

PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

LUIZA GALINA

**AVALIAÇÃO DA ENZIMA 3-DESOXI-D-ARABINO-HEPTULOSONATO-7-FOSFATO SINTASE
(DAHPS) COMO UM ALVO MOLECULAR VULNERÁVEL PARA O DESENVOLVIMENTO DE
NOVOS COMPOSTOS ANTIMICOBACTERIANOS**

Porto Alegre
2022

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Luiza Galina

Avaliação da enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato sintase (DAHPS) como um alvo molecular vulnerável para o desenvolvimento de novos compostos antimicobacterianos

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós- Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Coorientador: Dr. Bruno Lopes Abbadi

Porto Alegre
2022

Ficha Catalográfica

G158a Galina, Luiza

Avaliação da enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS) como um alvo molecular vulnerável para o desenvolvimento de novos compostos antimicobacterianos / Luiza Galina. – 2022.

98.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso.

Coorientador: Prof. Dr. Bruno Lopes Abbadi.

1. Tuberculose. 2. Mycobacterium tuberculosis. 3. Vulnerabilidade. 4. Via do chiquimato. 5. CRISPRi. I. Basso, Luiz Augusto. II. Abbadi, Bruno Lopes. III. , . IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

LUIZA GALINA

AVALIAÇÃO DA ENZIMA 3-DESOXI-D-ARABINO-HEPTULOSONATO-7-FOSFATO
SINTASE (DAHPS) COMO UM ALVO MOLECULAR VULNERÁVEL PARA O
DESENVOLVIMENTO DE NOVOS COMPOSTOS ANTIMICOBACTERIANOS

Tese apresentada como requisito
para a obtenção do grau de Doutor
pelo Programa de Pós- Graduação
em Medicina e Ciências da Saúde
da Escola de Medicina da Pontifícia
Universidade Católica do Rio
Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Luis Caetano Martha Antunes - FIOCRUZ/RJ

Dra. Florencia Maria Barbe Tuana – PUCRS

Dr. Maurício Reis Bogo – PUCRS

Dr. André Arigony Souto – PUCRS (Suplente)

Dedico este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

Os capítulos que compõe essa Tese resumem de forma muito simplificada todos os eventos que aconteceram durante esses quatro anos. Foram anos de muito trabalho, dedicação e de muitas lições aprendidas. Durante o doutorado, muitos experimentos não funcionaram e muitos resultados não saíram como o esperado. Lidar com as frustrações, dúvidas e anseios sem perder a resiliência e persistência são lições valiosas que também se aprende durante o doutorado. Aprende-se muito sobre si mesmo. Concluir essa Tese é a confirmação de que estes quatro anos realmente valeram a pena. Todas as coisas maravilhosas ou ruins que aconteceram e todas as tentativas valeram a pena.

Durante este período estiveram presentes familiares, amigos e colegas que contribuíram de todas as formas, para que esse trabalho fosse finalizado. Agradeço primeiramente aos meus pais Luiz e Alice Galina e ao meu irmão Ulisses Galina por todo o suporte psicológico, afetivo e financeiro, por terem sempre me apoiado e acreditado em mim.

Agradeço aos meus professores Diógenes Santos (*in memoriam*), Luiz Augusto Basso, Cristiano Valim Bizarro e Pablo Machado e ao meu coorientador Bruno Lopes Abbadi por todas as oportunidades dentro do CPBMF, e por terem me orientado, contribuindo para o meu crescimento. Agradeço por toda a paciência, dedicação e amizade. Agradeço também a professora Dra. Tanya Parish, por todo o apoio durante o doutorado-sanduíche, pelas considerações e sugestões durante na correção do artigo científico, e por todas as oportunidades oferecidas.

Agradeço a todos os meus colegas de trabalho. Aos que já saíram do laboratório e aos que permanecem, agradeço por todas as discussões de experimentos, cafés, risadas, parcerias e colaborações. São muitas pessoas que fizeram parte dos meus dias durante o doutorado e citar nomes é injusto, afinal todos foram importantes de certa forma. Porém quero agradecer a Marcia Perello, Natália Sperotto, Fernanda Macchi, Alexia Mattos, Talita Freitas, Alejandro Duque, Laura Calle, Candida Deves e José Eduardo Nunes por todo o auxílio no planejamento e execução dos experimentos, e na discussão dos resultados.

Obrigada por todas as amizades construídas no laboratório, muitas que serão levadas para a vida.

Aos meus amigos, os melhores que eu podia ter cruzado na vida, e que estiveram comigo durante esse período do doutorado, agradeço todo o suporte e amizade: Guilherme Guimarães, Victória Lauffer, Bruna Schroeder, Eduardo Capellesso, Juliana Pestana, Rafael Lugo, Cissa Tarasconi, Bruno Altenhofen, Bruno Kern, Cláudia Daltoé, Gabriel Wagner, Maria Isabel Cavalcante, Estevan Ramalho e Stéfanie Arruda.

Agradeço a vida.

Muito obrigada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade.”

Marie Salomea Skłodowska-Curie

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. O tratamento atual para a TB consiste na administração de quatro antibióticos de primeira-linha, por no mínimo seis meses, causando vários efeitos colaterais, embora efetivo. O surgimento de cepas resistentes aos fármacos é um problema adicional no controle da doença. Dessa forma, novos agentes anti-TB eficazes inclusive para cepas resistentes e mais toleráveis são necessários. As estratégias para o desenvolvimento racional de fármacos baseado em alvos visam desenvolver inibidores que atuem sobre alvos moleculares específicos e essenciais à sobrevivência do patógeno. Além da essencialidade do alvo, determinar a sua vulnerabilidade permite avaliar qual o nível de inibição do alvo é necessário para impactar no crescimento da bactéria. A via metabólica do chiquimato é responsável pela formação do corismato, o qual é precursor de vários compostos aromáticos biologicamente importantes para a sobrevivência do bacilo. A via do chiquimato tem sido estudada para identificação de alvos para o desenvolvimento de herbicidas e antibióticos, visto que essa é uma rota metabólica ausente em mamíferos. A essencialidade da via em *M. tuberculosis* foi comprovada em estudos anteriores, indicando que as enzimas nela presentes possam ser alvos promissores para o desenho racional de fármacos. A enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato sintase (DAHPS), codificada pelo gene *aroG*, é responsável pelo primeiro passo chave da via do chiquimato e representa um potencial alvo molecular para ação de inibidores. O objetivo principal dessa tese foi determinar a vulnerabilidade da enzima DAHPS de *M. tuberculosis* (*MtbDAHPS*) em diferentes contextos de crescimento bacteriano. Os resultados obtidos demonstraram que o silenciamento do gene *aroG* pelo sistema CRISPRi é capaz de inibir o crescimento do bacilo em condições ideais de cultivo e em macrófagos infectados. Os dados apresentados nesta tese evidenciam que o gene é vulnerável nos contextos experimentados, indicando a proteína *MtbDAHPS* como um alvo factível para o desenho de inibidores, podendo assim contribuir para o desenvolvimento de novos agentes anti-TB. Além disso, o estudo contribuiu para um melhor entendimento sobre a via de biossíntese de compostos aromáticos e da fisiologia do bacilo.

Palavras-chave: Tuberculose. *M. tuberculosis*. Vulnerabilidade. Via do chiquimato. *aroG*. Silenciamento gênico. CRISPRi.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a disease caused mainly by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*. The current treatment for TB consists of four first-line antibiotics for at least six months, which leads to adherence issues and the emergence of drug-resistant *M. tuberculosis* strains. Therefore, anti-TB agents effective against drug-resistant strains and more tolerable by the human host are needed. Target-based approaches to the rational drug development ought to identify potential molecular targets that are essential for the pathogen survival. Besides the target essentiality, determining the vulnerability of the target allows us to assess what level of target inhibition is necessary to impact bacterial growth. The shikimate pathway is responsible for the biosynthesis of chorismate, which is the precursor of several essential aromatic compounds required for the bacillus growth. As this metabolic pathway is absent in mammals, the shikimate pathway has been studied to identify targets to develop herbicides and antibiotics. The essentiality of the pathway in *M. tuberculosis* was confirmed in previous studies, indicating the enzymes present in the pathway as promising targets for the rational design of drugs. The enzyme 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (DAHPS), encoded by the *aroG* gene, is responsible for the first key step of the shikimate pathway and represents a potential molecular target for inhibitors. The main objective of this thesis was to determine the vulnerability of the enzyme DAHPS from *M. tuberculosis* (*MtbDAHPS*) in different infection contexts. The results showed that the silencing of the *aroG* gene by the CRISPRi system is capable of inhibiting the growth of the bacillus under normal growth conditions and in infected macrophages, proving the vulnerability of *aroG* in the tested contexts, thereby indicating the *MtbDAHPS* protein as a target for the design of inhibitors and hence the development of new anti-TB agents. In addition, the study contributes to a better understanding of the biosynthesis of aromatic compounds and the bacillus physiology.

Keywords: Tuberculosis. *M. tuberculosis*. Vulnerability. Shikimate pathway. *aroG* Gene silencing. CRISPRi.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

| | |
|---|----|
| 1. Introdução..... | 15 |
| 1.1 Aspectos gerais da tuberculose | 15 |
| 1.2 Epidemiologia da tuberculose | 18 |
| 1.3 Tratamento e resistência aos fármacos | 21 |
| 1.4 Desenvolvimento de novos fármacos | 22 |
| 1.5 Validação de novos alvos – essencialidade e vulnerabilidade..... | 25 |
| 1.6 Via metabólica do ácido chiquímico..... | 30 |
| 1.7 A enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato sintase (DAHPs) de <i>M. tuberculosis</i> (<i>Mt</i> DAHPs)..... | 34 |
| 2. Objetivos | 41 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 41 |
| 2.2 Objetivos específicos | 41 |

CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| 3. Manuscrito submetido ao periódico mBIO..... | 43 |
|--|----|

CAPÍTULO III

| | |
|---|----|
| 4. Nocaute do gene <i>aroG</i> | 70 |
| 4.1 Construção de plasmídeos e de cepas <i>M. tuberculosis</i> H37Rv Δ <i>aroG</i> complementadas..... | 70 |
| 4.2 Construção de plasmídeos e cepas <i>M. tuberculosis</i> H37Rv nocaute para o gene <i>aroG</i> | 72 |
| 4.3 Geração de mutantes pontuais do gene <i>aroG</i> | 74 |
| 5. Resultados parciais do nocaute do gene <i>aroG</i> | 75 |
| 5.1 Construção de plasmídeos | 75 |
| 5.2 Complementação e nocaute | 76 |
| 6. Expressão e purificação da proteína <i>Mtb</i> DAHPs | 78 |
| 6.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes com mutações pontuais | 79 |
| 6.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC- MS/MS) | 81 |
| 7. Resultados parciais da expressão e purificação da proteína <i>Mtb</i> DAHPs selvagem e mutante | 81 |

CAPÍTULO IV

| | |
|------------------------------|----|
| 8. Considerações Finais..... | 86 |
| 9. Perspectivas..... | 89 |

| | |
|-----------------------|----|
| 10. Referências | 90 |
| 11. Anexos | 97 |



CAPÍTULO I

Introdução

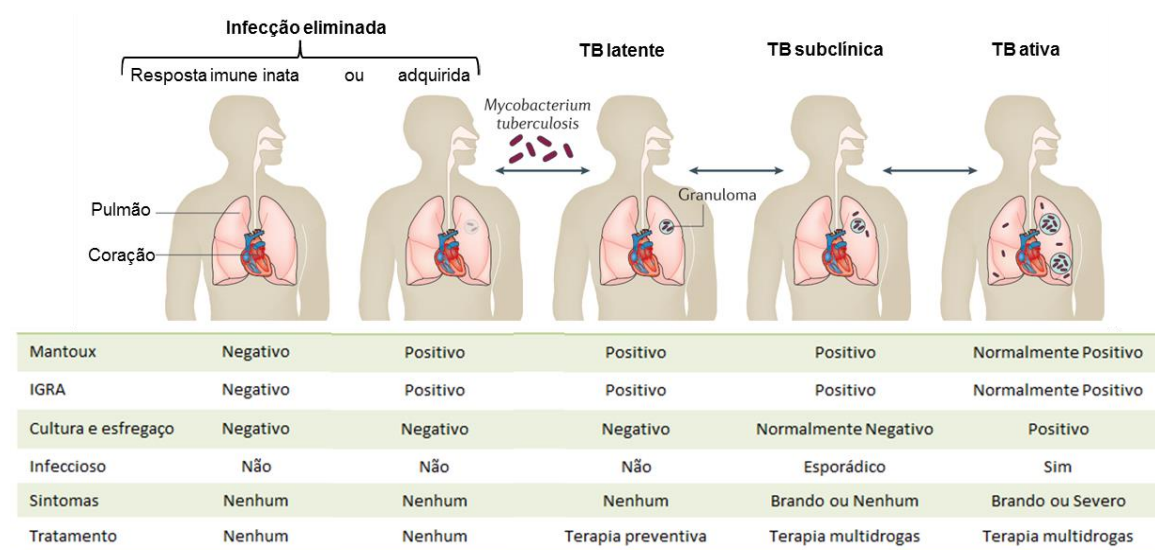
Objetivos

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais da tuberculose

A tuberculose (TB) humana é uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Embora o patógeno possa infectar outros tecidos como a pleura, os linfonodos, a pele, os ossos e as meninges, o pulmão representa a principal porta de entrada e o local mais importante de manifestação da enfermidade (PAI, M., *et al.*, 2016; LEE, J., 2015). O processo de infecção da TB é regulado essencialmente pela integridade do sistema imune do hospedeiro (Figura 1), o qual pode ter sucesso em eliminar imediatamente o patógeno, condicionar o bacilo a permanecer de forma latente no tecido, ou falhar, resultando no desenvolvimento da doença ativa (DUCATI, Rodrigo Gay *et al.*, 2006). Os pacientes com TB ativa apresentam sintomas como tosse, febre e perda de peso, e o diagnóstico geralmente é dado pela combinação de diferentes exames, como a baciloscopia direta (esfregaço de escarro), o teste tuberculínico (Mantoux), o ensaio de liberação de interferon- γ (IGRA), a cultura para detecção de BAAR (bacilos álcool-ácido resistentes) e testes moleculares (amplificação de ácidos nucléicos). Indivíduos com TB ativa podem ser assintomáticos, sendo descritos por apresentarem a TB subclínica. Os indivíduos infectados podem avançar ou regredir de condição dependendo da situação do seu sistema imune e/ou da associação com outras comorbidades (PAI, M., *et al.*, 2016).

Figura 1. Processo de infecção da TB.



