misma manera como se describió para la forma apo. Los cristales de RS unidos a riboflavina (RS-RBF) obtenidos tras este procedimiento mostraron un marcado color amarillo, corroborando la presencia del ligando.

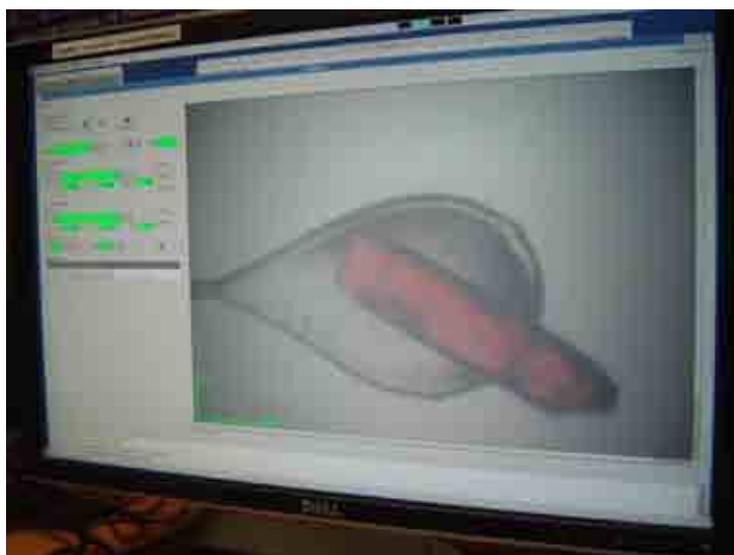


Figura M-2. Cristal de RS-riboflavina montado en el loop previo a la incidencia con rayos X en sincrotrón.

Colección y procesamiento de datos de difracción de rayos X

Se colectaron datos preliminares de difracción a 100 K en el Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay, en un difractómetro de ánodo rotatorio MicroMax-007 HF (Rigaku, The Woodlands, Texas, USA) equipado con detector Image Plate MAR345 (Rayonix, Evanston, Illinois, EE.UU.). El conjunto de datos finales fue colectado a 100 K en la línea de cristalografía de proteínas PROXIMA1 del sincrotrón SOLEIL, Francia, usando un detector PILATUS 6M (Dectris, Baden, Suiza) (Figura M-3) y en la línea de cristalografía de proteínas X6A del National Synchrotron Light Source (NSLS), EE.UU., equipada con un detector ADSC Quantum 270 CCD (Poway, California, EE.UU.). Se utilizó un único cristal para colectar cada conjunto de datos. Los datos de difracción de rayos X se procesaron con los programas MOSFLM (Leslie y Powell, 2007), SCALA (Evans, 2006) y XDS (Kabsch, 2010), con este último ejecutado en modo semi-automatizado utilizando el paquete xdsme (<http://code.google.com/p/xdsme/>). Un 5% de las reflexiones registradas fueron separadas para la realización de validación cruzada. Los detalles

de los parámetros de colección de datos y estadísticas de procesamiento se muestran en la Tabla M-4.



Figura M-3. Sincrotrón SOLEIL, París, Francia.

	RS-APO	RS-RBF	RS-ROS	RS-NRP
PDB	4fxu	4e0f	4g6i	4gqn
<i>Colección de datos</i>				
Sincrotrón	SOLEIL	NSLS	SOLEIL	SOLEIL
Línea	PROXIMA 1	X6A	PROXIMA 1	PROXIMA 1
Número de imágenes de difracción	1000	220	400	800
Paso de oscilación (deg)	0.2	1.0	0.2	0.2
Distancia al detector (mm)	320.2	310.0	295.3	344.7
Longitud de Onda (Å)	0.98011	1.0000	0.98011	0.98011
Exposición por imagen (s)	0.2	60	0.2	0.2
<i>Indexación y escalado</i>				
Parámetros de celda				
a (Å)	67.42	69.98	68.04	69.85
b (Å)	93.48	91.82	92.57	92.30
c (Å)	103.30	98.77	102.58	99.09
$\alpha=\beta=\gamma$ (deg)	90	90	90	90
Grupo espacial	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Límite de resolución (Å)	1.90	2.85	1.78	1.85
Número de reflexiones totales	380981	130810	178081	321086
Número de reflexiones únicas	52161	15167	60197	55235
Multiplicidad ^a	7.3 (7.3)	8.6 (8.7)	3.0 (3.0)	5.8 (5.8)
I/ σ	21.6 (2.0)	5.9 (1.9)	21.2 (2.1)	15.7 (2.0)
R _{int}	0.043 (0.902)	0.108 (0.397)	0.026 (0.514)	0.075 (0.773)
Compleitud (%)	99.8 (98.7)	98.7 (98.6)	96.1 (95.3)	99.6 (98.7)
Trímeros por unidad asimétrica	1	1	1	1
Contenido de solvente (%)	47.1	45.8	46.7	46.1
Factor B (Wilson plot, Å ²)	41.2	48.1	32.1	26.0

Refinamiento

Rango de resolución (Å)	27.7-1.90	67.3-2.85	32.3-1.78	27.1-1.85
Número de átomos de proteína	4143	4590	4556	4637
Número de átomos de ligando	-	27	116	126
Número de moléculas de agua	148	66	240	307
R	0.232	0.216	0.240	0.200
R _{free}	0.264	0.267	0.273	0.234
R.m.s.d de valores ideales †				
Longitud de enlaces(Å)	0.010	0.006	0.005	0.007
Ángulos (°)	1.1	0.9	0.9	1.0
Factor B (promedio, Å ²)	50.4	22.5	35.0	31.4
<i>Validación con MolProbity</i> ‡				
Clashscore	1.96	5.01	2.79	1.48
Rotámeros desfavorables (%)	5.1	5.1	2.1	3.7
Ramachandran plot				
Favorecidos (%)	97.6	96.2	97.8	96.8
Permitidos (%)	2.2	3.6	2.2	3.2
Prohibidos (%)	0.2	0.2	-	-

† Engh & Huber (1991). ‡ Chen et al. (2010).

Tabla M-4. Colección de datos y estadísticas del refinamiento. Los valores en paréntesis corresponden a la capa de mayor resolución: RS-APO, 2.01–1.90 Å; RS-RBF, 3.00–2.85 Å; RS-ROS, 1.89–1.78 Å; RS-NRP, 1.96–1.85 Å.

Resolución de la estructura, modelado manual y refinamiento

Todas las estructuras se resolvieron por el método de remplazo molecular en el rango 15-4 Å con el programa AMoRe (Navaza, 1994). RS-RBF fue la primera estructura resuelta, usando las coordenadas de la RS trimérica de *E. coli* como modelo de búsqueda (1I8D, (Liao *et al.*, 2001). Las otras estructuras fueron resueltas usando RS-RBF como modelo de búsqueda. En todos los casos un sólo trímero fue localizado en la unidad asimétrica, y los empaquetamientos cristalinos correspondientes fueron chequeados con éxito. Las coordenadas orientadas fueron sometidas a refinamiento posicional y de factores B individuales con los programas REFMAC (Murshudov *et al.*, 2011) y Buster (Bricogne *et al.*, 2011), con la aplicación restricciones de simetría no cristalográfica (SNC) considerando restricciones de similitud de estructura local (LSSR) (Smart *et al.*, 2012) para tener en cuenta las diferencias observadas entre las cadenas individuales eliminándolas de la SNC. La construcción manual de modelos fue realizada con el programa Coot (Emsley *et al.*, 2010). En las últimas etapas del refinamiento se añadieron las moléculas de agua y ligando. Las coordenadas de la riboflavina (Gerhardt, Haase, *et al.*, 2002), roseoflavina (Serganov *et al.*, 2009) y NRP (Klinke *et al.*, 2007) se obtuvieron de estructuras publicadas, y sus bibliotecas de restricciones CIF fueron obtenidas de la base de datos CCP4 (Winn *et al.*, 2011). Las estadísticas detalladas del proceso de refinamiento se pueden encontrar en la Tabla 1.

Validación y análisis de los modelos

Las cuatro estructuras cristalográficas se sometieron a validación con el programa MolProbity (Chen *et al.*, 2010) y con el módulo de validación implementado en Coot. A continuación se mencionan los servidores web del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) que se utilizaron: PDBePISA (estudio de interfaces; http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/) (Krissinel & Henrick, 2007), PDBeFold (superposiciones y cálculos de rmsd; <http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) (Krissinel & Henrick, 2004); y ClustalW2 (alineamientos de secuencias; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Larkin *et al.*, 2007).

