

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR

VIRGÍNIA CARLA DE ALMEIDA FALCÃO

**VALIDAÇÃO DA ENZIMA DI-HIDRONEOPTERINA ALDOLASE (EC 4.1.2.25) DE
Mycobacterium tuberculosis COMO UM ALVO MOLECULAR PARA O
DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE**

Porto Alegre

2017

VIRGÍNIA CARLA DE ALMEIDA FALCÃO

**VALIDAÇÃO DA ENZIMA DI-HIDRONEOPTERINA ALDOLASE (EC 4.1.2.25) DE
Mycobacterium tuberculosis COMO UM ALVO MOLECULAR PARA O
DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular da
Faculdade de Biociências da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Valim Bizarro

Porto Alegre

2017

VIRGÍNIA CARLA DE ALMEIDA FALCÃO

**VALIDAÇÃO DA ENZIMA DI-HIDRONEOPTERINA ALDOLASE (EC 4.1.2.25) DE
Mycobacterium tuberculosis COMO UM ALVO MOLECULAR PARA O
DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS ANTITUBERCULOSE**

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular da
Faculdade de Biociências da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: 30 de Março de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Diego Bonatto- UFRGS

Prof. Dr. Maurício Reis Bogo-PUCRS

Prof. Dr. Jeverson Frazzon-UFRGS

Porto Alegre

2017

Dedico esta tese aos meus pais Genilda e José
Jailton pelo total apoio tanto financeiro como emocional.

“Don’t be afraid of hard work. Nothing worthwhile comes easily. Don’t let others discourage you or tell you that you can’t do it”.

Gertrude B. Elion

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador professor Dr Cristiano Valim Bizarro pela orientação e por todos os ensinamentos que foram essenciais para a finalização deste trabalho e que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Professor Dr Diógenes Santiago Santos pela oportunidade de trabalhar no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional/Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (CPBMF/INCT-TB) e pela confiança e indispensável apoio ao longo destes anos.

Ao Professor Dr Luiz Augusto Basso pela disponibilidade em tirar dúvidas e pelos ensinamentos.

Ao Dr Vincent Delorme pelo estágio no Instituto Pasteur Korea e pelos ensinamentos.

Em especial agradeço aos queridos amigos Anne Drumond Villela, Kenia Pissinate, Valnês da Silva Rodrigues Junior, Zilpa Adriana Quitian pela amizade sincera, pela indispensável ajuda e especialmente por trilhar esse caminho nem sempre fácil juntos até a finalização deste trabalho.

Aos amigos e colegas do CPBMF e QUATRO G por todos os anos de convívio e compartilhamento de ruins e bons momentos.

Ao amigo Rogério Valim Trindade (in memoriam) pela valiosa ajuda na purificação das enzimas, desejo que esteja em paz, sempre vai deixar muitas saudades.

Ao Fr Gilberto Hickmann e familiares pelo apoio incondicional.

À FAPERGS/CAPES pela bolsa concedida durante o doutorado.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular-PUCRS

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização e finalização deste trabalho.

Meu sincero muito obrigado a todos.

RESUMO

A tuberculose (TB) tornou-se a principal causa mundial de morte por doenças infecciosas. Em 2015, de acordo com a OMS, surgiram 10,4 milhões de novos casos de tuberculose no mundo. Atualmente os tratamentos comumente utilizados não são eficientes contra as formas da doença resistentes aos fármacos anti-TB mais eficazes, sendo necessários fármacos com novos mecanismos de ação. A di-hidroneopterina aldolase de *Mycobacterium tuberculosis* (*MtDHNA/FolB*) é uma enzima da via do folato, codificada pelo gene *folB*, que apresenta características importantes que a tornam um potencial alvo para síntese de novos agentes antimicrobianos. Neste estudo, por meio de mutagênese sítio-direcionada, análises bioquímicas e experimentos de nocaute gênico, demonstramos que o gene *folB* é essencial para a sobrevivência de *Mtb*, e além disso provamos que essa essencialidade depende das atividades de aldolase/epimerase da proteína *MtFolB*. O gene do tipo selvagem (wt) e os mutantes pontuais K99A e Y54F foram clonados e expressos, e as proteínas recombinantes correspondentes foram purificadas e monitoradas para as atividades de aldolase, epimerase e oxigenase utilizando HPLC. Em contraste com a enzima *MtFolB* selvagem (wt), ambas as mutantes não apresentaram atividade de aldolase nem de epimerase nas condições testadas. A mutante Y54F manteve a atividade da oxigenase, enquanto que para a mutante K99A foi possível detectar a atividade de oxigenase apenas na presença de HP e GA como substratos. Os experimentos de nocaute mostraram que o gene *folB* é essencial para a sobrevivência de *Mtb* sob as condições testadas. Entretanto, diferentemente da cópia selvagem, quando as sequências que codificam os mutantes K99A ou Y54F foram utilizadas para complementação, não foram obtidas colônias viáveis, indicando que estes mutantes pontuais não poderiam resgatar as células após o nocaute do gene *folB*. Esses resultados indicam que as atividades de aldolase e/ou epimerase são cruciais para a sobrevivência de *Mtb*. A construção de cepas com fusão *folB*-GFP de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) que contêm a sequência do tipo selvagem do gene *folB* ou um mutante com o C-terminal deletado (*folB* Δ C), desprovida da sequência supostamente necessária para a ancoragem da enzima dentro dos compartimentos de nanocargas, foram realizadas e juntamente com outros métodos de biologia celular descritos neste trabalho também poderão ser utilizados para um melhor entendimento das funções celulares apresentadas por *MtDHNA/FolB* e para validação dessa enzima como potencial alvo terapêutico.

Palavras-chave: Nocaute do gene *folB*. Mutagênese sítio-direcionada. Validação de alvo. Descoberta de fármacos. Fusão *folB*-GFP.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) has become the leading global cause of death from infectious diseases. In 2015, according to WHO, 10.4 million new cases of tuberculosis worldwide have emerged. Currently the commonly used treatments are not effective against the forms of disease resistant to the most effective anti-TB drugs, and drugs with new mechanisms of action are needed. *Mycobacterium tuberculosis* dihydroneopterin aldolase (*MtDHNA* /FolB) is a folate enzyme encoded by the *folB* gene, which has important properties that make it a potential target for the synthesis of new antimicrobial agents. As a first step for target validation in the antimicrobial drug development pipeline, it is important to prove that the gene encoding a putative target is essential for pathogen's viability. In this study, using site directed mutagenesis, biochemical analyzes and gene knockout experiments, we demonstrated that the *folB* gene is essential for the survival of Mtb, and furthermore we prove that this essentiality depends on the aldolase/epimerase activities of the *MtFolB* protein. The wild-type gene (wt) and the point mutants K99A and Y54F were cloned and expressed, and the corresponding recombinant proteins were purified and monitored for the activities of aldolase, epimerase and oxygenase using HPLC. In contrast to the wild-type *MtFolB* (wt) enzyme, both mutants had neither aldolase nor epimerase activities under the conditions tested. The Y54F mutant maintained oxygenase activity, whereas for the K99A mutant it was possible to detect oxygenase activity only in the presence of HP and GA as substrates. Knockout experiments showed that the *folB* gene is essential for the survival of Mtb under the conditions tested. However, unlike the wild-type copy, when the sequences encoding the K99A or Y54F mutants were used for complementation, no viable colonies were obtained, indicating that these point mutants could not rescue the cells after the *folB* knockout. These results indicate that aldolase and/or epimerase activities are crucial for the survival of Mtb. The construction of *Mycobacterium tuberculosis folB*-GFP fusion (Mtb) strains containing wild-type *folB* gene sequence or a deleted C-terminal mutant (*folB* Δ C), devoid of the sequence presumably necessary for anchoring the enzyme within nanocage compartments, were performed and together with other cell biology methods described in this work will be used for a better understanding of *MtDHNA*/FolB cellular functions and for the validation of this enzyme as a therapeutic target.

Keywords: *FolB* gene knockout. Site-directed mutagenesis. Target validation. Drug discovery. *folB*-GFP fusion.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADCL, 4-amino-4-deoxicorismato liase
- ADCS, 4-amino-4-deoxicorismato sintase
- AG, arabinogalactanos
- BCG, Bacille-Calmette-Guérin
- Can, canamicina
- Can^R, resistência a canamicina
- DHF, di-hidrofolato
- DHFR, di-hidrofolato redutase
- DHFS, di-hidrofolato sintase
- DHMP, 7,8-di-hidromonapterina
- DHMTP, 7,8-di-hidromonapterina trifosfato
- DHNA, 7,8-di-hidroneopterinase aldolase
- DHNE, 7,8-di-hidroneopterinase epimerase
- DHNMP, 7,8-di-hidroneopterinase monofosfato
- DHNP, 7,8-di-hidroneopterinase
- DHNTTP, 7,8-di-hidroneopterinase trifosfato
- DHNTTPase, 7,8-di-hidroneopterinase trifosfatase
- DHNTPE, 7,8-di-hidroneopterinase trifosfato epimerase
- DHP, di-hidropteroato
- DHPP, 6-hidroximetil-7,8-di-hidropterinase pirofosfato
- DHPS, di-hidropteroato sintase
- DHS, di-hidropteroato sintase
- DNA, ácido desoxirribonucleico
- DOTS, Directly Observed Treatment Short Course Strategy

dTMP, desoxitimidina monofosfato

EcDHNA, *E. coli* di-hidroneopterina aldolase

FDA, Food and Drug Administration

FPGS, folilpoli- γ -glutamato sintase.

FR, folato redutase

GA, Glicolaldeído

GCHY-I, GTP ciclo-hidrolase

GFP, Green fluorescent protein

GTP, guanosina trifosfato

HIV, vírus da imunodeficiência humana

HP, 6-hidroximetil-7,8-di-hidropterina

HPO, 6-hidroximetil-pterina

HPPK, 6-hidroximetil-7,8-di-hidropterina pirofosfato quinase

IGRA, Interferon Gama Release Assay

ILTB, infecção latente da tuberculose

INH, isoniazida

IPTG, isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo

LB, Lysogeny Broth

LC-MS/MS, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

MDR-TB, tuberculose resistente a múltiplos fármacos

MP, Monapterina

MtDHNA, di-hidroneopterina aldolase de *Mycobacterium tuberculosis*

NP, Neopterina

OADC, complexo contendo ácido oleico, albumina, dextrose e catalase

PABA, ácido p-aminobenzóico

PCR, reação em cadeia da DNA polimerase

PG, peptidoglicanos

Pi, fosfato

PPD, derivado de proteína purificada (tuberculina)

PPi, pirofosfato

SaDHNA, di-hidroneopterina aldolase de *Staphylococcus aureus*

SDS-PAGE, eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes com dodecil sulfato de sódio

TB, tuberculose

TB-RR, TB resistente à rifampicina

TDR-TB, tuberculose totalmente resistente a fármacos

THF, tetra-hidrofolato

TXDR-TB, tuberculose extensivamente resistente a fármacos

WHO, Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estimativa da taxa de incidência de TB em 2015.....	15
Figura 2 - Porcentagem de novos casos de TB com MDR/RR-TB.....	16
Figura 3 - Micrografia eletrônica de varredura de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
Figura 4 - <i>Mycobacterium tuberculosis</i> em meio Middlebrook 7H10 agar.....	22
Figura 5 - Sítios e mecanismos de ação de agentes anti-TB.....	23
Figura 6 - Infecção por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
Figura 7 - Estrutura do folato.....	27
Figura 8 -Via de biossíntese do folato.....	28
Figura 9 - Estrutura cristalina da di-hidroneopterina aldolase de <i>Staphylococcus aureus</i> (SaDHNA)	29
Figura 10 - Atividade de di-hidroneopterina aldolase da proteína FolB.....	31
Figura 11 - Atividades de aldolase e epimerase da proteína FolB.....	32
Figura 12 - Interconexão das vias de biossíntese de tetra-hidrofolato (THF) e tetra- hidromonapterinas (THMPs).....	33
Figura 13 - Nanocompartimento <i>Thermotoga maritima</i>	58
Figura 14 - Mapa do plasmídeo pNIP48 que será utilizado para modificar a cepa parental.....	59
Figura 15 - Triagem dos plasmídeos recombinantes pNIP40:: <i>folB</i> Δ clivados com <i>XbaI</i>	61
Figura 16 - Esquemas de clonagens de <i>folB/folB</i> Δ C fusionados com GFP e subclonados no vetor pNIP40.....	64
Figura 17 - PCRs das sequências <i>folB /folB</i> Δ C e GFP.....	65
Figura 18 - PCRs das fusões <i>folB/folB</i> Δ C com GFP.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estruturas químicas dos fármacos de primeira linha anti-TB	17
Tabela 2- Fármacos de primeira e segunda linha recomendados para o tratamento de RR-TB e MDR-TB (Classificação da OMS)	18
Tabela 3- Projeção de primers para inserção de <i>folB/foIBΔC</i> no pNIP48-GFP	62
Tabela 4- Projeção de primers utilizados nas construções <i>folB/foIBΔC</i> fusionados com GFP e subclonados no vetor pNIP40	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Tuberculose: epidemiologia, tratamento e resistência	14
1.1.1 Agente etiológico	21
1.1.2 Infecção	23
1.2 Avaliação da essencialidade na validação do alvo	25
1.3 As enzimas da via de biossíntese do folato como alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos	26
1.4 Proteína FolB (DHNA/FolB)	29
1.5 Atividades enzimáticas de FolB	30
1.6 Inibidores de DHNA/FolB	33
2 JUSTIFICATIVA	35
3 OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4 RESULTADOS	38
4.1 Manuscrito publicado no periódico Biophysical Research Communications	39
4.2 Desenvolvimento e aplicação de métodos necessários para um ensaio fenotípico utilizando fluorescência confocal automatizada para validação da enzima di-hidroneopterina aldolase como potencial alvo terapêutico.....	57
4.2.1 Proteína FolB e a resposta ao estresse oxidativo.....	57
4.2.2 Construções de cepas de expressão-GFP	58
4.2.3 Construção da cepa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv nocaute para o gene <i>folB</i> complementado com uma cópia extra do gene <i>folB</i> sem a extensão C- terminal.....	59
4.2.4 Amplificação <i>folB/folBΔC</i> e clonagem no vetor pNIP48 para coexpressão	61
4.2.5 Clonagem do gene <i>folB /folBΔC</i> fusionado com GFP e subclonado no vetor pNIP40.....	61
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose: epidemiologia, tratamento e resistência

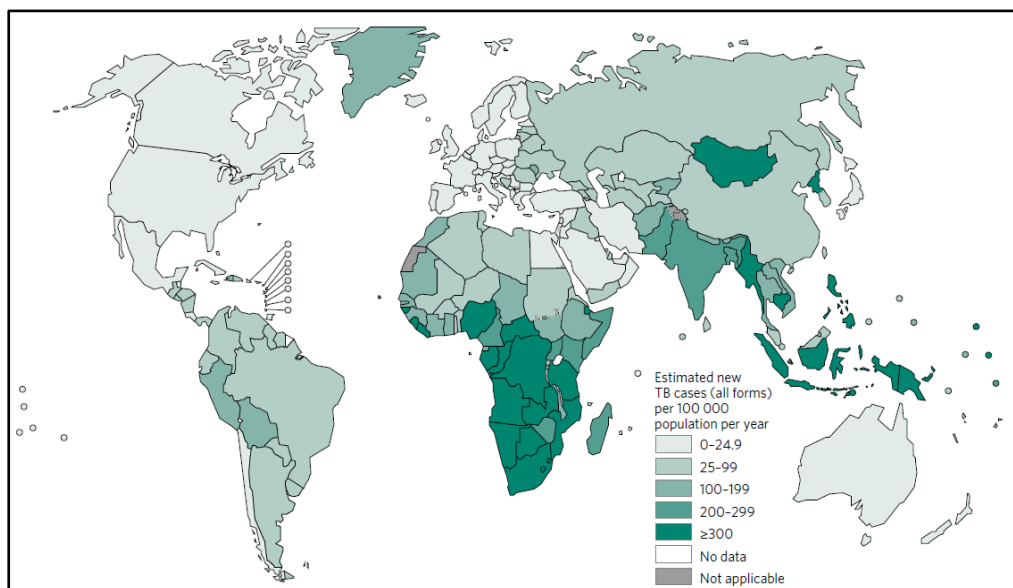
A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa cujo principal agente etiológico é a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), descoberta por Robert Koch em 1882 (1-3). O bacilo é geralmente transmitido através do ar pela tosse de pessoas infectadas com TB pulmonar. A probabilidade de desenvolver TB é mais comum em pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (4). A TB tornou-se a primeira causa de morte por doenças infecciosas em todo o mundo, colocando em segundo lugar a síndrome da imunodeficiência humana (HIV) (4). As últimas estimativas da OMS indicam o surgimento de 10,4 milhões de novos casos de tuberculose em 2015 no mundo, sendo que 1,2 milhões desse total representam pessoas que vivem com HIV (4). Esse panorama mostra as proporções de pandemia da TB e as razões de ela ser considerada um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (5). Em meados de 1993, a tuberculose foi considerada pela OMS um problema emergencial de saúde pública global, mas desde 1990 diversos esforços foram empregados pela OMS para controlar a TB tanto em nível nacional como internacional. Por conta disso, foi desenvolvida a estratégia de tratamento diretamente supervisionado de curta duração (DOTS), que é dividida em cinco passos específicos: (I) compromisso político, (II) diagnóstico através da baciloscopia, (III) fornecimento regular de fármacos anti-TB de primeira linha, (IV) quimioterapia de curta duração e (V) o estabelecimento de um sistema padrão para gravar e relatar o número de casos detectados por programas nacionais de controle da TB. Essa estratégia foi adotada entre 1994-2005 por vários países e obteve resultados importantes no combate à TB (6).

Outra estratégia desenvolvida pela OMS com o intuito de fortalecer a estratégia anterior (DOTS) foi denominada “Stop-TB”, que durou entre 2006 e 2015 e tinha como objetivos alcançar o acesso universal a cuidados de alta qualidade para todas as pessoas com TB, reduzir o sofrimento humano e a carga socioeconômica associada à TB, proteger as populações vulneráveis de TB, TB/HIV e TB resistentes a fármacos, apoiar o desenvolvimento de novas ferramentas e facilitar o seu uso efetivo e oportuno, proteger e, por fim, promover os direitos humanos na prevenção, cuidados e controle de TB (7). Após 2015, uma nova estratégia global de combate à tuberculose foi desenvolvida e denominada “End TB”. Essa estratégia consiste de três importantes pilares: (I) prevenção, cuidado integrado e centrado no paciente; (II) políticas

arrojadas e sistemas de apoio; e (III) intensificação da pesquisa e inovação (4). O grande sucesso e eficiência dessas estratégias foram importantes para reduzir a incidência de TB globalmente. Embora o número de mortes por TB tenha diminuído em 22% entre 2000 e 2015, a tuberculose continuou sendo uma das 10 principais causas de morte em todo o mundo em 2015, e a cada ano estima-se o surgimento de milhões de novos casos. A Índia, Indonésia, China, Nigéria, Paquistão e África do Sul responderam por 60% dos novos casos. Assim, grandes avanços são necessários na prevenção e cuidados de TB nesses países para acelerar o declínio global da doença. Entretanto, a taxa de declínio na incidência de tuberculose permaneceu em apenas 1,5% entre 2014 e 2015 no mundo. A nova estratégia pelo fim da TB (End TB) estima que seja necessária uma queda anual de 4-5% até 2020 para atingir os primeiros marcos estipulados (4).

De acordo com resultados apresentados em 2015 foram diagnosticados e registrados 63.189 novos casos de tuberculose no Brasil. A taxa de incidência no país foi de 38,7/100 mil habitantes em 2006 e de 30,9/100 mil habitantes em 2015. Aproximadamente 23.161 novos casos de tuberculose foram notificados nas capitais brasileiras, o que equivale a 36,6% do total do país. As capitais Manaus-AM (98,3/100 mil hab.), Porto Alegre-RS (88,8/100 mil hab.), Recife-PE (78,3/100 mil hab.) e Rio de Janeiro-RJ (66,8/100 mil hab.) apresentaram um elevado índice da doença e excederam o valor nacional (30,9/100 mil hab.) em mais de 100% (8). O panorama mundial, com as estimativas de taxas de incidência de TB em 2015 representadas por categorias, são apresentadas na Figura 1 (7).

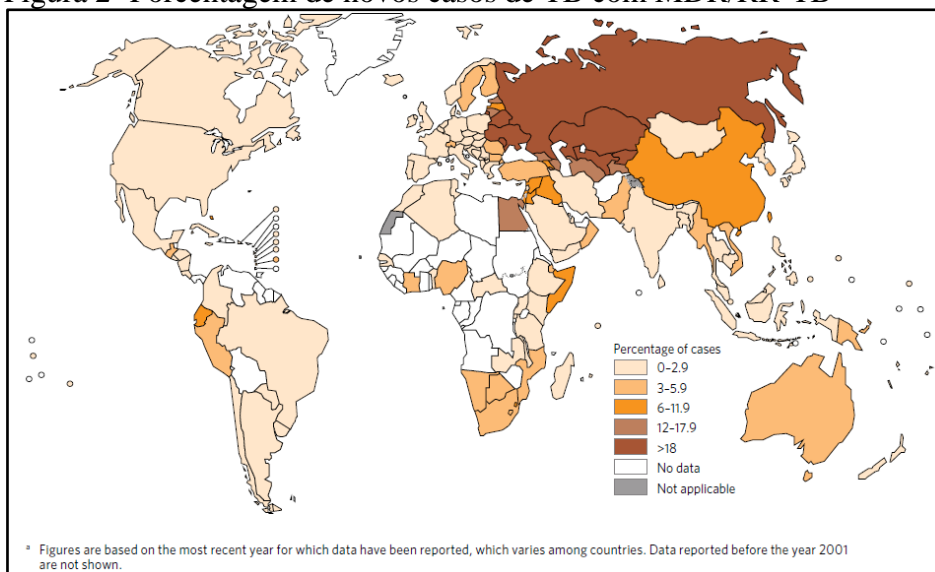
Figura 1- Estimativa da taxa de incidência de TB em 2015



Fonte: Organização Mundial da Saúde. WHO (2016).