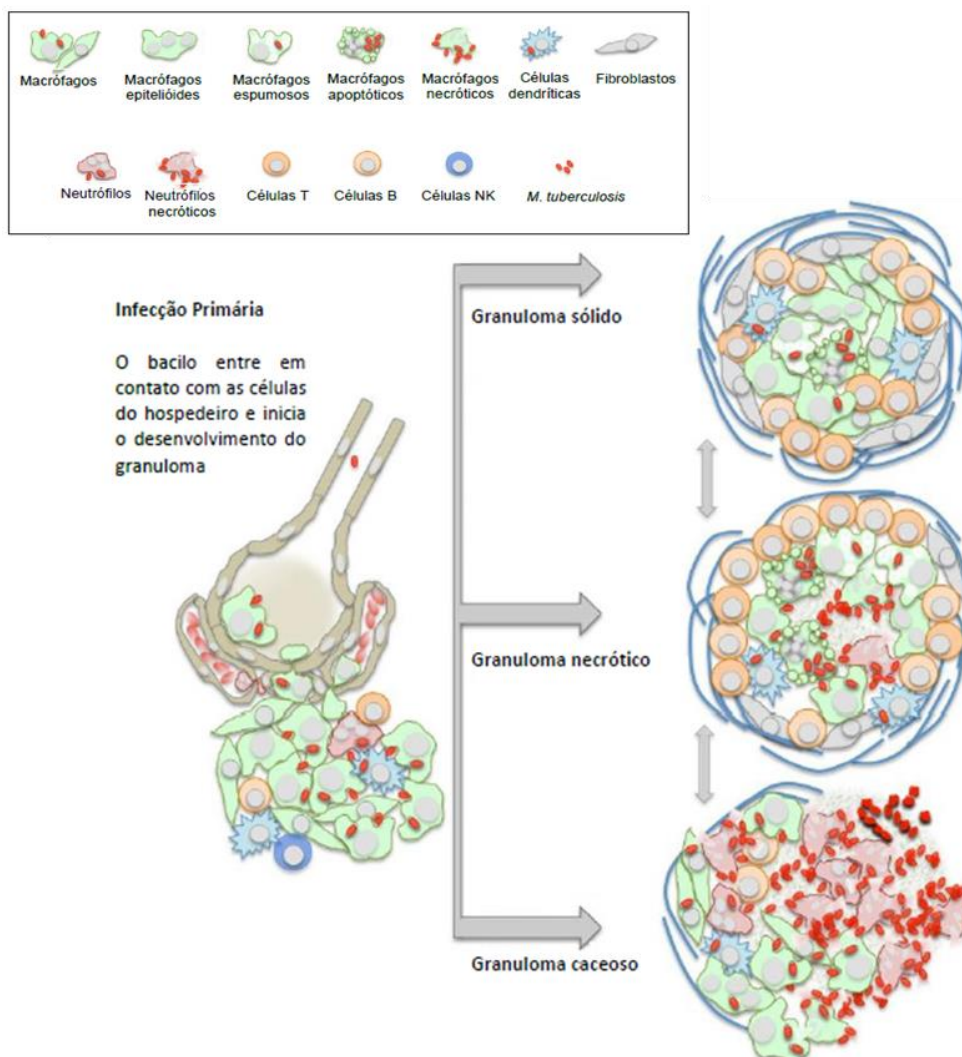
Fonte: Adaptado de PAI, M., *et al.*, 2016.

A transmissão em humanos ocorre pela inalação de aerossóis contendo o *M. tuberculosis* que são expelidos através da tosse ou espirro pelos indivíduos que manifestam a forma ativa da doença. Esses aerossóis podem permanecer por horas na atmosfera, e estima-se que a dose infecciosa (número de organismos necessários para estabelecer a infecção) esteja na faixa de 1 a 10 bacilos (KAUFMANN, S., 2001; RUSSELL, D. *et al.*, 2010). Após ser inalado, o bacilo alcança os alvéolos pulmonares, onde é prontamente fagocitado pelos macrófagos alveolares, monócitos e células dendríticas (PAI, M., *et al.*, 2016). Os macrófagos infectados então atravessam a camada epitelial para alcançar o interstício pulmonar, local em que geralmente se estabelece a infecção primária (YUAN, T. & SAMPSON, N., 2018; KORB, V. C., CHUTURGOON, A. A. & MOODLEY, D., 2016). Este processo induz uma resposta pró-inflamatória levando ao recrutamento de células mononucleares para o sítio de infecção que darão início à formação de um complexo multicelular bastante característico da doença, chamado de granuloma (Figura 2) (RUSSELL *et al.*, 2010; KORB, V. C., CHUTURGOON, A. A. & MOODLEY, D., 2016). Nos estágios iniciais, o granuloma torna-se altamente vascularizado e a produção de quimiocinas pelos macrófagos infectados promove o recrutamento de outros macrófagos, linfócitos e células dendríticas para o sítio da infecção.

O recrutamento celular é acompanhado da diferenciação dos macrófagos em diferentes morfotipos, como as células gigantes multinucleadas, as epitelioides e os macrófagos espumosos. Nesta etapa, a estrutura do granuloma se torna mais estratificada e uma cápsula fibrosa começa a se formar em volta dos macrófagos, excluindo a maioria dos linfócitos do centro do granuloma e dando origem ao chamado granuloma sólido. Nesta estrutura sólida, a carga bacteriana permanece constante e a infecção entra em estado de latência, no qual não há sintomas evidentes, nem transmissão da doença. O *M. tuberculosis* pode persistir em estado de dormência dentro do granuloma por muitos anos e, na maioria dos indivíduos, o sistema imune mantém o patógeno neste estágio, sem que haja progressão da doença para a forma ativa (KORB, V. C., CHUTURGOON, A. A. & MOODLEY, D., 2016; GENGENBACHER, M, & KAUFMANN, S., 2012; ULRICHS, T. & KAUFMANN, S., 2006). À medida que o granuloma se estabelece e a formação da cápsula fibrosa progride, ocorre o aumento no número de macrófagos espumosos, ocasionando o

acúmulo de detritos no centro do granuloma. Isso favorece a necrose do tecido e a formação de um ambiente hipóxico, dando origem ao granuloma necrótico (GENGENBACHER, M, & KAUFMANN, S., 2012). Já no granuloma caseoso, o centro necrótico da estrutura se torna liquefeito, criando uma cavidade no interior do granuloma, e o *M. tuberculosis* volta a tornar-se metabolicamente ativo. O granuloma então perde a solidez e, eventualmente, a estrutura colapsa, liberando os bacilos vivos nas vias aéreas, e o paciente passa a apresentar a sintomatologia da doença (YUAN, T. & SAMPSON, N., 2018). Menos de 10% dos indivíduos infectados irão desenvolver a forma ativa da doença durante a vida. Porém, uma vez que a doença se manifeste e permaneça sem tratamento, será fatal em 50% dos casos (KAUFMANN, S., 2001).

Figura 2. Estágios do desenvolvimento do granuloma tuberculoso.



Fonte: Adaptado de EHLERS, S. & SCHAIBLE, U.E., 2013.

1.2 Epidemiologia da tuberculose

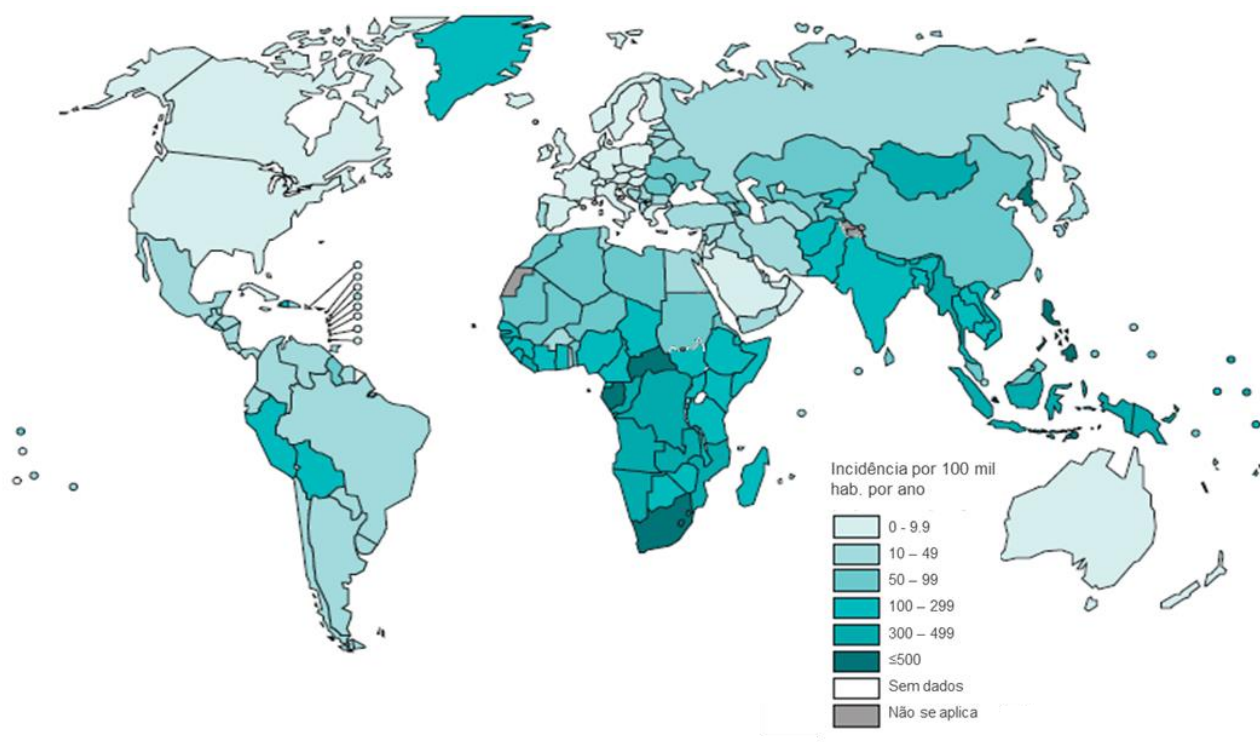
A OMS, no ano de 2015, propôs uma nova estratégia global de combate à TB denominada “End TB”. Essa estratégia consiste em três importantes pilares: (I) prevenção, cuidado integrado e centrado no paciente; (II) políticas arrojadas e sistemas de apoio; e (III) intensificação da pesquisa e inovação. Para que essa estratégia consiga atingir seu objetivo, é necessária a redução de 90% das mortes por TB e de 80% na incidência da doença até 2030, em comparação com o ano de 2015 (WHO, 2021). Entretanto, com o advento da pandemia da COVID-19, o progresso no fornecimento de serviços essenciais para diagnóstico e tratamento da TB foram severamente prejudicados. O maior impacto da pandemia se deu sobre o controle da TB, evidenciado pela queda global no número de pessoas recém-diagnosticadas com TB e notificadas, que passou de 7,1 milhão em 2019 para 5,8 milhão em 2020, retrocedendo aos mesmos índices reportados em 2012. O acesso reduzido ao diagnóstico e ao tratamento resultou em um aumento nas mortes por TB. As melhores estimativas para 2020 (Figura 3) foram de 1,3 milhão de mortes por TB entre pessoas HIV-negativas e um adicional de 214.000 entre pessoas HIV-positivas. O número de mortes total combinado retrocede os esforços contra TB ao nível de 2017. Outros impactos negativos importantes causados pela pandemia de COVID-19 incluem reduções no número de pessoas que receberam tratamento para TB resistente a fármacos e tratamento preventivo, além da queda nos investimentos globais em serviços de diagnóstico, tratamento e prevenção de TB (WHO, 2021). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2020 foram registrados 66.819 casos novos de TB (Figura 4) sendo que 8,4% dos casos novos foram entre pessoas HIV-positivas. Em 2019, foram notificados cerca de 4,5 mil óbitos pela doença em território nacional.

Outros fatores que comprometem o tratamento da TB envolvem a coinfeção TB-HIV, que aumenta o risco da reativação da TB latente em 20 vezes (PAWLOWSKI, A., *et al.*, 2012). A coinfeção TB-HIV tem um profundo efeito sobre as respostas imunes dos pacientes, acelerando a progressão da TB e resultando na morte prematura dos pacientes, se não tratados. Além disso, o principal fármaco na terapia da TB, a rifampicina, é conhecido por ser um potente indutor de enzimas metabolizadoras de fármacos como o citocromo P450 (CYP)3A4. Essa indução

reduz drasticamente os níveis plasmáticos dos fármacos utilizados na terapia do HIV e, dessa forma, os pacientes são frequentemente forçados a completar o tratamento da TB antes de iniciar o tratamento antirretroviral (HOAGLAND, D., *et al.*, 2016; PAWLOWSKI, A., *et al.*, 2012).

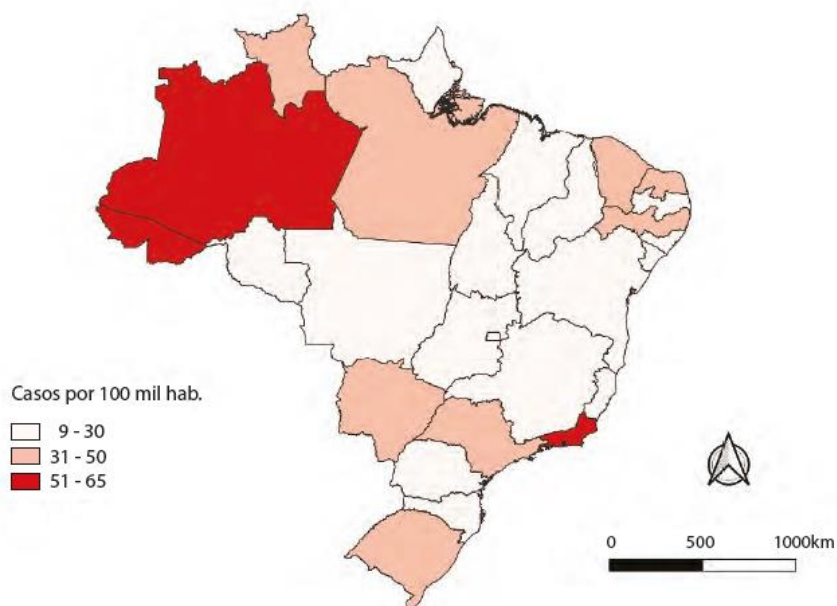
Outro agravante é a coinfeção TB-COVID-19. Embora infecções respiratórias virais e a TB prejudiquem as respostas imunológicas do hospedeiro, ainda há poucas evidências disponíveis sobre essa coinfeção. Entretanto, sabe-se que o status da TB pode desempenhar um papel no desenvolvimento e exacerbação do curso da COVID-19 para a população coinfectada. Um estudo recente (ainda em versão *preprint*) se propôs a realizar uma avaliação transcriptômica sistemática de assinaturas imunes associadas com COVID-19 e o espectro de TB assintomática e sintomática em amostras de sangue total, célula mononuclear de sangue periférico e do fluido de lavagem bronco alveolar. Os dados levantados pelos autores sugerem que a TB subclínica e ativa aumenta o risco de COVID-19 grave, devido ao aumento da abundância de subpopulações mieloides circulantes que são também encontradas nos pulmões de pacientes graves com COVID-19 (SHEERIN, D. *et al.*, 2020). O aumento da produção de IFN tipo I e III nas assinaturas das respostas imunes é regulado positivamente em casos de COVID-19 severa e TB, o que pode levar a progressão da doença e a desfechos graves ou fatais. Além disso, o uso de imunossupressores em casos graves e críticos de pacientes com COVID-19, mesmo que feito por um período limitado de tempo, pode resultar em aumento da probabilidade de TB ativa causada por reativação ou por nova infecção (SHEERIN, D. *et al.*, 2020).

Figura 3. Estimativa da taxa de incidência de casos de TB no mundo no ano de 2020.



Fonte: Adaptado de WHO, Tuberculosis Report 2021.

Figura 4. Coeficiente de incidência de tuberculose (por 100 mil hab.) para o ano de 2020.



Fonte: Adaptado de Secretaria de Vigilância em Saúde, 2021.

1.3 Tratamento e resistência aos fármacos

O tratamento preconizado para tratar a TB ativa e sensível a fármacos compreende um regime de 6 meses ininterruptos com os quatro fármacos de primeira-linha: rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, sendo os dois primeiros meses com uso dos quatro fármacos, seguidos de mais 4 meses com isoniazida e rifampicina apenas. Cerca de 85% das pessoas que recebem e cumprem esse tratamento conseguem se curar da doença (WHO, 2021). A eficácia e o progresso da terapia são normalmente monitorados com exames repetidos de esfregaço, cultura e radiografia de tórax (PAI, M., *et al.*, 2016). O regime de tratamento para a TB latente é variável e as opções indicadas são: uma dose semanal de rifapentina e isoniazida por 3 meses; uma dose diária de rifampicina mais isoniazida por 3 meses; uma dose diária de rifapentina mais isoniazida por 1 mês; uma dose diária de rifampicina por 4 meses; ou uma dose diária de isoniazida por 6 meses ou mais. Esses regimes terapêuticos apresentam vários efeitos adversos como náuseas, cefaleia, febre, dor articular e anemia. Além disso, o extenso tempo de tratamento leva muitos pacientes a abandonarem precocemente o uso dos antituberculares, principalmente após 2-3 meses quando, normalmente, ocorre o desaparecimento dos sintomas no caso da TB ativa. A descontinuação do tratamento favorece a seleção de cepas resistentes aos fármacos e também ao seguimento do ciclo de transmissão da doença (RAWAL, T. & BUTANI, S., 2016; COHEN, A. *et al.*, 2014; WHO, 2021).