Representación gráfica

Las estructuras moleculares y sus densidades electrónicas fueron representadas mediante el programa PyMOL (Schrödinger, Nueva York, EE.UU.). Las estructuras químicas se dibujaron con Accelrys Draw (Accelrys, San Diego, California, EE.UU.).

Cálculo de pesos moleculares por dispersión estática de luz

Los pesos moleculares en solución se calcularon utilizando un instrumento de dispersión de luz estática Precision Detectors PD2080 (Bellingham, Massachusetts) conectado en tándem con un equipo de cromatografía líquida de proteínas y un refractómetro diferencial LKB 2142 (LKB, Bromma, Suecia). En cada de caso, 250 ml de una solución de proteína de 2 mg/ml se inyectó en una columna analítica Superdex 200 y se eluyó con buffer Tris 20 mM, cloruro de sodio 0,25 M, 0,5 mM PMSF, DTT 0,5 mM, pH 7.8. Ambas señales correspondientes a 90° de dispersión de la luz ($\lambda = 682$ nm) y el índice de refracción de los picos eluidos se registraron y luego se procesaron con el software Discovery32 suministrado por Precision Detectors. Como estándar para la calibración del detector de dispersión de luz se utilizó albúmina de suero bovino, BSA (peso molecular 66 500 Da).

Constante de disociación de Riboflavina y estequiometría de unión

La constante de disociación para la riboflavina (K_d) y su estequiometría de unión se determinó por titulación de la fluorescencia en un Espectrofluorómetro Jasco FP-6500 (Easton, Maryland, EE.UU.) de acuerdo con los procedimientos publicados por Fischer (Fischer *et al.*, 2002). Brevemente, una solución de ligando 30 μ M se tituló por la adición secuencial de alícuotas de 5 μ M de RS (monómero) en 50 mM de buffer fosfato potasio pH 7.0 a 20° C. La emisión de fluorescencia fue medida después de cada alícuota con longitudes de onda de excitación y emisión de 470 y 535 nm, respectivamente. Los experimentos de control se realizaron con

BSA. El análisis de datos fue realizado utilizando GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, California, EE.UU.).

Ensayo cinético

Los experimentos de actividad catalítica se realizaron fluorométricamente como se describe por Fischer et al. (2005) con algunas modificaciones. Específicamente, a mezclas de reacción de buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7.0 y 50 nM de RS (monómero) se les adicionó 6,7-Dimetil-8-ribitillumazina en una amplia gama de concentraciones (0-1000 mM) a un volumen final de 1 ml. La fluorescencia de riboflavina se monitoreó como se describió previamente cada 0,5 s por 20 min. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado. Para corregir las variaciones sistemáticas del espectrofluorómetro, se midieron series de dilución de riboflavina en conjunto con cada experimento. Estas mediciones se utilizaron para definir tanto el rango lineal como la respuesta del instrumento. Las intensidades relativas de fluorescencia fueron convertidas a concentraciones absolutas de riboflavina utilizando la pendiente de la regresión lineal de las mediciones de fluorescencia de una serie de diluciones de riboflavina (datos no mostrados). Para cada concentración de sustrato se calculó la velocidad inicial (V_i). Finalmente, estos puntos se ajustaron a varios modelos cinéticos derivados de la curva de velocidad inicial versus concentración de sustrato utilizando un método de regresión no lineal de mínimos cuadrados en Excel 2010 (Microsoft, Redmond, Washington, EE.UU.). Para los experimentos de inhibición por producto, se determinaron los valores de V_i a partir de mezclas de reacción que contenían una concentración fija de 6,7-Dimetil-8-ribitillumazina (5 μ M) con diferentes concentraciones de riboflavina.

High Throughput Screening

Materiales y Reactivos

- Hepes (Sigma), pH 7.5, stock 1M
- DL- Ditioneitol (DTT), (Sigma)
- Tween 20, (Bio-Rad)
- Albúmina Sérica Bobina, Fracción V 96% (Sigma)
- Beta Glicerofosfato (Sigma)
- Ortovanadato de Sodio (Na_3VO_4), (Sigma)
- Agua MilliQ (Fuente interna)
- Dimetil Sulfóxido (DMSO) 99.9% A.C.C spectrophotometric grade, (Sigma)
- Coating reagent CR-3 (Caliper Life Sciences)

- Coating reagent CR-8 (Caliper Life Sciences)
- Solución CR-8 diluida en 100mM Hepes a pH 7.3
- Detergente Brij 35, solución acuosa 30% (Calbiochem), diluido con agua MilliQ al 10%
- Ácido Trifluoracético, sequanal grade (Pierce)
- Placas de 384 pocillos (Greiner)
- LabChip EZ Reader, 12 Sipper Chip, (Caliper life sciences)
- LC3000 Caliper Reader (Lab J. Hamon)
- Riboflavina Sintasa (*B. abortus*), PM: 23046.0 Da, stock 60 mg/ml
- Sustrato: Lumazina (6,7-dimetil-8-ribitillumazina) Chemie Uni Hamburg (10mg), stock 10.2mM en DMSO, PM: 326.31 Da

Reactivos enzimáticos y sustratos

Reactivos	Peso	Stock	Fuente
Riboflavina	23046.	60 mg/ml	Sigma
6,7-dimetil-8-ribitillumazina	326.31	10.2 mM	Chemie Uni Hamburg (B. Illarionov)
JAK3*	122.6	10 mM	Biosyntan

* Péptido de referencia interna

Concentración de Reactivos

Los buffers y soluciones utilizadas durante el ensayo de High Throughput Screening se encuentran detallados en el anexo I, todos ellos fueron preparados frescos cada día de trabajo.

Procedimiento automatizado

Cada compuesto de la biblioteca se disolvió en DMSO a una concentración final de 30 μ M/well. La concentración final de DMSO/pocillo fue de 1%. La reacción se llevó a cabo en placas de 384 pocillos siguiendo la siguiente secuencia:

1. 90 nl compuesto (30 μ M)
2. + 4.5 μ l Mix de Reacción A (RS= 8 nM; JAK3=200 nM)
3. + 4.5 μ l Mix de Reacción B (6,7-dimetil-8-ribitillumazina =20 μ M)
4. Incubación por 60 min a 30 °C, 95% humedad.
5. Se detiene la reacción adicionando 15 μ l de solución stop de la reacción

En primera instancia se adicionaron 2 μ l de 5.5% de TFA (inhibición total) en los controles negativos que no poseen compuestos. Luego se procedió a adicionar 4.5 μ l del Mix de Reacción A y 4.5 μ l del Mix de Reacción B al resto de la placa que contenía 90 nl/pocillo de los

compuestos a analizar, mediante un dispensador de alto rendimiento y precisión para volúmenes pequeños (Innovadyne Nanodrop Express de 16 canales) con el objetivo de eliminar la variación debido al tiempo necesario para transferir todos los reactivos. Debido a que el sustrato 6,7-dimetil-8-ribitillumazina poseía una fluorescencia muy baja para ser detectada por el sistema Caliper a las concentraciones utilizadas, fue necesario usar el péptido JAK3 que contiene Fuo-Taq el cual fue utilizado como standard del ensayo y de este modo el software pudo calcular la conversión. El control positivo no contenía inhibidor. Posteriormente se transfirió la placa a la incubadora y se incubó la reacción por 60 min a 30°C y 95% de humedad. La reacción finalizó con el agregado de 15 µl de solución Stop de la Reacción (1,2% TFA) a todos los pocillos. Durante el tiempo de incubación, se procedió a acondicionar el chip para el screening. Se lo colocó dentro de un dispositivo "cartucho" especialmente diseñado para este fin, se adicionó Coating buffer en los reservorios (250 µl en los pocillos pequeños y 500 µl en los pocillos grandes), y dicho módulo fue instalado en el Caliper LC3000 workstation. El cartucho actúa como soporte y guía para el chip y lo conecta al puerto de presión y al controlador de alto voltaje (Figura M-4). Una vez concluido el tiempo de incubación, las placas fueron transferidas al Caliper LabChip3000 Drug Discovery workstation (Caliper Technologies Corp., Mountain View, CA) (Figura M-5) donde se realizó la lectura en modo "off-chip". De cada pocillo, una alícuota fue pipeteada por medio de una cánula de LabChip®12-Sipper. El producto de la reacción, la enzima y el sustrato fueron sometidos a un campo eléctrico y fueron separados por electroforesis de acuerdo a sus cargas intrínsecas. El flujo del buffer dentro del capilar se mantuvo constante mediante la aplicación de una presión negativa. Los picos de producto y sustrato fueron excitados por un rayo láser y la intensidad de fluorescencia fue registrada. El porcentaje de conversión se calculó como una relación del área bajo el pico del producto con respecto a la suma de los picos del sustrato y producto. Los ajustes del instrumento para las condiciones de separación fueron optimizados para cada reactivo en relación a la separación de picos y a los tiempos de separación. Los parámetros operativos del sistema de software para el chip fueron seleccionados de la siguiente manera:

-upstream voltaje: -750 V

-downstream voltaje: -2500V

-presión: -2.1 psi

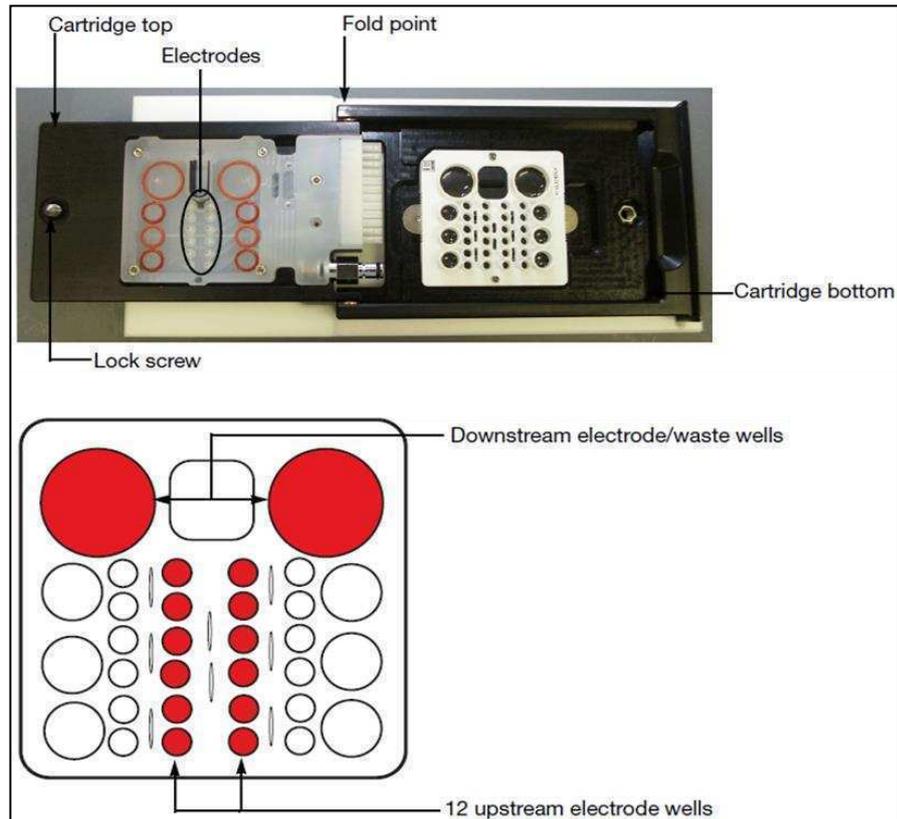


Figura M-4. Arriba: Cartucho de 12 cánulas. Abajo: dibujo esquemático del chip de 12 cánulas.

Controles y standards

- Control negativo: 2µl de 5,5% TFA (5,5% TFA/94,5% H₂O v/v), en reemplazo de compuesto.
- Control positivo: sin compuesto.
- Concentración final de DMSO en cada well: 1%

Análisis de datos

Los parámetros estadísticos del ensayo se basaron en los controles positivos y negativos, que se ejecutaron como estándares internos de cada placa de ensayo. Los datos fueron analizados en el programa HELIOS (Novartis Pharma AG).

-Señal sobre el background (S/B): éste parámetro fue usado para establecer la proporción de señal específica respecto de la señal no específica (background).

$$S / B = \frac{\text{media}_{\text{control positivo}}}{\text{media}_{\text{control negativo}}}$$



Figura M-5. LabChip 3000 Screening System con los elementos primarios detallados

Cálculo de los parámetros de calidad del ensayo

Los parámetros de calidad del ensayo se determinaron sobre la base de los controles positivos (alto) y negativos (bajo), los cuales se encontraban dentro de cada plato analizado. Un factor calculado comúnmente utilizado para describir la calidad de un ensayo basado en los controles positivo y negativo y su estabilidad se llama factor de Z' (Zhang *et al.*, 1999):

$$Z' = \frac{(3 \cdot SD_{controlpositivo} + 3 \cdot SD_{controhegativo})}{|media_{controlpositivo} - media_{controhegativo}|}$$

Cálculo de los valores de porcentaje de inhibición

La cantidad relativa del producto riboflavina r , se calculó utilizando las alturas del pico de sustrato, s , y el pico de producto, p : $r = p / (p + s)$. A continuación se determinó el porcentaje de inhibición como:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times \frac{1 - (r - r \text{ control negativo})}{(r \text{ control positivo} - r \text{ control negativo})}$$

Lista de Hits

La lista de muestras (compuestos) junto con sus respectivos valores de actividad por encima de un determinado umbral List of samples (compounds) together with their respective activity values above a given threshold and possible Flag values.

Cálculo de los valores de CI_{50} de NRP y de los 164 hits

Los valores de CI_{50} para los 164 hits y NRP fueron realizadas de ocho concentraciones (32 μ M, 10.7 μ M, 3.6 μ M, 1.2 μ M, 0.4 μ M, 0.13 μ M, 0.044 μ M y 0.015 μ M) para cada sustancia de ensayo (curva CI_{50} de ocho puntos). La reacción se incubó a 30°C y 95% de humedad y al cabo de 60 min se detuvo con la adición de 15 μ l de buffer stop el cual contenía 1,2% de TFA. Luego, las placas fueron analizadas en el LabChip 3000 Screening System como fue descrito en detalle previamente. El ensayo de las sustancias se realizó en $N = 1$ (única medición por sustancia). Para el cálculo de las gráficas se ajustaron los datos a una curva dosis-respuesta sigmoidea. Estos cálculos se realizaron con el programa de evaluación HELIOS, perteneciente a Novartis.

Programa de evaluación HELIOS

El programa HELIOS es un software de análisis para datos científicos como screenings y perfiles. Esta aplicación fue especialmente desarrollada por el departamento de Investigación de Novartis (NIBR) y soporta varias otras aplicaciones tales como el programa de registro de placas y numerosas bases de datos de compuestos.

Estudio en cultivo bacteriano de inhibidores obtenidos del High throughput screening

Se diluyó cultivo de *B. abortus* 2308 crecido O.N hasta una DO600 entre 0,02-0,03. El cultivo se fraccionó en tubos de microbiología a un volumen final de 500 μ l y se adicionaron los compuestos (Inhibidor 1=BMP142, Inhibidor 2= BMF205, Inhibidor 3=BMH037, Inhibidor 4=BNG508, Inhibidor 5= BNG453, Inhibidor 6= BNG504, Inhibidor 7= BNQ176, Inhibidor 8= BNQ176, Inhibidor 9= BNG452, Inhibidor 10= BNG414) a una concentración final de 150 μ M. Al

cultivo control se le adicionó 5 μ l de DMSO 100% que se utilizó como control. Se incubó a 37°C y se midió la DO600 a las 24 y 48h post incubación.

Los inhibidores 4, 5, 6, 9 y 10 fueron analizados a distintas concentraciones (150 μ M, 75 μ M, 37,5 μ M, 18,5 μ M). Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Del tubo con 150 μ M del I4 se tomaron muestras a las 20 y 48h post inoculación para sembrar en placas de Tryptic Soy Agar. Se incubó a 37°C por 24h y se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias.

Estudios moleculares de Docking

Preparación del sistema

El esquema de los compuestos fue generado utilizando el módulo de dibujo del modelado molecular de Marvin 15.6.8, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>). Las geometrías y la protonación de estos compuestos fueron optimizados utilizando las herramientas conformacionales de Marvin. Las coordenadas proteicas se obtuvieron de la Protein Data Banco, los códigos correspondientes son: 4G6I para RS-ROS, 4E0F para RS-RBF, 4GQN de RS-NRP y 4FXU para la forma apo (Serer *et al.*, 2014). Para el protocolo de docking fue seleccionada la cadena A del sistema 4G6I debido a que poseía dos ligandos en sus dominios N y C-terminal. Para las simulaciones de dinámica molecular utilizamos la forma trimérica de la apo proteína, que presenta diferentes poses para cada ligando.