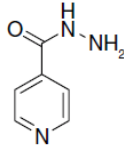
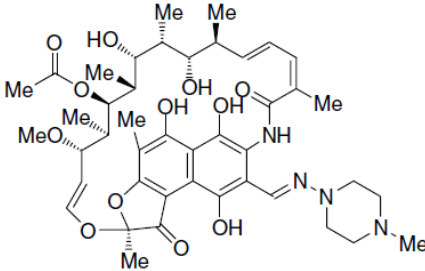
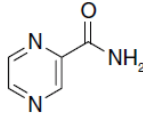
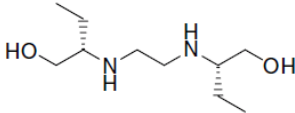
As estratégias da OMS ainda devem superar os maiores desafios do tratamento da TB: o surgimento de cepas resistentes aos fármacos anti-TB disponíveis; a baixa qualidade dos sistemas públicos de saúde; os elevados níveis de coinfeção com o HIV; e a falta de novos fármacos capazes de reduzir o tempo de tratamento. Outro problema é a existência de interações medicamentosas, o que impede a coadministração de alguns fármacos anti-TB com fármacos antirretrovirais utilizadas para tratar a AIDS, ou fármacos utilizados em doenças crônicas, como diabetes (9). Em 1940 foram desenvolvidos os primeiros tratamentos contra tuberculose (7). Atualmente o tratamento recomendado para novos casos de TB é a administração de fármacos chamados de primeira linha: isoniazida (INH), rifampicina, etambutol e pirazinamida por dois meses, seguidos por quatro meses de INH e rifampicina por um período de 6 meses (Tabela 1). O tratamento da TB resistente à rifampicina (TB-RR) e da TB multirresistente (MDR-TB) é mais longo e requer fármacos mais caros e tóxicos (4). Usualmente, o tratamento recomendado pela OMS para cepas resistentes tem duração de 20 meses. No entanto, em 2016, tendo por base novas evidências, a OMS divulgou um novo regime de tratamento, ou seja, atualmente é recomendado um período de tratamento mais curto para MDR-TB de 9-12 meses para todos os pacientes (excluindo mulheres grávidas) com MDR/RR-TB pulmonar que não sejam resistentes a fármacos de segunda linha (capreomicina, amicacina, canamicina) e fluoroquinolonas. Em 2015, foram estimados 480.000 novos casos de tuberculose multirresistente e mais 100.000 casos adicionais com tuberculose resistente à rifampicina (Figura 2) (4). Atualmente a OMS considera que os fármacos mostrados nas Tabelas 1 e 2 têm um papel importante no tratamento de MDR-TB sob determinadas condições.

Figura 2- Porcentagem de novos casos de TB com MDR/RR-TB



Fonte: Organização Mundial da Saúde WHO (4).

Tabela 1- Estruturas químicas dos fármacos de primeira linha anti-TB

Fármacos	Estrutura	Mecanismo de ação
Isoniazida		Parede celular (inibição da *InhA)
Rifampicina		RNA polimerase
Pyrazinamida		Múltiplos (incluindo acidificação intracelular, diminuição do ΔpH)
Etambutol		Parede celular (inibição da arabinosil transferase)

*InhA- NADH-dependente enoil-ACP redutase.

Fonte: Adaptado de Kaneko, Cooper e Mdluli (2011) (10).

A eficácia do tratamento com fármacos de primeira e segunda linha depende da adesão do paciente ao tratamento. No entanto, a grande maioria dos indivíduos infectados não adere ao tratamento devido a efeitos colaterais graves, complexidade de tratamento com grande número de diferentes fármacos e doses, e especialmente à duração prolongada (seis a doze meses, até dois anos, dependendo da cepa) (9). A principal consequência da baixa adesão e o regime de tratamento errôneo pelo paciente é a manutenção da doença no indivíduo infectado, o que resulta na transmissão contínua da doença e a propagação de cepas resistentes.

As formas multirresistentes de TB (MDR-TB) surgiram a partir de alguma infecção em organismos já resistentes aos fármacos anti-TB mais eficazes (isoniazida e rifampicina) ou durante o tratamento de algum paciente. Outra forma extensivamente resistente a fármacos (XDR-TB) é resistente tanto a fármacos de primeira linha (isoniazida e rifampicina) como de segunda linha injetáveis (amicacina, canamicina ou capreomicina) e a fluoroquinolonas (4). Porém a forma denominada totalmente resistente a fármacos (TDR-TB) é até o momento resistente a qualquer tipo de fármaco utilizado no tratamento da tuberculose (9,11,12).

Tabela 2- Fármacos de primeira e segunda linha recomendados para o tratamento de RR-TB e MDR-TB (Classificação da OMS)

Classes	Mecanismos de ação	Fármacos
Grupo A: fluoroquinolonas		
Fluoroquinolonas	Inibição da DNA Girase	Levofloxacina Moxifloxacina Gatofloxacina
Grupo B: Segunda linha - agentes injetáveis		
Aminoglicosídeos	Inibição da síntese de proteínas	Amicacina Capreomicina Canamicina (estreptomicina)*
Grupo C: Outros agentes de segunda linha		
Tioamidas	Inibição da síntese da parede celular	Etionamida Protionamida
		Ciclosserina

Oxazolidinonas	Inibição da síntese de proteínas	Terizidona Linezolida Clofazimina
----------------	----------------------------------	---

Grupo D. Agentes complementares

D1, várias classes: Hidrazida do ácido isonicotínico (elevada dose de isoniazida); análogos da nicotinamida (pirazinamida); Aminoalcol (etambutol)	Inibição da síntese dos ácidos micólicos	Elevadas doses de isoniazida
	Disrupção de membranas do plasma	Pirazinamida
	Inibição da síntese da parede celular	Etambutol
D2, várias classes: diarilquinolina (bedaquilina); nitro-di-hidroimidazooxale (delamanida)	Inibição de ATP sintase Mitocondrial	Bedaquilina
	Inibição da síntese de ácidos micólicos	Delamanida
D3, várias classes: amino-fenol (ácido para-aminossalicílico); carbapenemos; tiosemicarbazonas (tioacetazona)	Inibição do precursor da síntese de DNA	Ácido p-aminossalicílico
	Inibição da síntese dos peptoglicanos	Imipenem mais Cilastatina ou Meropenem mais Clavulanato (Disponível oralmente com Amoxicilina)
	Inibição da síntese de ácidos micólicos	Tioacetazona

*Estreptomicina pode ser utilizada quando o isolado é suscetível e nenhum dos outros fármacos injetáveis estão disponíveis.

Fonte: Adaptado WHO (2016) (13).

Recentes avanços no tratamento de TB incluem a aprovação pelas agências reguladoras de novos fármacos chamados de bedaquilina e delamanida. Nos Estados Unidos, o FDA (Food and Drug Administration) acelerou a aprovação da bedaquilina para uso combinado no tratamento de adultos com MDR-TB, quando terapias alternativas não estão disponíveis (Provisional CDC guidelines). A combinação destes dois novos fármacos com fármacos anti-TB existentes pode levar a regimes de tratamento mais toleráveis e mais curtos, com menos interações fármaco-fármaco, quando comparados aos regimes existentes (14). Embora já aprovado para usos específicos, ambos os fármacos ainda estão em ensaios clínicos, uma vez que são necessários mais estudos. Portanto, apesar da terapia de fármacos disponíveis e a profilaxia da vacina *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), que é utilizada mundialmente na prevenção da TB, principalmente em crianças pequenas, há ainda a necessidade de pesquisa para desenvolver novas vacinas e novos agentes anti-TB, em uma tentativa de reduzir a incidência global da doença até 2035 (15). A longa duração do tratamento é um fator primordial no surgimento de cepas multirresistentes a fármacos, que por sua vez contribuem para o aumento da incidência da TB no mundo. Portanto a identificação de novas vias requeridas no crescimento micobacteriano são extremamente necessárias na busca de novos alvos para o desenvolvimento de fármacos mais eficientes. O sequenciamento completo de genomas e a análise da estrutura de proteínas em grande escala proporcionaram o desenvolvimento de novas estratégias para a descoberta de alvos para produção de fármacos (16).

Novos agentes anti-infecciosos têm sido necessários para conter a resistência microbiana contra os antibióticos comumente utilizados. Nesse contexto, a via de biossíntese do folato destaca-se como uma via promissora para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (17). O primeiro agente antifolato sintetizado foi o ácido para-aminossalicílico (PAS) que é um análogo estrutural ao ácido p-aminobenzóico (PABA) da via de biossíntese de folatos. O PAS atua na inibição da di-hidropteroato sintase (DHPS) em *Mycobacterium tuberculosis*, bloqueando seu crescimento com os produtos de seu metabolismo (18). As enzimas da via do folato di-hidropteroato sintase (DHPS) e di-hidrofolato redutase (DHFR) são os alvos para os fármacos sulfa e trimetoprim, respectivamente, que são utilizados para tratar doenças como a malária, pneumocystis pneumonia (PCP), entre outras (19).

Em *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), a identificação de diversas estruturas de proteínas e o desenvolvimento de novas técnicas de mutagênese podem produzir informações importantes na elucidação da biologia celular deste organismo (20).

Além da di-hidropteroato sintase (DHS) e di-hidrofolato redutase (DHFR), outras enzimas da via do folato também são alvos potenciais que devem ser mais bem exploradas (17).

A necessidade de desenvolvimento de novos fármacos aumentou não só devido ao surgimento e propagação da resistência aos agentes antimicrobianos, mas também ao fato de que muitos dos novos antibióticos utilizados são modificações de estruturas químicas de fármacos existentes. Diversos estudos têm mostrado que a di-hidroneopterina aldolase (DHNA), que é uma enzima da via do folato, apresenta características importantes que a tornam um alvo em potencial para síntese de novos agentes antimicrobianos (21).

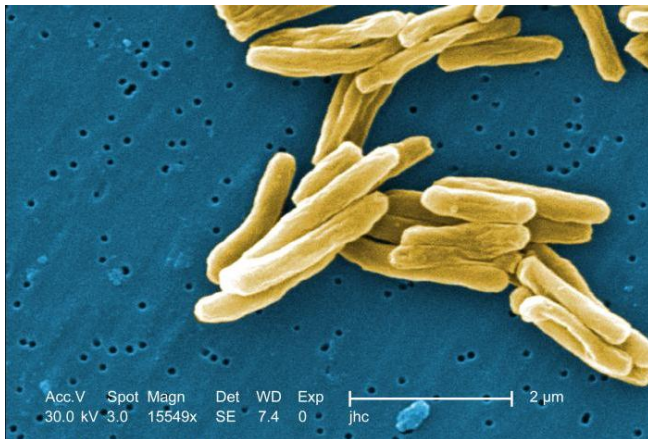
1.1.1 Agente etiológico

Mycobacterium tuberculosis, o principal agente causador da tuberculose (TB) em humanos, é uma espécie do gênero *Mycobacterium* pertencente ao complexo *M. tuberculosis* (MTBC), que inclui outras espécies patogênicas, principalmente *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG), *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium pinnipedii* e *Mycobacterium caprae* (22-24).

O gênero *Mycobacterium* abrange uma série de bactérias Gram-positivas aeróbicas e é o único membro da família *Mycobacteriaceae* na ordem *Actinomycetales* (Figura 3). O gênero geralmente tem um alto conteúdo de guanina e citosina (62-70%) e se caracteriza pela produção de ácidos micólicos, característica também presente nos gêneros *Nocardia* e *Corynebacterium*, dentro de *Actinomycetales* (25). As micobactérias são actinomicetos aeróbios imóveis, álcool-ácido resistentes (BAAR). As colônias são secas e ásperas e às vezes têm uma superfície nodular ou enrugada (Figura 4). O *M. tuberculosis* não forma esporos, mas tem a capacidade de permanecer latente, ou seja, em um estado de não replicação caracterizado por baixa atividade metabólica e resistência fenotípica à fármacos. *M. tuberculosis* pode ser visualizado pela coloração Ziehl-Neelsen (ácido-rápido) e é visto como um bacilo vermelho em forma de bastão. As micobactérias apresentam um elevado teor de lipídios complexos na parede celular que impede o acesso de corantes. Por isso o método Gram não pode ser utilizado nesse caso, sendo necessário a utilização de outros procedimentos especiais (por exemplo, coloração com Ziehl-Neelsen (26). Em relação ao crescimento quando comparado a outras bactérias, o crescimento da maioria das espécies de micobactérias é lento, com tempos de geração de 15-20 horas (*M. ulcerans* 36 h) em meios comumente usados, ou seja, o meio MTB Middlebrook, que é um meio à base de ágar, e meio Lowenstein-Jensen, que é um meio à base de ovo (26-27). O processo de divisão celular representa um desafio para as micobactérias por conta da complexidade da parede celular que exige mecanismos especializados para permitir que a

divisão celular ocorra. A síntese da parede celular precisa ser coordenada evitando desagregação dos seus componentes mantendo a integridade ao longo da divisão. Finalmente, a divisão celular precisa também ser regulada em resposta a estímulos ambientais (22). A parede celular micobacteriana possui características únicas, sendo a impermeabilidade a uma série de compostos em parte responsável pela resistência inerente do bacilo a diversos fármacos (Figura 5).

Figura 3- Micrografia eletrônica de varredura de *Mycobacterium tuberculosis*



Aumento: 15549X.

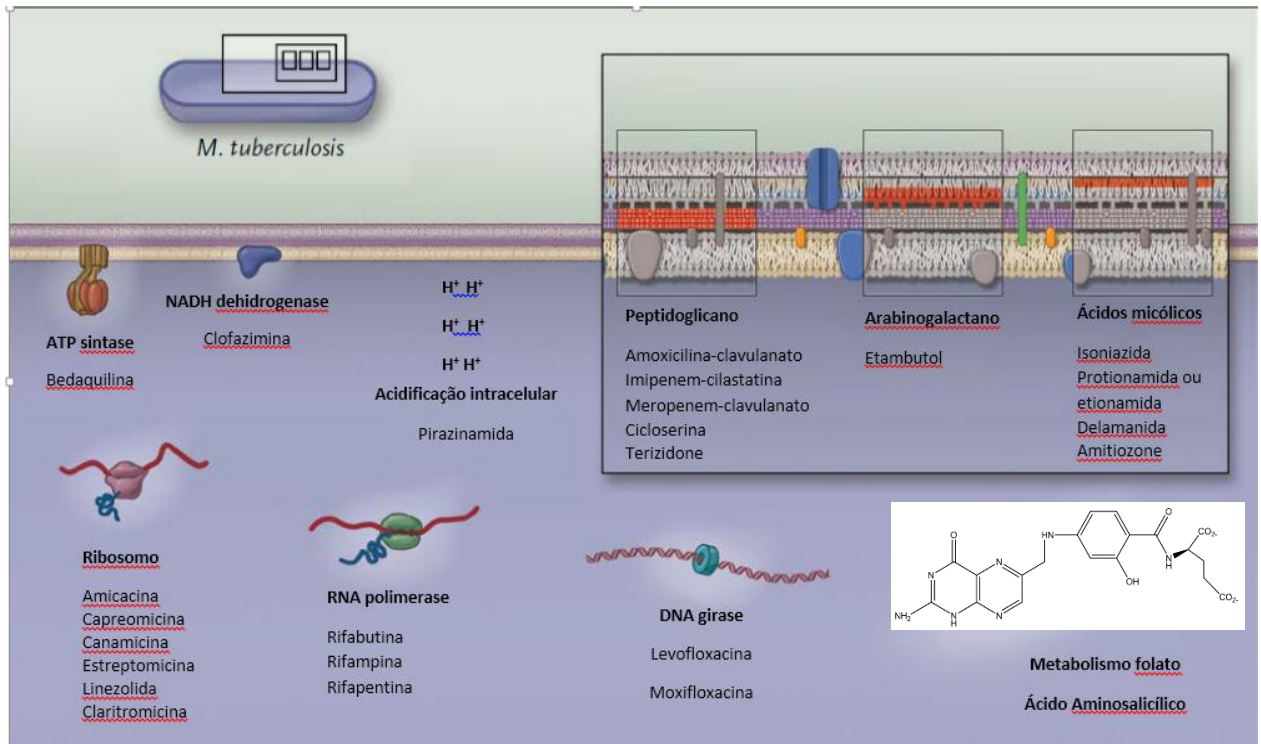
Fonte: Extraído do Center of Disease Control (CDC) (28).

Figura 4- *Mycobacterium tuberculosis* em meio Middlebrook 7H10 agar



Fonte: Pfyffer G. (2015) (26).

Figura 5- Sítios e mecanismos de ação de agentes anti-TB



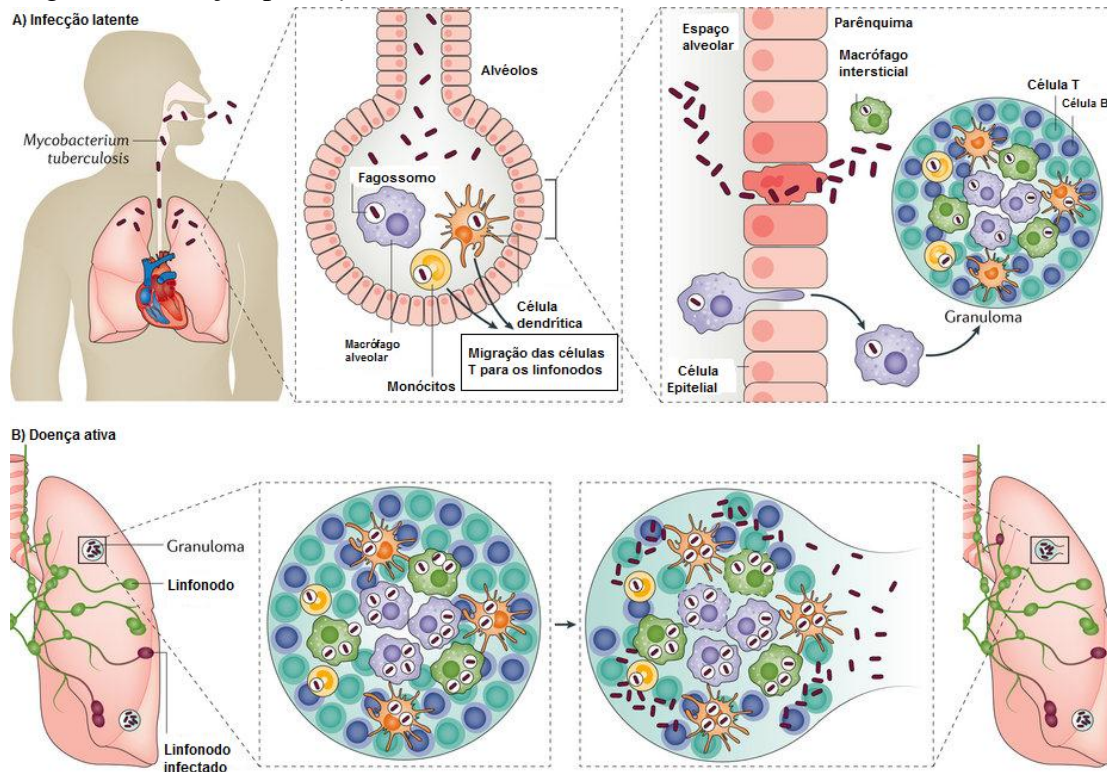
Fonte: Adaptado de Horsburgh et al. (2015) (33).

1.1.2 Infecção

Os seres humanos são infectados com *M. tuberculosis* (Mtb) através da inalação de minúsculas gotículas de aerossóis que transportam um pequeno número de bactérias (29). No diagnóstico de Mtb os procedimentos mais realizados são a radiografia do tórax, a detecção pelo escarro e o teste cutâneo da tuberculina, conhecido também como derivado de proteína purificada (PPD) ou teste de Mantoux. No entanto, na última década, foram desenvolvidos os ensaios de liberação de interferon-gama (IGRA) utilizados para diagnosticar a TB latente (30). A infecção por Mtb pode ser vista como dinâmica e contínua. Os pacientes podem ser categorizados como tendo infecção latente da tuberculose (ILTb) ou doença de TB ativa. Dependendo da exposição ao Mtb, o patógeno pode ser eliminado ou persistir no organismo do hospedeiro. Os pacientes com doença de TB ativa podem apresentar sintomas como tosse, febre e perda de peso, e o diagnóstico geralmente pode ser confirmado com esfregaço de escarro, cultura e testes moleculares. A infecção é iniciada quando o Mtb atinge os pulmões por meio da inalação e chega ao espaço alveolar encontrando macrófagos alveolares residentes. No entanto, se as células de defesa de primeira linha falharem na eliminação das bactérias, o Mtb pode invadir o tecido intersticial pulmonar de dois modos distintos, ou seja, infectando

diretamente o epitélio alveolar ou também infectando os macrófagos alveolares que migram até o parênquima pulmonar. As células dendríticas ou monócitos inflamatórios transportam Mtb para linfonodos pulmonares para iniciação de células T. Nesse momento ocorre o recrutamento de células imunes, incluindo células T e B, para o parênquima pulmonar para a formação do granuloma (Figura 6 a). As bactérias replicam dentro do granuloma em crescimento. Se a carga bacteriana for excessiva, o granuloma não conseguirá conter a infecção e as bactérias serão liberadas e disseminarão eventualmente para outros órgãos, incluindo o cérebro. Nesta fase, as bactérias podem entrar na corrente sanguínea ou reentrar no trato respiratório, assim o hospedeiro infectado torna-se infeccioso sintomático e agora o paciente tem a doença na forma ativa. (Figura 6 b) (15). O risco de progressão da infecção por Mtb para a doença na forma ativa também pode ser aumentado pela infecção com HIV. A coinfeção TB-HIV pode reduzir drasticamente o número de células T $CD4^+$. As células T $CD4^+$, assim como citocinas IL-12, IFN- γ e TNF desempenham um papel crítico no sistema imunológico atuando no controle da infecção por Mtb. Fatores genéticos do hospedeiro e do patógeno também podem aumentar o risco de desenvolvimento da doença ativa (31-32).

Figura 6- Infecção por *Mycobacterium tuberculosis*



Fonte: Adaptado de Pai, M. et al. (2016) (15).

1.2 Avaliação da essencialidade na validação do alvo

A escolha de alvos moleculares adequados é fundamental em qualquer programa de descoberta de fármacos baseados em alvo. Idealmente, os agentes terapêuticos desenvolvidos para o tratamento de doenças infecciosas devem ser capazes de matar o patógeno, sem serem tóxicos para o hospedeiro. Portanto, as enzimas de vias metabólicas essenciais para a sobrevivência bacteriana e ausentes na célula hospedeira são candidatos atrativos para alvos de fármacos. A essencialidade de um gene alvo pode ser acessada por meio do nocaute desse gene e avaliação da capacidade da célula em sobreviver na sua ausência, em condições ambientais definidas. Tradicionalmente, devido à baixa eficiência de transformação, alto nível de recombinação ilegítima, e necessidade de nível de biossegurança 3, *Mtb* tem sido considerado um organismo difícil de ser analisado geneticamente (34-35). De fato, a aplicação de ferramentas experimentais para estudar a função de genes em bacilos *Mtb* ficou para trás quando comparada a sistemas-modelo, tais como *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. No entanto, muitos avanços foram feitos para contornar essas limitações e hoje em dia temos um arsenal de diferentes ferramentas disponíveis para estudar a genética de micobactérias (36-38). Geralmente, a fim de produzir mutantes nocautes, o alelo do tipo selvagem é trocado por um alelo nulo, usando para tanto a maquinaria de recombinação homóloga da célula hospedeira. Sequências *upstream* e *downstream* que flanqueiam o gene alvo são clonadas em um plasmídeo e é inserido um marcador de resistência a antibiótico entre as sequências flaqueadoras. Mutantes de troca alélica são selecionados pelo seu fenótipo de resistência a antibiótico. A obtenção dos nocautes gênicos é confirmada em diferentes níveis (DNA, RNA, proteína) utilizando técnicas como Southern blot, PCR, RT-PCR e Western blot (39).