A OMS no ano de 2021 atualizou as definições de cepas de TB resistentes, que foram classificadas em cinco categorias: a TB resistente à isoniazida (HR-TB), a TB resistente à rifampicina (RR-TB), a TB multirresistente (MDR-TB, definido como resistência à isoniazida e rifampicina), a TB pré-extensivamente resistente a medicamentos (pré-XDR-TB) e a XDR-TB. A pré-XDR-TB é a TB resistente a rifampicina e qualquer fluoroquinolona, enquanto a XDR-TB é a TB resistente à rifampicina, mais qualquer fluoroquinolona e pelo menos uma das drogas bedaquilina e linezolida. Para pessoas diagnosticadas com cepas resistentes, o tratamento é realizado com fármacos de segunda e terceira linha como fluoroquinolonas (levofloxacino e moxifloxacino), bedaquilina, delamanida, linezolida, clofazimina, pretionamida e ácido p-aminosalicílico. Os tratamentos

podem se estender de 9 até 20 meses, dependendo da resposta do paciente. Esses medicamentos além de possuírem um custo elevado, requerem maior assistência aos pacientes devido aos possíveis efeitos adversos. As taxas de sucesso do tratamento para RR-TB estão na faixa de 50–75% (WHO, 2021).

Atualmente, a única vacina licenciada para prevenção da tuberculose é a Bacilo de Calmette e Guérin (BCG). A vacina BCG foi desenvolvida há 100 anos, previne formas graves de TB em crianças e é amplamente utilizada. Não há vacinas eficazes na prevenção da TB em adultos, embora alguns resultados de ensaios de Fase II do candidato M72/AS01E sejam promissores (WHO, 2021).

1.4 Desenvolvimento de novos fármacos

Diante da gravidade da doença e dos casos de cepas resistentes, faz-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos anti-TB. Os novos candidatos a fármacos devem apresentar, preferencialmente, mecanismos de ação diferentes dos fármacos atuais, possibilitando diminuir o tempo e os efeitos adversos do tratamento, bem como devem ser efetivos contra as diferentes cepas resistentes.

O primeiro sequenciamento completo do genoma de *M. tuberculosis*, em 1998, (COLE, T., *et al.*, 1998) possibilitou o desenvolvimento de novas áreas de pesquisa em TB, como a transcriptômica baseada em microarranjo, a proteômica, a genômica comparativa e a genômica estrutural. Esses avanços ampliaram o entendimento sobre a biologia do *M. tuberculosis* e, conseqüentemente, facilitaram a identificação e a validação de alvos moleculares para a ação de novos inibidores (LECHARTIER, B., *et al.*, 2014). O desenvolvimento de fármacos para TB (Figura 5) pode seguir por duas abordagens principais: a abordagem baseada no alvo (do inglês *target-based* ou *target-to-drug*) e a abordagem baseada na triagem fenotípica (do inglês *phenotypic screening* ou *drug-to-target*).

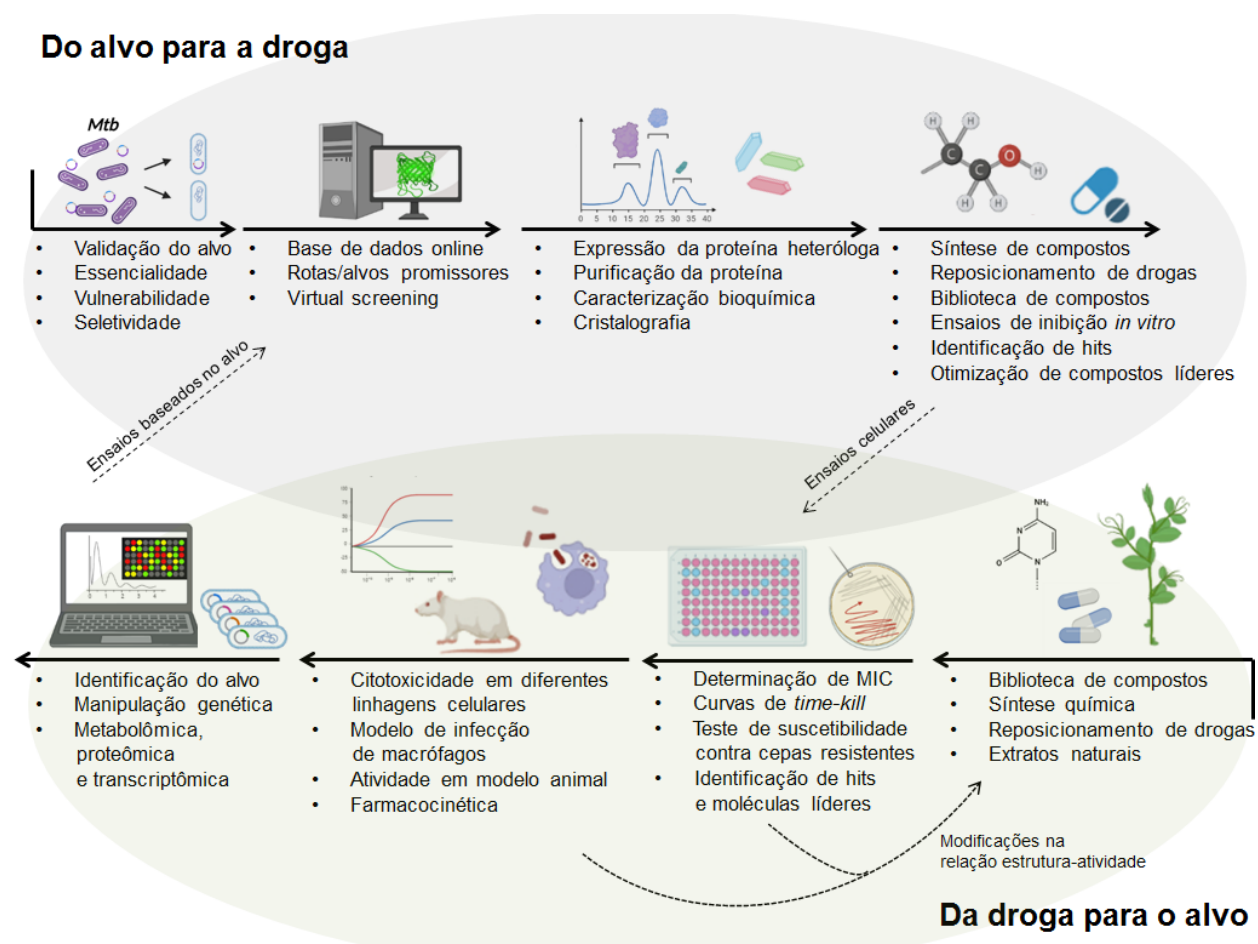
A abordagem baseada na triagem fenotípica requer a disponibilidade de bibliotecas de compostos químicos que são testados contra células de *M. tuberculosis*, replicantes e não-replicantes, em ensaios *in vitro* de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), citotoxicidade em células de mamífero, entre outros. Uma vez encontrado um

composto ativo, faz-se necessário a elucidação do mecanismo de ação e a identificação do alvo molecular do inibidor em questão (SALA C. & RUBEN H., 2011). Todos os fármacos atualmente utilizados para tratamento da TB foram identificados através da abordagem fenotípica, incluindo os medicamentos recentemente aprovados bedaquilina, delamanida e pretonamida (MATSUMOTO, M., *et al.*, 2006; RAKESH, D., *et al.*, 2017; ANDRIES, K., *et al.*, 2005; LECHARTIER, B. *et al.*, 2014). Apesar das abordagens fenotípicas terem sido bem-sucedidas no desenvolvimento de fármacos anti-TB, estas possuem suas limitações e complexidades, que incluem a necessidade de elucidação do mecanismo de ação e do alvo molecular do candidato a fármaco para auxiliar os esforços de otimização pela química medicinal. Embora avanços significativos na genética de micobactérias, biologia química e outras tecnologias tenham fornecido um conjunto de ferramentas que permitem esta identificação, esse processo pode ser bastante complicado, custoso e demorado devido à desconexão frequente entre o mecanismo de resistência de um composto químico identificado e seu mecanismo de ação, bem como compostos que apresentam múltiplos alvos moleculares (SINGH, V. & MIZRAHI, V., 2017).

Por sua vez, a abordagem baseada no alvo envolve a seleção de rotas metabólicas e enzimas que sejam essenciais à sobrevivência do patógeno e que possam servir como alvos para a ação de inibidores. A seleção e a validação dos possíveis alvos moleculares são feitas com base em um conjunto de experimentos, que incluem a expressão e purificação da proteína alvo; ensaios bioquímicos; a determinação da estrutura tridimensional e da função biológica da proteína; a validação *in vitro* da essencialidade e da vulnerabilidade do alvo; e ensaios para triagem de inibidores (LECHARTIER, B., *et al.*, 2014; WEI, J., *et al.*, 2011; DALBERTO, P. F. *et al.*, 2020). Embora ainda não tenham sido obtidos fármacos anti-TB através da abordagem baseada no alvo, a validação genética de genes e enzimas, juntamente com sua detalhada caracterização bioquímica, fornecem uma plataforma sólida para futuros esforços de descoberta de medicamentos (SINGH, V. & MIZRAHI, V., 2017). Técnicas como a geração de mutantes com silenciamento transcricional condicional, também conhecidos como 'hipomorfos', são importantes ferramentas aplicadas na descoberta de medicamentos para TB para validar geneticamente novos alvos e comparar suas vulnerabilidades, avaliando o impacto

da depleção de alvos em *M. tuberculosis in vitro* e *in vivo* (CARROLL, P. *et al.*, 2011; BOLDRIN, F. *et al.*, 2014). Por exemplo, o trabalho de Kolly e colaboradores 2014, realizou o silenciamento condicional da expressão de enzimas da via de decaprenil-fosfo-D-arabinofuranose (DPA) de *M. tuberculosis*, responsável pela biossíntese de polissacarídeos da parede celular do bacilo. Com base nos dados levantados, os pesquisadores estabeleceram a enzima DprE1 como o alvo mais vulnerável da via, evidenciado pelo rápido declínio na viabilidade de *M. tuberculosis in vitro* devido a redução na expressão da DprE1 (KOLLY, G. *et al.*, 2014). Outra enzima da parede celular micobacteriana que foi identificada como alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos anti-TB é a fosfatidil-mioinositol-manosiltransferase (PimA). A essencialidade e a vulnerabilidade da PimA foram confirmadas através da demonstração de que a depleção da enzima exerce um efeito bactericida sobre o *M. tuberculosis* em experimentos *in vitro* e *in vivo*, levando à eliminação completa da infecção nos pulmões de camundongos com o contínuo silenciamento da expressão da PimA (BOLDRIN, F. *et al.*, 2014). Embora alguns potenciais inibidores da enzima PimA tenham sido encontrados pela triagem da biblioteca química *Nested Chemical Library* da Vichem, os compostos não mostraram atividade contra o crescimento de células de *M. tuberculosis* (SIPOS, A. *et al.*, 2015).

Figura 5. Principais abordagens para o desenvolvimento de fármacos anti-TB.



Fonte: Adaptado de Dalberto, P.F., *et al* 2020.

1.5 Validação de novos alvos – essencialidade e vulnerabilidade

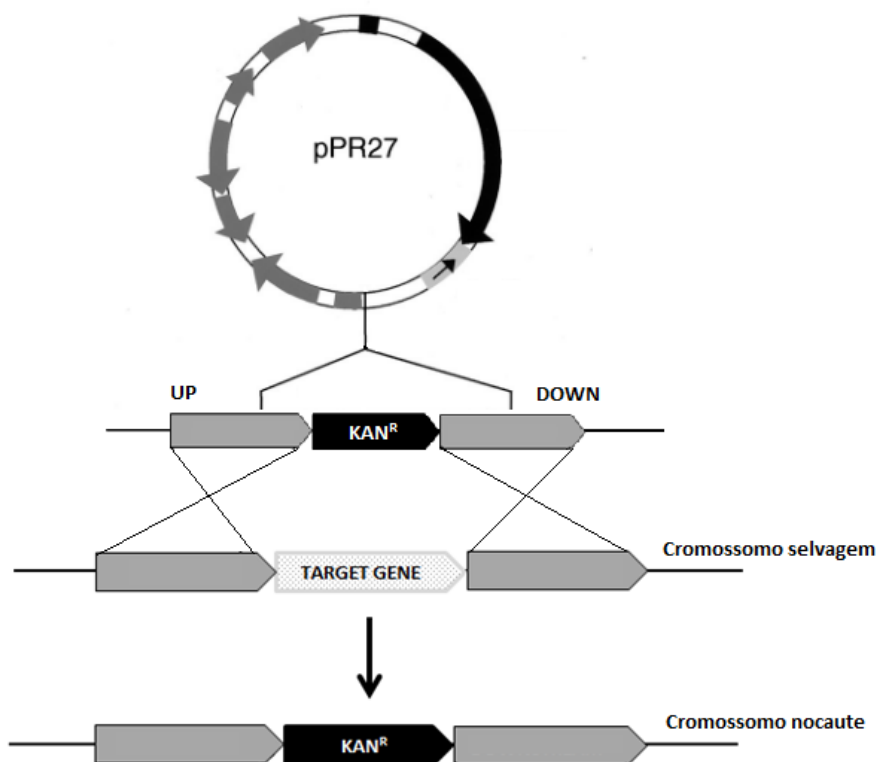
A característica mais óbvia, e crítica, de um alvo molecular é a sua essencialidade para o crescimento e/ou sobrevivência do patógeno no contexto de infecção no hospedeiro humano. Atualmente, diferentes ferramentas genéticas podem ser utilizadas para validar a essencialidade dos genes (e proteínas) micobacterianos. Dentre essas ferramentas, encontra-se o nocaute genético por recombinação homóloga, uma abordagem baseada em genética reversa que permite interromper ou remover, parcial ou completamente, o gene selvagem de interesse. Geralmente essa remoção é acompanhada pela introdução de um marcador seletivo, como um gene de resistência a um antibiótico, para que seja

possível selecionar as células que sofreram o processo de nocaute gênico (JACKSON, M., *et al.*, 2001; SALA C. & RUBEN C., 2011) (Figura 6). Essa abordagem leva à perda funcional do gene, permitindo dessa forma acessar a sua importância para o metabolismo e a sobrevivência do bacilo.

A ausência do alvo pode resultar em efeitos danosos ao metabolismo, tais como o acúmulo de metabólitos intermediários tóxicos ou a perda da homeostase bioenergética, o que pode levar a bactéria à morte celular (YUAN, T. & SAMPSON, N., 2018). Como exemplo de um alvo essencial, pode-se citar o gene *inhA* de *M. tuberculosis* (Rv1484), que codifica a enzima 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase, a qual é alvo do fármaco isoniazida, um dos medicamentos de primeira linha utilizado no tratamento da TB. Nos experimentos de inativação desse gene, observou-se que o acúmulo de ácidos graxos saturados ocasionou alterações na parede celular que, conseqüentemente, provocaram a lise e a morte do patógeno (VILCHÈZE, C., *et al.*, 2000). Nas situações em que a deleção de um determinado gene em ensaios *in vitro* não leva à morte da célula, que, num primeiro momento, seria considerado um gene não-essencial, é primordial avaliar como essa mesma cepa nocauteada se comportará em diferentes condições de cultivo (ex.: depleção nutricional, hipóxia, pH ácido) e num contexto de infecção, uma vez que esse gene pode ser um importante fator de virulência da micobactéria (YUAN, T. & SAMPSON, N., 2018; LECHARTIER, B., *et al.*, 2014; JACKSON, M., *et al.*, 2001; HINGLEY-WILSON, S. *et al.*, 2003). Este é o caso do gene *mgtC* de *M. tuberculosis*, o qual codifica uma proteína de membrana envolvida no transporte de Mg^{2+} . A inativação desse gene não altera o crescimento da bactéria em condições ótimas de cultivo; entretanto, foi demonstrado que o gene é requerido para o crescimento do bacilo em baixas concentrações de Mg^{2+} ou em meio acidificado, assim como para o crescimento eficiente em macrófagos e para virulência da bactéria em camundongos (BUCHMEIER, N., *et al.*, 2000). Como exemplo de gene não essencial podemos citar o gene *deoD* de *M. tuberculosis* (Rv3307) que codifica a enzima purina-nucleosídeo fosforilase. Essa enzima tem sido estudada como um possível alvo molecular para a ação de inibidores em função da importância do metabolismo de purinas no qual atua. O nocaute do gene *deoD*, entretanto, mostrou que a deleção do gene não afeta o crescimento do *M. tuberculosis* em condições de normóxia ou hipóxia, além de não ser necessário para invasão ou para o crescimento do bacilo

em macrófagos, muito provavelmente devido à redundância funcional com outras enzimas das vias de biossíntese de nucleotídeos em *M. tuberculosis* (DALBERTO, P. *et al.*, 2018).