Protocolo de docking

Las simulaciones de docking fueron llevados a cabo utilizando el programa Autodock 4 (Morris *et al.*, 2009) en el caso de los compuestos de la serie BNG. Para las búsquedas conformacionales fue utilizado el algoritmo genético Lamarckian. Para todas las simulaciones se utilizaron los siguientes parámetros: una población de 150 individuos (este parámetro está relacionada con el número de cópulas que se utiliza para iniciar la simulación), cinco millones de evaluaciones energéticas, tasa de mutación de 0.02, tasa de crossover de 0.8 y un valor de elitismo de 1. Se realizaron 100 rondas de docking independientes por cada ligando, y los resultados que difirieron en menos de 2.0 Å fueron agrupados en el mismo cluster. Para validar el protocolo de docking, los ligandos fueron removidos del sistema original y dockeados nuevamente (experimentos de re-docking). Durante estos ensayos, la proteína fue mantenida rígida.

Por otro lado, en el caso del docking del compuesto BMP142, se utilizó a estructura tridimensional de la RS-RBF (PDB 4e0f). Las estructuras tridimensionales fueron minimizadas energéticamente utilizando ICM-Pro (Molsoft, California EE.UU.). La proteína fue cargada en

este programa y se le adicionaron los átomos de hidrógeno. Asimismo, el sitio de unión seleccionado fue la interfaz del dominio N-terminal de la cadena A y el C-terminal de la cadena B. Luego, el ligando fue seleccionado y mediante ICM Ligand Editor (Molsoft, California EE. UU. y Novartis Pharma AG, Cmbridge, EE. UU.) se le adicionaron los átomos de hidrógeno. Se realizó docking flexible con el fin de lograr también scores de las uniones no rotables. Las torsiones fueron creadas y se obtuvieron poses de cada rotación. Diez runs independientes fueron iniciados por cada complejo. La mejor posición fue seleccionada en base al mejor score calculado por el software. La mínima energía expresa la mayor afinidad de unión. De los resultados de docking, la mejor conformación fue anotada con la menor energía de docking. Las interacciones fueron analizadas por el visualizador de gráficos moleculares Maestro (Schrödinger, Nueva York, EE.UU).

Simulación de Dinámica Molecular

Con el objetivo de una mejor comprensión y la validación de los resultados de docking obtenidos, sumado a la necesidad de estudiar la estabilidad general del modo de unión de los compuestos se condujo una simulación de 25 ns de dinámica molecular (DM) de los complejos proteína-ligando BNG508 y BMP142 utilizando el paquete AMBER 14 (DA Case, 2014). El r.m.s.d. del ligando fue calculado y trazado para todos los sistemas a partir de la final de la fase de equilibrado. Los patrones de interacción se inspeccionaron para el mantenimiento de los enlaces de hidrógeno predichos por el docking, así como también los contactos hidrofóbicos para post-producción de DM. Fueron asignados estados de protonación estándar para los residuos titulables (Asp y Glu están cargadas negativamente; Lys y Arg están cargados positivamente). La protonación de la His fue asignada favoreciendo la formación de enlaces de hidrógeno en la estructura cristalina. Cada sistema fue solvatado por una caja octaédrica truncada de agua TIP3P, asegurando que la distancia entre la superficie de la biomolécula y el límite de la caja era de al menos 10 Å. Cada sistema se optimizó primero utilizando un algoritmo de gradiente conjugado para 2000 pasos, seguido de 200 ps de volumen constante de equilibrado de DM, tiempo durante el cual la temperatura del sistema fue creciendo lentamente de 0 a 300K. El calentamiento fue seguido de una simulación de DM de 200 ps de temperatura y presión constante. Durante estos procesos de temperatura y presión constantes, los átomos del backbone de la proteína fueron restringidos a una fuerza constante de 1 kcal/molÅ usando un potencial armónico centrado en cada posición de partida de los átomos. No se aplicaron restricciones durante la producción siguiente.

Análisis del modo de unión y Rescoring

Además de utilizar simulaciones de DM para refinar los modelos dockeados, otro método fue necesario para predecir las energías de enlace, debido a la importancia de tener en cuenta ciertos factores que fueron ya sea ignorado o desatendidos durante la puntuación (scoring) inicial de docking, como la solvatación y los términos entrópicos. La metodología utilizada fue MM-PBSA. En este contexto, nuestro protocolo utilizó el MM-PBSA para sugerir el ranking del conjunto final de poses de docking. Brevemente para el cálculo de las energías libres de unión de diferentes poses del complejo RS-inhibidor fueron utilizados los últimos 20 ns de cada 25 ns de trayectorias explícitas de DM de solvente. Un total de 1000 conformaciones de complejos RS-inhibidor de cada trayectoria se obtuvieron mediante la recopilación de imágenes instantáneas igualmente espaciadas en intervalos de 20 ps. La energía libre de unión se calculó utilizando un enfoque solvente implícito MM/PBSA (Bill R. MillerIII, 2012), mediante la eliminación de coordenadas de moléculas de disolvente de cada una de las imágenes instantáneas extraídas y para el cálculo de la energía libre de unión se utilizaron las coordenadas del dominio de unión y del inhibidor unido. Se calculó la energía libre para cada especie molecular: complejos RS-inhibidor, receptor (dominio de la cadena A de RS) y el ligando (inhibidor). La energía libre de unión para el inhibidor se calcula utilizando la ecuación:

$$\Delta G_{\text{unión}} = G_{\text{complejo}} - G_{\text{receptor}} - G_{\text{inhibidor}}$$

Anexo: Buffers y reactivos del ensayo de High throughput Screening

Buffer de reacción

Reactivos	Concentración final
HEPES pH 7.5	50 mM
Tween 20	0,02 %
DTT	1 mM
BSA	0,02 %
Na ₃ VO ₄	10 µM
β-Glycerolfosfato	10 mM
Agua MilliQ	Hasta llegar a 40 ml

Mix de reacción A: Enzima de la reacción + JAK 3

Reactivos	Stock	Concentración final (2x)
Buffer de reacción	1x	1x
JAK3	10 mM	0,2 µM
Riboflavina Sintasa	10,2 mM	0,016 µM

Solución Stop de la Reacción

Reactivos	Stock	Concentración final
Buffer de reacción	1x	
Ácido Trifluoroacético	100%	1,2%

Solución Stop del control positivo

Reactivos	Stock	Concentración final
Buffer de reacción	1x	
Ácido Trifluoroacético	100%	5,5 %

Mix de Reacción B: Sustrato de la reacción

Reactivos	Stock	Concentración final (2x)
Buffer de reacción	1x	1x
Lumazina	10,2 mM	40 μ M

Coating buffer con CR-3 y CR-8

Reactivos	Concentración final
Hepes pH 7.5	100mM
DMSO	5%
EDTA	10mM
Brij 35	0,015%
Coating-3 Reagent	3,5 % v/v
Coating-8 Reagent:	0,5 % v/v