A abordagem genética para avaliar essencialidade no contexto de validação do alvo assume que o nocaute gênico ou knockdown de um gene alvo é um substituto válido para os efeitos esperados de um inibidor atuando sobre uma proteína alvo correspondente in vivo. Em muitos casos, no entanto, uma mutação genética e um pequeno inibidor podem perturbar as atividades celulares de uma proteína alvo de diferentes maneiras (40). Essas discrepâncias podem estar relacionadas com as diversas funções exibidas pelas proteínas dentro da célula. Como um exemplo, sete genes de *Bacillus subtilis* que codificam enzimas glicolíticas foram identificadas como essenciais em condições de crescimento (meio complexo de crescimento), nas quais não se espera que a glicólise e tampouco a gliconeogênese sejam necessárias (41). Esses resultados sugeriram que as enzimas glicolíticas poderiam desempenhar papéis essenciais

não relacionados com as suas atividades enzimáticas, que motivaram estudos subsequentes que forneceram evidências do envolvimento dessas proteínas em processos de estabilidade de RNA (42). Presumivelmente, uma pequena molécula capaz de inibir a atividade dessas enzimas na glicólise e/ou na gliconeogênese não teria nenhum efeito sobre a função biológica que confere a essencialidade para os genes correspondentes. Portanto, no contexto da validação de alvos, é importante assegurar que a essencialidade de um gene particular é dependente da atividade enzimática do produto gênico que pretendemos inibir quimicamente.

1.3 As enzimas da via de biossíntese do folato como alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos

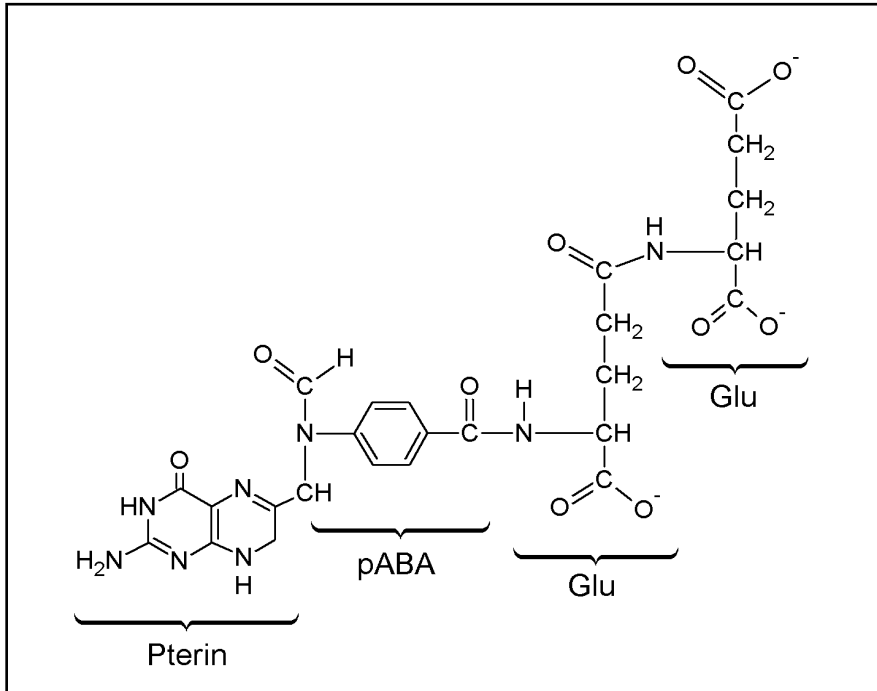
O folato é uma vitamina B essencial solúvel em água encontrada naturalmente em alimentos (43) e tem sido reconhecido desde 1940 como importante cofator no metabolismo de unidades monocarbonadas, sendo essencial no metabolismo de processos metabólicos e celulares, como a síntese de DNA, metilação, entre outros. A descoberta do folato como cofator metabólico foi seguida pelo desenvolvimento de análogos de folato e antifolatos que podem ser efetivos agentes antimicrobianos e antineoplásicos (44).

O folato e seus derivados atuam como cofatores em várias reações enzimáticas que envolvem a transferência de unidades monocarbonadas (Figura 7). Eles estão envolvidos em uma variedade de processos metabólicos, tais como a biossíntese de purinas e pirimidinas (timidilato sintase), glicina, metionina e pantotenato, em quase todas as células vivas. No entanto, os organismos obtêm folato de diferentes maneiras. Enquanto os mamíferos obtêm folato da dieta, aproveitando-se de um sistema de transporte ativo por meio de proteínas de membrana, plantas e a maioria dos microorganismos sintetizam folatos *de novo*.

A presença da via de biossíntese do folato (Figura 8) em muitos patógenos e a sua ausência em humanos tornam as enzimas constituintes desta via alvos moleculares atraentes para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (46). Assim, sulfonamidas, que foram os primeiros antibióticos sintéticos amplamente utilizados a partir da década de 1930, agem como análogos do ácido para-aminobenzóico (pABA), intermediário da biossíntese do folato, inibindo a di-hidropteroato sintase (Figura 8, passo 8). Esses compostos foram utilizados no tratamento de infecções causadas por vários agentes patogênicos, incluindo *Mycobacterium leprae*, causador da hanseníase (19). Di-hidrofolato redutase (Figura 8, passo 10), é alvo do trimetoprim, que é uma diaminopirimidina amplamente utilizada como antibiótico. Esses

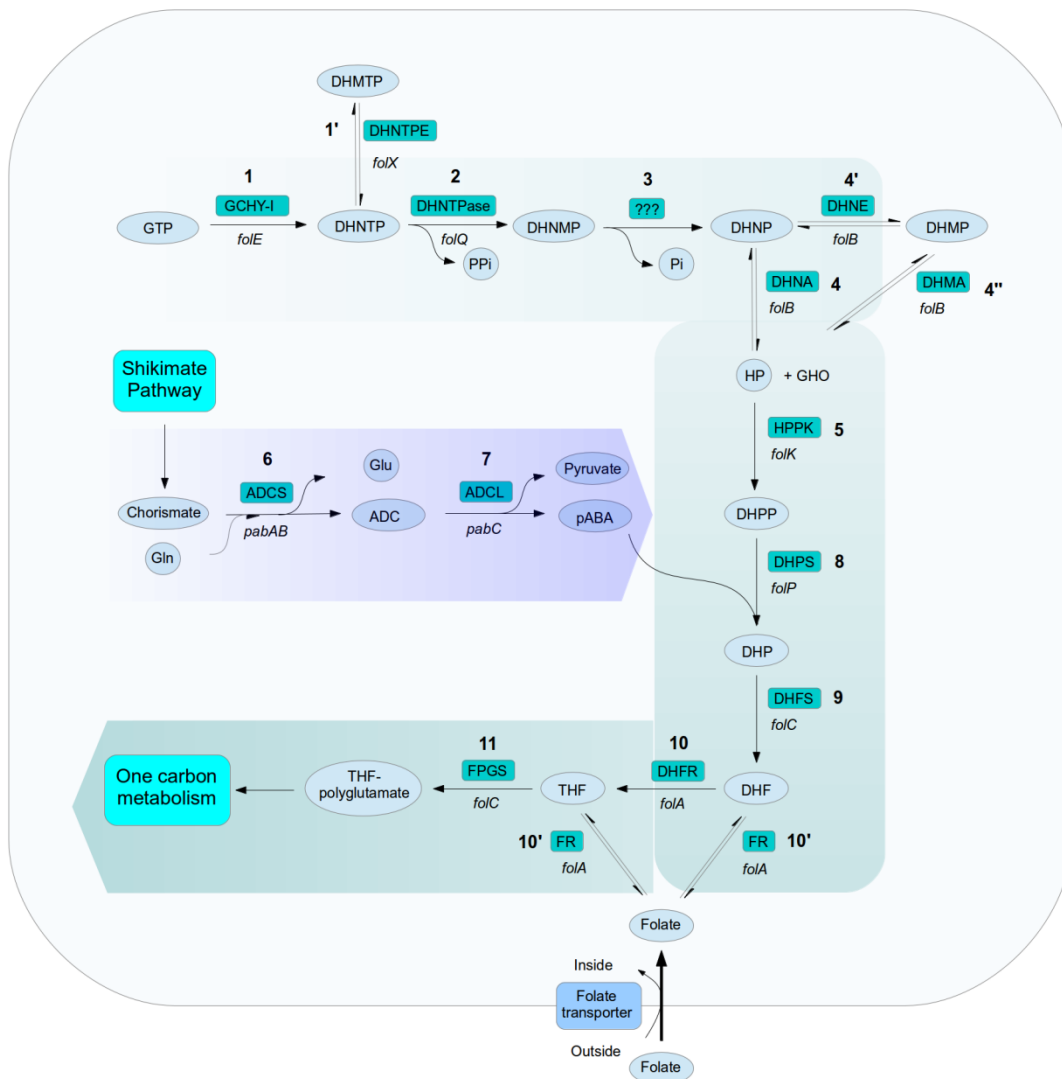
antibióticos foram utilizados isoladamente ou combinados, onde trimetoprim foi comumente associado com sulfametoxazol (uma sulfonamida). Esta associação, conhecida como cotrimoxazol, foi empregada com sucesso por bastante tempo devido ao efeito sinérgico desses dois fármacos, que atuam em diferentes passos da via da biossíntese do folato.

Figura 7- Estrutura do folato



pABA: ácido para-aminobenzoico; resíduos de Glu: Glutamato
 Fonte: Adaptado de Stover & Field (2011) (45).

Figura 8-Via de biossíntese do folato

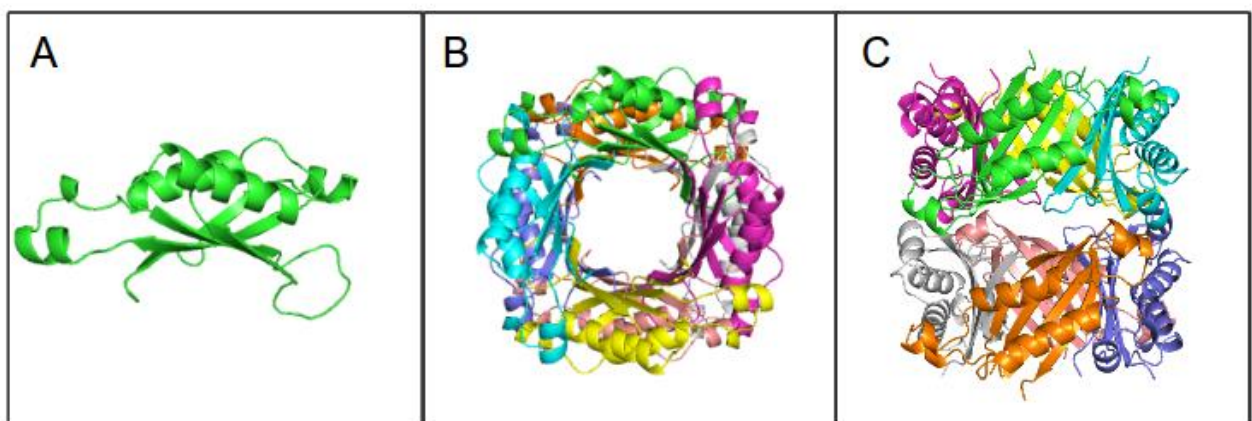


Os nomes dos genes estão em itálico. Nota-se que alguns produtos gênicos (codificados pelos genes *folA*, *folB* e *folC*) são responsáveis por mais de uma atividade enzimática na via de biossíntese do folato. Nenhuma enzima que remove o fosfato final do DHNTP (passo 3) foi identificada até o momento. O ramo do chiquimato está representado dentro de uma seta azul-claro enquanto que o ramo principal da pterina está representado com um fundo turquesa. **Substratos/produtos:** GTP, guanosina trifosfato; DHNTP, 7,8-di-hidroneopterina trifosfato; DHMTP, 7,8-di-hidromonapterina trifosfato; PPI, pirofosfato; DHNMP, 7,8-di-hidroneopterina monofosfato; Pi, fosfato; DHNP, 7,8-di-hidroneopterina; DHMP, 7,8-di-hidromonapterina; HP, 6-hidroxi-metil-7,8-di-hidropterina; DHPP, 6-hidroxi-metil-7,8-di-hidropterina pirofosfato; DHP, di-hidropteroato; DHF, di-hidrofolato; THF, tetra-hidrofolato. **Atividades enzimáticas:** (1) GCHY-I, GTP ciclo-hidrolase I; (1') DHNTPE, 7,8-di-hidroneopterina trifosfato epimerase; (2) DHNTase, 7,8-di-hidroneopterina trifosfatase; (4') DHNE, 7,8-di-hidroneopterina epimerase; (4) DHNA, 7,8-di-hidroneopterina aldolase, (5) HPPK, 6-hidroxi-metil-7,8-di-hidropterina pirofosfato quinase; (6) ADCS, 4-amino-4-deoxicorismato sintase; (7) ADCL, 4-amino-4-deoxicorismato liase; (8) DHPS, di-hidropteroato sintase; (9) DHFS, di-hidrofolato sintase; (10) DHFR, di-hidrofolato redutase; (10') FR, folato redutase; (11) FPGS, folilpoli- γ -glutamato sintase. Fonte: Elaborado por C. V. Bizarro (2016).

1.4 Proteína FolB (DHNA/FolB)

A proteína FolB de *M. tuberculosis* (*Mt*DHNA/FolB) é codificada pelo gene *folB* e foi verificada como tendo atividades de aldolase, epimerase e oxigenase. A proteína FolB é conservada entre as espécies bacterianas e nenhum homólogo foi identificado em mamíferos até o momento (49). A primeira estrutura cristalográfica de DHNA/FolB foi obtida para *Staphylococcus aureus* (*Sa*DHNA) (50). Descobriram que *Sa*DHNA é um octâmero de subunidades idênticas compostas por dois anéis tetraméricos montados numa orientação “head to head” (Figura 9). A fim de mapear o sítio ativo, o cristal foi embebido com o substrato DHNP. Uma densidade eletrônica compatível com o produto HP foi encontrada na interface de duas subunidades (50). O reconhecimento da pterina foi semelhante ao encontrado para a di-hidrofolato redutase e para a 6-piruvil tetra-hidropterina sintase, com um bolsão fundo e estreito com um resíduo negativamente carregado na sua base (Glu 74). Glu 22 e Lys 100, os quais são rigorosamente conservados em diferentes DHNAs, foram propostos para serem resíduos cataliticamente essenciais e uma forma mutante K100A foi desprovida da atividade de DHNA (50). As estruturas de DHNAs de *Arabidopsis thaliana* (51), *Mycobacterium tuberculosis* (49), e a enzima bifuncional DHNA/HPPK de *Streptococcus pneumoniae* (52) foram mais tarde resolvidas. A estrutura de DHNA de *Escherichia coli* também foi resolvida (PDB ID: 2O90), mas ainda não publicada.

Figura 9- Estrutura cristalina da di-hidroneopterina aldolase de *Staphylococcus aureus* (*Sa*DHNA)



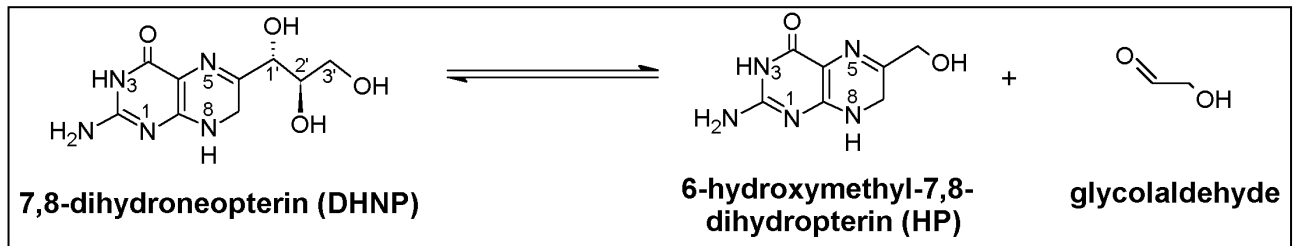
A. Monômero de *Sa*DHNA, mostrando um único domínio estrutural que compreende uma folha β antiparalela, duas longas α -hélices e dois curtos segmentos helicoidais. **B.** Octâmero de *Sa*DHNA, visto de cima. **C.** Octâmero de *Sa*DHNA, vista lateral. Nota-se que a estrutura é composta por dois tetrâmeros na orientação “head-to-head” formando um cilindro oco. Figura obtida utilizando Polyview-3D. Fonte: Adaptado de Porollo & Meller (2007) (53) (PDB ID:1DHN).

A DHNA de *A. thaliana* é também um homo-octâmero que assume a forma de um cilindro oco. A DHNA/HPPK bifuncional de *S. pneumoniae* também forma uma homo-octâmero. Nesta proteína, cada monômero compreende um domínio HPPK e um domínio DHNA. Curiosamente, os domínios DHNA de cada monômero montaram um cilindro oco topologicamente equivalente à estrutura oligomérica de DHNAs monofuncionais (52). A DHNA de *M. tuberculosis* (*MtDHNA/Folb*) foi cristalizada em um octâmero mas também em uma forma tetramérica (49). A forma octamérica foi obtida complexada com o produto HP da reação de aldolase, enquanto os tetrâmeros foram compostos de subunidades sob a forma apo. Propõe-se que o estado oligomérico de *MtDHNA* seja regulado alostericamente pela presença de DHNP (49). Blaszczyk et al. (21) relataram as estruturas de *SaDHNA* complexada com neopterina (NP) ou com monapterin (MP), que são análogos estruturais de DHNP ou DHMP, respectivamente.

1.5 Atividades enzimáticas de FolB

A proteína FolB foi caracterizada primeiramente como uma aldolase em *Escherichia coli* (54) que catalisa a conversão de 7,8-di-hidroneopterina a 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina glicolaldeído na via de biossíntese do folato (Figura 10). Com base no mecanismo catalítico apresentado, aldolases são agrupadas em duas classes diferentes. Aldolases de classe I requerem a formação de uma base de Schiff com uma lisina conservada no sítio ativo, a fim de ativar seus substratos doadores. Aldolases de classe II, por outro lado, ativam substratos doadores utilizando um cofator metálico (geralmente de Zn^{2+}) ligado por resíduos de histidina no sítio ativo da enzima (55). O DHNA/Folb (EC 4.1.2.25) é uma aldolase única, que não exige nem um íon de metal nem a formação de uma base de Schiff entre a enzima e o substrato para realizar a catálise (54). O mecanismo catalítico é semelhante ao das aldolases de classe I, no entanto a base de Schiff é incorporada no substrato (50).

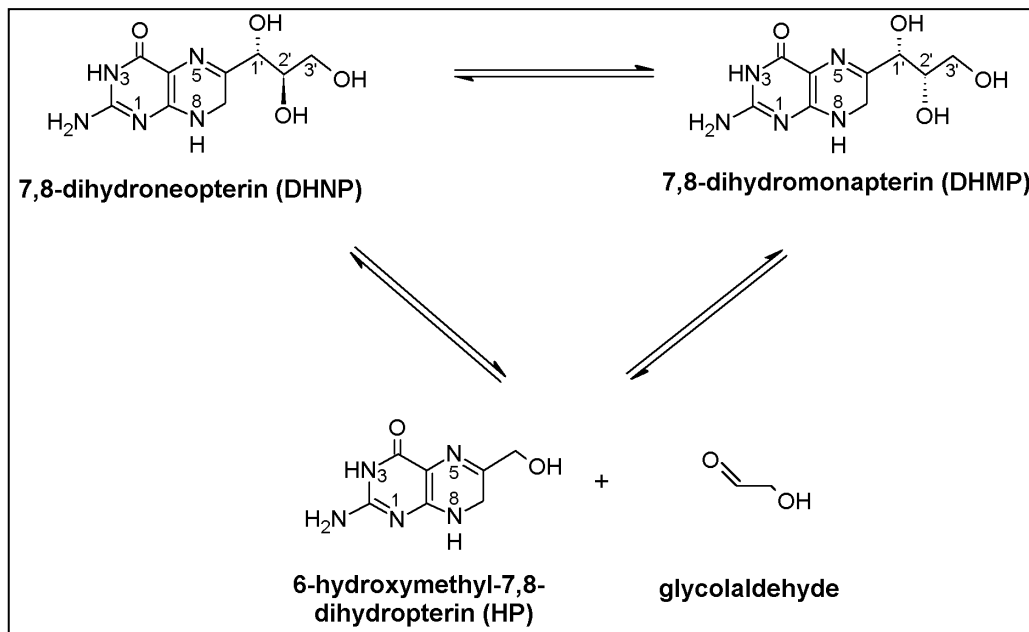
Figura 10- Atividade de di-hidroneopterina aldolase da proteína FolB



Fonte: Elaborado por C. V. Bizarro (2016).

A proteína FolB é também uma epimerase que catalisa a interconversão entre 7,8-dihidroneopterina (DHNP) e 7,8-di-hidromonapterina (DHMP). Apesar das semelhanças nas reações de epimerização catalisadas por ambas DHNA/FolB e L-ribulose-5-fosfato-4-epimerase, essas enzimas são estruturalmente distintas. Além disso, DHNA não compartilha qualquer identidade de sequência com outras epimerases. A DHNA é uma enzima única que possui ambas as atividades de epimerase e aldolase e também pode usar DHMP como substrato na reação de aldolase (Figura 11) (21). Além disso, *MtDHNA/FolB* também é uma oxigenase (56). As estruturas de *SaDHNA* com NP e com MP (21) ajudaram a elucidar como as reações de aldolase e epimerase de DHNA estão mecanicamente conectadas. Juntamente com os dados estruturais anteriores de *SaDHNA* complexada com HP ou na sua forma livre (50), os autores propuseram um mecanismo molecular detalhado que representa ambas as reações aldol e de epimerização catalisadas por DHNA/FolB (21). A estrutura do complexo *SaDHNA*·NP revelou interações entre o grupo 2'-hidroxil de NP e o grupo ε-amino de K100. A partir da mesma estrutura, mostrou-se que uma molécula de água estabelece ligações de hidrogênio com o átomo N5 de NP e com o resíduo de lisina K100. Propõe-se que DHNA/FolB tenha um mecanismo de catálise ácido-base geral em que a protonação de N5 é mediada pela água catalítica (ácido geral) coordenado por K100 e a desprotonação de 2'-hidroxil é mediada pelo próprio K100 (base geral). Um fio condutor de prótons conecta N5 e o 2'-hidroxil de DHNP através de K100, resultando na quebra da ligação C1'-C2' e na formação de um intermediário enólico. A reformação da ligação C-C na ausência de estereosseletividade resultaria na formação de DHNP ou DHMP. Um segundo fio de prótons, envolvendo novamente K100, mas também Y54' (a linha indica que o resíduo é proveniente da subunidade vizinha), é crítica para a formação de HP a partir do intermediário. Portanto, K100 é crítica para ambas as atividades de aldolase e epimerase, enquanto que Y54' parece ser essencial para a atividade de aldolase, mas não para a atividade de epimerase. Estudos de mutagênese tem confirmado em *SaDHNA* e também em *EcDHNA* (de *E. coli*) as funções catalíticas propostas para ambos os resíduos com base nas análises estruturais (57,58).