Figura 6. Representação esquemática do evento de recombinação homóloga induzido pela técnica de nocaute gênico.



Fonte: Adaptado de Dalberto, P. *et al.*, 2018. Legenda: UP – região a montante do gene de interesse. DOWN – região à jusante do gene de interesse. TARGET GENE – gene de interesse. KAN^R – gene de resistência à canamicina.

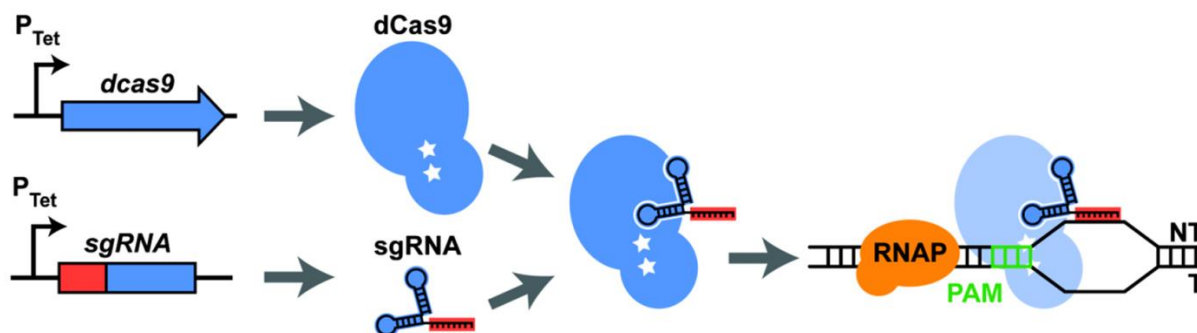
Outra característica fundamental dos alvos moleculares é a sua vulnerabilidade, a qual é definida pelo grau de inibição requerido para causar a morte da célula. Os alvos vulneráveis são aqueles que causam a morte celular mesmo que a inibição da expressão do alvo seja incompleta; alvos não-vulneráveis, por outro lado, requerem valores próximos de 100% de inibição para afetar a viabilidade celular, ou até mesmo a ausência completa do alvo (WEI, J., *et al.*, 2011; REDDY, B. *et al.*, 2014). Assim como para a essencialidade, é crucial determinar a vulnerabilidade do alvo em diferentes condições e estágios de desenvolvimento da doença. Para esse fim, foram desenvolvidas abordagens para definir o grau de

inibição da proteína alvo na célula, a fim de avaliar com mais precisão a vulnerabilidade do alvo em diferentes estágios da infecção pelo *M. tuberculosis*. As abordagens de silenciamento gênico condicional, nas quais a expressão do gene alvo pode ser modulada em diferentes níveis, são consideradas boas ferramentas para avaliar a vulnerabilidade de genes específicos (YUAN, T. & SAMPSON, N., 2018; WEI, J. R. & RUBIN, J. R., 2008).

Entre as abordagens de silenciamento gênico condicional (do inglês *conditional gene knock down*) existentes, encontra-se a estratégia denominada CRISPR de interferência (CRISPRi - do inglês *clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference*). Essa técnica foi recentemente desenvolvida para permitir a modulação da expressão de um gene de interesse através da adição de um indutor, a fim de validar a vulnerabilidade de alvos em *M. tuberculosis* (ROCK, J. *et al.*, 2017). A técnica baseia-se na coexpressão condicional e modulável de dois componentes: (1) uma proteína denominada dCas9Sth1 (do inglês *dead-Cas9*), proveniente da bactéria *Streptococcus thermophilus*, que é cataliticamente inativa, devido à introdução de duas mutações nos seus domínios endonucleolíticos; e (2) uma molécula de RNA fita-simples, denominada RNA guia (do inglês *guide-RNA* ou gRNA), que tem uma sequência de bases complementar a uma das fitas de DNA do gene que deve ser silenciado. A coexpressão dessas moléculas está sob controle de um promotor dependente de anidrotetraciclina (ATc), ou seja, o sistema CRISPRi torna-se ativo e silencia o gene de interesse dentro da célula *apenas* na presença da ATc. Para que ocorra a interação da dCas9Sth1 com a sequência do gene de interesse, é crucial a presença da sequência do protoespaçador PAM (do inglês *protospacer adjacent motif*). A sequência PAM deve estar localizada na fita de DNA oposta àquela que está fazendo pareamento de bases com o sgRNA, logo após a sequência do gene de interesse. O sistema CRISPRi desenvolvido por Rock. J. e colaboradores 2017, descreve diferentes sequências PAMs que interagem com maior ou menor força com a dCas9Sth1. A ligação da dCas9Sth1 ao complexo DNA-gRNA causa um bloqueio na transcrição ao impedir a ligação da RNA polimerase ao promotor do gene (quando o gRNA está ligado a uma sequência dentro do promotor), ou a passagem da enzima pela sequência codificadora do gene (quando o gRNA está ligado a uma sequência dentro do gene) (Figura 7).

Ambas as situações levam à redução da formação do RNA mensageiro e, conseqüentemente, à expressão da proteína (ROCK, J. *et al.*, 2017).

Figura 7. Representação esquemática da abordagem CRISPRi.



Fonte: Adaptado de Rock, J. *et al.*, 2017. Legenda: PTet - Promotor regulado por anidrotetraciclina. dCas9 – proteína Cas9 sem atividade catalítica. sgRNA – RNA-guia. RNAP – enzima RNA-polimerase. PAM – motivo adjacente ao protoespaçador. NT – fita não-molde do DNA. T – fita molde do DNA.

O sistema CRISPRi é uma ferramenta simples e eficiente para investigar e caracterizar a função de genes e alvos moleculares potenciais para o desenvolvimento de inibidores. Esse sistema foi empregado com sucesso para validar a essencialidade e vulnerabilidade de alvos micobacterianos, como, por exemplo, o silenciamento condicional de genes envolvidos na via metabólica do folato (*folA*, *folP1* e *folC*) de *M. smegmatis*, que resultou na inibição do crescimento da bactéria quando o sistema CRISPRi foi ativado, comprovando a vulnerabilidade destes genes em *M. smegmatis* (ROCK, J. *et al.*, 2017). Esse sistema também foi empregado para realizar o silenciamento condicional da proteína de membrana MmpL3 de *M. tuberculosis*, um alvo molecular promissor para o qual foram identificados múltiplos inibidores (MCNEIL, M. & COOK, G., 2019). Neste caso, foi demonstrado que o CRISPRi produz um comprometimento robusto e proporcional em função da repressão do gene *mmpL3*, o que compromete o crescimento micobacteriano e promove a morte bacteriana. Além disso, a repressão deste gene tornou a célula mais suscetível a um inibidor específico da proteína MmpL3, validando o modo de ação deste composto químico (MCNEIL, M. & COOK, G., 2019).

1.6 Via metabólica do ácido chiquímico

A identificação de novos alvos, bem como a validação da sua essencialidade e vulnerabilidade, é um passo necessário para o desenvolvimento racional de novos inibidores pela abordagem baseada no alvo.

Diferentes rotas metabólicas importantes para a fisiologia do *M. tuberculosis* têm sido estudadas para a identificação e seleção de potenciais alvos moleculares que sejam preferencialmente ausentes em humanos (LECHARTIER, B., *et al.*, 2014). Dentre essas rotas, destacam-se as vias de biossíntese de parede celular e ácidos micólicos (KOLLY, G. *et al.*, 2014; HARRISON, J. *et al.*, 2016), as de metabolismo energético (ANDRIES, K., *et al.*, 2005; ZHONG, W. *et al.*, 2019), as de biossíntese de folatos (MINATO, Y., *et al.*, 2015; FALCÃO, V., *et al.*, 2017) e a de biossíntese de anéis aromáticos, a qual envolve uma série de transformações químicas que juntas constituem a via metabólica do chiquimato (BENTLEY, R., 1990; GORDON, S., *et al.*, 2015; NUNES, J., *et al.*, 2020).

A via do chiquimato inicia por uma reação de condensação aldólica entre o fosfoenolpiruvato (PEP) e o D-eritrose 4-fosfato (E4P), catalisada pela enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPS), formando o açúcar 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP) e fosfato inorgânico. O DAHP é subsequentemente convertido, a partir de seis passos enzimáticos, no composto corismato (Figura 8a). A partir do corismato, a via se ramifica em várias vias terminais adicionais que levam à formação dos aminoácidos aromáticos fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp), assim como de outros compostos biologicamente importantes, como as ubiquinonas, os folatos, as naftoquinonas, as menaquinonas e as micobactinas (Figura 8b) (BENTLEY, R., 1990; NUNES, J., *et al.*, 2020).

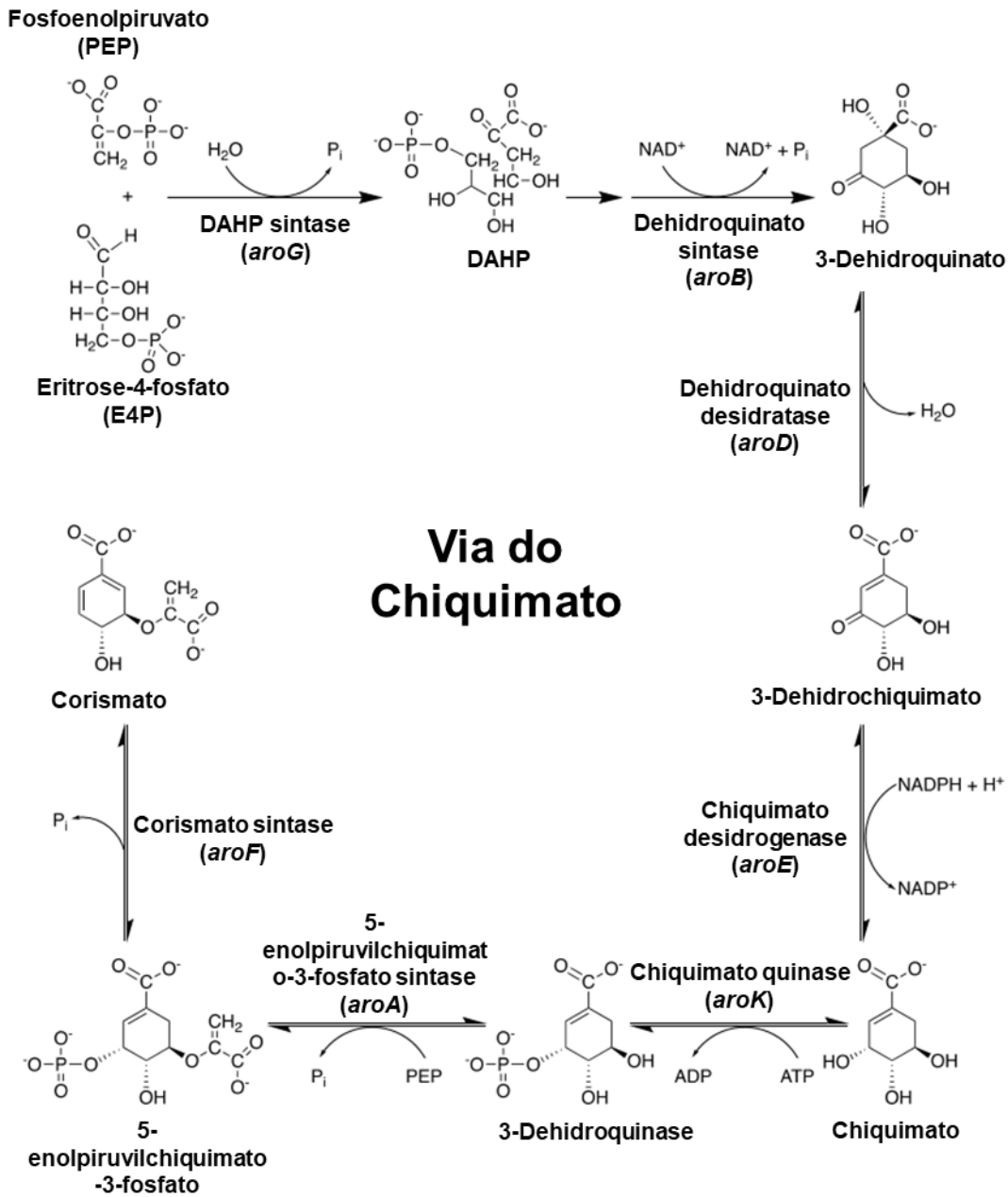
A via do chiquimato e a biossíntese dos aminoácidos aromáticos está presente em bactérias, fungos e plantas, mas não em mamíferos, os quais adquirem seus compostos aromáticos através da dieta. Esse fato torna essa rota metabólica bastante atrativa, visto que as chances de um inibidor para as enzimas dessa via ser tóxico para o hospedeiro humano são reduzidas. De fato, a via do chiquimato tem sido extensivamente explorada em bactérias e plantas como alvo para o

desenvolvimento de novos herbicidas e antibióticos (TZIN, V., *et al.*, 2012; DUCATI, R, *et al.*, 2007).