Referencias

- Akaike, H. (1974). *IEEE Transactions on Automatic Control* **19**, 716-723.
- Al Dahouk, S., Jubier-Maurin, V., Scholz, H. C., Tomaso, H., Karges, W., Neubauer, H. & Kohler, S. (2008). *Proteomics* **8**, 3862-3870.
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyon, I. & Gorvel, J. P. (2005). *Nature immunology* **6**, 618-625.
- Arenas, G. N., Staskevich, A. S., Aballay, A. & Mayorga, L. S. (2000). *Infection and immunity* **68**, 4255-4263.
- Atluri, V. L., Xavier, M. N., de Jong, M. F., den Hartigh, A. B. & Tsolis, R. M. (2011). *Annual review of microbiology* **65**, 523-541.
- Audic, S., Lescot, M., Claverie, J. M. & Scholz, H. C. (2009). *BMC genomics* **10**, 352.
- Bacher, A., Eberhardt, S., Fischer, M., Kis, K. & Richter, G. (2000). *Annual review of nutrition* **20**, 153-167.
- Baldwin, C. L. & Winter, A. J. (1994). *Immunology series* **60**, 363-380.
- Barbier, T., Nicolas, C. & Letesson, J. J. (2011). *FEBS letters* **585**, 2929-2934.
- Barquero-Calvo, E., Chaves-Olarte, E., Weiss, D. S., Guzman-Verri, C., Chacon-Diaz, C., Rucavado, A., Moriyon, I. & Moreno, E. (2007). *PloS one* **2**, e631.
- Beach, R. & Plaut, G. W. (1969). *Tetrahedron letters*, 3489-3492.
- Becker, D., Selbach, M., Rollenhagen, C., Ballmaier, M., Meyer, T. F., Mann, M. & Bumann, D. (2006). *Nature* **440**, 303-307.
- Bickerton, G. R., Paolini, G. V., Besnard, J., Muresan, S. & Hopkins, A. L. (2012). *Nature chemistry* **4**, 90-98.
- Bill R. MillerIII, T. D. M., Jason M. Swails, Nadine Homeyer, Holger Gohlke, and Adrian E. Roitberg (2012). *Journal of Chemical Theory and Computation*, 3314-3321.
- Billard, E., Cazevielle, C., Dornand, J. & Gross, A. (2005). *Infection and immunity* **73**, 8418-8424.
- Blount, K. F. & Breaker, R. R. (2006). *Nature biotechnology* **24**, 1558-1564.
- Bohacek, R. S., McMartin, C. & Guida, W. C. (1996). *Medicinal research reviews* **16**, 3-50.
- Bonomi, H. R., Marchesini, M. I., Klinke, S., Ugalde, J. E., Zylberman, V., Ugalde, R. A., Comerci, D. J. & Goldbaum, F. A. (2010). *PloS one* **5**, e9435.
- Borovok, I., Gorovitz, B., Yanku, M., Schreiber, R., Gust, B., Chater, K., Aharonowitz, Y. & Cohen, G. (2004). *Molecular microbiology* **54**, 1022-1035.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Benjamin, D. K., Jr., Bradley, J., Guidos, R. J., Jones, R. N., Murray, B. E., Bonomo, R. A. & Gilbert, D. (2013). *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **56**, 1685-1694.
- Bragg, R., van der Westhuizen, W., Lee, J. Y., Coetsee, E. & Boucher, C. (2014). *Advances in experimental medicine and biology* **807**, 97-110.
- Bricogne, G., Blanc, E., Brandl, M., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Roversi, P., Sharff, A., Smart, O. S., Vonrhein, C. & Womack, T. O. (2011). *BUSTER version 2.10.0*.
- Burmann, B. M., Luo, X., Rosch, P., Wahl, M. C. & Gottesman, M. E. (2010). *Nucleic acids research* **38**, 314-326.
- Burmann, B. M., Uc-Mass, A., Schweimer, K., Gottesman, M. E. & Rosch, P. (2008). *Biochemistry* **47**, 7335-7341.
- Carrica Mdel, C., Fernandez, I., Marti, M. A., Paris, G. & Goldbaum, F. A. (2012). *Molecular microbiology* **85**, 39-50.
- Carrica Mdel, C., Fernandez, I., Sieira, R., Paris, G. & Goldbaum, F. A. (2013). *Molecular microbiology* **88**, 222-233.
- Case, E. D., Akers, J. C. & Tan, M. (2011). *Journal of bacteriology* **193**, 4396-4404.
- Celli, J., de Chastellier, C., Franchini, D. M., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2003). *The Journal of experimental medicine* **198**, 545-556.
- Celli, J. & Gorvel, J. P. (2004). *Current opinion in microbiology* **7**, 93-97.
- Cole, S. T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K. D., Thomson, N. R., Wheeler, P. R., Honore, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth,

- T., Connor, R., Davies, R. M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rutherford, K. M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J. R. & Barrell, B. G. (2001). *Nature* **409**, 1007-1011.
- Comerci, D. J., Martinez-Lorenzo, M. J., Sieira, R., Gorvel, J. P. & Ugalde, R. A. (2001). *Cellular microbiology* **3**, 159-168.
- Corbel, M. J. (2006). *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*.
- Craig, P. O., Berguer, P. M., Ainciart, N., Zylberman, V., Thomas, M. G., Martinez Tosar, L. J., Bulloj, A., Boccaccio, G. L. & Goldbaum, F. A. (2005). *Proteins* **61**, 1089-1100.
- Cushman, M., Mihalic, J. T., Kis, K. & Bacher, A. (1999). *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **9**, 39-42.
- Cushman, M., Sambaiah, T., Jin, G., Illarionov, B., Fischer, M. & Bacher, A. (2004). *The Journal of organic chemistry* **69**, 601-612.
- Cushman, M., Yang, D., Gerhardt, S., Huber, R., Fischer, M., Kis, K. & Bacher, A. (2002). *The Journal of organic chemistry* **67**, 5807-5816.
- Cushman, M., Yang, D., Kis, K. & Bacher, A. (2001). *The Journal of organic chemistry* **66**, 8320-8327.
- Chain, P. S., Comerci, D. J., Tolmasky, M. E., Larimer, F. W., Malfatti, S. A., Vergez, L. M., Aguero, F., Land, M. L., Ugalde, R. A. & Garcia, E. (2005). *Infection and immunity* **73**, 8353-8361.
- Chen, J., Illarionov, B., Bacher, A., Fischer, M., Haase, I., Georg, G., Ye, Q. Z., Ma, Z. & Cushman, M. (2005). *Analytical biochemistry* **338**, 124-130.
- Chen, J., Sambaiah, T., Illarionov, B., Fischer, M., Bacher, A. & Cushman, M. (2004). *The Journal of organic chemistry* **69**, 6996-7003.
- Chen, V. B., Arendall, W. B., 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S. & Richardson, D. C. (2010). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 12-21.
- DA Case, V. B., J Berryman, RM Betz, Q Cai, DS Cerutti, TE Cheatham Iii, TA Darden, RE Duke, H Gohlke. (2014).
- Dahl, S. G., Sylte, I. & Ravna, A. W. (2004). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **309**, 853-860.
- Das, A. (1992). *Journal of bacteriology* **174**, 6711-6716.
- Detilleux, P. G., Deyoe, B. L. & Cheville, N. F. (1990). *Infection and immunity* **58**, 2320-2328.
- Duschak, V. G. & Couto, A. S. (2009). *Current medicinal chemistry* **16**, 3174-3202.
- Eberhardt, S., Richter, G., Gimbel, W., Werner, T. & Bacher, A. (1996). *European journal of biochemistry / FEBS* **242**, 712-719.
- Eiken M, P. J., Petersen KE, Kaufmann HJ. (1984). *European journal of pediatrics* **141**, 231-235.
- El-Tras, W. F., Tayel, A. A., Eltholth, M. M. & Guitian, J. (2010). *Veterinary microbiology* **141**, 321-325.
- Elden, A. C., Kim, H. J., Hart, M. P., Chen-Plotkin, A. S., Johnson, B. S., Fang, X., Armakola, M., Geser, F., Greene, R., Lu, M. M., Padmanabhan, A., Clay-Falcone, D., McCluskey, L., Elman, L., Jühr, D., Gruber, P. J., Rub, U., Auburger, G., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Van Deerlin, V. M., Bonini, N. M. & Gitler, A. D. (2010). *Nature* **466**, 1069-1075.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 486-501.
- Fischer, M. & Bacher, A. (2005). *Natural product reports* **22**, 324-350.
- Fischer, M. & Bacher, A. (2008). *Archives of biochemistry and biophysics* **474**, 252-265.
- Fischer, M., Haase, I., Feicht, R., Richter, G., Gerhardt, S., Changeux, J. P., Huber, R. & Bacher, A. (2002). *European journal of biochemistry / FEBS* **269**, 519-526.
- Fischer, M., Haase, I., Feicht, R., Schramek, N., Kohler, P., Schieberle, P. & Bacher, A. (2005). *Biological chemistry* **386**, 417-428.