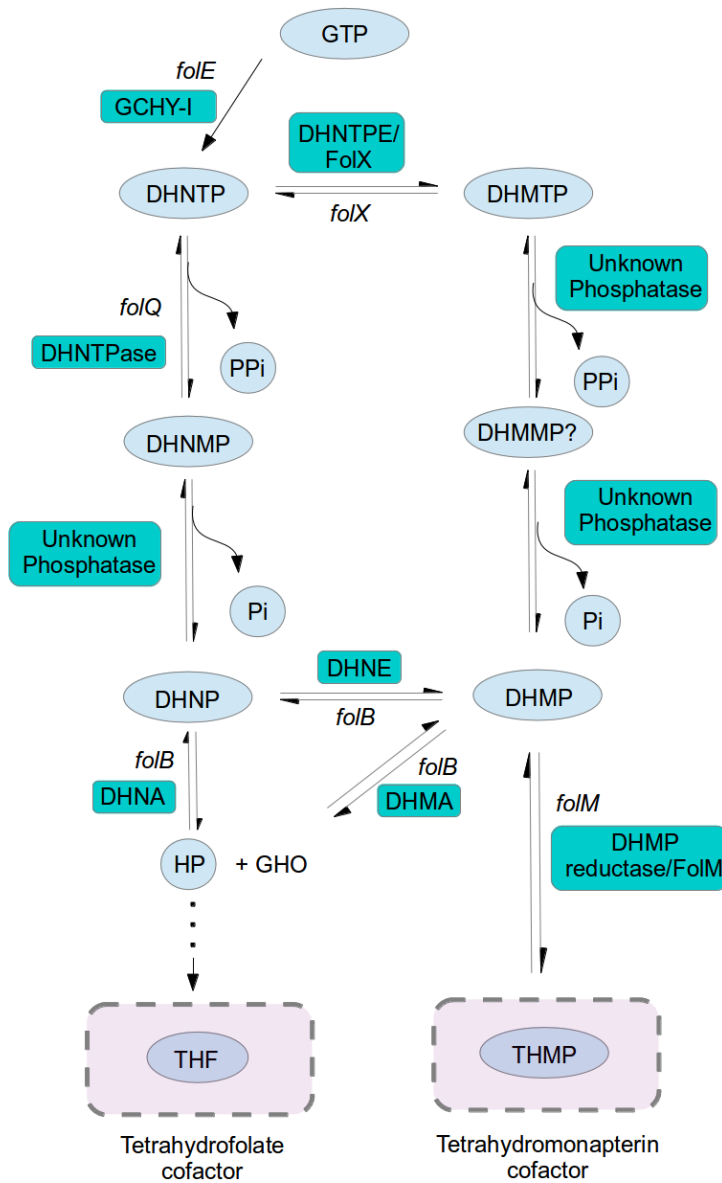
Figura 11- Atividades de aldolase e epimerase da proteína FolB



Fonte: Adaptado de Blaszczyk et al. (2007) (21).

O papel biológico de DHMP no metabolismo celular se houver, ainda não é conhecido. Em *E. coli* e em *Pseudomonas aeruginosa* as proteínas FolX e FolM são necessárias para a síntese de tetra-hidromonapterina (59). O produto do gene *folX* (Figura 12, passo 1') catalisa a conversão de di-hidroneopterina trifosfato (DHNTF) em di-hidromonapterina trifosfato (DHMTF). Sugere-se que FolM reduza DHMP a tetra-hidromonapterina (THMP) (59). Uma ou mais atividades das fosfatases ainda não caracterizadas seriam presumivelmente responsáveis pela produção de DHMP a partir de DHMTF nesses organismos (Figura 12). Curiosamente, THMP é o cofator fisiológico da fenilalanina hidroxilase, tanto em *E. coli* quanto em *P. aeruginosa*, e este composto excede o folato como um produto final na biossíntese de pterinas (59). Estes resultados estão de acordo com um estudo anterior que relata que a forma reduzida da monapterina, a (6R) 5,6,7,8-tetra-hidro-L-monapterina, é a principal tetra-hidropterina encontrada em *E. coli* (60). Não há nenhuma sequência anotada como *folX* em micobactérias. No entanto, a atividade de epimerase da *MtDHNA/FolB* poderia representar uma via alternativa para a biossíntese de tetra-hidromonapterinas (Figura 12). Mesmo que não tenham sequências anotadas como *folM* em genomas de micobactérias, algumas das sequências genericamente anotadas como "redutases" poderiam executar essa função.

Figura 12- Interconexão das vias de biossíntese de tetra-hidrofolato (THF) e tetra-hidromonapterinas (THMPs)



Fonte: Elaborado por C. V. Bizarro (2016).

1.6 Inibidores de DHNA/FolB

Potentes inibidores de DHNA/FolB foram descobertos usando a técnica de triagem por cristalografia de raio-X CrystaLEAD, seguida de otimização direcionada da estrutura (61). A triagem de uma biblioteca de 10.000 compostos para atividade inibitória permitiu a identificação de vários compostos-líder com valores de IC_{50} de cerca de 1 μ M contra

DHNA/FolB de *Staphylococcus aureus*. No entanto, nenhum dos compostos descritos no presente estudo inibiu o crescimento das bactérias, incluindo o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, entre outros. Isto pode ser devido ao fato de que os inibidores foram inativados por enzimas intracelulares ou através da ligação não específica de proteínas intracelulares, ou a membrana celular pode reduzir a concentração do inibidor disponível (61). Portanto, são necessários mais estudos, a fim de se obter fármacos anti-TB promissores que tenham *Mt*DHNA/FolB como alvo.

2 JUSTIFICATIVA

Embora existam aproximadamente 200 proteínas essenciais conservadas em bactérias, o número de alvos celulares atualmente explorados para o desenvolvimento de fármacos é muito pequeno. A maioria dos antibióticos geralmente utilizados atingem apenas três alvos ou vias: o ribossomo, síntese da parede celular e DNA girase/DNA topoisomerase (62). Portanto, a validação de novos alvos para a descoberta de fármacos é urgentemente necessária. Isto é particularmente verdadeiro no contexto da tuberculose com o aparecimento de cepas MDR, XDR e TDR.

A validação de um alvo é um passo crucial no processo de desenvolvimento de novos fármacos. O papel do alvo precisa ser bem definido na doença antes de iniciar a procura por novos fármacos. A grande maioria dos fármacos relatados na literatura são inibidores que impedem a ação de uma determinada proteína-alvo. Entretanto, também é importante considerar a relação entre a essencialidade do gene e uma função específica exibida pelo seu produto. A essencialidade é normalmente considerada necessária, mas não é suficiente para a validação de um alvo. Diante do crescente número de evidências de que as proteínas podem mostrar múltiplas funções no interior da célula, é importante assegurar que a essencialidade de um gene particular (avaliada geneticamente em um conjunto definido de condições) é de fato dependente de uma atividade em particular de seu produto proteico que se pretende inibir farmacologicamente. Essa etapa de validação é, portanto, necessária para se evitar falhas posteriores. Entretanto, essa etapa não tem sido incorporada nos programas de desenvolvimento de fármacos atuais.

As enzimas da via de folato são alvos para alguns antimicrobianos que têm sido utilizados contra TB e, portanto, constituem uma via atrativa para o desenvolvimento de fármacos. Além disso, algumas das enzimas da via do folato que não são encontradas no hospedeiro humano, tais como di-hidroneopterina aldolase (DHNA/FolB), nunca foram utilizadas como alvos para agentes antimicrobianos. Estas enzimas oferecem oportunidades interessantes para a descoberta de novos agentes anti-TB mecanisticamente distintos dos atuais, que poderiam ser úteis contra cepas resistentes (MDR, XDR e TDR). Para validar esse alvo em questão combinamos bioquímica, mutagênese sitio-direcionada e experimentos de nocaute gênico para fornecer evidências claras de que, de fato, as atividades de aldolase/ epimerase da proteína FolB são as responsáveis pela essencialidade do gene *folB*. Neste trabalho nós comprovamos que a atividade de aldolase/epimerase da *MtDHNA/MtFolB* no contexto da via

de biossíntese de folato é de fato responsável pela essencialidade do gene *folB*, fornecendo uma base sólida para esforços que visem o desenvolvimento de inibidores da atividade de aldolase/epimerase da *MtDHNA/MtFolB* como candidatos a novos agentes anti-TB.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar se a essencialidade do gene *folB* de *Mycobacterium tuberculosis* é decorrente das atividades de aldolase e/ou epimerase de seu produto proteico, a enzima di-hidroneopterina aldolase (DHNA/FolB), pertencente à via de biossíntese do folato.

3.2 Objetivos Específicos

1. Clonar e expressar em *Escherichia coli* o gene *folB* em sua forma selvagem e contendo mutações pontuais (K99A e Y54F) e purificar as proteínas recombinantes correspondentes (WT, K99A e Y54F *Mt*DHNA/FolB);
2. Comparar as atividades de aldolase, epimerase e oxigenase das proteínas recombinantes WT, K99A e Y54F *Mt*FolB por meio de ensaios por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência);
3. Confirmar a essencialidade do gene *folB* de *M. tuberculosis* H37Rv por meio da técnica de nocaute gênico;
4. Avaliar se as sequências do gene *folB* contendo mutações pontuais (K99A e Y54F) são capazes de complementar uma cepa de *M. tuberculosis* H37Rv nocaute para o gene *folB*.

4 RESULTADOS

Os Resultados obtidos em cada etapa do trabalho estão organizados em seções:

4.1 Consiste em um artigo publicado no qual diversos experimentos foram utilizados em conjunto para validar a enzima *MtDHNA/FolB* como alvo para o desenvolvimento de fármacos anti-TB. As versões sem tags de *MtDHNA/FolB* do tipo selvagem, K99A e Y54F foram clonadas com êxito, superexpressas e purificadas (Objetivo Específico 1). As atividades de aldolase, epimerase e oxigenase das proteínas recombinantes purificadas foram comparadas por meio de ensaios de atividade usando HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) (Objetivo Específico 2), fornecendo uma base sólida para interpretar os resultados das análises genéticas (Objetivos Específicos 3 e 4). Primeiramente, a essencialidade do gene *folB* de *M. tuberculosis* foi confirmada por meio de nocaute gênico (Objetivo Específico 3) e então as sequências de *folB* contendo as mesmas mutações pontuais cujas atividades foram monitoradas (K99A e Y54F) foram utilizadas na complementação de uma cepa de *M. tuberculosis* H37Rv nocaute para o gene *folB* (Objetivo Específico 4).

4.2 Descreve e apresenta resultados obtidos durante o intercâmbio no laboratório de pesquisa em Tuberculose do Instituto Pasteur Korea (IPK).

5 Apresenta as Considerações Finais.

4.1 Manuscrito publicado no periódico Biophysical Research Communications

Validation of *Mycobacterium tuberculosis* dihydroneopterin aldolase as a molecular target for anti-tuberculosis drug development

V.C.A. Falcao, A.D Villela, V.S. Rodrigues-Junior, K. Pissinate, P. Eichler, A.F.M. Pinto
L.A.Basso, D. S.Santos, C. V. Bizarro



Validation of *Mycobacterium tuberculosis* dihydroneopterin aldolase as a molecular target for anti-tuberculosis drug development



V.C.A. Falcão^{a, b}, A.D. Villela^{a, c}, V.S. Rodrigues-Junior^{a, c}, K. Pissinate^a, P. Eichler^a,
A.F.M. Pinto^{a, 1}, L.A. Basso^{a, b, c}, D.S. Santos^{a, b, **}, C.V. Bizarro^{a, b, *}

^a Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PUCRS), Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 February 2017

Accepted 27 February 2017

Available online 28 February 2017

Keywords:

Site-directed mutagenesis

Gene knockout

Target validation

TB drug discovery

Essentiality evaluation

ABSTRACT

An early step of target validation in antimicrobial drug discovery is to prove that a gene coding for a putative target is essential for pathogen's viability. However, little attention has been paid to demonstrate the causal links between gene essentiality and a particular protein function that will be the focus of a drug discovery effort. This should be considered an important step in target validation since a growing number of proteins are found to exhibit multiple and unrelated tasks. Here, we show that the *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) *folB* gene is essential and that this essentiality depends on the dihydroneopterin aldolase/epimerase activities of its protein product, the FoIB protein from the folate biosynthesis pathway. The wild-type (WT) *MtFolB* and point mutants K99A and Y54F were cloned, expressed, purified and monitored for the aldolase, epimerase and oxygenase activities using HPLC. In contrast to the WT *MtFolB*, both mutants have neither aldolase nor epimerase activities in the conditions assayed. We then performed gene knockout experiments and showed that *folB* gene is essential for Mtb survival under the conditions tested. Moreover, only the WT *folB* sequence could be used as a rescue copy in gene complementation studies. When the sequences of mutants K99A or Y54F were used for complementation, no viable colonies were obtained, indicating that aldolase and/or epimerase activities are crucial for Mtb survival. These results provide a solid basis for further work aiming to develop new anti-TB agents acting as inhibitors of the aldolase/epimerase activities of *MtFolB*.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Target validation is central to both target-based and phenotype-based approaches for drug discovery. In the field of antimicrobial drug discovery, one of the first steps usually performed for target validation is to evaluate whether the gene coding for a target candidate is essential for pathogen's survival under a defined set of conditions [1–4]. The essentiality of such a gene can be assessed genetically, by knocking out its sequence from the pathogen's genome, and evaluating the ability of the pathogen to survive in its

absence. By applying this approach for target validation, it is assumed that if a gene is essential then a drug developed to inhibit the activity of its protein product could be a promising start point for the development of a new antimicrobial agent.

A pitfall in the above-mentioned rationale is that a growing number of proteins were found participating in unrelated processes, simultaneously or under different cellular contexts [5]. It is not necessarily clear which of the activities displayed by a protein (whose gene was found to be essential) is the one responsible for gene essentiality. Therefore, in the context of target validation, it is important to ensure that the essentiality of a gene is dependent on the particular activity of its gene product we plan to knockdown chemically.

We decided to explore this idea in the context of tuberculosis (TB) drug discovery. TB is the leading cause of death from infectious diseases worldwide, with the emergence of 10.4 million new TB cases in 2015 [6]. Moreover, to cope with the rise and spread of

* Corresponding authors. Av. Ipiranga 6681 – Prédio 92A, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

** Corresponding authors. Av. Ipiranga 6681 – Prédio 92A, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: cristiano.bizarro@pucrs.br (C.V. Bizarro).

¹ Current address: Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA.

multiple drug resistant (MDR) and extensively drug resistant (XDR) strains of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the major etiological agent of TB, drugs with new mechanisms of action (MoA) are needed.

Enzymes of the folate pathway are targets for some antimicrobials that have been used against TB, such as trimethoprim, sulfonamides and *para*-aminosalicylic acid (PAS) [7,8]. The third step in the folate pathway, conversion of 7,8-dihydroneopterin (DHNP) to afford glycolaldehyde (GA) and 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin (HP), is catalyzed by the dihydroneopterin aldolase activity (DHNA; EC 4.1.2.25) of FolB protein in Mtb. This protein has not yet been explored in TB drug discovery and could represent a new drug target.

The FolB protein, encoded by the *folB* gene, is conserved among bacterial species and is absent in mammals [9]. The FolB protein from Mtb (*MtDHNA/MtFolB*) is an octamer in the presence of HP, but assumes a tetrameric state in its apo form [10]. Interestingly, FolB is the only known enzyme that possesses both epimerase and aldolase activities and can also use DHMP as substrate in the aldolase reaction [11,12]. As a dihydroneopterin epimerase (DHNE), FolB catalyzes the interconversion of DHNP and 7,8-dihydroneopterin (DHMP). Moreover, the FolB protein from Mtb (*MtDHNA/MtFolB*) possess oxygenase activity (Fig. 1) [11].

Structural, biochemical and site-directed mutagenesis studies have established the central role of four active site residues in enzyme catalysis in FolB orthologs from *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, namely, E22, Y54, E74, and K100 (numbering from *S. aureus*) [13,14]. However, the biological role of both FolB epimerase and oxygenase activities, if any, are currently unknown.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of WT, K99A and Y54F *MtFolB* expression constructs

The *folB* gene (*Rv3607c*) was amplified by PCR using genomic DNA from Mtb H37Rv as template. The forward (*folB* Forw) and reverse (*folB* Rev) primers (Table S1) were designed based on the *Rv3607c* sequence available on Tuberculist database [15]. The amplified *folB* gene (402 pb) was cloned into pCR-Blunt® vector (Invitrogen). The *folB* gene was then released from pCR-Blunt by digestion with *NdeI* and *HindIII* and subcloned into the pET23a(+) expression vector (Novagen, Madison, USA) digested with the same restriction enzymes.

Mutations were carried out using the QuickChange XL site-directed mutagenesis kit from Stratagene, according to

manufacturer's instructions. The pET23a(+):*folB* construct (described above) was used as template for PCR-based mutagenesis. To generate the K99A *MtFolB* mutant, we used the K99A Forw and K99A Rev primers, whereas primers Y54F Forw and Y54F Rev were used to generate the Y54F *MtFolB* mutant (Table S1). All sequences were confirmed by automatic DNA sequencing.

2.2. Overexpression and purification of recombinant WT and mutants of *MtFolB*

Plasmids carrying the WT or site-directed mutants (K99A or Y54F) of *folB* gene were used to transform competent *E. coli* BL21 (DE3) cells (Novagen) for protein production. Transformants were selected and grown according to standard procedures (Supplementary Materials and Methods). The cells were harvested by centrifugation, at 11,800g for 30 min at 4 °C, resuspended in buffer A (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5% glycerol) and lysed by sonic disruption. WT *MtFolB* and mutants were purified using a procedure adapted from Hennig et al. [16] (Supplementary Materials and Methods). Protein fractions were analyzed by 15% SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue [17]. Protein concentration was determined by the method of Bradford [18] using the Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, USA) and bovine serum albumin as standard and stored at –80 °C. The identity of each recombinant protein was confirmed in LC-MS/MS peptide mapping experiments (Supplementary Materials and Methods).

2.3. Analysis of pterins by high performance liquid chromatography (HPLC)

7,8-dihydro-L-threo-monapterin (DHMP) and 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin hydrochloride (HP) were purchased from Schircks Laboratories (Jona, Switzerland). 7,8-dihydro-D-erythro-neopterin (DHNP) and glycolaldehyde (GA) were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), and 7,8-dihydroxanthopterin (DHXP) from Sphinx Scientific Laboratory (Sycamore, Illinois-USA). Product formation was monitored by HPLC using an Äkta HPLC system (GE Healthcare® life Science). The Unicorn 5.31 (Build 743) and ACD lab software were used for data acquisition and processing.

Pterin compounds were analyzed by HPLC using a protocol modified from Czekster and Blanchard (2012) [11] (Supplementary Materials and Methods). The pterins were monitored at 330 nm, and the peak areas of products were integrated and compared with standard solutions of DNHP, DHMP, HP and DHXP. Control solutions

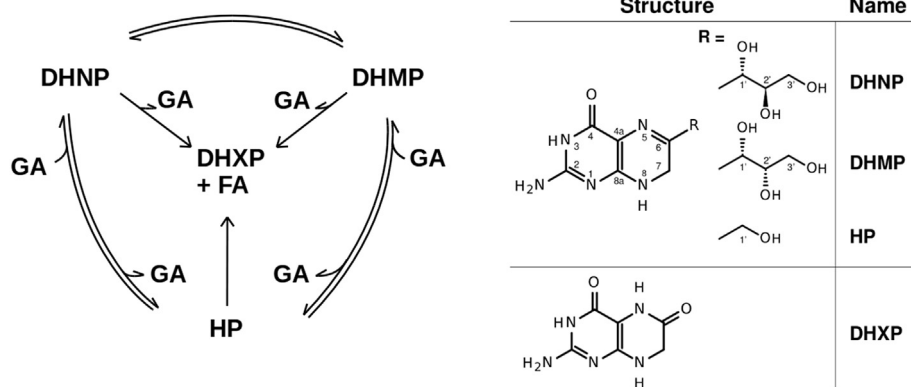


Fig. 1. Reactions catalysed by FolB and structures of its substrates and products. Double harpoons denote reversible reactions, while single-headed arrows denote irreversible reactions. DHNP, 7,8-dihydro-D-erythro-neopterin; DHMP, 7,8-dihydro-L-threo-monapterin; HP, 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin; GA, glycolaldehyde; DHXP, 7,8-dihydroxanthopterin; FA, formic acid.

without the enzyme were conducted under the same conditions to check for substrate degradation before and after the incubation time of each enzymatic reaction (Fig. S1).

2.4. Disruption of *folB* gene

A schematic representation of the suicide delivery construct is presented on Supplementary Fig. S2. The procedures to synthesize molecular constructs are described in the Supplementary Materials and Methods. The *ts-sacB* method [19] was used to achieve allelic replacement at *folB* locus of Mtb H37Rv strain. Transformation by electroporation was performed using 2 µg of suicide delivery construct. Bacteria were plated on Middlebrook 7H10 10% OADC containing 25 µg/mL kanamycin, and incubated at 32 °C. After 6 weeks, 1% catechol was dropped on colonies to select those containing the plasmid. Three different yellow colonies were picked up from a plate containing selected colonies and were cultivated in Middlebrook 7H9 10% OADC 0.05% tween-80 with 25 µg/mL kanamycin at 32 °C. Individual cultures were plated on Middlebrook 7H10 10% OADC containing 25 µg/mL kanamycin, 2% sucrose, and cultivated at 39 °C. After 6 weeks, 1% catechol was dropped on colonies to select those that might be double crossover (DCO) strains.

2.5. Generation of complemented strains

All complementation constructs (*folB*, K99A and Y54F *folB* mutants) were electroporated into Mtb to obtain the complemented strains. Transformation of Mtb H37Rv was performed by electroporation using 2 µg of each construct. Bacteria were plated on Middlebrook 7H10, 10% OADC containing 50 µg/mL hygromycin, and incubated at 37 °C. After 3 weeks, a single colony for each construction was cultivated in 5 mL Middlebrook 7H9, 10% OADC, 0.05% tween-80 with 50 µg/mL hygromycin at 37 °C, transferred to 50 mL of the same medium, and electrocompetent cells were prepared. Mtb cells containing the complementation construct integrated were electroporated with 2 µg of suicide delivery construct. The subsequent steps to obtain the complemented strains were the same as described above, with the addition of 50 µg/mL hygromycin on culture medium.

To confirm that selected cells are indeed complementation strains and not revertants containing the WT copy of *folB* in its original genomic location, we performed a PCR experiment using oligonucleotides annealing to the flanking regions of *folB* gene as primers (primers *folBKO* CKForw and *folBKO* CKRev, Table S1). Cycling conditions were as following: 95 °C, 5', 30 cycles of 95 °C for 45", 55 °C for 30", and 72 °C for 5', followed by a final step of 72 °C for 10 min.

3. Results

3.1. Overexpression, purification and structural characterization of recombinant WT and mutants of MtFolB

The WT sequence coding for MtFolB was cloned and two mutants were generated (K99A and Y54F). The three sequences were

overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells without any tag or extra coding sequence added, and the recombinant proteins were obtained in homogeneous form (Supplementary Fig. S3). The identities of recombinant proteins were confirmed in LC-MS/MS peptide mapping experiments. MS/MS spectra from the three proteins were compared with the Mtb proteome containing the WT MtFolB and both mutants. For the WT sequence, we identified 16 peptides (396 spectra) covering 94.7% of the primary sequence. For K99A mutant, we identified 21 peptides (659 spectra) covering 78.8% of the primary sequence, while we found 12 peptides (2738 spectra) covering 85.6% of Y54F primary sequence. We found peptides containing the expected mutation for both mutants. We next performed intact protein analysis to determine the molecular mass of each protein with isotopic resolution. Spectra of WT and both mutants were recorded using an Orbitrap analyzer and the peaks detected were deconvoluted (Supplementary Fig. S4). The experimental masses matched (with subppm accuracy for two of them) the monoisotopic masses expected for the recombinant proteins with the N-terminal methionine removed (Table 1).