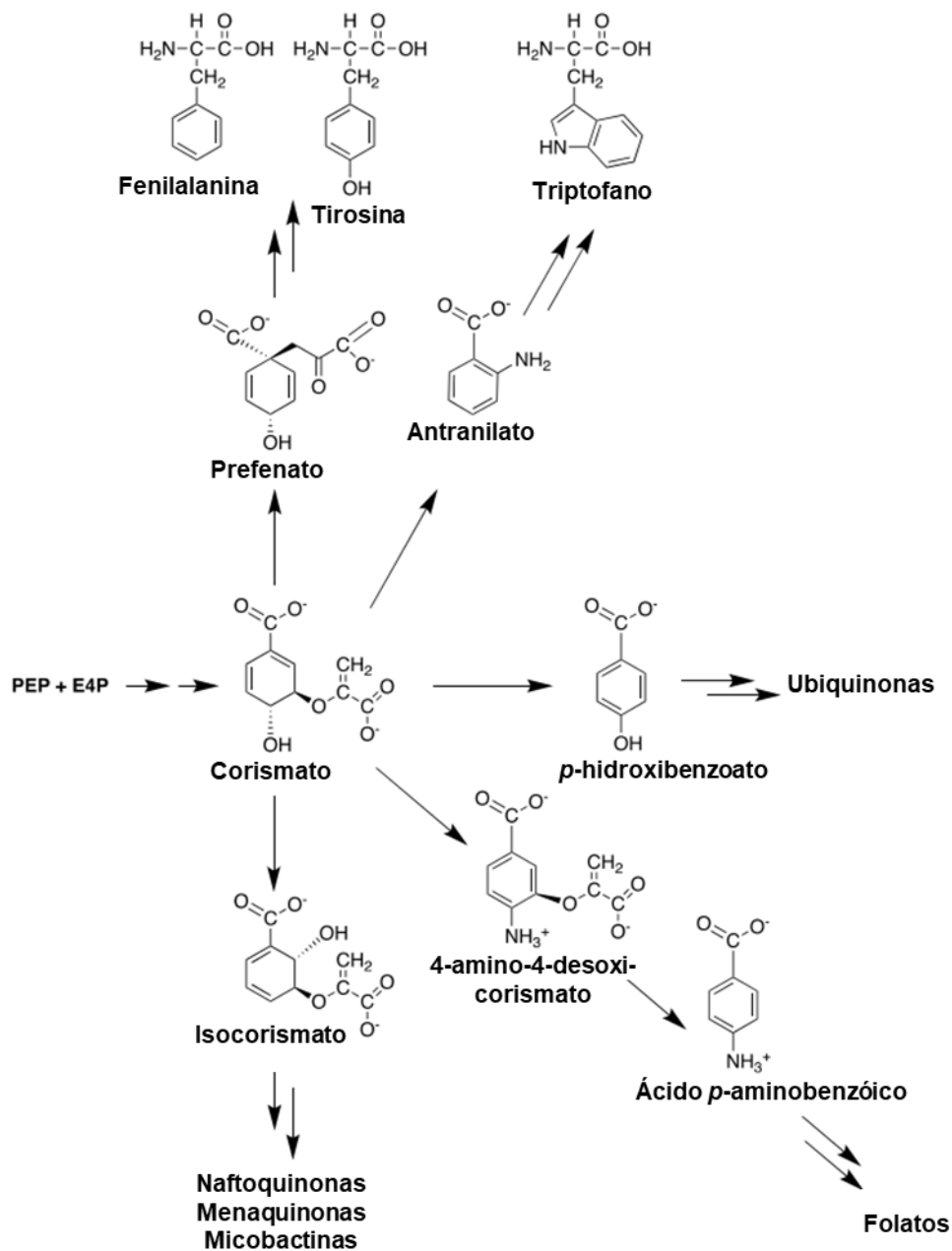
A organização genômica dos genes do *M. tuberculosis* que codificam as enzimas da via do chiquimato revela que os genes *aroQ* (Rv2537c), *aroB* (Rv2538c), *aroK* (Rv2539c) e *aroC* (Rv2540c) estão agrupados em um mesmo operon, enquanto os genes *aroE* (Rv2552c) e *aroA* (Rv3227) fazem parte de operons com outros genes não relacionados à via do chiquimato. O gene *aroG* (Rv2178c), por sua vez, é o único monocistrônico (Figura 9). Em *M. tuberculosis* a deleção do gene *aroK*, que codifica a enzima chiquimato quinase, comprovou que a via do chiquimato é essencial para a viabilidade do bacilo, apoiando a escolha das enzimas envolvidas nesta via como possíveis alvos para o desenvolvimento de novos agentes antimicobacterianos (PARISH, T. & STOKER, N., 2002).

Figura 8. Rota metabólica do chiquimato em *M. tuberculosis*.

a)

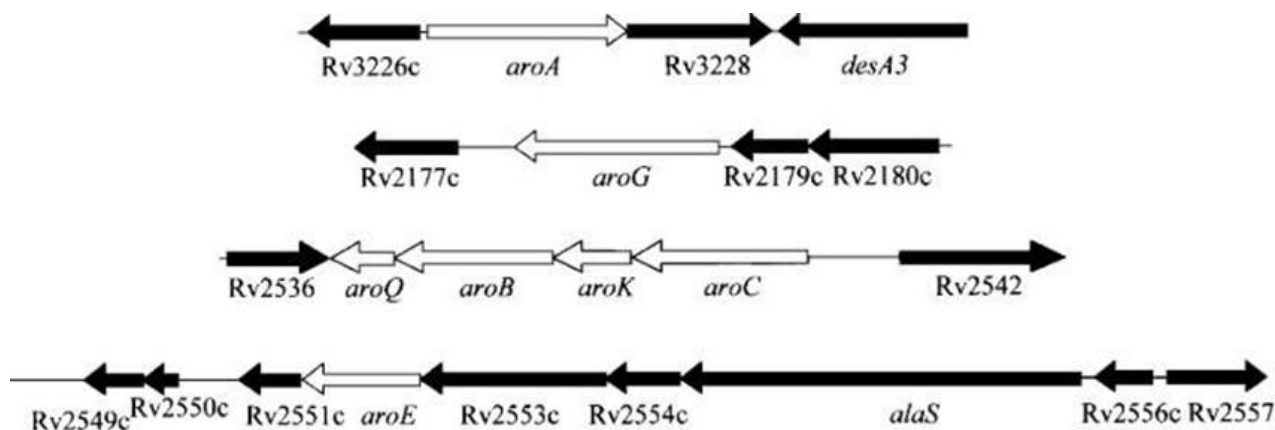


b)



Fonte: Adaptado de Nunes, J., *et al.*, 2020. a) Via do chiquimato. b) Vias terminais adicionais que levam à formação de compostos aromáticos.

Figura 9. Organização genômica dos genes *aro* da rota metabólica do chiquimato em *M. tuberculosis*.

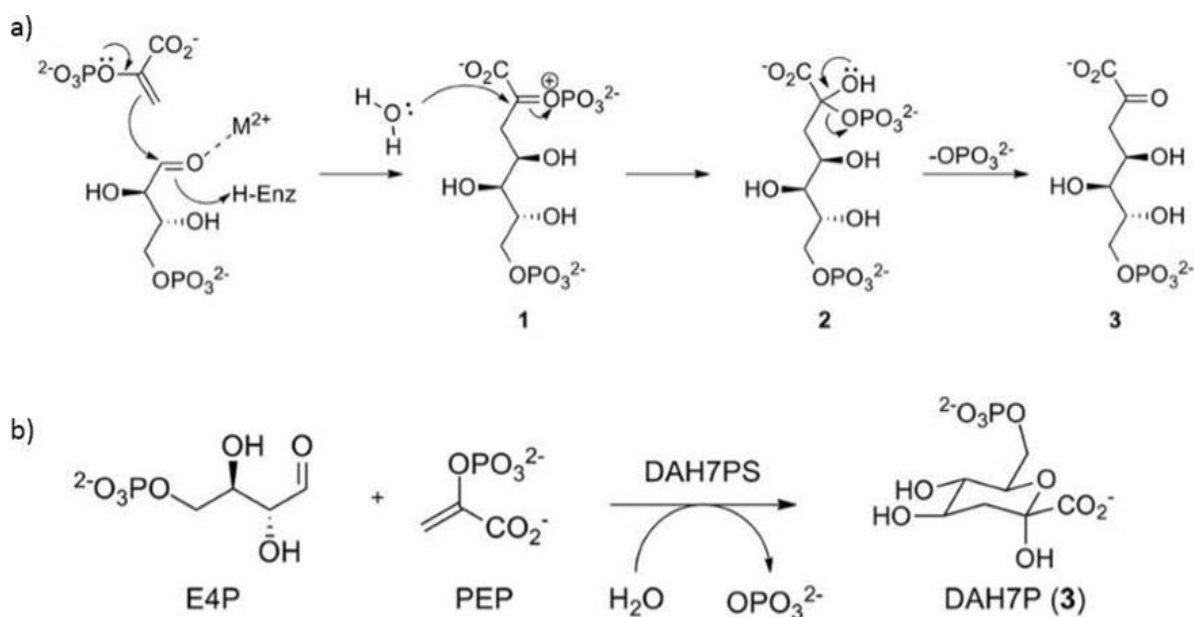


Fonte: Adaptado de Parish & Stoker, 2002.

1.7 A enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase (DAHPs) de *M. tuberculosis* (*MtbDAHPs*)

A reação catalisada pela enzima DAHPs constitui a primeira etapa chave da via do chiquimato para a biossíntese dos aminoácidos aromáticos e de outros metabólitos aromáticos secundários em bactérias, fungos e plantas (HERRMANN, K. & WEAVER, L., 1999). O mecanismo cinético proposto para a reação catalisada pela enzima inicia com um ataque nucleofílico do PEP na porção aldeído da E4P, resultando na formação de um intermediário oxocarbenium **1** (Figura 10). A presença de um íon metálico divalente no sítio ativo da enzima facilita o ataque nucleofílico entre os substratos, sendo, portanto, essencial para a atividade enzimática. O íon oxocarbenium formado é atacado por uma molécula de água presente no sítio ativo para formar o intermediário fosfohemiquetal **2**. O centro estereogênico do intermediário **2** é transitório e esta forma estereoquímica é perdida pela eliminação do fosfato na etapa final da reação para gerar o produto DAH7P **3**. O produto da reação é formado na forma acíclica e após a liberação do sítio ativo da proteína DAHPs, o DAH7P assume a forma cíclica (REICHAU, S. *et al.*, 2011).

Figura 10. Reação catalisada pela enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato sintase.



Fonte: Adaptado de Reichau S. et al 2011. Legenda: a) Mecanismo de condensação entre o PEP com o E4; b) reação catalisada pela enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato sintase.

Análises filogenéticas sugeriram que as enzimas DAHPs podem ser divididas em duas classes: tipo I e tipo II. Baseado em diferenças nas sequências de aminoácidos, as enzimas da classe tipo I são divididas em subtipos ($I\alpha$ e $I\beta$), dependendo da maneira com que elas são reguladas alostericamente. Diferenças sutis na sequência determinam se as enzimas tipo $I\alpha$ são inibidas por fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) ou triptofano (Trp), enquanto a presença ou ausência de extensões nas porções N- ou C-terminais nas enzimas do tipo $I\beta$ estão associadas às enzimas reguladas por Phe/Tyr, por corismato/prefenato ou não são reguladas (LIGHT, S. & ANDERSON, W., 2013).

As enzimas do tipo II, a qual pertence a DAHPs de *M. tuberculosis* (*MtbDAHPs*), apresentam apenas 10% de similaridade de sequência com as do tipo I, as quais são relativamente bem caracterizadas em organismos como *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* (REICHAU, S. et al., 2011). A enzima *MtbDAHPs* é o único membro da classe tipo II estruturalmente já caracterizada. Apesar da baixa similaridade de sequência, ambas as enzimas DAHPs tipo I e tipo II compartilham uma estrutura de barril (β/α)₈ triosefosfato isomerase (TIM) e similaridades no mecanismo catalítico (Figura 10a) (WEBBY, C., et al., 2005). A estrutura

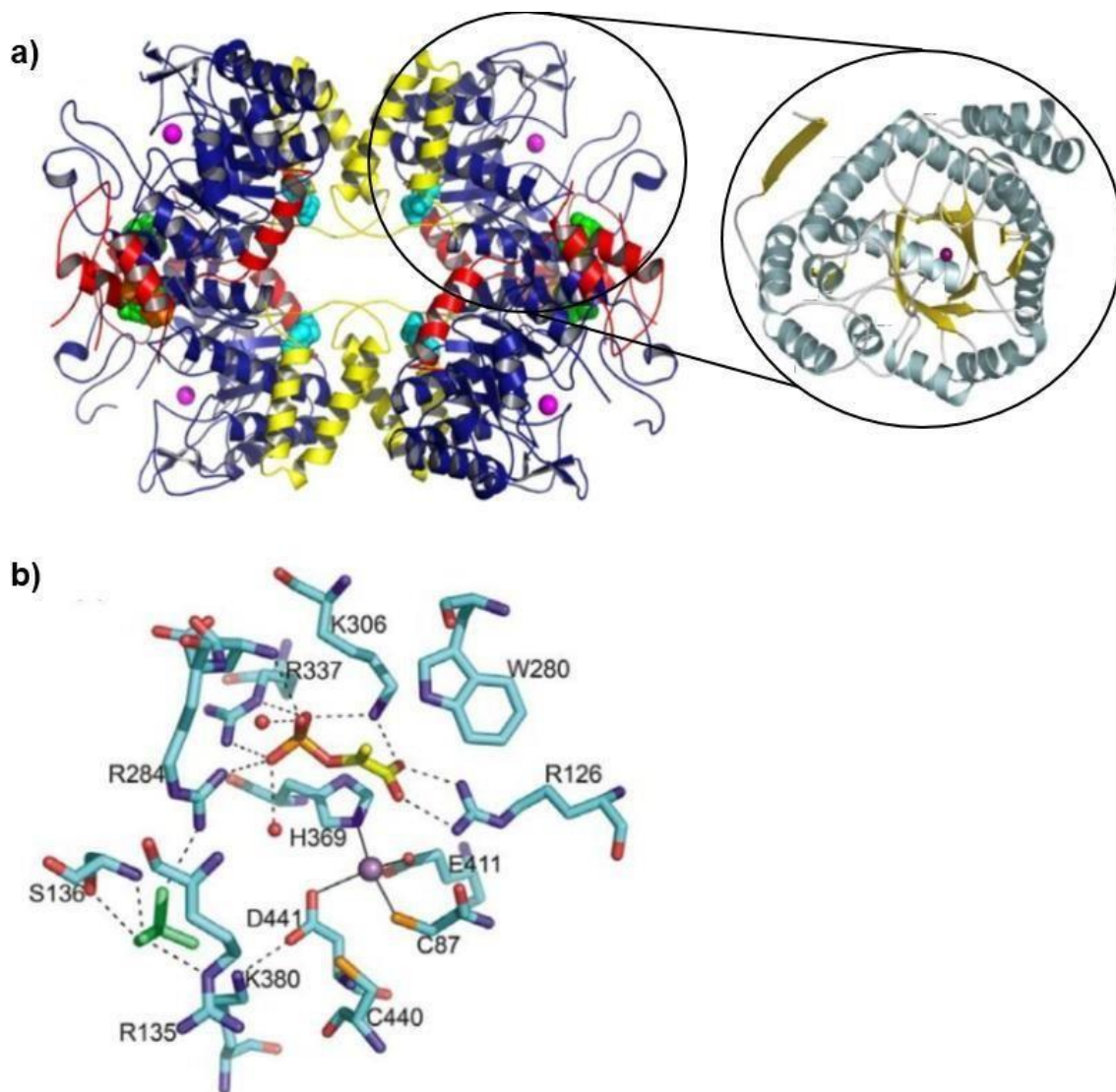
cristalográfica da enzima *MtbDAHPs* revelou que a estrutura quaternária da enzima é um homotetrâmero, cujas interfaces diméricas e tetraméricas são formadas por interações acessórias entre as subunidades do barril $(\beta/\alpha)_8$ TIM. A estrutura cristalográfica também possibilitou a identificação dos possíveis resíduos de aminoácidos do sítio ativo que são essenciais para a catálise, revelando que o sítio de ligação do substrato PEP é definido por uma rede de ligações de hidrogênio entre a proteína e os grupos fosfato e carboxilato da PEP, que usam quase todo o seu potencial de ligação de hidrogênio (WEBBY, C., *et al.*, 2005).

Pela análise da estrutura tridimensional, o grupo fosfato do PEP faz ligações de hidrogênio com os peptídeos da fração NH dos resíduos de aminoácidos arginina 284 (Arg284), ácido glutâmico 283 (Glu283), lisina 306 (Lys306), Arg337 e duas moléculas de água, na qual cada átomo de oxigênio do fosfato recebe pelo menos duas ligações de hidrogênio (Figura 11(b)). O grupo carboxilato do PEP forma uma dupla ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido Arg126 e mais uma ligação de hidrogênio com o grupo 3-amino do resíduo de aminoácido Lys306 e uma molécula de água. Cada átomo de oxigênio do grupamento carboxílico recebe, assim, duas ligações de hidrogênio de geometria favorável para o reconhecimento molecular dos substratos no sítio ativo da enzima (WEBBY, C., *et al.*, 2005).