- Fischer, M., Schott, A. K., Romisch, W., Ramsperger, A., Augustin, M., Fidler, A., Bacher, A., Richter, G., Huber, R. & Eisenreich, W. (2004). *Journal of molecular biology* **343**, 267-278.
- Fluit, A. C., Visser, M. R. & Schmitz, F. J. (2001). *Clinical microbiology reviews* **14**, 836-871, table of contents.
- Foster, G., Osterman, B. S., Godfroid, J., Jacques, I. & Cloeckart, A. (2007). *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **57**, 2688-2693.
- Fretin, D., Fauconnier, A., Kohler, S., Halling, S., Leonard, S., Nijskens, C., Ferooz, J., Lestrade, P., Delrue, R. M., Danese, I., Vandenhoute, J., Tibor, A., DeBolle, X. & Letesson, J. J. (2005). *Cellular microbiology* **7**, 687-698.
- Garcia Angulo, V. A., Bonomi, H. R., Posadas, D. M., Serer, M. I., Torres, A. G., Zorreguieta, A. & Goldbaum, F. A. (2013). *Journal of bacteriology* **195**, 4611-4619.
- Gee, J. M., Valderas, M. W., Kovach, M. E., Grippe, V. K., Robertson, G. T., Ng, W. L., Richardson, J. M., Winkler, M. E. & Roop, R. M., 2nd (2005). *Infection and immunity* **73**, 2873-2880.
- Gerhardt, S., Haase, I., Steinbacher, S., Kaiser, J. T., Cushman, M., Bacher, A., Huber, R. & Fischer, M. (2002). *Journal of molecular biology* **318**, 1317-1329.
- Gerhardt, S., Schott, A. K., Kairies, N., Cushman, M., Illarionov, B., Eisenreich, W., Bacher, A., Huber, R., Steinbacher, S. & Fischer, M. (2002). *Structure* **10**, 1371-1381.
- Goemaere, E., Melet, A., Larue, V., Lieutaud, A., Alves de Sousa, R., Chevalier, J., Yimga-Djapa, L., Giglione, C., Huguet, F., Alimi, M., Meinel, T., Dardel, F., Artaud, I. & Pages, J. M. (2012). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **67**, 1392-1400.
- Golebiowski, A., Klopfenstein, S. R. & Portlock, D. E. (2001). *Current opinion in chemical biology* **5**, 273-284.
- Gorvel, J. P. & de Chastellier, C. (2005). *Nature medicine* **11**, 18-19.
- Grill, S., Busenbender, S., Pfeiffer, M., Kohler, U. & Mack, M. (2008). *Journal of bacteriology* **190**, 1546-1553.
- Grinberg, I., Shteinberg, T., Gorovitz, B., Aharonowitz, Y., Cohen, G. & Borovok, I. (2006). *Journal of bacteriology* **188**, 7635-7644.
- Grinberg, I., Shteinberg, T., Hassan, A. Q., Aharonowitz, Y., Borovok, I. & Cohen, G. (2009). *Journal of bacteriology* **191**, 1169-1179.
- Haldane, J. B. S. (1930). *Enzymes*. London, New York,: Longmans, Green.
- Ham, Y. W., Humphreys, D. J., Choi, S. & Dayton, D. L. (2011). *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **21**, 5071-5074.
- Hickey, S. F. & Hammond, M. C. (2014). *Chemistry & biology* **21**, 345-356.
- Holmes, R. K., Koning, F. A., Bishop, K. N. & Malim, M. H. (2007). *The Journal of biological chemistry* **282**, 2587-2595.
- Holst, J. J. (2004). *Expert opinion on emerging drugs* **9**, 155-166.
- Hoogendam J, F.-S. H., Wÿnaendts LC, Löwik CW, Wit JM, Karperien M. (2007). *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **92**, 1088-1095.
- Illarionov, B., Eisenreich, W. & Bacher, A. (2001). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7224-7229.
- Illarionov, B., Kemter, K., Eberhardt, S., Richter, G., Cushman, M. & Bacher, A. (2001). *The Journal of biological chemistry* **276**, 11524-11530.
- Irwin, J. J. & Shoichet, B. K. (2005). *Journal of chemical information and modeling* **45**, 177-182.
- Jean-Marc Rolain, D. R. (2003). *Quinolone Antimicrobial Agents, Third Edition*, 323-335.
- Jimenez de Bagues, M. P., Loisel-Meyer, S., Liautard, J. P. & Jubier-Maurin, V. (2007). *Infection and immunity* **75**, 531-535.
- John A. Howe, H. W., Thierry O. Fischmann¹, Carl J. Balibar, Li Xiao, Andrew M. Galgoci, Juliana C. Malinverni,, Todd Mayhood, A. V., Ali Nahvi, Nicholas Murgolo, Christopher M. Barbieri, Paul A. Mann, Donna Carr,, Ellen Xia, P. Z., Dan Riley, Ronald E.Painter, Scott S. Walker, Brad Sherborne, Reynalda de Jesus, Weidong Pan,, Michael A. Plotkin, J.,

- Diane Rindgen, John Cummings, Charles G. Garlisi, Rumin Zhang, Payal R. Sheth, & Charles J. Gill, H. T. T. R. (2015). *Nature*.
- Joosten, V. & van Berkel, W. J. (2007). *Current opinion in chemical biology* **11**, 195-202.
- Keller, M. A. & Stiehm, E. R. (2000). *Clinical microbiology reviews* **13**, 602-614.
- Kim, R. R., Illarionov, B., Joshi, M., Cushman, M., Lee, C. Y., Eisenreich, W., Fischer, M. & Bacher, A. (2010). *Journal of the American Chemical Society* **132**, 2983-2990.
- Kim, S., Watarai, M., Kondo, Y., Erdenebaatar, J., Makino, S. & Shirahata, T. (2003). *Infection and immunity* **71**, 3020-3027.
- Kin, M. S., Fort, M., de Echaide, S. T. & Casanave, E. B. (2014). *Veterinary microbiology* **170**, 442-445.
- Kjer-Nielsen, L., Patel, O., Corbett, A. J., Le Nours, J., Meehan, B., Liu, L., Bhati, M., Chen, Z., Kostenko, L., Reantragoon, R., Williamson, N. A., Purcell, A. W., Dudek, N. L., McConville, M. J., O'Hair, R. A., Khairallah, G. N., Godfrey, D. I., Fairlie, D. P., Rossjohn, J. & McCluskey, J. (2012). *Nature* **491**, 717-723.
- Klinke, S., Zylberman, V., Bonomi, H. R., Haase, I., Guimaraes, B. G., Braden, B. C., Bacher, A., Fischer, M. & Goldbaum, F. A. (2007). *Journal of molecular biology* **373**, 664-680.
- Klinke, S., Zylberman, V., Vega, D. R., Guimaraes, B. G., Braden, B. C. & Goldbaum, F. A. (2005). *Journal of molecular biology* **353**, 124-137.
- Knowles, J. & Gromo, G. (2003). *Nature reviews. Drug discovery* **2**, 63-69.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2004). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **60**, 2256-2268.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). *Journal of molecular biology* **372**, 774-797.
- Lamontagne, J., Forest, A., Marazzo, E., Denis, F., Butler, H., Michaud, J. F., Boucher, L., Pedro, I., Villeneuve, A., Sitnikov, D., Trudel, K., Nassif, N., Boudjelti, D., Tomaki, F., Chaves-Olarte, E., Guzman-Verri, C., Brunet, S., Cote-Martin, A., Hunter, J., Moreno, E. & Paramithiotis, E. (2009). *Journal of proteome research* **8**, 1594-1609.
- Langer, S., Nakanishi, S., Mathes, T., Knaus, T., Binter, A., Macheroux, P., Mase, T., Miyakawa, T., Tanokura, M. & Mack, M. (2013). *Biochemistry* **52**, 4288-4295.
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2005). *Current opinion in microbiology* **8**, 60-66.
- Laplagne, D. A., Zylberman, V., Ainciart, N., Steward, M. W., Scitutto, E., Fossati, C. A. & Goldbaum, F. A. (2004). *Proteins* **57**, 820-828.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. & Higgins, D. G. (2007). *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Lee, E. R., Blount, K. F. & Breaker, R. R. (2009). *RNA biology* **6**, 187-194.
- Leeson, P. D. & Davis, A. M. (2004). *Journal of medicinal chemistry* **47**, 6338-6348.
- Lei, P., Ayton, S., Finkelstein, D. I., Adlard, P. A., Masters, C. L. & Bush, A. I. (2010). *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**, 1775-1778.
- Levin, B. R. & Bull, J. J. (2004). *Nature reviews. Microbiology* **2**, 166-173.
- Li, X. Z. & Nikaido, H. (2004). *Drugs* **64**, 159-204.
- Liao, D. I., Wawrzak, Z., Calabrese, J. C., Viitanen, P. V. & Jordan, D. B. (2001). *Structure* **9**, 399-408.
- Lindsay, M. A. (2003). *Nature reviews. Drug discovery* **2**, 831-838.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. (2001). *Advanced drug delivery reviews* **46**, 3-26.
- Loisel-Meyer, S., Jimenez de Bagues, M. P., Basseres, E., Dornand, J., Kohler, S., Liautard, J. P. & Jubier-Maurin, V. (2006). *Infection and immunity* **74**, 1973-1976.
- Long, Q., Ji, L., Wang, H. & Xie, J. (2010). *Chemical biology & drug design* **75**, 339-347.
- Lundin, D., Torrents, E., Poole, A. M. & Sjöberg, B. M. (2009). *BMC genomics* **10**, 589.
- Luo, X., Hsiao, H. H., Bubunenko, M., Weber, G., Court, D. L., Gottesman, M. E., Urlaub, H. & Wahl, M. C. (2008). *Molecular cell* **32**, 791-802.