3.2. K99A and Y54F mutants of MtFolB are defective in both aldolase and epimerase activities

The activities of WT, K99A and Y54F MtFolB recombinant proteins were monitored and compared using an HPLC assay (see Materials and Methods). The activities of aldolase (aldol condensation and retroaldol cleavage of the C-C bond between C1' and C2'), epimerase (interconversion of DHMP and DHNP), and oxygenase activities were monitored by comparing the retention times (Rt) of reaction products with those of HPLC standards (Fig. S5).

As expected, we detected the activities of aldolase (in the retroaldol cleavage direction), epimerase and oxygenase in the WT MtFolB using either DHNP or DHMP as substrates (Fig. 2A and B). The aldol condensation activity of WT MtFolB could be readily detected using HP and GA as substrates, affording both DHNP and DHMP as reaction products (Fig. 2C). In contrast, the activities of both Y54F and K99A MtFolB mutants were markedly different from those of the WT enzyme. The Y54F mutant was converted into an oxygenase enzyme, as already found for the correspondent single-point mutants of FolB orthologs from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [14]. Neither epimerase nor aldolase activities (in both directions) were detected for this mutant (Fig. 2D–F). Moreover, we have not detected any enzymatic activity of any type for the K99A mutant using either DHNP or DHMP as substrates, even after an incubation of 4 h s (Fig. 2G and H), in agreement with previous studies that reported a substantial decrease in aldolase activity for the correspondent single-point mutants of *E. coli* and *S. aureus* [13,16]. However, using HP and GA as substrates, this mutant in Mtb still retains its oxygenase activity (Fig. 3I).

3.3. The *folB* gene is essential for Mtb growth

As suggested by high-density mutagenesis studies [20,21], the *folB* gene is essential for Mtb growth *in vitro*. A suicide delivery construct based on the *ts-sacB* vector pPR27*xyIE* [22] containing the genomic regions flanking *folB* and a kanamycin resistance marker

Table 1
Molecular masses of intact WT and mutants (K99A and Y54F) of MtFolB.

Protein	Theoretical monoisotopic mass (Da)	Experimental monoisotopic mass (Da)	$\Delta_{\text{theor} - \text{exp}}$ (Da)	Accuracy (ppm)
MtFolB WT	14,412.5215	14,412.5288	0.0073	0.5
MtFolB K99A	14,355.4636	14,355.4301	0.0335	2.3
MtFolB Y54F	14,396.5265	14,396.5332	0.0067	0.5

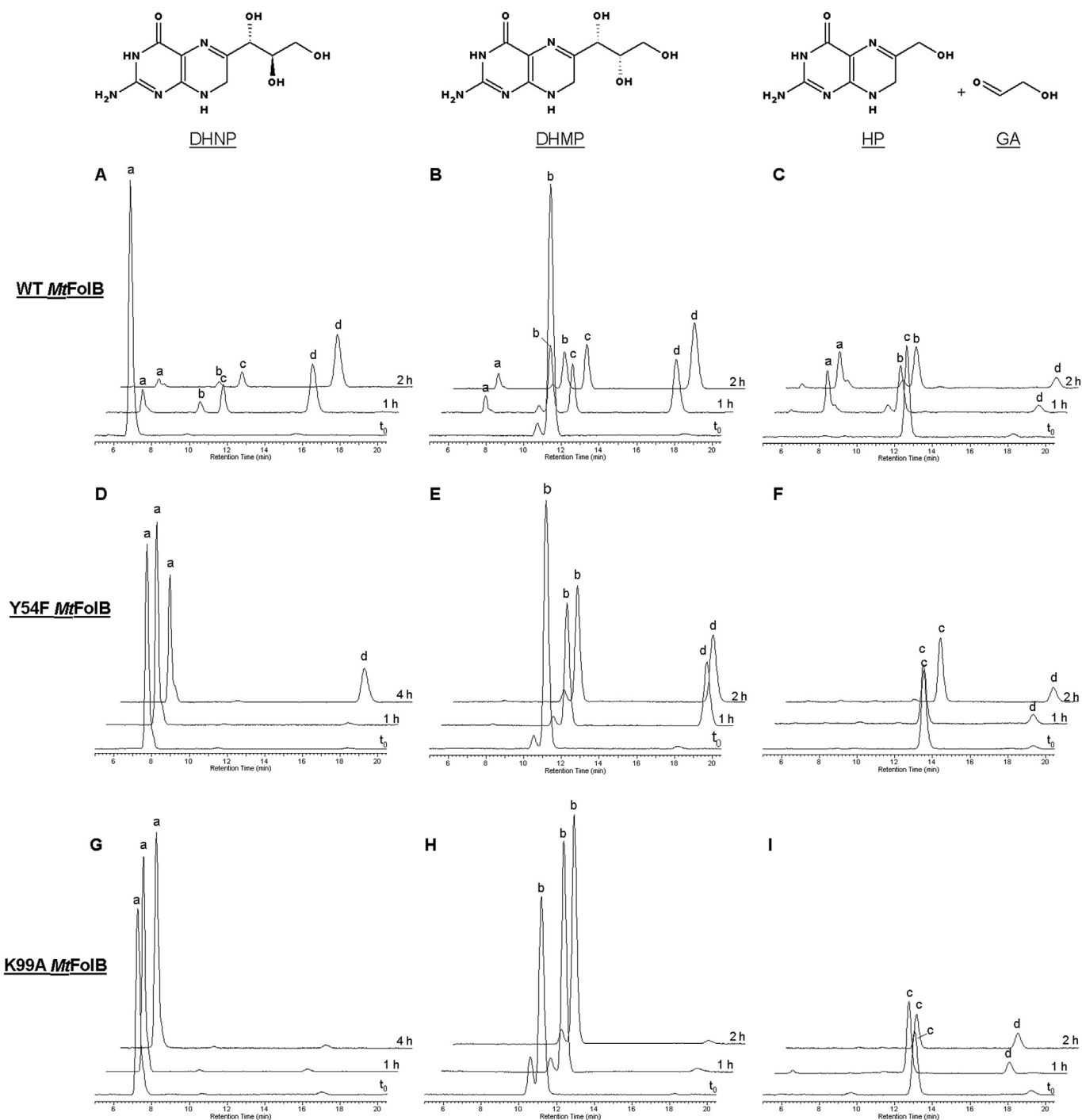


Fig. 2. Enzymatic activities of WT, Y54F and K99A MtFolB proteins monitored by HPLC assays. After incubating reaction mixtures at 25 °C for 5 min, reactions were initiated by the addition of 5 μ M of WT (A, B, C), Y54F (D, E, F) or K99A (G, H, I) MtFolB protein. Reactions were allowed to proceed for the time intervals shown and were stopped by the addition of 1 N HCl, followed by neutralization with 1 N NaOH after 1 min. Aliquots of 150 μ L were centrifuged (17,900 \times g for 3 min) and the supernatants were injected into a reversed phase C-18 column and pterins monitored at 330 nm. At each reaction mixture, 200 μ M of DHNP (A, D, G), 200 μ M of DHMP (B, E, H), or 200 μ M of HP and 50 mM of GA (C, F, I) were added as substrates. Peaks: a, DHNP; b, DHMP; c, HP; d, DHXP.

(Fig. S2) was synthesized and used to remove the *folB* sequence from the genome by an allelic exchange process. Three recombinant colonies (colored yellow after catechol addition) were selected. However, we were unable to select from these colonies double crossover events (DCOs) (white colonies in the presence of catechol, resistant to kanamycin and sucrose), indicating that the *folB* gene is essential for Mtb growth under the conditions tested. To

confirm the essentiality of *folB*, we performed complementation experiments using the WT MtFolB. We repeated the knockout procedure in Mtb cells already transformed with complementation constructs containing the WT MtFolB. A copy of the WT *folB* sequence was sufficient to rescue the lethality phenotype (Fig. 3A–C). This result confirms that *folB* is essential for Mtb growth under the conditions tested.

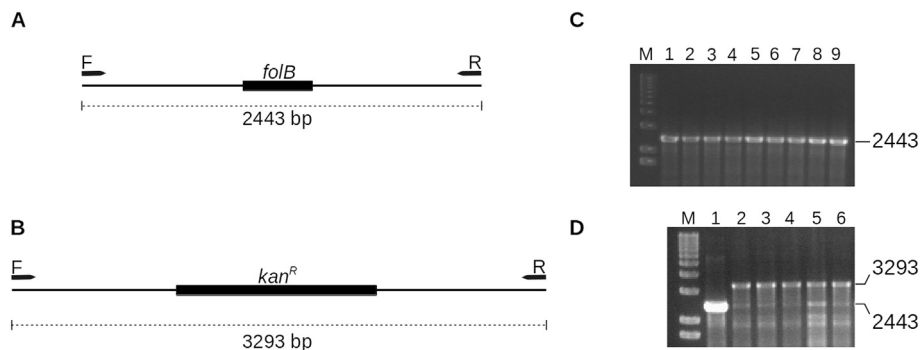


Fig. 3. The *folB* gene is essential for Mtb growth and its essentiality depends on the aldolase and/or epimerase activity of MtFolB. A. Expected amplicon from wild-type *folB* locus using gene-specific forward (F) and reverse (R) primers. Primer F: *folBKO* CKForw. Primer R: *folBKO* CKRev (see Table 1 for the sequences). B. Expected amplicon using the same gene-specific primers after allelic exchange with suicide delivery construct. C. Agarose gel electrophoresis of PCR products of double crossover (DCO) candidates that were transformed with pNIP40::WT*MtfolB*. M – 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); Lane 1 – Mtb H37Rv genomic DNA (control); Lanes 2–6 – Strains complemented with WT *MtfolB* sequence. D. Agarose gel electrophoresis of PCR products of DCO candidates that were transformed with pNIP40::Y54F*MtfolB* or pNIP40::K99A*MtfolB*. M – 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); Lane 1 – Mtb H37Rv genomic DNA (control); Lanes 2–8 – Strains complemented with Y54F *MtfolB* sequence; Lanes 9 – Strain complemented with K99A *MtfolB* sequence.

3.4. The essentiality of *folB* gene depends on the aldolase and/or epimerase activity of MtFolB protein

In parallel to the complementation experiments using the *folB* sequence coding for the WT MtFolB, we attempted to complement Mtb with *folB* sequences coding for Y54F or K99A mutants. We were not able to rescue the lethality phenotype with neither of these mutant sequences. After applying the selection procedures, we found 7 white colonies (after catechol addition) using the sequence coding for the Y54F mutant as a rescue copy and only one white colony using the sequence coding for K99A mutant for the same purpose. However, all colonies possessed the WT *folB* locus (Fig. 3D), strongly suggesting that Mtb requires in vivo the aldolase and/or epimerase activities of MtFolB to survive under the conditions tested.

4. Discussion

It is proposed that FolB has a general acid-base catalysis mechanism in which a proton-conducting wire is responsible for the deprotonation of the 2'-hydroxyl of DHNP or DHMP and protonation of N5 from the pterin ring, resulting in the formation of an enol intermediate and GA. An active site lysine (K99 in Mtb) is a key component of this proton wire, abstracting a proton from the 2'-hydroxyl group and coordinating a water molecule that protonates N5, which results in the cleavage of the C1'-C2' bond [12]. The fate of the reaction intermediate determines the products synthesized, indicating that all reactions catalyzed by FolB are mechanistically connected. The non-stereoselective reformation of the C1'-C2' bond between the intermediate and GA would result in the formation of DHNP and DHMP, accounting for the epimerase activity of FolB. A second proton wire, requiring an active site tyrosine from the other subunit (Y54' in Mtb) as a proton donor, results in the formation of HP (aldolase activity in the retroaldol cleavage direction). The WT MtFolB was also found to be an oxygenase enzyme. According to the mechanism proposed, a carbanion resulting from the deprotonation of N5 from the enol intermediate would react with dioxygen to afford DHXP and formic acid in an irreversible reaction [11]. Moreover, the functional roles of active site lysine and tyrosine were directly confirmed in site-directed mutagenesis studies in both *E. coli* and *S. aureus* [13,14].

To provide compelling evidences that the activities of aldolase/epimerase of FolB are responsible for the essentiality observed in vivo for the *folB* gene (also directly confirmed in this study), we selected residues to perform point mutations and test the ability of

these mutants to complement Mtb knockouts for *folB*. Based on the current knowledge about the catalytic mechanisms of FolB we converted lysine 99 into alanine (K99A) and tyrosine 54 into phenylalanine (Y54F), as already performed for MtFolB orthologs from *E. coli* and *S. aureus* [13,14]. We confirmed the effect of these site-directed mutations on MtFolB activity by cloning, expressing and purifying the WT and mutant forms (K99A and Y54F) of MtFolB. Homogeneous preparations of recombinant proteins were obtained without any tag or extra sequences added (Figs. S3 and S4) and the activities of WT and mutant proteins were monitored using fluorimetry and HPLC assays. Both mutants were found to be devoid of both aldolase and epimerase activities (Fig. 2D–I). The absence of lysine 99 would hamper both the deprotonation of 2'-hydroxyl and protonation of N5, preventing the formation of the enol intermediate, GA and, consequently, the epimerase, aldolase and oxygenase activities, as observed (Fig. 2G and H). As expected from the current catalytic mechanism proposed for FolB, Y54F MtFolB mutant was found to be devoid of aldolase activity, using either DHNP or DHMP as substrates (Fig. 2D and E). Moreover, this mutant is also devoid of epimerase activity (Fig. 2D and E). Although not part of the first proton-conducting wire required for the formation of the enol intermediate and GA, tyrosine 54 was found to establish hydrogen bonds with 2'-hydroxyl in DHNP and 3'-hydroxyl in DHMP (and with GA after C1'-C2' cleavage) in SaFolB [12]. These interactions could be pivotal to the proper orientation of GA in the active site required for the reformation of the C1'-C2' bond, reforming DHNP and producing DHMP (DHNP was used as substrate) or reforming DHMP and producing DHNP (DHMP was used as substrate). Indeed, a correspondent point mutation in EcFolB and SaFolB converted FolB into an oxygenase enzyme in both cases [14]. Interestingly, Y54F MtFolB maintained its oxygenase activity when supplied with DHNP or DHMP (Fig. 2D and E), which is expected since the enol intermediate is predicted to be formed in this mutant.

Having established biochemically that mutants Y54F and K99A MtFolB are devoid of aldolase or epimerase activities, we performed gene knockout experiments to study whether the essentiality of the gene *folB* depended on the in vivo activities of aldolase and/or epimerase of its protein product, the FolB enzyme. Using gene knockouts, we directly evaluated the essentiality of *folB* gene already reported in high-density mutagenesis studies [20,21]. We were unable to delete the original *folB* locus without supplying cells with a rescue copy of *folB*, indicating that this gene is essential under the conditions tested (Fig. 3A–C). Next, we tested for the ability of mutant copies of *folB* genes (coding for Y54F or K99A MtFolB mutants) to rescue Mtb cells containing the original *folB*

locus deleted. In contrast to what was obtained using the WT copy of *folB* as a rescue sequence, we could not obtain Mtb cells with the original *folB* knocked out (Fig. 3D). This result strongly suggests that the aldolase and/or epimerase activity(ies) displayed by MtFolB in vivo are responsible for the essentiality of *folB* gene, providing a solid basis for future endeavors aiming to develop MtFolB aldolase/epimerase inhibitors as potential anti-TB agents.

Reducing the high attrition rates in drug discovery is an important issue of contemporary pharmaceutical industry [23–25]. Drug failures in the clinic have been considered in part the result of sloppy early target validation [26]. However, the task of putting in firm grounds the causal links between protein function and gene essentiality have not been addressed in most target validation initiatives. Here, using gene knockout experiments, we confirm that the *folB* gene is essential for Mtb growth under the conditions tested and, more importantly, we provide evidences that the aldolase and/or epimerase activities of MtFolB are responsible for the essentiality of *folB* gene. Therefore, further efforts to develop anti-TB agents based on inhibitors of aldolase/epimerase activity of MtFolB will be well-grounded.

Acknowledgements

This work was supported by Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES/FUNTEC - 14.20914.1) and National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDTC-CAPES), Brazil (465318/2014-2). D. S. S. and L. A. B. also acknowledge grants awarded by FINEP (0498/07) and FAPERGS-CNPq-PRONEX-2009 (10/0013-0). D. S. S. and L. A. B. are research career awardees of the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq). V. R. J. acknowledges a scholarship awarded by FAPERGS-CAPES (DOCFIX, 05/2013). The fellowship from CNPq (304156/2014-0) to A. F. M. P. is also acknowledged. V.C.A.F acknowledges FAPERGS/CAPES (Doctorate Scholarship- 015/2012).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.137>.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.137>.

References

- [1] M. Zalacain, S. Biswas, K.A. Ingraham, et al., A global approach to identify novel broad-spectrum antibacterial targets among proteins of unknown function, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 6 (2003) 109–126.
- [2] K.J. Williams, K. Duncan, Current strategies for identifying and validating

- targets for new treatment-shortening drugs for TB, *Curr. Mol. Med.* 7 (2007) 297–307.
- [3] W. Hu, S. Sillaots, S. Lemieux, et al., Essential gene identification and drug target prioritization in *Aspergillus fumigatus*, *PLoS Pathog.* 3 (2007) e24.
- [4] A.D. Villela, P. Eichler, A.F.M. Pinto, et al., Gene replacement and quantitative Mass spectrometry approaches validate guanosine monophosphate synthetase as essential for *Mycobacterium tuberculosis* growth, *Biochem. Biophys. Rep.* 4 (2015) 277–282.
- [5] C.J. Jeffery, An introduction to protein moonlighting, *Biochem. Soc. Trans.* 42 (2014) 1679–1683.
- [6] World Health Organization, Global Tuberculosis Report, WHO Press, Geneva, 2016, 2016.
- [7] A. Estrada, D.L. Wright, A.C. Anderson, Antibacterial antifolates: from development through resistance to the next generation, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6 (2016), <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a028324>.
- [8] Y. Minato, J.M. Thiede, S.L. Kordus, et al., *Mycobacterium tuberculosis* folate metabolism and the mechanistic basis for para-aminosalicylic acid susceptibility and resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (2015) 5097–5106.
- [9] V. de Crécy-Lagard, B. El Yacoubi, R.D. de la Garza, et al., Comparative genomics of bacterial and plant folate synthesis and salvage: predictions and validations, *BMC Genomics* 8 (2007) 245.
- [10] C.W. Goulding, M.I. Apostol, M.R. Sawaya, et al., Regulation by oligomerization in a mycobacterial folate biosynthetic enzyme, *J. Mol. Biol.* 349 (2005) 61–72.
- [11] C.M. Czekster, J.S. Blanchard, One substrate, five products: reactions catalyzed by the dihydroneopterin aldolase from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 19758–19771.
- [12] J. Blaszczyk, Y. Li, J. Gan, et al., Structural basis for the aldolase and epimerase activities of *Staphylococcus aureus* dihydroneopterin aldolase, *J. Mol. Biol.* 368 (2007) 161–169.
- [13] Y. Wang, Y. Li, H. Yan, Mechanism of dihydroneopterin aldolase: functional roles of the conserved active site glutamate and lysine residues, *Biochemistry* 45 (2006) 15232–15239.
- [14] Y. Wang, G. Scherperel, K.D. Roberts, et al., A point mutation converts dihydroneopterin aldolase to a cofactor-independent oxygenase, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 13216–13223.
- [15] Tuberculist *Mycobacterium tuberculosis* Database, <http://tuberculist.epfl.ch/>, (Accessed 15 October 2014).
- [16] M. Hennig, A. D'Arcy, I.C. Hampele, et al., Crystal structure and reaction mechanism of 7,8-dihydroneopterin aldolase from *Staphylococcus aureus*, *Nat. Struct. Biol.* 5 (1998) 357–362.
- [17] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [18] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [19] M. Jackson, L.R. Camacho, B. Gicquel, C. Guilhot, In methods in molecular medicine (chapter 5), in: first ed., in: T. Parish, N.G. Stocker (Eds.), *Mycobacterium tuberculosis* Protocols, vol. 54, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2001, pp. 59–75.
- [20] C.M. Sasseti, E.J. Rubin, Genetic requirements for mycobacterial survival during infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 12989–12994.
- [21] J.E. Griffin, J.D. Gawronski, M.A. Dejesus, et al., High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism, *PLoS Pathog.* 7 (2011) e1002251.
- [22] V. Pelicic, M. Jackson, J.M. Reyrat, et al., Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 10995–11060.
- [23] I. Kola, J. Landis, Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 711–715.
- [24] L. Moreno, A.D. Pearson, How can attrition rates be reduced in cancer drug discovery? *Expert Opin. Drug Discov.* 8 (2013) 363–368.
- [25] M.J. Waring, J. Arrowsmith, A.R. Leach, et al., An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies, *Nat. Rev. Drug Discov.* 14 (2015) 475–486.
- [26] C. Smith, Drug target validation: hitting the target, *Nature* 422 (2003) 341–347.

Supplementary Material

Materials and Methods

Overexpression and purification of recombinant WT and mutants of *MtFolB*.

Plasmids carrying the WT or site-directed mutants (K99A or Y54F) of *folB* gene were used to transform competent *E. coli* BL21 (DE3) cells (Novagen) for protein production.

Transformants were selected on LB agar plates supplemented with 100 µg mL⁻¹ ampicillin.

Single colonies were grown overnight at 37 °C in LB medium (50 mL) supplemented with ampicillin 50 µg mL⁻¹. Part of the culture (8.5 mL) was inoculated into 500 mL of LB medium supplemented with 50 µg mL⁻¹ ampicillin and grown at 37 °C in shaker at 180 rpm until reaching an optical density (OD_{600nm}) of 0.4-0.6. The cells were then harvested by centrifugation, at 11,800 g for 30 min at 4 °C, resuspended in buffer A (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5% glycerol) and lysed by sonic disruption. As a negative control, an identical procedure was employed for BL12 (DE3) *E. coli* cells transformed with the empty vector pET23a(+). In all experiments, protein production was confirmed by 15% SDS-PAGE and Coomassie Brilliant Blue staining. WT *MtFolB* and mutants were purified using a procedure adapted from Hennig et al [1]. High performance liquid chromatography (HPLC) was performed using an ÄKTA System (GE Healthcare® Life Sciences, Pittsburgh, USA) at 4 °C. Approximately 2 g of cell paste was resuspended in 10 mL of buffer A (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5% glycerol) containing a protease inhibitor cocktail tablet (Complete EDTA-free, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and gently stirred for 30 min in the presence of 0.2 mg mL⁻¹ lysozyme (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) and subsequently cells were disrupted by sonication (ten pulses of 10 s, with cooling intervals of 1 min, at 60% amplitude) and the lysate was centrifuged at 38,900 g for 30 min at 4 °C. The supernatant was treated with 1% (w/v) streptomycin sulphate (final concentration) for 30 min to precipitate nucleic acids and ribonuclear proteins under slow agitation and centrifuged at 38,900 g for 30 min at 4 °C. After centrifugation, the supernatant was dialyzed against buffer A, and loaded onto a DEAE Sepharose CL6B anionic exchange

column (GE Healthcare® Life Sciences, Pittsburgh, USA) equilibrated with buffer A. The column was washed with 3 column volumes (CV) and adsorbed protein were eluted by a linear gradient (0-1 M NaCl) with 14.3 CV in buffer B (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 5% glycerol) at 1 mL min⁻¹ flow rate. The fractions eluted from anionic exchange column were incubated with ammonium sulphate to a final concentration of 1 M and loaded on a Butyl Sepharose High Performance HiLoad16/10(GE Healthcare) equilibrated with buffer C (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M ammonium sulphate, 5 % glycerol). The column was washed with 7 CV of buffer C and the adsorbed proteins were eluted by a linear gradient (1 to 0 M ammonium sulphate) with 20 CV in buffer C at 1 mL min⁻¹ flow rate. The fractions containing the enzyme were pooled and concentrated using a 50-mL stirred ultrafiltration cell (Millipore, Billerica, USA) with a 3 kDa cutoff filter, and loaded on a HiLoad Superdex 200 26/60 size exclusion column (GE Healthcare® Life Sciences, Pittsburgh, USA), previously equilibrated with buffer A. Proteins were isocratically eluted with 1 CV of buffer A at 0.3 mL min⁻¹ flow rate. All protein fractions were analyzed by 15% SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue [2]. Protein concentration was determined by the method of Bradford [3] using the Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, USA) and bovine serum albumin as standard and stored at -80 °C.