Também na região do sítio ativo, próximo à sua abertura e a aproximadamente 10 Å de distância da PEP, está ligado um íon sulfato (SO_4^{2-}). Este íon marca a posição provável do grupo fosfato do substrato E4P e faz ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Arg135, Arg284 e serina 136 (Ser136). O resíduo de aminoácido Arg284 fornece uma ponte entre o PEP e o sulfato, sendo um hidrogênio ligado ao grupo fosfato do PEP e outro ao íon sulfato. Contudo, a importância dos resíduos de aminoácidos citados acima para o mecanismo catalítico da enzima *MtbDAHP* ainda não foi demonstrada experimentalmente. Dessa forma, a substituição destes resíduos de aminoácidos, através de experimentos de mutagênese sítio-direcionada, contribuirá para o melhor entendimento do mecanismo químico e catalítico da enzima. Além disso, uma das diferenças mais significativas no sítio ativo da *MtDAHPs*, em relação a enzimas DAHPs da classe tipo I, parece ser a presença do anel aromático do resíduo de aminoácido Trp280 adjacente ao PEP (WEBBY, C., *et al.*, 2005; BLACKMORE, N., *et al.*, 2013).

Entretanto até o momento não foi mostrado se o contato feito pelo PEP com o resíduo de aminoácido Trp280 é importante para o modo de ação da enzima.

Figura 11. Caracterização estrutural da enzima *Mt*DAHPs.

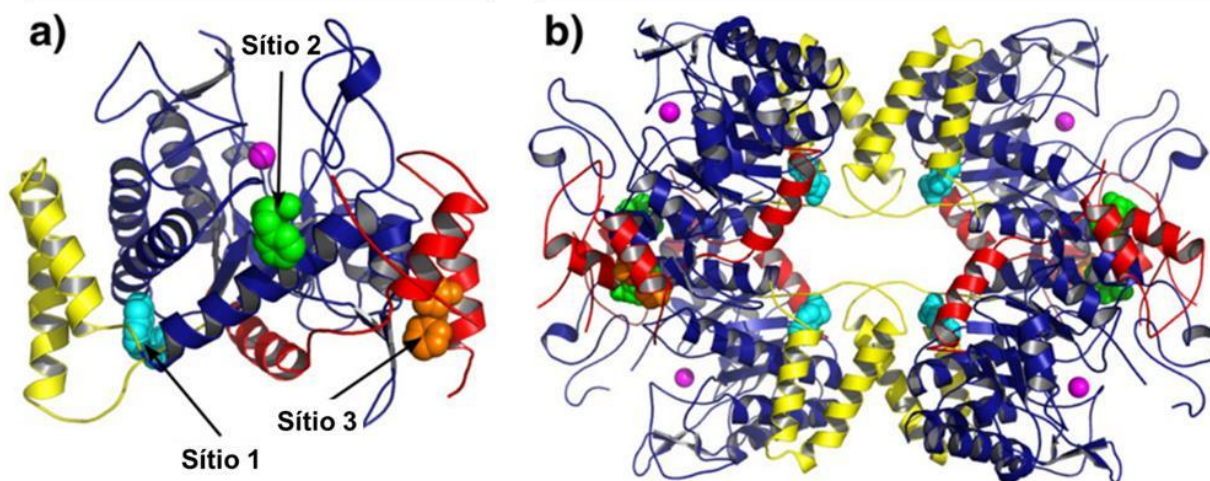


Fonte: Adaptado de Webby, C. et al, 2005 e Blackmore, N. J. et al 2013. Legenda: a) Vista da estrutura tetramérica da proteína *Mt*DAHPs, com detalhe do barril (β/α)8 triosefosfato isomerase (TIM) na estrutura monomérica. A esfera magenta representa o íon metálico divalente, indicando a localização do sítio ativo. b) Visualização do sítio ativo da enzima, mostrando as interações com o íon (esfera magenta), com o substrato PEP (modelo amarelo e laranja em bastão) e o íon sulfato (verde) que marca a provável posição do grupo fosfato do substrato E4P. Moléculas de água são mostradas como pequenas esferas vermelhas. Ligações covalentes são mostradas com linhas pretas finas e ligações de hidrogênio com linhas tracejadas. Os principais resíduos que contribuem para a ligação ao metal, PEP ou sulfato estão marcados.

Estudos prévios já mostraram que a enzima *Mtb*DAHPs é regulada por retroalimentação negativa pelos três aminoácidos aromáticos, os quais interagem

com a proteína através de três sítios distintos (Figura 12a). O sítio 1, ocupado pelo Trp, está localizado na interface tetramérica e é constituído principalmente pelos resíduos de aminoácidos da extensão do loop $\alpha\beta 3$ e da hélice $\alpha 1$. O sítio 2 é ocupado pela Phe e/ou Tyr, e está na interface dimérica, coberto pela folha $\beta 0$ da extensão do N- terminal do barril TIM. O sítio 3 está localizado entre as hélices extra-barril na porção N-terminal (hélices $\alpha 0a$ e $\alpha 0c$) e a hélice $\alpha 3$ do barril principal. Esse sítio é ocupado pela Phe e/ou Tyr, juntamente com o sítio 2 (Figura 12b). (BLACKMORE, N., *et al.*, 2013). A enzima *MtbDAHPs* é alostericamente regulada pelos três aminoácidos aromáticos, sendo que combinações binárias de Trp e Phe (ou Trp e Tyr em menor intensidade) são capazes de inibir a atividade da enzima, enquanto que as ligações dos aminoácidos individualmente apresentam pouco efeito inibitório (WEBBY, C., *et al.*, 2010; BLACKMORE, N., *et al.*, 2013). Outros estudos realizados com a *MtbDAHPs* demonstraram que a enzima forma um complexo enzimático com a enzima corismato mutase, a qual atua no ponto de ramificação que conecta a via do chiquimato e a produção de Phe e Tyr. A corismato mutase liga-se à *MtbDAHPs* através da interface tetramérica para formar um complexo hetero-octamérico, o que provoca um aumento substancial na atividade da enzima corismato mutase (SASSO, S., *et al.*, 2009; MUNACK, S., *et al.*, 2016; JIAO, W. *et al.*, 2017). Esses achados sugerem que a *MtbDAHPs* possui de fato um papel importante na regulação do metabolismo dos compostos aromáticos em *M. tuberculosis*.

Figura 12. Estrutura tridimensional da proteína *MtbDAHPs*.



Fonte: Adaptado de Blackmore, N. J. et al 2013. Legenda: (a) Estrutura monomérica da proteína *MtbDAHPs* em complexo com Phe e Trp (PDB 3KGF). Os sítios 1, 2 e 3 estão indicados. A ligação do Trp no sítio 1 é mostrada como esferas ciano, a Phe no sítio 2 é mostrado como esferas verdes e a Phe no sítio 3 é mostrado como esferas laranja. (b) Homotetrâmero da proteína *MtbDAHPs* em complexo com Phe e Trp (PDB 3KGF). Os elementos extra-barril N-terminal (as hélices N-terminais $\alpha 0a - \alpha 0c$) estão mostrados em vermelho, e as hélices $\alpha 2a$ e $\alpha 2b$ adicionais são mostradas em amarelo. Os íons metálicos do sítio ativo estão mostrados como esferas roxas.

Ensaio de atividade enzimática *in vitro* com mutantes estruturais da *MtbDAHPs*, nos quais o resíduo de aminoácido Arg171 no sítio 2 foi trocado pela alanina (R171A), e o resíduo de aminoácido Arg256 no sítio 3 também foi alterado por uma alanina (R256A), mostraram que ambas as mutações prejudicaram significativamente a ligação da Phe no sítio 2 e a ligação da Tyr no sítio 3, reduzindo o efeito de inibição alostérica causado por esses aminoácidos (BLACKMORE, N., *et al.*, 2013). Por este fato, torna-se interessante avaliar se essas mesmas mutações seriam capazes de gerar alguma mudança fenotípica ou no potencial de virulência do *M. tuberculosis*, muito provavelmente devido a alterações no mecanismo de regulação alostérica controlado pela Phe e pela Tyr. Através da geração de cepas de *M. tuberculosis* com enzimas *MtbDAHPs* mutantes para cada um desses resíduos de aminoácidos (Arg171 e Arg256), será possível compreender melhor a influência da regulação alostérica para a sobrevivência e o desenvolvimento do patógeno.

Caso esses resíduos sejam, de fato, essenciais para o controle alostérico da enzima e/ou mecanismo químico, esses dados poderão contribuir para o planejamento futuro de um inibidor que interaja com esses resíduos de aminoácidos e que seja capaz de inviabilizar o crescimento do bacilo e/ou progressão da TB.

Ensaio de inibição da enzima *MtbDAHPs* realizados utilizando bifosfatos desenhados como análogos simplificados dos substratos da enzima apresentaram resultados promissores, sugerindo que esses análogos possam servir como estrutura líder para o desenvolvimento de moléculas com atividade antimicobacteriana (REICHAU, S. *et al.*, 2011). Além disso, em ensaios *in silico* nos quais a enzima *MtbDAHPs* foi complexada com os compostos α -tocoferol, piridina-3-carboxaldeído e rutina, demonstraram que esses compostos têm atividade inibitória contra a enzima, sugerindo-os como candidatos a inibidores da *MtbDAHPs* (NIRMAL, C., 2015). No entanto, até o momento não foram realizados testes com esses inibidores diretamente sobre o bacilo.

Diante deste panorama, a presente tese propôs-se a validar a enzima *MtbDAHPs* como um alvo molecular para o desenho racional de novos inibidores micobacterianos. Este estudo partiu de um projeto anterior realizado em nosso grupo de pesquisa por Rizzi, C. *et al.* 2005 (RIZZI, C., *et al.*, 2005), que expressou, purificou e caracterizou parcialmente a enzima *MtbDAHPs*. Para dar continuidade a esse trabalho e para aprofundar o conhecimento da importância da enzima *MtbDAHPs* para a sobrevivência e desenvolvimento do *M. tuberculosis*, tanto a essencialidade quanto a vulnerabilidade dessa enzima foram avaliadas por diferentes metodologias.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a enzima 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato sintase de *M. tuberculosis* (*MtbDAHPs*) como um alvo molecular vulnerável para o desenvolvimento racional de novos compostos antimicobacterianos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Construir vetores micobacterianos para o nocaute do gene *aroG* e para a complementação gênica em *M. tuberculosis*;

2.2.2 Construir vetores micobacterianos para o silenciamento condicional do gene *aroG* em *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*;

2.2.3 Avaliar a essencialidade do gene *aroG* e dos resíduos de aminoácidos Lisina306, Arginina337, Triptofano280, Arginina171 e Arginina256 para a atividade catalítica da enzima *MtDAHPs* no contexto celular;

2.2.4 Clonar, expressar e purificar as mutantes estruturais da enzima *MtDAHPs*;

2.2.5 Avaliar a atividade e os parâmetros cinéticos das mutantes estruturais da *MtDAHPs* por meio de ensaios de atividade enzimática *in vitro*;

2.2.6 Padronizar a técnica CRISPRi em cepas *M. smegmatis* mc²155;

2.2.7 Realizar o silenciamento condicional do gene *aroG* pelo sistema CRISPRi em *M. tuberculosis* H37Rv e avaliar os efeitos sobre o crescimento celular em cultura.

CAPÍTULO II

Manuscrito submetido ao periódico mBIO

3. Manuscrito submetido ao periódico mBIO

Os resultados do presente trabalho foram submetidos no periódico *mBIO*, fator de impacto 6.87 (2020). Revista indexada-Qualis A1 (ISSN: 2150-7511).

Evaluation of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (DAHPS) as a vulnerable target in *Mycobacterium tuberculosis*

Luiza Galina^{1,2}, Fernanda S M Hopf^{1,3}; Bruno Lopes Abbadi¹, Nathalia D de Moura Sperotto¹; Alexia M. Czczot^{1,2}; Mario A. Duque-Villegas¹, Marcia Alberton Perello¹, Letícia Beatriz Matter^{1,3}, Eduardo Vieira de Souza¹; Tanya Parish⁴; Pablo Machado^{1,3}; Luiz A Basso^{1,2,3}; Cristiano V Bizarro^{1,3}.

1 Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil;

2 Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90616-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

3 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90616-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

4 Center for Global Infectious Disease Research, Seattle Children's Research Institute, Seattle, WA, United States

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains one of the leading causes of death due to a single pathogen. The emergence and proliferation of multi-drug-resistant (MDR-TB) and extensively drug-resistant strains (XDR-TB) represent compelling reasons to invest in the pursuit of new anti-TB agents. The shikimate pathway, responsible for chorismate biosynthesis, which is a precursor of important aromatic compounds, is required for *Mycobacterium tuberculosis* growth. The enzyme 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase (*MtbDAHPS*) catalyzes the first step in the shikimate pathway and it is an attractive target for anti-tubercular agents. Here we used a CRISPRi system to evaluate the DAHPS as a vulnerable target in *M. tuberculosis*. The silencing of *aroG* reduces significantly the *M. tuberculosis* growth in both rich medium and in infected murine macrophages. The supplementation with

amino acids was only able to partially rescue the growth of bacilli, whereas the Aro supplement (aromix) was enough to sustain the bacterial growth at lower rates. This study shows that *Mtb*DAHPS protein is vulnerable and therefore an attractive target to develop new anti-TB agents. In addition, the study contributes to a better understanding of the biosynthesis of aromatic compounds and the bacillus physiology.

IMPORTANCE

Determining the vulnerability of a potential target allows us to assess whether its partial inhibition will impact bacterial growth. Here we evaluated the vulnerability of the enzyme 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase (DAHPS) from *M. tuberculosis* by silencing the DAHPS-coding *aroG* gene in different contexts. These results could lead to the development of novel and potent anti-tubercular agents in the near future.

Keywords Vulnerability, CRISPRi, *aroG*, Shikimate pathway, macrophages

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB), a disease caused mainly by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*, is one of the leading causes of death worldwide. Until the coronavirus (COVID-19) pandemic, TB was the leading cause of death from a single infectious agent. Unfortunately, the COVID-19 pandemic has reversed years of progress in providing essential services against TB and reducing the disease burden (1). Although TB is a curable disease, the emergence of multi-drug resistant and extensively drug-resistant strains of *M. tuberculosis* require an urgent development and implementation of new drugs for future control of TB (2). The shikimate pathway is essential for the biosynthesis of aromatic compounds in bacteria and others organisms and its absence in mammals makes it an attractive target for the development of antimicrobial agents (3). This pathway has been shown to be essential for the viability of *M. tuberculosis* by the disruption of *aroK* gene, which encodes the shikimate kinase enzyme (4). The first enzyme of shikimate pathway is the 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase (DAHPS). DAHPS catalyzes the first committed step in the shikimate pathway by a

stereospecific condensation of phosphoenolpyruvate (PEP) and D-erythrose 4-phosphate (E4P), forming DAHP and inorganic phosphate, and is a major control point for shikimate pathway flux (5). The *aroG* gene encodes for the DAHPS in *M. tuberculosis* (*MtbDAHPS*) whereas in *M. smegmatis* this enzyme (*MsgDAHPS*) is encoded by the ortholog *MSMEG_4244*. According to a pairwise alignment (6), *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* share 87.3% identity and 94.0% of similarity between the protein sequences, suggesting a high conservation between these organisms (Fig. S1). The *MtbDAHPS* was shown to be negatively feedback regulated by metabolites whose biosynthesis relies on the shikimate pathway, Tryptophan (Trp), Phenylalanine (Phe) and Tyrosine (Tyr), by means of a sophisticated mechanism of allosteric regulation (7,8). Additionally, the *MtbDAHPS* forms an enzymatic complex with the chorismate mutase, which is located at the branch point leading to Phe and Tyr biosynthesis. The interaction between the *MtbDAHPS* and the chorismate mutase results in a significant activation of the latter enzyme (9-11). These findings point toward *MtbDAHPS* playing an important role in regulating the metabolism of aromatic compounds in *M. tuberculosis* and, as a consequence, being an attractive target for drug development. Target-based drug development approaches are primarily based on molecular target essentiality for pathogen survival during the infection in a human host. Another crucial feature of a target is its vulnerability, which is defined by the magnitude of inhibition required to lead the pathogen to death even when the target inhibition is incomplete (12-14). Additionally, the target vulnerability is correlated to the level of drug–target engagement required to generate a pharmacological response (15). Among the methods to validate vulnerable targets, the CRISPRi (clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference) is an efficient tool for generation of gene specific knockdown strains (16), providing a required predictable and titratable reduction of gene expression (17).