- Luttgen, H., Robelek, R., Muhlberger, R., Diercks, T., Schuster, S. C., Kohler, P., Kessler, H., Bacher, A. & Richter, G. (2002). *Journal of molecular biology* **316**, 875-885.
- Mansjo, M. & Johansson, J. (2011). *RNA biology* **8**, 674-680.
- Martin, B., Golden, E., Carlson, O. D., Pistell, P., Zhou, J., Kim, W., Frank, B. P., Thomas, S., Chadwick, W. A., Greig, N. H., Bates, G. P., Sathasivam, K., Bernier, M., Maudsley, S., Mattson, M. P. & Egan, J. M. (2009). *Diabetes* **58**, 318-328.
- Martin, F. A., Posadas, D. M., Carrica, M. C., Cravero, S. L., O'Callaghan, D. & Zorreguieta, A. (2009). *Journal of bacteriology* **191**, 2530-2540.
- Martin, Y. C., Kofron, J. L. & Traphagen, L. M. (2002). *Journal of medicinal chemistry* **45**, 4350-4358.
- Martinez-Nunez, C., Altamirano-Silva, P., Alvarado-Guillen, F., Moreno, E., Guzman-Verri, C. & Chaves-Olarte, E. (2010). *Journal of bacteriology* **192**, 5603-5608.
- Martinez de Tejada, G., Pizarro-Cerda, J., Moreno, E. & Moriyon, I. (1995). *Infection and immunity* **63**, 3054-3061.
- Martirosyan, A., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (2011). *Immunological reviews* **240**, 211-234.
- McDonald, W. L., Jamaludin, R., Mackereth, G., Hansen, M., Humphrey, S., Short, P., Taylor, T., Swingler, J., Dawson, C. E., Whatmore, A. M., Stubberfield, E., Perrett, L. L. & Simmons, G. (2006). *Journal of clinical microbiology* **44**, 4363-4370.
- McKethan, B. L. & Spiro, S. (2013). *Molecular microbiology* **90**, 278-289.
- McOrist, S. (2000). *Trends in microbiology* **8**, 483-486.
- Meining, W., Eberhardt, S., Bacher, A. & Ladenstein, R. (2003). *Journal of molecular biology* **331**, 1053-1063.
- Meining, W., Mortl, S., Fischer, M., Cushman, M., Bacher, A. & Ladenstein, R. (2000). *Journal of molecular biology* **299**, 181-197.
- Mironov, A. S., Gusarov, I., Rafikov, R., Lopez, L. E., Shatalin, K., Kreneva, R. A., Perumov, D. A. & Nudler, E. (2002). *Cell* **111**, 747-756.
- Moreno, E., Cloeckert, A. & Moriyon, I. (2002). *Veterinary microbiology* **90**, 209-227.
- Moreno, E. M. I. (2006). *Springer, New York*. **5**, 315 - 456.
- Moreno, E. & Moriyon, I. (2002). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 1-3.
- Moreno, E., Speth, S. L., Jones, L. M. & Berman, D. T. (1981). *Infection and immunity* **31**, 214-222.
- Morgunova, E., Illarionov, B., Saller, S., Popov, A., Sambaiyah, T., Bacher, A., Cushman, M., Fischer, M. & Ladenstein, R. (2010). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 1001-1011.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. & Olson, A. J. (2009). *Journal of computational chemistry* **30**, 2785-2791.
- Mosqueda, N., Gato, E., Roca, I., Lopez, M., de Alegria, C. R., Fernandez Cuenca, F., Martinez-Martinez, L., Pachon, J., Cisneros, J. M., Rodriguez-Bano, J., Pascual, A., Vila, J., Bou, G. & Tomas, M. (2014). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **69**, 2629-2633.
- Mowa, M. B., Warner, D. F., Kaplan, G., Kana, B. D. & Mizrahi, V. (2009). *Journal of bacteriology* **191**, 985-995.
- Muhlberger, R., Robelek, R., Eisenreich, W., Ettenhuber, C., Sinner, E. K., Kessler, H., Bacher, A. & Richter, G. (2003). *Journal of molecular biology* **327**, 973-983.
- Murshudov, G. N., Skubak, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F. & Vagin, A. A. (2011). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **67**, 355-367.
- Naroeni, A. & Porte, F. (2002). *Infection and immunity* **70**, 1640-1644.
- Navaza, J. A. (1994). *Acta Crystallogr. Sect. A* **50**, 157-163.
- Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C. A. & Rhodius, V. A. (2006). *Genes & development* **20**, 1776-1789.
- Norrby, S. R., Nord, C. E. & Finch, R. (2005). *The Lancet infectious diseases* **5**, 115-119.

- O'Shea, R. & Moser, H. E. (2008). *Journal of medicinal chemistry* **51**, 2871-2878.
- Ott, E., Stolz, J., Lehmann, M. & Mack, M. (2009). *RNA biology* **6**, 276-280.
- Otto, M. K. & Bacher, A. (1981). *European journal of biochemistry / FEBS* **115**, 511-517.
- Panosa, A., Roca, I. & Gibert, I. (2010). *PloS one* **5**, e11328.
- Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M. & Tsianos, E. (2005). *The New England journal of medicine* **352**, 2325-2336.
- Pastagia, M., Schuch, R., Fischetti, V. A. & Huang, D. B. (2013). *Journal of medical microbiology* **62**, 1506-1516.
- Patel, O., Kjer-Nielsen, L., Le Nours, J., Eckle, S. B., Birkinshaw, R., Beddoe, T., Corbett, A. J., Liu, L., Miles, J. J., Meehan, B., Reantragoon, R., Sandoval-Romero, M. L., Sullivan, L. C., Brooks, A. G., Chen, Z., Fairlie, D. P., McCluskey, J. & Rossjohn, J. (2013). *Nature communications* **4**, 2142.
- Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J. & Pompliano, D. L. (2007). *Nature reviews. Drug discovery* **6**, 29-40.
- Pedroli, D., Langer, S., Hobl, B., Schwarz, J., Hashimoto, M. & Mack, M. (2015). *The FEBS journal*.
- Pedroli, D. B., Jankowitsch, F., Schwarz, J., Langer, S., Nakanishi, S., Frei, E. & Mack, M. (2013). *Current pharmaceutical design* **19**, 2552-2560.
- Pedroli, D. B., Matern, A., Wang, J., Ester, M., Siedler, K., Breaker, R. & Mack, M. (2012). *Nucleic acids research* **40**, 8662-8673.
- Pedroli, D. B., Nakanishi, S., Barile, M., Mansurova, M., Carmona, E. C., Lux, A., Gartner, W. & Mack, M. (2011). *Biochemical pharmacology* **82**, 1853-1859.
- Pelgrift, R. Y. & Friedman, A. J. (2013). *Advanced drug delivery reviews* **65**, 1803-1815.
- Pizarro-Cerda, J., Meresse, S., Parton, R. G., van der Goot, G., Sola-Landa, A., Lopez-Goni, I., Moreno, E. & Gorvel, J. P. (1998). *Infection and immunity* **66**, 5711-5724.
- Pizarro-Cerda, J., Moreno, E., Sanguedolce, V., Mege, J. L. & Gorvel, J. P. (1998). *Infection and immunity* **66**, 2387-2392.
- Porte, F., Liautard, J. P. & Kohler, S. (1999). *Infection and immunity* **67**, 4041-4047.
- Posadas, D. M., Martin, F. A., Sabio y Garcia, J. V., Spera, J. M., Delpino, M. V., Baldi, P., Campos, E., Cravero, S. L. & Zorreguieta, A. (2007). *Infection and immunity* **75**, 379-389.
- Ramaswamy, S. & Musser, J. M. (1998). *Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease* **79**, 3-29.
- Richardson, J., Greenblatt, J. (1996). *American Society for Microbiology Press*, 822-848.
- Ritsert, K., Huber, R., Turk, D., Ladenstein, R., Schmidt-Base, K. & Bacher, A. (1995). *Journal of molecular biology* **253**, 151-167.
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., Cohen, J., Findlay, D., Gyssens, I., Heure, O. E., Kahlmeter, G., Kruse, H., Laxminarayan, R., Liebana, E., Lopez-Cerero, L., MacGowan, A., Martins, M., Rodriguez-Bano, J., Rolain, J. M., Segovia, C., Sigauque, B., Taconelli, E., Wellington, E. & Vila, J. (2015). *New microbes and new infections* **6**, 22-29.
- Rodionov, D. A. & Gelfand, M. S. (2005). *Trends in genetics : TIG* **21**, 385-389.
- Rollenhagen, C. & Bumann, D. (2006). *Infection and immunity* **74**, 1649-1660.
- Roop, R. M., 2nd, Gaines, J. M., Anderson, E. S., Caswell, C. C. & Martin, D. W. (2009). *Medical microbiology and immunology* **198**, 221-238.
- Rouot, B., Alvarez-Martinez, M. T., Marius, C., Menanteau, P., Guilloteau, L., Boigegrain, R. A., Zumbihl, R., O'Callaghan, D., Domke, N. & Baron, C. (2003). *Infection and immunity* **71**, 1075-1082.
- Samartino, L. E. (2002). *Veterinary microbiology* **90**, 71-80.
- Sangari, F. J. & Aguero, J. (1996). *Microbiologia* **12**, 207-218.
- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Puhler, A. (1994). *Gene* **145**, 69-73.