***MtFolB* identification by LC-MS/MS peptide mapping experiments**

Identification of WT and site-directed mutants (K99A and Y54F) of *MtFolB* was accomplished by LC-MS/MS peptide mapping. In-solution trypsin digestion for each homogeneous protein was performed after protein purification, and followed a protocol adapted from Klammer and MacCoss [4]. Briefly, one nmol of protein in 100 mM Tris, pH 8.5, 8 M urea, and 5 mM dithiothreitol was incubated at 37 °C for 20 min for reduction of disulphide bonds, and then cysteines were alkylated in 25 mM iodoacetamide for 20 min at room temperature in the dark. Urea was diluted to 2 M with 100 mM Tris, and trypsin was added in a ratio of 1:100 enzyme/protein along with 2 mM CaCl₂. Reaction occurred by overnight incubation at 37 °C. Formic acid was added to finish the reaction (5% v/v final concentration). Peptides were separated by reversed-phase chromatography on an in-house 20 cm packed column (inner dia meter 75 µm, 3 µm ODS-AQ C18 Yamamura Chemical

Lab, USA), using an Eksigent nanoLC Ultra 1D plus with AS-2 autosampler (currently part of AB Sciex, Dublin, USA), coupled to a LTQ-XL Orbitrap Discovery (Thermo Fischer Scientific, USA). Mobile phases were water/acetonitrile/formic acid (90:10:0.1, v/v/v) as buffer A, and water/acetonitrile/formic acid (10:90:0.1, v/v/v) as buffer B. Gradient elution was 120 min long at 300 nL/min as follows: 0-5% B in 5 min; 5-25% B in 60 min; 25-50% B in 20 min; 50-80% B in 15 min; 80% B for 5 min; 80-5% B in 1 min; 5% B for 14 min. Mass spectra were acquired in a data-dependent manner, with an automatic switch between a full MS scan analysis (mass accuracy < 1ppm and 30,000 resolution at 400 m/z) and 8 intensity dependent MS/MS scans of the 8 most abundant ions. Dynamic exclusion was applied as 1 repeat count, 30 s repeat duration, 100 exclusion list size, and 30 s exclusion duration. Electrospray voltage was set to 2.3 kV, capillary temperature to 275°C and voltage to 35 V, and tube lens voltage was set to 110 V. Tandem mass spectra were searched for peptide spectra matches with software Thermo Proteome Discoverer 1.3 and SEQUEST algorithm (Thermo Fisher Scientific Inc.). Database consisted in a non-redundant *E. coli* reference proteome (ID UP000002032, www.uniprot.org) with the *MtFolB* sequence (ID P9WNC5, www.uniprot.org) and both K99A and Y54F mutants. The search parameters sets were: two missed trypsin cleavage sites, precursor tolerance of 10 ppm, fragment tolerance of 0.8 Da, static carbamidomethylation on cysteines, and dynamic oxidation on methionine residues. Analyses were restricted to matches with an Xcorr score > 2.0 for doubly charged ions and Xcorr score > 2.5 for triply charged ions, and decoy database was used.

Intact mass determination by MS

After purification, the molecular mass of intact forms from homogeneous WT, K99A and Y54F *MtFolB* proteins was determined by MS. Each desalted and lyophilized protein was reconstituted in acetonitrile 50 %/formic acid 1% (v/v), and directly injected to the IonMax electrospray ion source (Thermo Electron Corporation). Electrospray parameters were set as follows: positive mode; 4.5 kV at source; 5 arbitrary units (0-100 range) of sheath gas, and 6 of auxiliary gas flows; 250 °C and 48 V at the capillary ion transfer tube, and 170 V at the tube lens. Full spectra (650 – 2000 m/z range) were acquired in profile mode at a nominal resolution of 30,000 at m/z 400 using FT automatic gain control target value of

1,000,000 charges. Spectra average of 95 scans with 3 μ scans for *MtFolB*, 250 scans for K99A and 580 scans for Y54F mutants, were processed with Xtract for charge state deconvolution and isotopic molecular mass determination.

Analysis of pterins by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Pterin compounds were analyzed by HPLC using a protocol modified from Czekster and Blanchard (2012) [5]. Each reaction was performed using 5 μ M of WT or mutant *MtFolB* (K99A or Y54F). Using 200 μ M of DHNP or DHMP as substrates, the retroaldol cleavage of the C–C bond between C1' and C2' was monitored through HP formation, while epimerization was monitored by the formation of the corresponding epimer (DHMP or DHNP, respectively). The aldol condensation activity of each enzyme was monitored by measuring the formation of DHNP or DHMP using 200 μ M of HP and 50 mM GA as substrates. In all reactions, oxygenation activity was monitored by DHXP formation.

Reactions were carried out in 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5% glycerol, pH 8.0 under anaerobic conditions (Argon atmosphere) at 25 °C and protected from light to avoid oxidation. Except for the enzyme, all reaction components were added at 4°C. To assure thermal equilibrium, reaction mixtures were incubated at 25 °C for 5 minutes before adding enzyme. After enzyme addition (*MtFolB*, *MtK99A* or *MtY54F*), the reactions were allowed to proceed for different time intervals at the same temperature. Each reaction was stopped by adding 1 N HCl and neutralized with 1 N NaOH after 1 min. Aliquots of each reaction mixture (150 μ L) were centrifuged for 17,900 $\times g$ for 3 min at room temperature and the supernatants were injected into a reversed phase C-18 column (EC 250 \times 4.6 mm NUCLEODUR 100-5 C18ec particle size 5.0 μ m, Macherey-Nagel). Samples were eluted isocratically with water containing 1% methanol and 0.1% acetic acid pH 3.3, at a flow rate of the 1 mL min⁻¹.

Synthesis of the suicide delivery construct. A schematic representation of the suicide delivery construct is presented on Fig. S2. The genomic regions flanking *folB* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from *Mtb* H37Rv genomic DNA. The oligonucleotide sequences employed to obtain fragments of 1000 bp in length from both the upstream and downstream regions are presented in Table S1. The upstream fragment was

digested with EcoRI and SacI and subcloned into pUC19. Next, the downstream fragment was digested with HindIII and SacI and subcloned into the construct containing the upstream fragment cloned. Finally, a 1.2 kb kanamycin resistance cassette extracted from the pUC4K vector with HincII was cloned in between upstream and downstream fragments using the SacI restriction site. The whole insert was then transferred into the pPR27_{xyIE} vector digested with SpeI [6].

Synthesis of complementation constructs. To obtain a complemented strain for the *foiB* gene, its coding sequence (402 bp) was amplified by PCR from Mtb H37Rv genomic DNA using *foiB* Forw and *foiB* Rev2 oligonucleotides as primers (see Table 1). The amplicon was digested with NdeI and HindIII and subcloned into pMVHG1 vector, downstream to the heat shock promoter P_{hsp60} [7]. A fragment containing P_{hsp60} and *foiB* coding region was excised from pMVHG1 using XbaI, purified by gel extraction (QIAquick kit - Qiagen), and inserted into XbaI-linearized pNIP40/b, a mycobacteriophage Ms6-derived integrative vector [8].

Complementation constructs containing sequences coding for K99A and Y54F mutants were synthesized in order to test for their ability to complement a knockout strain for *foiB*. The above-mentioned pMVHG1::*foiB* was used as a template for PCR-based mutagenesis using the QuickChange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Oligonucleotides K99A Forw and Rev, and Y54F Forw and Rev (see Table S1) were used to introduce the correspondent mutations. The subsequent steps were performed as described above for the WT sequence. All complementation constructs were verified by restriction analysis and DNA sequencing.

References

- [1] M. Hennig, A. D'Arcy, I.C. Hampele, M.G. Page, C. Oefner and G.E. Dale., *Nat. Struct. Biol.* 5 (1998) 357–362.
- [2] U. K. Laemmli, *Nature.* 227 (1970) 680-85.
- [3] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-54.

- [4] A. A. Klammer and M. J. MacCoss, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 695-700.
- [5] C. M. Czekster and J. S. Blanchard, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 19758-71.
- [6] V. Pelicic, M. Jackson, J. M. Reyrat, W. R. Jacobs Jr, B. Gicquel and C. Guilhot, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 10995-60.
- [7] F. Pan, M. Jackson, Y. Ma and M. Mcneil, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 3991-98
- [8] A. Freitas-Vieira, E. Anes and J. Moniz-Pereira, *Microbiology*, 144 (1998) 3397-406.

Supplementary Figures

Figure S1

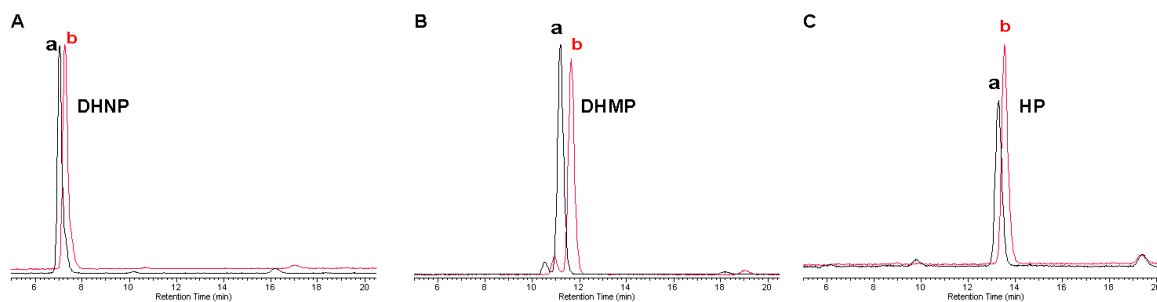


Fig. S1 HPLC chromatography of DHNP, DHMP and HP without the addition of *MtFolB*. Reaction mixtures were prepared as described in the main text except for the absence of *MtFolB*. Samples were loaded onto a reversed phase C-18 column at t_0 (a – in black) or after 6 h of incubation (b - in red). Chromatograms for DHNP (A), DHMP (B) and HP (C).

Figure S2

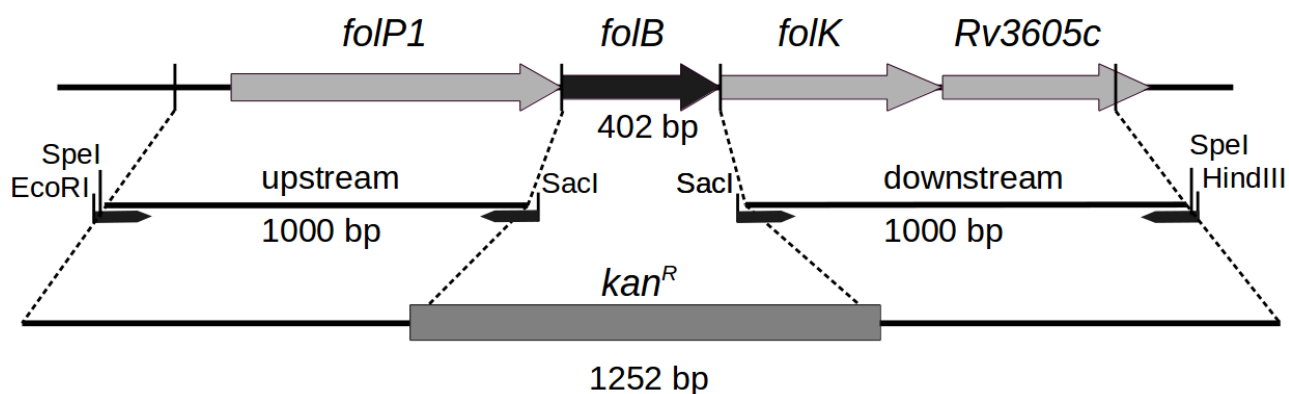


Fig. S2 Schematic representation of suicide delivery construct used to knockout *folB* gene from *M. tuberculosis*. Upstream and downstream regions (each of 1000 bp in length) flanking *folB* gene and a kanamycin resistance cassette (1252 bp in length) were subcloned into pUC19 vector. The recombinant construct was digested with *SpeI* and the liberated insert was cloned into the pPR27 $xyIE$ vector cut with the same enzyme.

Figure S3

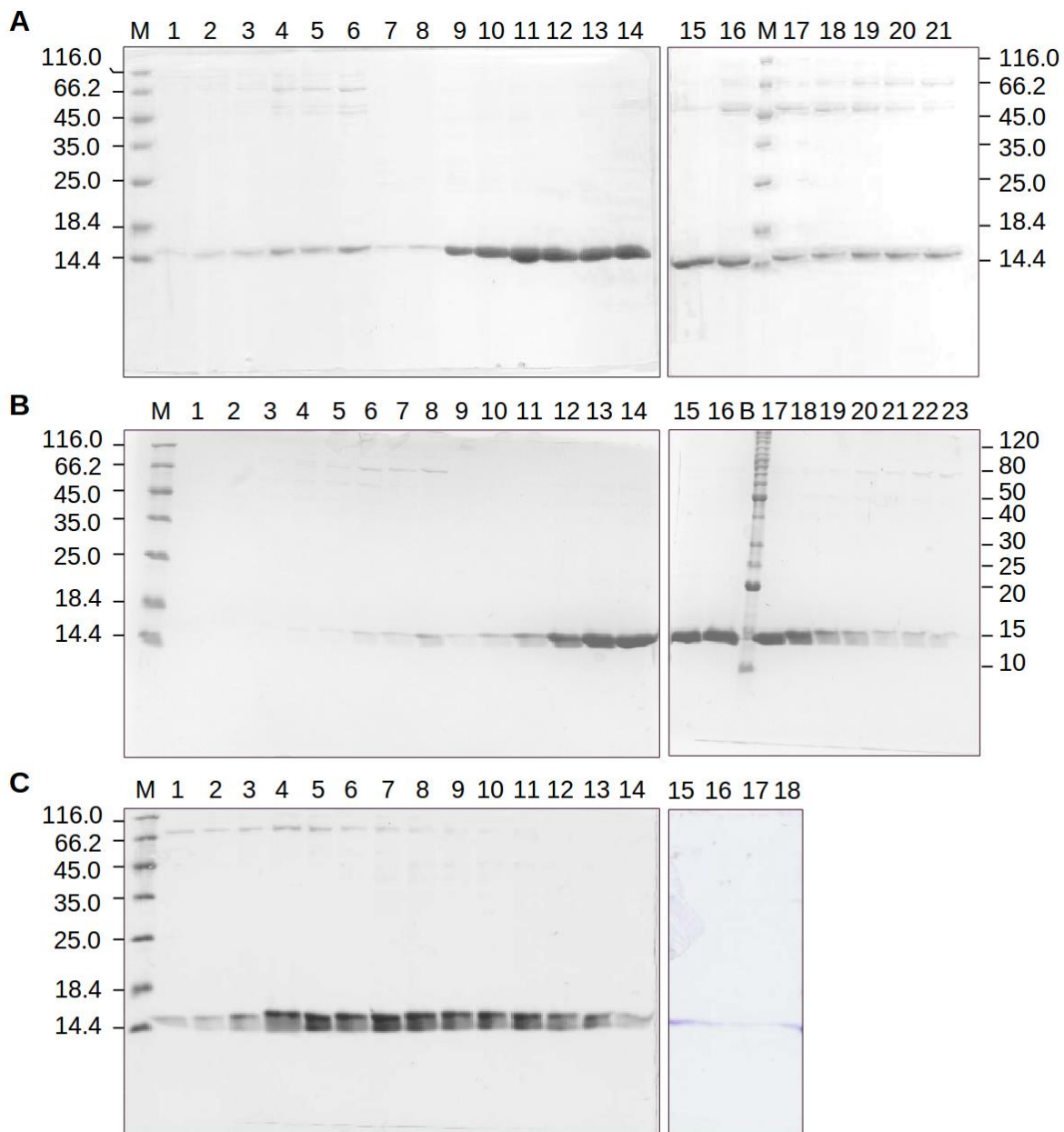


Fig. S3 15% SDS-PAGE electrophoresis of protein samples from fractions collected after last purification step of WT, Y54F and K99A *MtFolB*. The three recombinant proteins were subjected to size exclusion chromatography using a HiLoad Superdex 200 column as the final purification step. M: Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker. B: Thermo Scientific BenchMark Protein Ladder. A. Lanes 1-21: WT *MtFolB*. Fractions corresponding to lanes 9-15 were selected, pooled and used in experiments described in the main text. B. Lanes 1-23: K99A *MtFolB*. Fractions corresponding to lanes 11-17 were selected. C. Lanes 1-18: Y54F *MtFolB*. Fractions corresponding to lanes 8-14 were selected. Labels in molecular markers represent the molecular weight of standards in kDa.

Figure S4

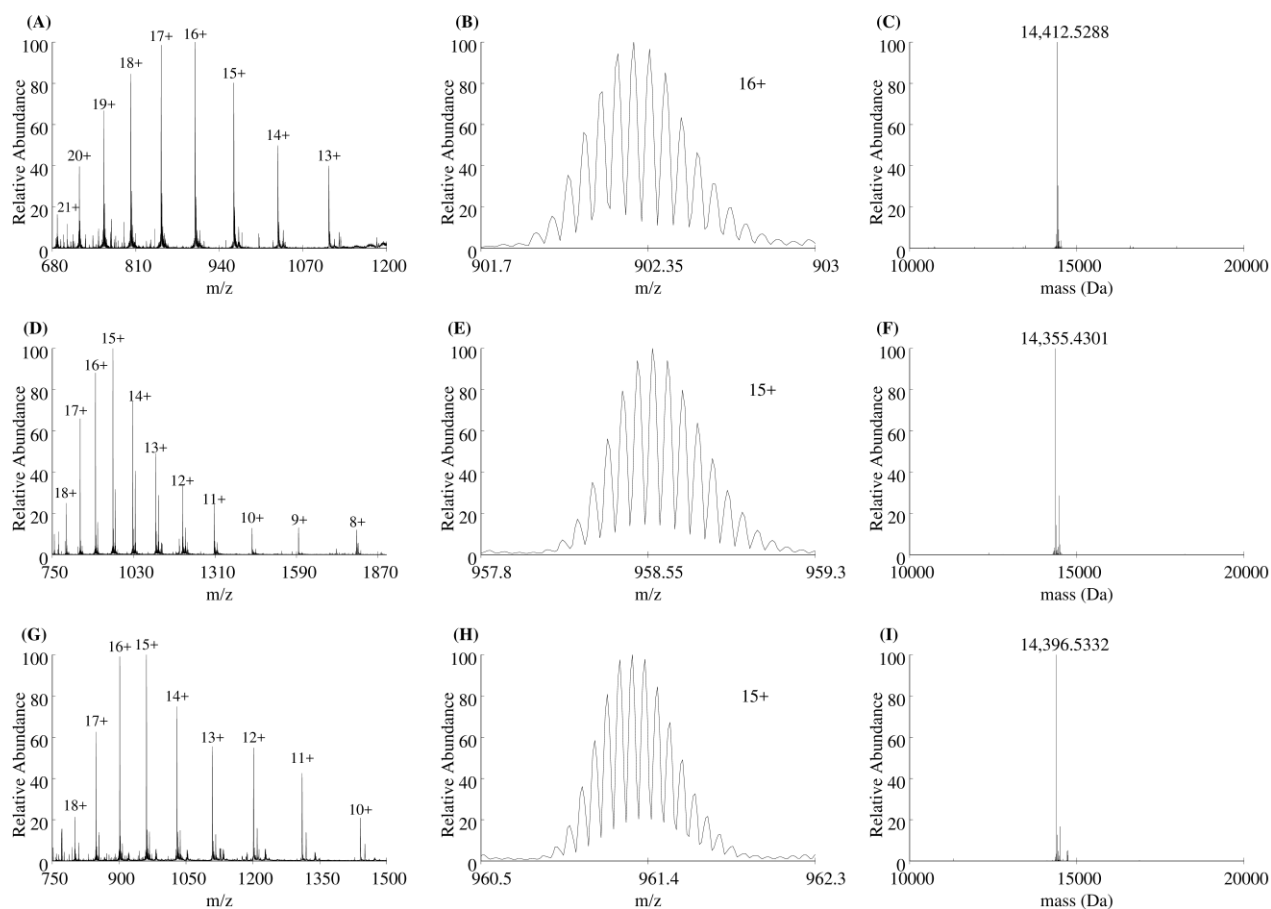


Fig. S4 Determination of WT, Y54F and K99A *MtFolB* monoisotopic molecular masses by mass spectrometry analysis. (A) ESI-FTMS spectra of WT *MtFolB* spanning from charge state 13+ to 21+. (B) Isotopic envelope of charge state 16+ from WT *MtFolB*. (C) Deconvoluted spectra of WT *MtFolB* resulted in a peak corresponding to a monoisotopic molecular mass of 14,412.5288 Da. This value matches the theoretical monoisotopic mass of WT *MtFolB* (14,412.5215 Da) with 0.5 parts-per-million mass accuracy (ppm). (D) ESI-FTMS spectra of K99A *MtFolB* (charge states from 8+ to 18+). (E) K99A *MtFolB*, isotopic envelope of charge state 15+. (F) Deconvoluted spectra of K99A *MtFolB* resulting in a peak of molecular mass 14,355.4301 Da, an accuracy of 2.3 ppm (theoretical monoisotopic mass: 14,355.4636 Da). (G) ESI-FTMS spectra of Y54F *MtFolB*, from charge state 10+ to 18+. (H) Y54F *MtFolB*, isotopic envelope of charge state 15+. (I) Deconvoluted spectra of Y54F *MtFolB* resulting in a peak of molecular mass 14,396.5332 Da, an accuracy of 0.5 ppm (theoretical monoisotopic mass: 14,396.5265 Da).