Here, we present the results obtained using a CRISPRi system in different culture conditions to evaluate *MtbDAHPS* as a vulnerable target for mycobacterial drug development.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

Escherichia coli DH10B strain was used for all cloning procedures and routinely grown in LB medium (broth and agar), at 37°C. All *M. tuberculosis* strains are derivatives of H37Rv (ATCC 27294) and all *M. smegmatis* strains are derivatives of mc²155. *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* were routinely grown at 37°C in 7H9 supplemented medium (Difco™ Middlebrook 7H9 broth supplemented with 10% oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC; BD, Difco), 0.2% glycerol (MERCK), 0.05% Tween 80 (Sigma-Aldrich), and 25 µg/mL kanamycin (Sigma-Aldrich)), under constant shaking at 100 rpm for *M. tuberculosis* or 180 rpm for *M. smegmatis*. Solid cultures were grown in 7H10 agar supplemented medium (Difco™ 7H10 Agar (BD) supplemented with 10% OADC, 0.5% glycerol, and 25 µg/mL kanamycin at 37°C). For induction of the CRISPRi system, anhydrotetracycline (ATc, Sigma-Aldrich) dissolved in DMSO at 100 ng/mL was added. *E. coli* DH10B cells were transformed by electroporation (200 Ω resistance, 25 µF capacitance, and pulses of 2.5 kV) using 0.2 cm cuvettes. Mycobacterial cells were also transformed by electroporation following standard procedures (18), but the resistance was increased to 1000 Ω. Cultures were allowed to recover in 10 mL 7H9 supplemented medium (see above) for approximately 4 or 24 hours with shaking at 37°C. Cultures were harvested, diluted and plated onto 7H10 agar supplemented medium (see above). Plates were incubated at 37°C for 4 days or 3-4 weeks.

Construction of plasmids for the CRISPRi system

The pLJR962 (*M. smegmatis*) and pLJR965 (*M. tuberculosis*) plasmids, carrying a CRISPR interference (CRISPRi) system developed by Rock et al. and reported in 2017 (16), were kindly provided by Dra. Sarah Fortune (Harvard University – USA).

The small guide RNAs (sgRNA) sequences were identified using an in-house script written in Python and made publicly available in the GitHub repository (https://github.com/Eduardovsouza/sgRNA_predicto). Three small-guide RNAs (named PAM1, PAM2, and PAM3) scaffolds were built for *M. smegmatis* and other three for *M. tuberculosis* to target different regions inside the coding sequence of the *aroG* gene (Rv2178c for *M. tuberculosis* and MSMEG_4244 for *M. smegmatis*), where three different PAM (protospacer adjacent motif) sequences were located

(Fig. 1). PAM sequences selected for *M. smegmatis* were 5'-NNGGAAC-3', 5'-NNAGGAC-3', and 5'-NNAGCAG-3', named as *MsgPAM1*, *MsgPAM2* and *MsgPAM3*, having 51.5X, 25.5X and 11.9X fold repression, respectively, as predicted by Rock, et al. (16). For *M. tuberculosis*, the PAM sequences selected were 5'-NNGGAAG-3', 5'-NNAGCAG-3', and 5'-NNGGCAG-3', named as *MtbPAM1*, *MtbPAM2* and *MtbPAM3*, having 145X, 42.2X and 4.0X fold repression, respectively. sgRNAs targeting the *mmpL3* (MSMEG_0250) or *inhA* (Rv1484) were used as positive controls of the gene silencing technique (see Table 1). A scrambled 22-bp sequence (5'-GGAGACGATTAATGCGTCTCGG-3') not found in the genomes of neither *M. smegmatis* nor *M. tuberculosis* was included as a nontargeting negative control. To clone the variable sequence of the sgRNAs, a pair of complementary primers were designed (20-25 nucleotides in length) to contain 5' overhangs that are able to base pair with Esp3I restriction sites left in the Esp3I-digested plasmids. Recombinant plasmids were checked by DNA sequencing and restriction enzyme digestion. All sgRNA targets and PAM sequences used are listed in Table 1.

Growth curves

Growth curves were performed to monitor the effect of conditional silencing of the target genes on *M. tuberculosis* and *M. smegmatis*.

For *M. tuberculosis*, a single colony of each strain carrying the CRISPRi system was grown in 10 mL of Middlebrook 7H9 broth at 37°C to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.6-0.8. Bacterial cultures were then diluted to a theoretical OD₆₀₀ of 0.07 in fresh Middlebrook 7H9 containing kanamycin. The cultures were then equally divided (16 mL) in two conical tubes of 50 mL, with or without 100 ng/mL ATc before being incubated at 37°C with shaking at 100 rpm. ATc was added to a final concentration of 100 ng/mL every 48 h and bacterial growth was monitored by measuring the OD₆₀₀ for 7 days.

For *M. smegmatis*, a single colony of each *MSMEG_4244*-targeted strain was grown in 5 mL of Middlebrook 7H9 broth containing kanamycin at 37°C for 72 h. These cultures were then diluted (1:200) in fresh Middlebrook 7H9 containing kanamycin and grown overnight. The bacterial cultures were diluted to a theoretical OD₆₀₀ of 0.02 in fresh Middlebrook 7H9 and then equally divided (16 mL) in two

conical tubes of 50 mL with or without ATc 100 ng/mL. Cultures were incubated at 37°C with shaking at 180 rpm and bacterial growth was monitored by measuring the OD₆₀₀ every 3h for 18 hours. The *mmpL3* (*M. smegmatis*) or *inhA* (*M. tuberculosis*)-targeted strain was used as a positive control and the strain containing the sgRNA with the scrambled sequence was used as a negative control.

To evaluate the effect of supplementation with chorismate derivatives in the growth of *M. tuberculosis* *aroG*-targeted strains, growth curves were performed with 50µg/mL of each of L-tryptophan, L-phenylalanine and L- tyrosine and 250 µM each of 4-hydroxybenzoic acid, 4-aminobenzoic acid and 2,3-dihydroxybenzoic acid (aromix supplement) or with 50µg/mL of each L-tryptophan, L-phenylalanine and L-tyrosine only (aa supplement).

These experiments were carried out using the same methodology described above. To cultures without ATc 100 ng/mL of DMSO was added. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA, followed by Bonferroni's post-test, using GraphPad Prism 9.0. Differences were considered significant at the 95% level of confidence. Results were expressed as mean ± standard deviation (SD) of two experimental duplicates from two biological replicates.

The area under the curve (AUC) was calculated using the R package Growthcurver, available for download at Comprehensive R Archive Network (CRAN) (19).

Phenotyping

A single colony of *M. smegmatis* or *M. tuberculosis* strain expressing each *aroG*-targeting sgRNA was grown to log-phase (OD₆₀₀ 0.6-0.8) in 7H9 broth. Then, cultures were diluted in fresh 7H9 broth to a bacterial density of 1,000, 100, 10 and 1 CFU/µL and deposited in isolated 5 µL spots (in triplicates) on 7H10 media with or without ATc 100 ng/mL. Plates were incubated at 37°C for 4 days (*M. smegmatis*) or 21 days (*M. tuberculosis*). Phenotyping experiments with supplementation with aa supplement or aromix supplement was performed using the same methodology.

Macrophage Infection

Macrophage infection experiments were performed based on previously described protocols (20)(21), with some modifications. The macrophage murine cell line RAW 264.7 (obtained from Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil) was cultured in RPMI-1640 medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco) at 37°C with 5% CO₂. Macrophages were seeded in 24-well culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) at a density of 5×10^4 cells/well in RPMI-1640 medium (supplemented with 10% FBS) and incubated for 24 h at 37°C with 5% CO₂. The cells were then washed three times with RPMI-1640 to remove non-adherent cells. Infection of RAW 264.7 cells with CRISPRi *M. tuberculosis* was performed at 1:1 MOI (macrophage:bacteria) for 3 h at 37 °C with 5% CO₂. Afterwards, infected cells were washed twice with pre-warm 1X PBS to remove non-internalized mycobacteria. Cell of the early control (EC) were lysed on the day of infection onset with 1mL of SDS 0.025% (dissolved in sterile 0.9% saline). Lysates were serially diluted and plated in 7H10 containing kanamycin 25 µg/mL for CFU enumeration after 3-4 weeks of incubation at 37°C. Subsequently, the infected cells were maintained in RPMI-FBS medium containing 100 ng/mL ATc for 3 days. After, wells were washed with pre-warm 1X PBS and cells were disrupted with SDS 0.025% to release intracellular bacteria. The supernatant of each well was serially diluted in 1X PBS and spread on 7H10 plates for CFU enumeration after 3-4 weeks of incubation at 37°C. For this experiment, the *inhA*-targeted strain was used as a negative growth control and the strain with the sgRNA containing the scrambled sequence as a positive growth control.

The results were expressed as mean numbers of the logarithms (\log_{10}) of CFU per well, and were evaluated with the one-way ANOVA analysis, followed by Bonferroni's post-test, using GraphPad Prism 9.0. Differences were considered significant at the 95% level of confidence.

mRNA quantification

Cultures of *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* were grown to log phase and then diluted to theoretical OD₆₀₀ value of 0.1. Then, ATc was added at 1, 10, or 100 ng/mL ATc to induce the CRISPRi system. Target knockdown was allowed to

proceed at 37°C under stirring for 9h (*M. smegmatis*) or 3 days (*M. tuberculosis*). Cells from each culture with equivalents OD₆₀₀ values were harvested by centrifugation, suspended in 1 mL of RNA Protect (Qiagen) and kept at -80°C (freezer). The same procedure was performed with the control strain (scrambled_sgRNA) of each mycobacterial species, which were induced with 100 ng/mL of ATc. For the RNA extraction, samples were centrifuged, the bacterial pellet was suspended in RLT Buffer (RNeasy, Qiagen), and cells were disrupted by bead beating (Lysing Matrix B, MP Biomedicals) with 3 pulses of 1 min and 2 min intervals on ice. The next steps for RNA extraction were performed according to the RNeasy kit extraction protocol. Genomic DNA residual contamination was digested with Turbo DNase (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific) and cDNA was prepared with random hexamers following Super Script III First Strand kit instructions (Invitrogen-Life Technologies). Gene expression was evaluated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) specific PrimeTime™ qPCR Probes (Table S1) from ITD (Integrated DNA Technologies) and 7500 cycler (Applied Biosystems). Primers and probes were designed by IDT software (<https://www.idtdna.com/pages/tools>). Signals were normalized with housekeeping sigA and quantified using the Livak and Schmittgen (2- $\Delta\Delta$ Ct) method (22). The statistical analysis was performed using a two-way ANOVA analysis, followed by Turkey's post-test, using GraphPad Prism 9.0. Error bars are 95% of confidence intervals of two experimental duplicates from two biological replicates.

RESULTS

***Growth of M. smegmatis* under *aroG* gene silencing by CRISPRi**

To evaluate the impact of *aroG* gene repression on cell growth in mycobacteria, we first performed CRISPRi experiments using the model organism *M. smegmatis*. We selected three sequences in the nontemplate (NT) strand and located in the first half of *aroG* coding sequence next to functional PAMs to be targeted by three different sgRNAs (Fig. 1A).

The silencing of the positive control gene *mmpL3* led to a strong growth perturbation starting after 9h of bacterial culture (Fig. 2A). As expected, silencing

using the sgRNA containing the scrambled sequence did not affect the growth curve (Fig. 2B). CRISPRi silencing of the *aroG* (*MSMEG_4244*) gene did not induce changes in the growth profile, (Fig. 2C-E). The absence of any growth perturbation caused by the silencing of the *MSMEG_4244* gene was also observed using the phenotyping methodology (see Methods for details). After three days of incubation, no difference between CFUs in the presence or absence of ATc was observed for cultures that had the gene of interest silenced, only for the positive control, *mmpL3* (Fig. 2A-E).

***M. tuberculosis aroG* gene silencing by CRISPRi**

Next, we evaluated DAHPS vulnerability by silencing the *aroG* gene directly in the virulent *M. tuberculosis* H37Rv strain. Similar to the studies with *M. smegmatis*, we selected three sequences in the NT strand in the first half of *M. tuberculosis aroG* coding sequence as targets of sgRNAs (Fig. 1B). As expected, silencing of the *inhA* gene encoding the vulnerable target enoyl-ACP reductase (InhA) lead to a strong growth perturbation after 120 h of induction (Fig. 4A), while silencing with the scrambled sgRNA did not cause any growth defect (Fig. 4B). Interestingly, sgRNAs targeting three different sequences inside the *M. tuberculosis aroG* gene caused a significant arrest in growth seen after 72 h for *MtbPAM1* and 96 h for *MtbPAM2* and *MtbPAM3* (Fig. 4C-E). This growth defect was sustained for at least 168 h (7 days). In accordance with the growth profile in liquid medium, phenotyping on solid medium also resulted in growth retardation in the *inhA*- and *aroG*-knockdown cells, but not in cells expressing the scrambled sgRNA (Fig. 4A-E).

We performed quantitative real-time (qRT-PCR) analysis to investigate the strength of the transcriptional repression on the *M. tuberculosis aroG* gene after induction of the CRISPRi system. The qRT-PCR analysis showed a strong transcriptional repression for all targeted sequences after adding 10 or 100 ng/mL of ATc (Fig. 3). Additionally, we did not observe any difference in *aroG* repression level regardless of the theoretical PAM repression strength.

We also performed CRISPRi-mediated *aroG* silencing experiments in media supplemented with aromatic amino acids (“aa” supplement, see Methods; Fig. 5A, C and E) or with the “aromix” supplement, containing the three amino acids and

additional chorismate derivatives (see Methods for details; Fig. 5B, D and F). Cultures grown in either solid or liquid media showed a partial restoration of growth in the presence of either supplement (Fig. 5 main and insets). Interestingly, bacterial growth was boosted more in the presence of the aa supplement than with the aromix supplement for all strains (Fig. 6). We determined the AUC obtained from all growth curves; in the presence of the aa supplement the AUC increased from 48.86 to 65.49 for PAM1, from 56.28 to 69.26 for PAM2 and from 59.61 to 66.79 for PAM3. In the presence of the aromix supplementation, the AUC was decreased from 48.86 to 45.89 for PAM1, from 56.28 to 43.55 for PAM2 and from 59.61 to 49.91 for PAM3.

Macrophage Infection

To investigate whether the *M. tuberculosis* *aroG*-targeted strains would survive in an environment that more closely resembles the host infection context, we performed CRISPRi silencing in an *in vitro* macrophage model of infection. Murine RAW 264.7 cells were infected with each *aroG*-targeted strain for a period of 3 h, at which point ATc was added to silence gene expression. As shown in Fig. 7C-E, all three *aroG*-targeted strains showed a reduction in CFU ($p < 0.001$) after 3 days of ATc induction. Compared to the cultures without ATc, viability in the presence of ATc was reduced by 42.1% for PAM1, 28.3% for PAM2 and 39% for PAM3. These results suggest that *aroG* silencing jeopardizes *M. tuberculosis* growth in intracellular host conditions. Notably, the *aroG*-knockdown strains showed a similar intracellular growth perturbation pattern to the *inhA*-knockdown strain, which also was unable to sustain growth inside the macrophages (Fig. 7A). As expected, the knockdown strain containing the scrambled sgRNA maintained its viability in the macrophages during all the experiment (Fig. 7B).