- Scholz, H. C., Hubalek, Z., Nesvadbova, J., Tomaso, H., Vergnaud, G., Le Fleche, P., Whatmore, A. M., Al Dahouk, S., Kruger, M., Lodri, C. & Pfeffer, M. (2008). *Emerging infectious diseases* **14**, 1316-1317.
- Serer, M. I., Bonomi, H. R., Guimaraes, B. G., Rossi, R. C., Goldbaum, F. A. & Klinke, S. (2014). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **70**, 1419-1434.
- Serganov, A., Huang, L. & Patel, D. J. (2009). *Nature* **458**, 233-237.
- Shin, R. W., Iwaki, T., Kitamoto, T. & Tateishi, J. (1991). *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **64**, 693-702.
- Sieira, R., Comerci, D. J., Sanchez, D. O. & Ugalde, R. A. (2000). *Journal of bacteriology* **182**, 4849-4855.
- Singh, S. B., Young, K. & Miesel, L. (2011). *Expert review of anti-infective therapy* **9**, 589-613.
- Smart, O. S., Womack, T. O., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Sharff, A., Vonrhein, C. & Bricogne, G. (2012). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **68**, 368-380.
- Sohn, A. H., Probert, W. S., Glaser, C. A., Gupta, N., Bollen, A. W., Wong, J. D., Grace, E. M. & McDonald, W. C. (2003). *Emerging infectious diseases* **9**, 485-488.
- Sriranganathan, N., Boyle, S. M., Schurig, G. & Misra, H. (1991). *Veterinary microbiology* **26**, 359-366.
- Stagno, J. R., Altieri, A. S., Bubunenko, M., Tarasov, S. G., Li, J., Court, D. L., Byrd, R. A. & Ji, X. (2011). *Nucleic acids research* **39**, 7803-7815.
- Starr, T., Ng, T. W., Wehrly, T. D., Knodler, L. A. & Celli, J. (2008). *Traffic* **9**, 678-694.
- Stary, A. & Sarasin, A. (2002). *Research in microbiology* **153**, 441-445.
- Studier, F. W. (2005). *Protein expression and purification* **41**, 207-234.
- Takashima, H., Boerkoel, C. F., John, J., Saifi, G. M., Salih, M. A., Armstrong, D., Mao, Y., Quiocho, F. A., Roa, B. B., Nakagawa, M., Stockton, D. W. & Lupski, J. R. (2002). *Nature genetics* **32**, 267-272.
- Talukdar, A., Breen, M., Bacher, A., Illarionov, B., Fischer, M., Georg, G., Ye, Q. Z. & Cushman, M. (2009). *The Journal of organic chemistry* **74**, 5123-5134.
- Talukdar, A., Illarionov, B., Bacher, A., Fischer, M. & Cushman, M. (2007). *The Journal of organic chemistry* **72**, 7167-7175.
- Talukdar, A., Morgunova, E., Duan, J., Meining, W., Foloppe, N., Nilsson, L., Bacher, A., Illarionov, B., Fischer, M., Ladenstein, R. & Cushman, M. (2010). *Bioorganic & medicinal chemistry* **18**, 3518-3534.
- Tiller, R. V., Gee, J. E., Lonsway, D. R., Gribble, S., Bell, S. C., Jennison, A. V., Bates, J., Coulter, C., Hoffmaster, A. R. & De, B. K. (2010). *BMC microbiology* **10**, 23.
- Torrents, E., Aloy, P., Gibert, I. & Rodriguez-Trelles, F. (2002). *Journal of molecular evolution* **55**, 138-152.
- Torrents, E., Grinberg, I., Gorovitz-Harris, B., Lundstrom, H., Borovok, I., Aharonowitz, Y., Sjoberg, B. M. & Cohen, G. (2007). *Journal of bacteriology* **189**, 5012-5021.
- Truffault, V., Coles, M., Diercks, T., Abelmann, K., Eberhardt, S., Luttggen, H., Bacher, A. & Kessler, H. (2001). *Journal of molecular biology* **309**, 949-960.
- Veber, D. F. (2002). *Journal of medicinal chemistry* **45**, 2615-2623.
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W. & Kopple, K. D. (2002). *Journal of medicinal chemistry* **45**, 2615-2623.
- Viadas, C., Rodriguez, M. C., Garcia-Lobo, J. M., Sangari, F. J. & Lopez-Goni, I. (2009). *Microbial pathogenesis* **47**, 189-195.
- Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2002). *Nucleic acids research* **30**, 3141-3151.
- Vogl, C., Grill, S., Schilling, O., Stulke, J., Mack, M. & Stolz, J. (2007). *Journal of bacteriology* **189**, 7367-7375.
- von Barga, K., Gorvel, J. P. & Salcedo, S. P. (2012). *FEMS microbiology reviews* **36**, 533-562.
- Waldor, M. K. (2006). *The New England journal of medicine* **354**, 296-297.

- Walsh, C., Fisher, J., Spencer, R., Graham, D. W., Ashton, W. T., Brown, J. E., Brown, R. D. & Rogers, E. F. (1978). *Biochemistry* **17**, 1942-1951.
- Walsh, C. T. & Wencewicz, T. A. (2014). *The Journal of antibiotics* **67**, 7-22.
- Watarai, M., Makino, S., Fujii, Y., Okamoto, K. & Shirahata, T. (2002). *Cellular microbiology* **4**, 341-355.
- Wattam, A. R., Williams, K. P., Snyder, E. E., Almeida, N. F., Jr., Shukla, M., Dickerman, A. W., Crasta, O. R., Kenyon, R., Lu, J., Shallom, J. M., Yoo, H., Ficht, T. A., Tsolis, R. M., Munk, C., Tapia, R., Han, C. S., Detter, J. C., Bruce, D., Brettin, T. S., Sobral, B. W., Boyle, S. M. & Setubal, J. C. (2009). *Journal of bacteriology* **191**, 3569-3579.
- Whatmore, A. M., Dawson, C. E., Groussaud, P., Koylass, M. S., King, A. C., Shankster, S. J., Sohn, A. H., Probert, W. S. & McDonald, W. L. (2008). *Emerging infectious diseases* **14**, 517-518.
- Winkler, W. C., Cohen-Chalamish, S. & Breaker, R. R. (2002). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 15908-15913.
- Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A. & Wilson, K. S. (2011). *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **67**, 235-242.
- Yang, Y., Wang, L., Yin, J., Wang, X., Cheng, S., Lang, X., Qu, H., Sun, C., Wang, J. & Zhang, R. (2011). *Molecular immunology* **49**, 175-184.
- Yao, Y., Yonezawa, A., Yoshimatsu, H., Masuda, S., Katsura, T. & Inui, K. (2010). *The Journal of nutrition* **140**, 1220-1226.
- Yorita, K., Misaki, H., Palfey, B. A. & Massey, V. (2000). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 2480-2485.
- Zhang, J. H., Chung, T. D. & Oldenburg, K. R. (1999). *Journal of biomolecular screening* **4**, 67-73.
- Zhang, Y., Illarionov, B., Morgunova, E., Jin, G., Bacher, A., Fischer, M., Ladenstein, R. & Cushman, M. (2008). *The Journal of organic chemistry* **73**, 2715-2724.
- Zhang, Y., Jin, G., Illarionov, B., Bacher, A., Fischer, M. & Cushman, M. (2007). *The Journal of organic chemistry* **72**, 7176-7184.
- Zhao, Y., Bacher, A., Illarionov, B., Fischer, M., Georg, G., Ye, Q. Z., Fanwick, P. E., Franzblau, S. G., Wan, B. & Cushman, M. (2009). *The Journal of organic chemistry* **74**, 5297-5303.
- Zylberman, V., Craig, P. O., Klinke, S., Braden, B. C., Cauerhff, A. & Goldbaum, F. A. (2004). *The Journal of biological chemistry* **279**, 8093-8101.
- Zylberman, V., Klinke, S., Haase, I., Bacher, A., Fischer, M. & Goldbaum, F. A. (2006). *Journal of bacteriology* **188**, 6135-6142.