Figure S5

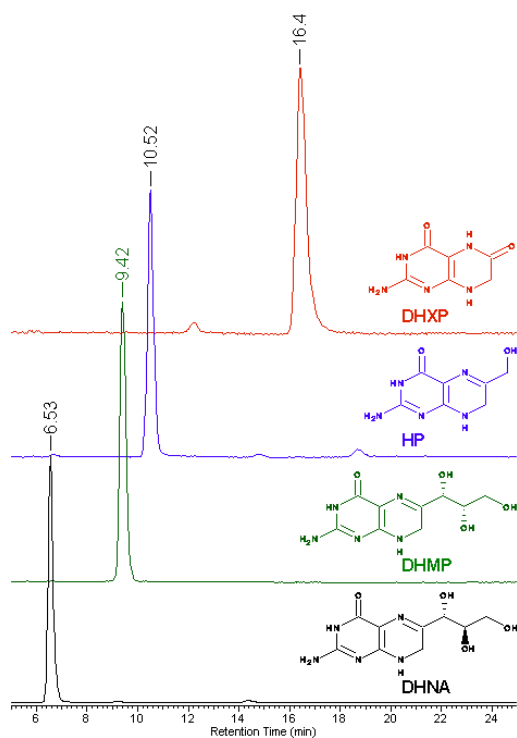


Fig. S5 HPLC chromatogram of reference standards: DHNA (black), DHMP (green), HP (blue) and DHXP (red) with corresponding retention times in minutes.

Supplementary Tables

Table S1 – Oligonucleotides used in this study.

Name	Sequence	Bold	<u>Underlined</u>
<i>folB</i> Forw	5'-GAAC ATAT GGCTGACCGAATCGAA-3'	NdeI	
<i>folB</i> Rev	5'-GCA AAGCTT CATACCGCGCCGCC-3'	HindIII	
<i>folB</i> Rev2	5'-TTTT AAGCTT <u>CTAGACT</u> ATACCGCGCCGCC-3'	HindIII	XbaI
K99A Forw	5'-CGTTGAGGTGGCGGTACAC CGC CGCAGGCGCC CATTCC-3'	Alanine codon ¹	
K99A Rev	5'-GGAATGGGCGCCTGCGG CGC GTGTACCGCCACC TCAACG-3'	Alanine codon ¹	
Y54F Forw	5'-CCGACACCTATGACTTTGTGCGGCTGGCTTCGC-3'	Phenylalanine codon ²	
Y54F Rev	5'-GCGAAGCCAGCCGCAC AA AGTCATAGGTGTCGG- 3'	Phenylalanine codon ²	
<i>folBKO</i> UpForw	5'-TTTT AAGCTT <u>ACTAGT</u> GTGCCAGTGGTGTCCCTCG-3'	HindIII	SpeI
<i>folBKO</i> UpRev	5'-GGGG GAGCTC GGCCGCGGTTGGGTAGTC-3'	SacI	
<i>folBKO</i> DownForw	5'-GGGG GAGCTC TAGACCCCGTGCCGACCAT-3'	SacI	
<i>folBKO</i> DownRev	5'-TTTT GAATTC <u>ACTAGT</u> GGCTCGGTCACCACTACG-3'	EcoRI	SpeI
<i>folBKO</i> CKForw	5'-ACCAGTCAGATCGCCGATG-3'		
<i>folBKO</i> CKRev	5'-CGGATCCTGCGGAGACTT-3'		

¹ Mutation converting Lysine codon to Alanine codon (K99A); ² Mutation converting tyrosine codon to phenylalanine codon (Y54F).

4.2 Desenvolvimento e aplicação de métodos necessários para um ensaio fenotípico utilizando fluorescência confocal automatizada para validação da enzima di-hidroneopterin aldolase como potencial alvo terapêutico

Este trabalho foi desenvolvido durante o estágio no Instituto Pasteur Korea (IPK) no laboratório de pesquisa em tuberculose. O estágio no IPK teve como objetivo principal estender nossos esforços atuais para validação DHNA/FolB através da realização de estudos de biologia celular utilizando diferentes cepas de Mtb contendo tipo selvagem e versões mutantes de FolB fusionada com a proteína fluorescente verde (GFP). O ensaio fenotípico desenvolvido no IPK faz uso da microscopia confocal integrada com sistemas automatizados de manuseio de placas e aquisição de imagens, todos localizados dentro de laboratório NB3. Esses ensaios serão utilizados para avaliar a potência de compostos na inibição da replicação *in vitro* de micobactérias dentro dos macrófagos. Sondas moleculares fluorescentes e microscopia confocal também serão utilizadas para monitorar e comparar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) entre as cepas do tipo selvagem e *folB* nocaute complementadas com a sequência DHNA/FolB C-terminal deletada (*folB* Δ C-GFP), que supostamente ancora esta enzima dentro de compartimentos de nanocargas. Um plasmídeo integrativo (pNIP48-eGFP) que contém uma proteína GFP aprimorada (eGFP) que vai ser utilizada na modificação da cepa Mtb parental. Transformantes GFP positivos serão selecionados em higromicina e cultivados em meio Middlebrook 7H9. Suspensões bacterianas serão utilizadas para infectar macrófagos murinos RAW 264.7, a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 2. O estresse oxidativo induzido por micobactérias dentro dos macrófagos será monitorado pela produção de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ROS, RNS), utilizando sondas moleculares fluorescentes comercialmente disponíveis.

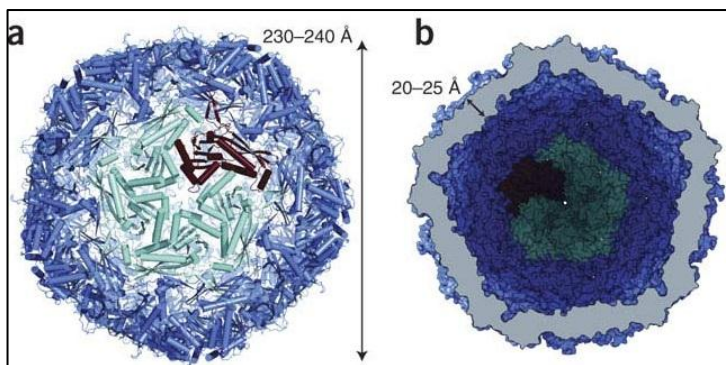
4.2.1 Proteína FolB e a resposta ao estresse oxidativo

Embora mamíferos não possuam uma via de biossíntese do folato, DHNP é encontrada em altas concentrações nas células de mamíferos durante a inflamação (63). O DHNP intracelular protege as proteínas dos macrófagos contra espécies reativas de oxigênio durante a inflamação e serve como um antioxidante inibindo a oxidação da lipoproteína de baixa densidade, a formação de radicais peroxil e geração de superóxido (64). Foi proposto que

*Mt*DHNA/FolB poderia controlar o nível intracelular do substrato DHNP e, por conseguinte, ter um papel na proteção dos bacilos contra espécies reativas de oxigênio dentro de células de macrófagos (49).

Recentemente, verificou-se que *Mt*DHNA/FolB é uma proteína de carga em um notável nano-compartimento de proteínas (65). Estas proteínas nano-compartimentalizadas são um conjunto de proteínas com alto peso molecular chamadas de encapsulinas que foram caracterizados estruturalmente em *Thermotoga maritima* (66). Sessenta monômeros de *T. maritima* encapsulina montaram uma superestrutura esférica com simetria icosaédrica e um diâmetro de 230-240 Å (66) (Figura 13). Curiosamente, estes nano-compartimentos contêm proteínas ferritina-like e peroxidases, ambas envolvidas na resposta do estresse oxidativo.

Figura 13- Nanocompartimento *Thermotoga maritima*



Legenda: a. Vista Externa b. Vista Interna.
Fonte: Adaptado de Sutter et al., 2008 (66).

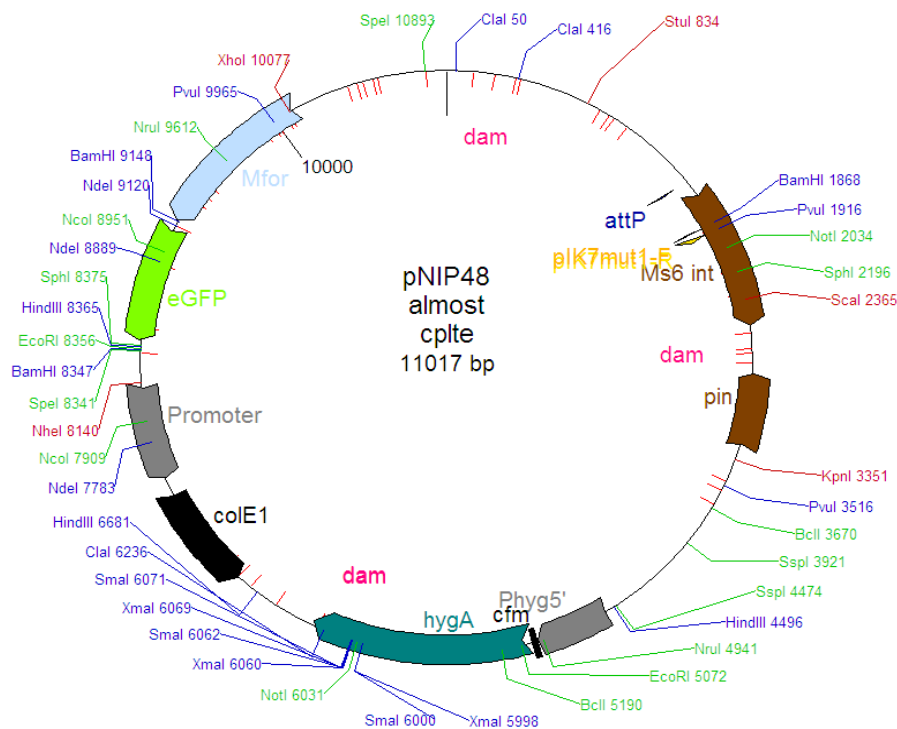
Diferentes proteínas de carga compartilham uma extensão C-terminal alifático necessário para a interação com as encapsulinas. Em *M. tuberculosis*, três proteínas foram encontradas para se comportar como proteínas de carga em nano-compartimentos de micobactérias: *Mt*-DYP (Rv0799c), uma peroxidase heme dependente cujo ortólogo de *E. coli* tem atividade de deferrochelatase, *Mt*-BfrB (Rv3841), uma proteína ferritina que armazena ferro, e DHNA/FolB (65). Estes dados sugerem que DHNA/FolB poderia ter um papel importante na resposta ao estresse oxidativo ainda não explorado.

4.2.2 Construções de cepas de expressão-GFP

Um plasmídeo integrativo (pNIP48-eGFP) contém uma proteína GFP aprimorada (eGFP) de *Aequoria victoria*, e um marcador de resistência à higromicina (Hyg^R), ambos sob o controle do promotor PblaF de *Mycobacterium fortuitum*, nos quais serão utilizados para

modificar a cepa parental (Figura 14). A região total de PblaF-Hyg^R-EGFP será inserida no genoma da cepa parental através de recombinação nos sítios attP específicos, induzidos pelo micobacteriófago MS6 integrado (67). Transformantes GFP-positivos serão selecionados com higromicina e cultivados em meio Middlebrook 7H9 suplementado com 50 ug/ml de higromicina.

Figura 14- Mapa do plasmídeo pNIP48 que será utilizado para modificar a cepa parental

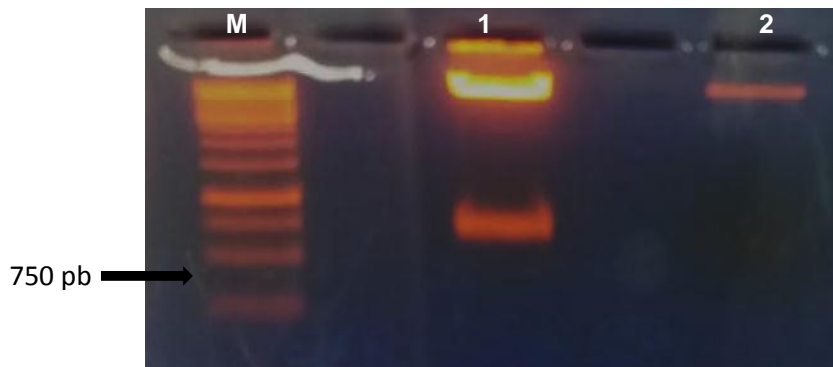


4.2.3 Construção da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv nocaute para o gene *folB* complementado com uma cópia extra do gene *folB* sem a extensão C-terminal

O gene *folB* sem a extensão C-terminal (375 pb) de *M. tuberculosis* foi amplificado por PCR utilizando o vetor recombinante pMVHG1::*folB* com Phsp60DNA e os seguintes primers: (5' ttttTCTAGAggtgaccacaacgacgc 3'), e (5'ttttaagcttTCTAGAccgtgagcgtcgatcac3'). Os primers forward e reverse contém os sítios de restrição para *XbaI*, *HindIII* e *XbaI*, respectivamente. O gene amplificado foi aplicado em gel de agarose 1 % e visualizado com o auxílio do corante Dyne Loading STAR® (Dyne Bio) capaz de intercalar no DNA e fluorescer

sob exposição à luz ultra-violeta. Após confirmação da amplificação do gene, a banda do amplicon foi removida do gel com o auxílio de um bisturi estéril e, em seguida, submetida a uma purificação pelo kit comercial DNA Quick Gel Extraction (Invitrogen). O DNA da amostra purificada foi quantificado com o auxílio do NanoVue Plus spectrophotometer (GE Lifesciences). O produto de PCR purificado e clivado com *XbaI* foi inserido no vetor pNIP40 (previamente linearizado com *XbaI* e desfosforilado com CIP -Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal) por meio da enzima T4 ligase e incubada a 16 °C por 16 horas. O plasmídeo recombinante foi transformado em células quimiocompetentes de *E. coli* (Top10 e DH5 α) a 42°C por 30 segundos e em seguida colocados em meio LB por 1 hora a 37°C. Depois disso as células foram semeadas em meio Luria - Bertani (LB) sólido com o antibiótico de resistência do vetor (Higromicina 200 μ g/ml) e incubadas a 37 °C por aproximadamente 16 horas. Algumas colônias contendo o plasmídeo recombinante foram selecionadas para serem inoculadas em tubos de ensaio com 5 mL de LB líquido cada, contendo o antibiótico Higromicina 200 μ g/ml. Os tubos foram mantidos em *shaker* sob uma agitação de 200 RPM a 37 °C por aproximadamente 16 horas. As células foram coletadas do meio por centrifugação a 13.000 RPM, e o DNA plasmidial foi extraído com auxílio do *kit* de extração plasmidial *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN) (68). Após a confirmação dos fragmentos clonados por clivagem com *XbaI*. As colônias contendo os plasmídeos recombinantes pNIP40::*folB* Δ C foram novamente coletadas e inoculadas em 5 mL de LB líquido (pré-inóculo) contendo o antibiótico Higromicina (200 μ g/mL) e depois incubadas em estufa a 37 °C por aproximadamente 16 horas. Os pré-inóculos ficaram sob agitação em *shaker* a 200 RPM a uma temperatura de 37 °C por 16 horas. Em seguida foram adicionados 5 mL do pré-inóculo em *erlenmeyers* contendo 50 mL de LB líquido com higromicina (200 μ g/ml). Estes *erlenmeyers* ficaram sob agitação a 200 RPM uma temperatura de 37 °C até que a cultura atinja uma densidade ótica (DO₆₀₀) entre 0,4 e 0,6, a leitura da DO é realizada em um comprimento de onda de 600 nm, pois cada unidade de DO corresponde a 0,8 x 10⁹ células/mL. As células foram coletadas do meio por centrifugação a 13.000 RPM, e o DNA plasmidial foi extraído com auxílio do *kit* de extração plasmidial *QIAprep Midiprep* (QIAGEN). Depois de obtidos os plasmídeos recombinantes (pNIP40::*folB* Δ C) contendo o fragmento do gene em questão foi clivado com a enzima de restrição *XbaI* para a liberação do inserto (Figura 15). O sequenciamento do plasmídeo recombinante pNIP40::*folB* Δ C confirmou a identidade e a integridade do gene *folB* e também não foi encontrada nenhuma mutação que poderia ter ocorrido durante os passos de amplificação por PCR.

Figura 15- Triagem dos plasmídeos recombinantes pNIP40::*folB* Δ clivados com *Xba*I



Fonte: produção do próprio autor

Legenda: M Marcador de DNA, O'GeneRuler 1 kb , linha 1 pNIP40::*folB* Δ C (top 10) 738pb) , linha 2 pNIP40::*folB* Δ C (DH5 α).

4.2.4 Amplificação *folB/fo**B* Δ C e clonagem no vetor pNIP48 para coexpressão

O gene *folB* (402 pb) e *folB* sem a extensão C-terminal (375 pb) de *M. tuberculosis* foram amplificados por PCR utilizando o vetor recombinante pMVHG1::*folB* com P_{hsp60} . Os oligonucleotídeos usados como iniciadores (*primers*) estão apresentados na Tabela 3. O sítio de restrição *Spe*I foi introduzido nesses oligonucleotídeos para facilitar a clonagem dos produtos amplificados no vetor pNIP48-GFP previamente clivado com *Spe*I.

4.2.5 Clonagem do gene *folB/fo**B* Δ C fusionado com GFP e subclonado no vetor pNIP40

O gene *folB* (402 pb) e *folB* sem a extensão C-terminal (375 pb) de *M. tuberculosis* foram amplificados por PCR a partir do DNA do plasmídeo recombinante pMVHG1::*folB* com P_{hsp60} e clonados no vetor pNIP40 (Figura 16). O vetor pNIP48-GFP foi utilizado como molde para amplificar o gene GFP (734 pb). Os primers utilizados são mostrados nas Tabelas 3 e 4. Os produtos das reações de PCR foram purificados e clivados com a enzima de restrição *Bam*HI (Figura 17). Após as clivagens os produtos foram ligados por meio da enzima T4 ligase e incubados a 16 °C por 16 horas. As seguintes reações de ligação foram realizadas: 1) *folB/fo**B* Δ C_N terminal foram ligados a GFP_C terminal, 2) GFP_N terminal foi ligado a *folB/fo**B* Δ C_C terminal. As reações de ligação foram utilizadas como molde na segunda reação de PCR onde os primers utilizados na amplificação apresentavam nas suas extremidades o sítio

de restrição de *XbaI* para facilitar a clonagem no vetor pNIP40 (Figura 18). Os produtos de PCR *folB/folBΔC*-GFP (1139 pb) e GFP-*folB/folBΔC* (1139 pb) foram purificados com o *kit DNA Quick Gel Extraction* (Invitrogen). Depois de purificados os insertos foram clivados com *XbaI* e inseridos no vetor pNIP40 (previamente linearizado com *XbaI* e desfosforilado com CIP Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal), de acordo com as técnicas citadas anteriormente.

Tabela 3- Projeção de primers para inserção de *folB/folBΔC* no pNIP48-GFP

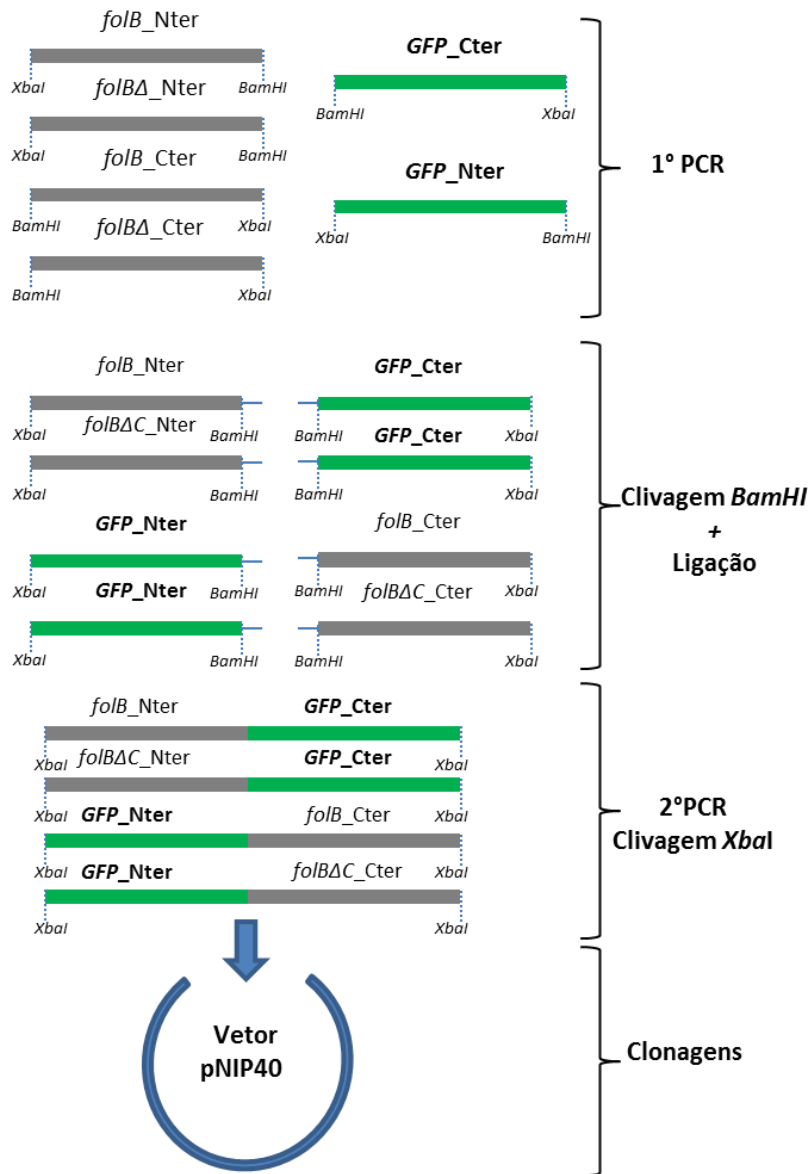
Primers	Sequência
FolB_SpeI_Fw	TTTT ACTAGT ATG gct gac cga atc gaa ctg SpeI (FolB)
FolB_SpeI_Rev	TTTT ACTAGT TCA tac cgc gcc gcc SpeI (FolB)
FolBΔC_SpeI_Rev	TTTT ACTAGT TCA ccg tga gcg tcg gat cac SpeI (FolBΔC)

Tabela 4- Projeção de primers utilizados nas construções *folB/folBΔC* fusionados com GFP e subclonados no vetor pNIP40

Primers	Sequência
FolB_Nter_Fw	TTTT TCTAGA ATG gct gac cga atc gaa ctg XbaI (FolB)
FolB_Nter_Rev	TTTT GGATCC tac cgc gcc gcc c BamHI (FolB)
FolBΔC_Nter_Rev	TTTT GGATCC ccg tga gcg tcg gat cac BamHI (FolBΔC)
GFP_Cter_Fw	TTTT GGATCC AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT GGA GTT G BamHI (GFP)

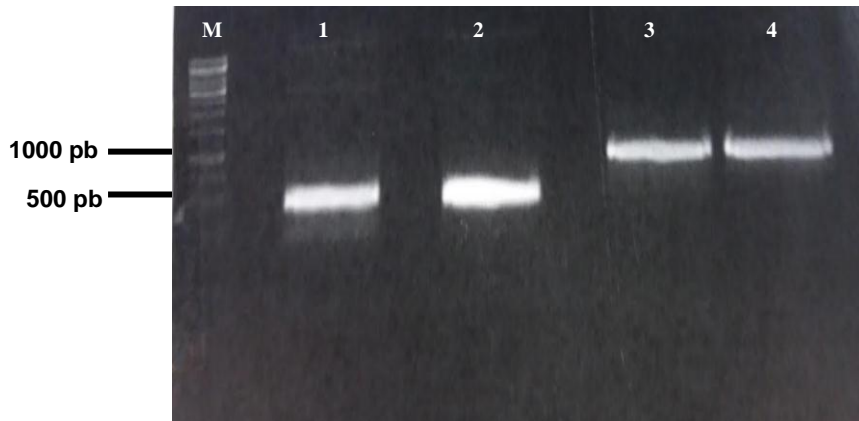
GFP_Cter_Rev	TTTT TCTAGA TTA TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC ATG TG XbaI (GFP)
GFP_Nter_Fw	TTTT TCTAGA ATG AGT AAA GGA GAA GAA CTT TTC ACT GGA G XbaI (GFP)
GFP_Nter_Rev	TTTT GGATCC TTT GTA TAG TTC ATC CAT GCC ATG TG BamHI (GFP)
FolB_Cter_Fw	TTTT GGATCC gct gac cga atc gaa ctg c BamHI (FolB)
FolB_Cter_Rev	TTTT TCTAGA TCA tac cgc gcc gc XbaI (FolB)
FolBDC_Cter_Rev	TTTT TCTAGA TCA ccg tga gcg tcg gat c XbaI (FolBΔC)

Figura 16- Esquemas de clonagens de *folB/foIBΔC* fusionados com GFP e subclonados no vetor pNIP40



Fonte: Produção do próprio autor

Figura 17- PCRs das sequências *folB* /*folB*ΔC e GFP

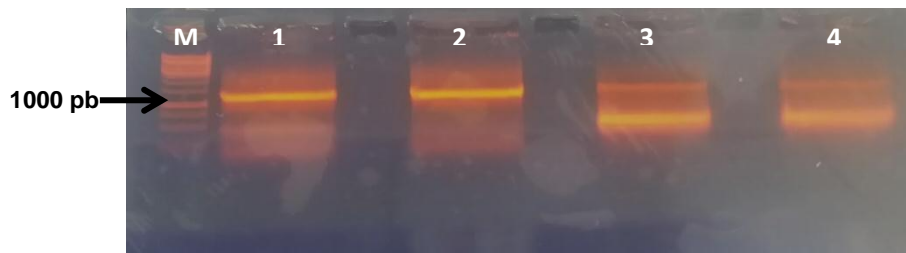


Fonte: Produção do próprio autor

Legenda: Amplificação dos produtos *folB*/*folB*ΔC e GFP .

M Marcador de DNA, O'GeneRuler 1 kb , linha 1 PCR *folB*_Nter, linha 2 PCR *folB*ΔC_Nter, linha 3 PCR GFP_Cter, Linha 4 PCR GFP_Nter.

Figura 18- PCRs das fusões *folB*/*folB*ΔC com GFP



Fonte: Produção do próprio autor

Legenda: Amplificações dos insertos *folB*/*folB*ΔC-GFP (1139 pb) e GFP-*folB*/*folB*ΔC (1139 pb) M Marcador de DNA, O'GeneRuler 1 kb DNA ladder. **Linha 1-** PCR *folB*_Nter+GFP_Cter, **Linha 2-** PCR *folB*ΔC_Nter+GFP_Cter. **Linha 3-** PCR GFP_Nter+*folB*_Cter. **Linha 4-** PCR GFP_Nter+*folB*ΔC_Cter.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mycobacterium tuberculosis é o patógeno bacteriano responsável pela doença conhecida como tuberculose (TB) que é a principal causa de morte por doenças infecciosas no mundo atualmente. De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (7), surgiram 10,4 milhões de novos casos de tuberculose (TB) no mundo em 2015. Atualmente os tratamentos comumente utilizados não são eficientes contra as formas resistentes de TB aos fármacos anti-TB mais eficazes. Por isso a identificação de novas vias requeridas no crescimento micobacteriano proporcionaram a busca de novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. A via da biossíntese do folato destaca-se como uma via bastante promissora para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Diversos estudos tem mostrado que a di-hidroneopterina aldolase (DHNA), que é uma enzima da via do folato, apresenta características importantes para tornar-se um alvo para síntese de novos agentes antimicrobianos. Na validação de novos alvos é importante assegurar que a essencialidade de um gene que codifica um candidato a alvo é dependente das atividades enzimáticas do seu produto gênico. Experimentos de mutagênese sítio direcionada, análises bioquímicas e nocautes gênico demonstramos que o gene *folB* é essencial para a sobrevivência de Mtb, e além disso foi comprovado que a sua essencialidade depende das atividades de aldolase/epimerase da proteína *MtFolB* (seção 4.1). O *MtFolB* do tipo selvagem (WT) e os mutantes pontuais K99A e Y54F foram clonados, expressos, purificados e as atividades de aldolase, epimerase e oxigenase foram monitoradas utilizando HPLC. Os resultados mostraram que os mutantes quando relacionados com o *MtFolB* selvagem (wt) não apresentaram atividade de aldolase nem epimerase nas condições testadas. O mutante Y54F manteve a atividade da oxigenase, enquanto que para o mutante K99A foi possível detectar a atividade de oxigenase apenas na presença de HP e GA como substratos (**Figura 2**). A essencialidade do gene *folB* de *M. tuberculosis* H37Rv como foi previsto por meio de estudos de mutagênese de alta densidade (16) foi confirmada por experimentos de nocaute gênico. A essencialidade do gene *folB* foi avaliada pela incapacidade de obter colônias após o nocaute do gene alvo e na ausência de uma cópia extra do gene *folB* selvagem (WT). Quando o gene nocauteado foi complementado com uma cópia extra do gene *folB* selvagem (WT) foi possível obter colônias viáveis. Este resultado confirma que *folB* é essencial para o crescimento do Mtb nas condições testadas (**Figura 3**). Além da complementação com o gene *folB*, foi fornecida a bactéria nocaute alelos mutantes contendo mutações nos resíduos crucialmente catalíticos (K99A *folB* e Y54F *folB*) para avaliar a

capacidade desses alelos na complementação da cepa nocaute. No entanto nenhuma colônia viável foi obtida indicando que as atividades de aldolase e/ ou epimerase são cruciais para a sobrevivência de Mtb. Esses resultados proporcionam um importante passo para a validação de DHNA/FolB como um novo alvo molecular para o desenvolvimento de fármacos anti-tuberculose. Os resultados obtidos foram colocados em um manuscrito publicado na revista internacional *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

O ensaio fenotípico (69) que faz uso da microscopia confocal integrada com sistemas automatizados de manuseio de placas e aquisição de imagens irão permitir o estudo de processos de replicação de micobactérias e colonização em macrófagos cultivados. Assim com o uso desta tecnologia com cepas de Mtb contendo tipo selvagem e versões mutantes de FolB fusionada com a proteína fluorescente verde (GFP), esperamos entender melhor os papéis celulares de DHNA/FolB, que irá orientar novos esforços para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos contra este alvo. A capacidade para pesquisar grandes bibliotecas químicas de alto rendimento de maneira automatizada, e monitorar diretamente a replicação micobacteriana dentro das células de macrófagos, abre a possibilidade de estudar o mecanismo de ação de compostos candidatos em nível celular. Os experimentos realizados no IPK continuam em andamento e até o momento foram realizadas as construções com fusão *folB*-GFP de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) que contêm a sequência do tipo selvagem do gene *folB* ou um mutante com o C-terminal deletado (*folB* Δ C), desprovida da sequência supostamente necessária para a ancoragem da enzima dentro dos compartimentos de nanocargas (**seção 4.2**).

Os resultados que serão obtidos com estes experimentos irão melhorar a compreensão das funções celulares apresentadas por DHNA/FolB e uma validação mais clara de DHNA/FolB como um alvo molecular para o desenvolvimento de fármacos são esperadas com a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Koch R. Die Aetiologie der Tuberculose (Nach einem in der physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 24. März gehaltenem Vortrage) Berliner klin Wochenschr.v.19, p.221-230,1882.
2. Koch R. In: The aetiology of tuberculosis. Pinner B, Pinner M, translators. New York City: National Tuberculosis Association, 1932.
3. Kaufmann S H, Winau F .From bacteriology to immunology: the dualism of specificity. Nat Immunol, v. 6, p.1063-1066, 2005.
4. WHO- World Health Organization, Global tuberculosis report 2016. WHO Report 2016. Disponível em <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html>. Acessado em 12/12/2015.
6. WHO- World Health Organization, Global tuberculosis report 2013. WHO Report 2013. Disponível em <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html>. Acessado em 15/10/2014.
5. WHO- World Health Organization, Global tuberculosis report 2012. WHO Report 2012. Disponível em <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html>. Acessado em 20/10/2013.
7. WHO- World Health Organization, Global tuberculosis report 2015. WHO Report 2015. Disponível em <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html>. Acessado em 10/06/2016.
8. Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume 47 N° 13 – 2016 ISSN 2358-9450. Perspectivas brasileiras para o fim da tuberculose como problema de saúde pública. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/11955-boletins-epidemiologicos-arquivos>>. Acessado em 08/10/2016.
9. Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. Nature. 27;469(7331):483-9, 2011.
10. Takushi Kaneko, Christopher Cooper e Khisimuzi Mdluli. Challenges and opportunities in developing novel drugs for TB. Future Medicinal Chemistry. v. 3, No. 11, P. 1373-1400, 2011.
11. Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, Jensen P, Bayona J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. Lancet. 22;375(9728):1830-43, 2010.

12. Udhwadia, Z. F.; Amale, R. A.; Ajbani, K. K.; Rodrigues, C. Totally Drug-Resistant Tuberculosis in India. *Clinical Infectious Diseases*, v. 54, n. 4, p. 579-581, 2012.
13. World Health Organization. WHO Treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis – 2016 update. WHO/HTM/TB/2016.04.
14. Zumla A, Memish ZA, Maeurer M, Bates M, Mwaba P, Al-Tawfiq JA, Denning DW, Hayden FG, Hui DS. Emerging novel and antimicrobial-resistant respiratory tract infections: new drug development and therapeutic options. *Lancet Infect Dis*. 14(11):1136-49, 2014.
15. Pai Madhukar , Behr Marcel A , Dowdy David , Dheda Keertan, Divangah Maziar i, Boehme Catharina C. , Ginsberg Ann , Swaminathan Soumya, Spigelman Melvin, Getahun Haileyesus, Menzies Dick and Raviglione Mario. *Nature Reviews Disease Primers* 2, vol 2, 2016.
16. Sasseti, C. M. *et al.* Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *J. Molecular Microbiology*, v. 48, n. 1, p. 77-84, 2003.
17. Illarionova Victoria, Wolfgang Eisenreich, Markus Fischer, Christoph Haußmann, Werner Romisch, Gerald Richter, and Adelbert Bacher. Biosynthesis of tetrahydrofolate stereochemistry of dihydroneopterin aldolase. *The journal of biological chemistry*. v. 277, n. 32, p. 28841–28847, 2002.
18. Chakraborty Sumit, Todd Gruber, Clifton E. Barry III, Helena I. Boshoff, Kyu Y. Rhee. Para-Aminosalicylic Acid Acts as an Alternative Substrate of Folate Metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*, v. 339, 2013.
19. Chhabra S, Barlow N, Dolezal O, Hattarki MK, Newman J, *et al.* Exploring the Chemical Space around 8-Mercaptoguanine as a Route to New Inhibitors of the Folate Biosynthesis Enzyme HPPK. *PLoS ONE*. v. 8, n. 4, 2013.
20. Goulding Celia W., Perry L. Jeanne, Anderson Daniel, Sawaya Michael R., Cascio Duilio, Apostol Marcin I., Chan Sum, Parseghian Angineh, Wang Shui-Shu, Wu Yim, Cassano Vicente, Gill Harindarpal S., Eisenberg David. Structural genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: a preliminary report of progress at UCLA. *Biophysical Chemistry*. v.105, p.361-370, 2003.
21. Blaszczyk Jaroslaw, Li Yue, Gan Jianhua, Yan Honggao, Ji Xinhua. Structural Basis for the Aldolase and Epimerase Activities of *Staphylococcus aureus* Dihydroneopterin Aldolase. *J Mol Biol*. v.368 (1), p. 161–169, 2007.
22. Erik C. Hett and Eric J. Rubin. *Microbiology and Molecular Biology reviews*, p. 126–156, 2008.
23. Martin Gengenbacher & Stefan H.E. Kaufmann. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev*.36,514–532, 2012.

24. Rodriguez-Campos S., Smith N.H., Boniotti M.B., Aranaz A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.*;97, 2014.
25. Beatrice Saviola and William Bishai. The Genus *Mycobacterium*–Medical. *Prokaryotes* Chapter 1.1.19. 3:919–933, 2006.
26. Pfyffer G. *Mycobacterium*: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures, p 536-569. In Jorgensen J, Pfaller M, Carroll K, Funke G, Landry M, Richter S, Warnock D (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition, 2015.
27. Brennan, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinburgh)* 83:91–97, 2003.
28. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Disponível: <<http://phil.cdc.gov/phil/sessionexpired.asp>>. Acessado em 10 /01/ 2017.
29. Issar Smith. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical microbiology reviews*, p. 463–496. v. 16, No. 3, 2003.
30. Esmail, H., Barry, C. E. 3rd, Young, D. B. & Wilkinson, R. J. The ongoing challenge of latent tuberculosis. *Phil. Trans. R. Soc. B*.369, (1645) 20130437, 2014.
31. O’Garra Anne, Redford Paul S., McNab Finlay W., Bloom Chloe I., Wilkinson Robert J, Berry, Matthew P.R. The Immune Response in Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 31:475–527 , 2013.
32. Sonnenberg, P. et al. How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. *J. Infect. Dis.* 191, 150–158 , 2005.
33. Horsburgh C Robert Jr, Barry Clifton E III and Lange Christoph. Treatment of Tuberculosis. *N Engl J Med* ; 373:2149-2160, 2015.
34. Jacobs WR Jr, Snapper SB, Lugosi L, Jekkel A, Melton RE, Kieser T, Bloom BR. Development of genetic systems for the mycobacteria. *Acta Leprol.* 7 Suppl 1:203-7, 1989.
35. Casali N, Ehrt S. Plasmid vectors. *Methods Mol Med.* 54:1-17, 2001.
36. Van Kessel JC, Hatfull GF. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Methods.* 4(2):147-52, 2007.

37. Parikh A, Kumar D, Chawla Y, Kurthkoti K, Khan S, Varshney U, Nandicoori VK. Development of a new generation of vectors for gene expression, gene replacement, and protein-protein interaction studies in mycobacteria. *Appl Environ Microbiol.* 79(5):1718-29, 2013.
38. Jain P, Hsu T, Arai M, Biermann K, Thaler DS, Nguyen A, González PA, Tufariello JM, Kriakov J, Chen B, Larsen MH, Jacobs WR Jr. Specialized transduction designed for precise high-throughput unmarked deletions in *Mycobacterium tuberculosis*. *MBio.* 5(3):e01245-14, 2014.
39. Morszeck C. Strategies for mycobacterial genetics. *Int J Med Microbiol.* 293(4):251-9, 2003.
40. Knight ZA, Shokat KM. Chemical genetics: where genetics and pharmacology meet. *Cell.*128(3):425-30,2007.
41. Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, Amati G, Andersen KK, Arnaud M, Asai K, Ashikaga S, Aymerich S, Bessieres P, Boland F, Brignell SC, Bron S, Bunai K, Chapuis J, Christiansen LC, Danchin A, Débarbouille M, Dervyn E, Deuerling E, Devine K, Devine SK, Dreesen O, Errington J, Fillinger S, Foster SJ, Fujita Y, Galizzi A, Gardan R, Eschevins C, Fukushima T, Haga K, Harwood CR, Hecker M, Hosoya D, Hullo MF, Kakeshita H, Karamata D, Kasahara Y, Kawamura F, Koga K, Koski P, Kuwana R, Imamura D, Ishimaru M, Ishikawa S, Ishio I, Le Coq D, Masson A, Mauël C, Meima R, Mellado RP, Moir A, Moriya S, Nagakawa E, Nanamiya H, Nakai S, Nygaard P, Ogura M, Ohanan T, O'Reilly M, O'Rourke M, Pragai Z, Pooley HM, Rapoport G, Rawlins JP, Rivas LA, Rivolta C, Sadaie A, Sadaie Y, Sarvas M, Sato T, Saxild HH, Scanlan E, Schumann W, Seegers JF, Sekiguchi J, Sekowska A, Séror SJ, Simon M, Stragier P, Studer R, Takamatsu H, Tanaka T, Takeuchi M, Thomaidis HB, Vagner V, van Dijl JM, Watabe K, Wipat A, Yamamoto H, Yamamoto M, Yamamoto Y, Yamane K, Yata K, Yoshida K, Yoshikawa H, Zuber U, Ogasawara N. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U SA.*100 (8):4678-83, 2003.
42. Commichau FM, Rothe FM, Herzberg C, Wagner E, Hellwig D, Lehnik-Habrink M, Hammer E, Völker U, Stülke J. Novel activities of glycolytic enzymes in *Bacillus subtilis*: interactions with essential proteins involved in mRNA processing. *Mol Cell Proteomics.* 8(6):1350-60, 2009.

43. Stover Patrick J. Physiology of Folate and Vitamin B12 in Health and Disease. Nutrition Reviews. v. 62, n. 6, 2004.
44. Suh, Jae Rin, Herbig A Katherine, and Stover J Patrick. New perspectives on Folate catabolism. Annu. Rev. Nutr.v.21,p.255-282, 2001.
45. Stover PJ, Field MS. Trafficking of intracellular folates. Adv Nutr. 2(4):325-31, 2011.
46. Bermingham A, Derrick JP. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. BioEssays.v. 24, p. 637-648, 2002.
47. Gonen N, Assaraf YG. Antifolates in cancer therapy: structure, activity and mechanisms of drug resistance. Drug Resist Updat.15(4):183-210,2012.
48. He Z, Toney MD. Direct detection and kinetic analysis of covalent intermediate formation in the 4-amino-4-deoxychorismate synthase catalyzed reaction. Biochemistry. 18;45(15):5019-28, 2006.
49. Goulding C.W, Apostol M.I, Sawaya M.R, Phillips M, Parseghian A, Eisenberg D. Regulation by oligomerization in a mycobacterial folate biosynthetic enzyme. J Mol Biol.v.72,p. 349-361, 2005.
50. Hennig M, D'arcy A, Hampele I.C, Page M.G, Oefner C, Dale G.E. Crystal structure and reaction mechanism of 7,8-dihydroneopterin aldolase from *Staphylococcus aureus*. Nat Struct Biol .v. 5, p.357-362,1998.
51. Bauer S, Schott AK, Illarionova V, Bacher A, Huber R, Fischer M. Biosynthesis of tetrahydrofolate in plants: crystal structure of 7,8-dihydroneopterin aldolase from *Arabidopsis thaliana* reveals a novel adolase class. J Mol Biol. 339(4):967-79, 2004.
52. Garçon A, Levy C, Derrick JP. Crystal structure of the bifunctional dihydroneopterin aldolase/6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase from *Streptococcus pneumoniae*. J Mol Biol. 360(3):644-53, 2006.
53. Porollo A, Meller J. Versatile annotation and publication quality visualization of protein complexes using POLYVIEW-3D. BMC Bioinformatics. 8:316, 2007.
54. Mathis JB, Brown GM. The biosynthesis of folic acid. XI. Purification and properties of dihydroneopterin aldolase. J Biol Chem. 10;245(11):3015-25, 1970.
55. Stephen M. Dean, William A. Greenberg and Chi-Huey Wong. Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis. Advanced Synthesis & Catalysis.4:349(8-9):1308-1320, 2007

56. Czekster CM, Blanchard JS. One substrate, five products: reactions catalyzed by the dihydroneopterin aldolase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Am Chem Soc.* 134(48):19758-71, 2012.
57. Wang Y, LI Yue, AND Yan Honggao (a). Mechanism of Dihydroneopterin Aldolase: Functional Roles of the Conserved Active Site Glutamate and Lysine Residues. *Biochemistry*.v.45, p.15232-15239, 2006.
58. Wang Y, Scherperel G, Roberts K.D, Jones A.D, Reid G.E, Yan H.G (b) A point mutation converts dihydroneopterin aldolase to a cofactor-independent oxygenase. *J Am Chem Soc.* v.128, p.13216-13223, 2006.
59. Pribat A, Blaby IK, Lara-Núñez A, Gregory JF 3rd, de Crécy-Lagard V, Hanson AD. FolX and FolM are essential for tetrahydromapterin synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 192(2):475-82, 2010.
60. Ikemoto K, Sugimoto T, Murata S, Tazawa M, Nomura T, Ichinose H, Nagatsu T. (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-monapterin from *Escherichia coli*, a novel natural unconjugated tetrahydropterin. *Biol Chem.* 383(2):325-30, 2002.
61. Sanders WJ, Nienaber VL, Lerner CG, McCall JO, Merrick SM, Swanson SJ, Harlan JE, Stoll VS, Stamper GF, Betz SF, Condroski KR, Meadows RP, Severin JM, Walter KA, Magdalinos P, Jakob CG, Wagner R, Beutel BA. Discovery of potent inhibitors of dihydroneopterin aldolase using CrystaLEAD high-throughput X-ray crystallographic screening and structure-directed lead optimization. *J Med Chem.* 47(7):1709-18, 2004.
62. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 12(5):371-87, 2013.
63. Duggan S, Rait C, Platt A, Giese S. Protein and thiol oxidation in cells exposed to peroxy radicals is inhibited by the macrophage synthesized pterin 7,8-dihydroneopterin. *Biochim Biophys Acta.* 1591(1-3):139-145, 2002.
64. Wirleitner B, Obermoser G, Böck G, Neuraüter G, Schennach H, Sepp N, Fuchs D. Induction of apoptosis in human blood T cells by 7,8-dihydroneopterin: the difference between healthy controls and patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* ;107(3):152-9, 2003.
65. Contreras H, Joens MS, McMath LM, Le VP, Tullius MV, Kimmey JM, Bionghi N, Horwitz MA, Fitzpatrick JA, Goulding CW. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* nanocompartment and its potential cargo proteins. *J Biol Chem.* 27;289(26):18279-89, 2014.

66. Sutter M, Boehringer D, Gutmann S, Günther S, Prangishvili D, Loessner MJ, Stetter KO, Weber-Ban E, Ban N. Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment. *Nat Struct Mol Biol.* 15(9):939-47, 2008.
67. Méderlé I, Bourguin I, Ensergueix D, Badell E, Moniz-Peireira J, Gicquel B, et al. Plasmidic versus insertional cloning of heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: impact on in vivo antigen persistence and immune responses. *Infect Immun.* 70(1): 303-14, 2002.
68. Sambrook, J.; Russel, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3. ISBN 0-87969-576-5, 2001.
69. Queval CJ, Song OR, Delorme V, Iantomasi R, Veyron-Churlet R, Deboosère N et al. A Microscopic Phenotypic Assay for the Quantification of Intracellular Mycobacteria Adapted for High-throughput/High-content Screening. *J. Vis. Exp.* (83), e51114, 2014.