DISCUSSION

The gene vulnerability is defined as the level of gene repression needed to lead to a decrease in organismal fitness. Moreover, the target vulnerability is related to the levels of drug-target interaction to achieve the desired pharmacological outcome (14,15). Studies of gene vulnerability have been used to infer the target

vulnerability and select targets in drug discovery efforts. Recently, a CRISPRi-based system was developed to systematically titrate the expression of all annotated genes from *M. tuberculosis* and *M. smegmatis*, and to predict the vulnerability index (VI) of each gene. Those results are available on an online platform (<https://pebble.rockefeller.edu>) (17). The quantification of gene vulnerability expand our understanding upon the *M. tuberculosis* physiology and, therefore, distinguish highly vulnerable genes from highly invulnerable genes for rational drug discovery (17). Nevertheless, it is necessary to evaluate gene vulnerability under different growth environments and conditions. Also, it is important to validate whether the chemical inhibition of the target enzyme could lead to a corresponding impact on fitness, as observed by gene silencing (16,23,24). Gene knockdown approaches such as CRISPRi are worthy tools to investigate target vulnerability, and also provides an easy genetic strategy for the validation of novel drug targets and mechanisms of action that could facilitate the discovery of new anti-TB drug (16,23,24).

We started performing our CRISPRi experiments in *M. smegmatis* as an experimental model for *M. tuberculosis*. The *M. smegmatis* is a saprophytic mycobacterium normally found in soil, water and plants. This bacterium is widely used as an experimental model for mycobacteria, since this organism is considered non-pathogenic and has a generation time of three to four hours, which allows for faster results compared to *M. tuberculosis* (25). In terms of cell biology, this bacillus shows significant differences between *M. tuberculosis*, including alcohol-acid resistance, cell diameter, cell length, surface areas, presence of antigens on the cell surface, volume, total number of ribosomes and ribosome density (26). Due these structural differences, some authors argue that it is not appropriate to use *M. smegmatis* as an experimental model, mainly in the investigation of the pathogenicity or virulence of *M. tuberculosis*, however, it is a good model to study the general biological properties of mycobacteria, such as physiological conditions, stress responses and reactivation of a dormant state (25).

Our results showed that the *aroG* knockdown in *M. smegmatis* did not cause impairment on cellular growth (Fig2C-E). These results are congruent with the recent online vulnerability platform which revealed that *aroG* is, in fact, invulnerable in *M. smegmatis* (VI -0.2050) while *aroG* is a high vulnerable gene in *M. tuberculosis*, with

a VI of -13.3670. Curiously, among the *aro* genes, which compose the shikimate pathway, only *aroB*, *aroK*, *aroA* and *aroF* genes are predicted to have high VI in both bacteria. Additionally, despite 94% sequence similarity between *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* (Fig. S1), there is a marked disparity for essentiality. These observations further reinforce the discussion about the use of the *M. smegmatis* as an experimental model for *M. tuberculosis*, since important differences in the metabolic flux of aromatic compounds were observed. Further investigations would be required on both proteomic and metabolomics spectrums to better understand those differences.

Silencing of the *aroG* gene in *M. tuberculosis* impairs the growth of the bacillus to a significant extent (Fig. 4). According to the vulnerability predictions made by Bosch, B. et al. 2021, the *aroG* in *M. tuberculosis* show a VI of -13.3670 whereas the *inhA*, which encode the target of the first-line drugs for TB, isoniazid, present a VI of -9.9130. These differences in VI values could explain the earlier impact on growth curves in *aroG* than *inhA* in presence of ATc (Fig. 4A and C), as *aroG* possess a higher VI score. The effect of gene silencing on growth curves was confirmed at molecular level with the use of selective probes for qRT-PCR, as shown in Fig. 3. Regardless of the predicted silencing strength of the PAM, a strong effect on *aroG* expression levels was observed at 10 ng/mL of ATc. This correlated with the phenotypic effect where the same reduction in growth rate was seen between the strains.

Interestingly, when supplemented with the aromatic amino acids or the aromix booster, the inhibition of bacterial growth was diminished (Fig. 5). The amino acid absorption from the media can be moderately explained due the fact that *M. tuberculosis* has a homologue *aroP2*, an aromatic amino acid transporter (27). A comparable result was observed by the silencing of the *aroA* gene in *M. smegmatis* (28). This gene encodes the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), the sixth enzyme of the shikimate pathway. The *aroA*-silencing provoked an impairment of bacterial growth within 24h, suggesting that the abrupt reduction in endogenous levels of the EPSPS enzyme does not cause bacterial death, but impairs growth. However, supplementation with only the three amino acids L-tryptophan, L-phenylalanine and L-tyrosine was sufficient to rescue the growth in *aroA*-knockdown cells, implicating that *aroA* from *M. smegmatis* is essential only

when sufficient amounts of L-tryptophan, L-phenylalanine, and L-tyrosine (AroAAs) are not available (28). On knockout studies with the shikimate kinase-encoding *aroK* gene from *M. tuberculosis* it was demonstrated that the essentiality of the mycobacterial shikimate pathway cannot be circumvented by supplementation with aromatic compounds, such as amino acids, p-hydroxybenzoate, p-amino-benzoic acid and 2,3-dihydroxybenzoate (4). Nonetheless, our findings showed the aromix supplement appears to slow the bacilli progress. This could be explained, hypothetically, due the adaptive stress generated by the low expression of the *aroG* gene that makes the strains hypersensitive to the extracellular supply of nutrients, reducing their growth rate even in rich media. Something similar was observed in histidine and tryptophan auxotrophs strains of *M. tuberculosis* that were unable to survive a single-amino-acid starvation but were able to endure long periods of complete starvation (29). Chorismate is the starting substrate for the p-aminobenzoate, p-hydroxybenzoate and isochorismate, leading to folates, ubiquinones, naphthoquinones, menaquinones and mycobactins, respectively, as well as for the pathways leading to phenylalanine, tyrosine and tryptophan. It is feasible that *aroG*-knockdown strains are able to absorb those compounds from the medium or produce them through compensatory routes, in enough quantities to maintain cell growth. Those outcomes suggest that the *aroG* gene is vulnerable, but context and concentration-dependent, since supplying the products from the branches of the shikimate pathway was capable of partially restoring the bacterial growth.

Next, we explore the vulnerability profile of *aroG* during infection in murine macrophages. In infected macrophages and in the granuloma, *M. tuberculosis* encounters different types of stressors imposed by the host immune system, such as nutrient deprivation, low pH and low oxygenation (12). Since the metabolism of the bacterium has to adapt to those changes depending on the context and stage of infection, it is essential to investigate whether the vulnerability of a target is maintained in different scenarios.

In murine macrophages, silencing of *aroG* reduced viable counts to a level similar to that of *inhA* silencing, indicating that decreased DAHPS expression has a strong effect on *M. tuberculosis* survival in macrophages (Fig. 7C-D). These data also suggest that the bacteria cannot obtain aromatic substrates in sufficient quantities to sustain intracellular replication. Therefore, the strong intracellular

growth inhibition displayed by the *aroG*-knockdown strains appears to be a direct consequence of the inhibition of the *MtbDAHPs* enzyme expression.

M. tuberculosis survival inside macrophages relies on the ability of the bacteria to acquire nutrients from the host cell. A systems-based tool for exploring the nitrogen metabolism of intracellular bacteria exposed that *M. tuberculosis* co-metabolizes multiple carbon sources during intracellular growth in the human host cell (30). The macrophages acquire the nitrogen sources Aspartate (Asp), Glutamate (Glu), Glutamine (Gln), Leucine (Leu), Alanine (Ala), and Glycine (Gly) directly from the growth media. *M. tuberculosis* takes Glu/Gln from the macrophage via yet-undefined transporter. Asp and asparagine is accessible to *M. tuberculosis* being uptake from the host macrophages via AnsP1 transporter (31). Leucine/iso-leucine (Leu/Ile) and Valine (Val) are acquired from the host macrophages via unidentified branched chain amino acid, probably an ATP-binding cassette-type transporter. Ala, Gly, and Ser are possibly acquired via D-serine/D-alanine/glycine transporter system. Gln, Val, and Asp were potential nitrogen donors for cellular protein synthesis, with Gln as the principal nitrogen donor in intracellular *M. tuberculosis*. The nitrogen flux analysis study revealed that several amino acids, including Phe and Tyr, are synthesized *de novo* to suit biomass requirements for growth during macrophage infection (30). Analysis of the non-steady state metabolism of carbon in intracellular *M. tuberculosis* demonstrated that the macrophages imported essential amino acids from the RPMI medium but made nonessential amino acids *de novo*, whereas the *M. tuberculosis* amino acids were all synthesized from host-derived substrates (either *de novo* or directly incorporated). The data also showed that the macrophage amino acids Ala, Glu/Gln, Asp contribute to the intracellular nutrition of *M. tuberculosis* (32).

Another study lighted on the mechanisms by which the bacteria survive host CD4-generated stress is through the production of Trp, thus avoiding starvation and death. It was demonstrated that loss or inhibition of the Trp biosynthetic pathway renders *M. tuberculosis* hypersusceptible to IFN- γ -mediated killing within macrophages, both *in vitro* and during infection (33). Consequently, our findings suggest that the *aroG* silencing can compromise fitness of the bacilli and the biosynthesis of chorismate derivate, such as Phe, Tyr and, mainly, Trp, which could make the mycobacteria susceptible to CD4-mediated host defenses as well.

According to our results, the *aroG* gene from *M. tuberculosis* remains vulnerable in this intracellular model. These data together reinforce the view of the *MtbDAHPS* as a promising target for the development of antimicrobial agents.

In conclusion, this study contributes to the understanding of *aroG* function in *M. tuberculosis* and opens a possibility for rational drug design targeting the enzyme *MtbDAHPs*. The inhibition of *aroG* expression was able to reduce *M. tuberculosis* in both rich media and, more importantly, during macrophage infection. This work also points to important differences in metabolic requirements for aromatic compounds between *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*. This in turn highlights the drawbacks of using the mycobacterium *M. smegmatis* as an experimental model in TB research, due to important physiologic and structural discrepancies between both species.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sara Fortune and Jeremy Rock for providing the pLJR962 and pLJR965 plasmids. C.V.B., P.M. and L.A.B. would like to acknowledge financial support given by CNPq/FAPERGS/CAPES/BNDES to the National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (INCT-TB), Brazil (grant numbers: 421703-2017-2/17-1265-8/14.2.0914.1). C.V.B. (310344/2016-6), P.M. (305203/2018-5) and L.A.B. (520182/99-5) are research career awardees of the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001.

References

1. WHO. 2021. Global tuberculosis report 2021.
2. Lechartier B, Rybniker J, Zumla A, Cole ST. 2014. Tuberculosis drug discovery in the post-post-genomic era. *EMBO Mol Med* 6:158–168.
3. Bentley R. 1990. The shikimate pathway—a metabolic tree with many branches. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 25:307–383.
4. Parish T, Stoker NG. 2002. The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 1414:36–3069.
5. Reichau S, Jiao W, Walker SR, Hutton RD, Baker EN, Parker EJ. 2011. Potent

- inhibitors of a shikimate pathway enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*: Combining mechanism- and modeling-based design. *J Biol Chem* 286:16197–16207.
6. Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, Basutkar P, Tivey ARN, Potter SC, Finn RD, Lopez R. 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res* 47:W636–W641.
 7. Webby CJ, Jiao W, Hutton RD, Blackmore NJ, Baker HM, Baker EN, Jameson GB, Parker EJ. 2010. Synergistic allostery, a sophisticated regulatory network for the control of aromatic amino acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 285:30567–76.
 8. Blackmore NJ, Reichau S, Jiao W, Hutton RD, Baker EN, Jameson GB, Parker EJ. 2013. Three sites and you are out: Ternary synergistic allostery controls aromatic amino acid biosynthesis in *mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Biol* 425:1582–1592.
 9. Sasso S, Kvist M, Roderer K, Gamper M, Codoni G, Krengel U, Kast P. 2009. Structure and function of a complex between chorismate mutase and DAHP synthase: Efficiency boost for the junior partner. *EMBO J* 28:2128–2142.
 10. Munack S, Roderer K, Ökvist M, Kamarauskaite J, Sasso S, Van Eerde A, Kast P, Krengel U. 2016. Remote Control by Inter-Enzyme Allostery: A Novel Paradigm for Regulation of the Shikimate Pathway. *J Mol Biol* 428:1237–1255.
 11. Jiao W, Blackmore NJ, Nazmi AR, Parker EJ. 2017. Quaternary structure is an essential component that contributes to the sophisticated allosteric regulation mechanism in a key enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 12:1–21.
 12. Yuan T, Sampson NS. 2018. Hit Generation in TB Drug Discovery: From Genome to Granuloma. *Chem Rev* 118:1887–1916.
 13. Wei JR, Rubin EJ. 2008. The many roads to essential genes. *Tuberculosis* 88.
 14. Wei J-R, Krishnamoorthy V, Murphy K, Kim J-H, Schnappinger D, Alber T, Sassetti CM, Rhee KY, Rubin EJ. 2011. Depletion of antibiotic targets has widely varying effects on growth. *Proc Natl Acad Sci* 108:4176–4181.
 15. Davoodi S, Daryaei F, Chang A, Walker SG, Tonge PJ. 2020. Correlating Drug-Target Residence Time and Post-antibiotic Effect: Insight into Target Vulnerability. *ACS Infect Dis* 6:629–636.

16. Rock JM, Hopkins FF, Chavez A, Diallo M, Chase MR, Gerrick ER, Pritchard JR, Church GM, Rubin EJ, Sasseti CM, Schnappinger D, Fortune SM. 2017. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nat Microbiol* 2:16274.
17. Bosch B, DeJesus MA, Poulton NC, Zhang W, Engelhart CA, Zaveri A, Lavalette S, Ruecker N, Trujillo C, Wallach JB, Li S, Ehrt S, Chait BT, Schnappinger D, Rock JM. 2021. Genome-wide gene expression tuning reveals diverse vulnerabilities of *M. tuberculosis*. *Cell* 184:4579-4592.e24.
18. Parish T, Stoker. NG. 1998. *No TitleMycobacteria protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press.
19. Sprouffske K, Wagner A. 2016. Growthcurver: An R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. *BMC Bioinformatics* 17:17–20.
20. Rodrigues-Junior VS, Dos Santos Junior AA, Villela AD, Belardinelli JM, Morbidoni HR, Basso LA, Campos MM, Santos DS. 2014. IQG-607 abrogates the synthesis of mycolic acids and displays intracellular activity against *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages. *Int J Antimicrob Agents* 43:82–85.
21. Choudhary E, Sharma R, Kumar Y, Agarwal N. 2019. Conditional silencing by CRISPRi reveals the role of DNA gyrase in formation of drug-tolerant persister population in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Cell Infect Microbiol* 9:1–13.
22. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408.
23. Mcneil MB, Cook GM. 2019. Utilization of CRISPR Interference To Validate MmpL3 as a Drug Target in *Mycobacterium tuberculosis* 1–7.
24. McNeil MB, Keighley LM, Cook JR, Cheung CY, Cook GM. 2021. CRISPR interference identifies vulnerable cellular pathways with bactericidal phenotypes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 116:1033–1043.
25. Sundarsingh JAT, J R, Rajan A, Shankar V. 2020. Features of the biochemistry of *Mycobacterium smegmatis*, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Public Health* 13:1255–1264.
26. Yamada H, Yamaguchi M, Igarashi Y, Chikamatsu K, Aono A, Murase Y,

- Morishige Y, Takaki A, Chibana H, Mitarai S. 2018. Mycolicibacterium smegmatis, Basonym Mycobacterium smegmatis, Expresses Morphological Phenotypes Much More Similar to Escherichia coli Than Mycobacterium tuberculosis in Quantitative Structome Analysis and CryoTEM Examination. *Front Microbiol* 9.
27. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon S V., Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream M-A, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 396:190–190.
 28. Duque-Villegas MA, Abbadi BL, Romero PR, Matter LB, Galina L, Dalberto PF, Rodrigues-Junior V da S, Ducati RG, Roth CD, Rambo RS, de Souza EV, Perello MA, Morbidoni HR, Machado P, Basso LA, Bizarro CV. 2021. EPSP Synthase-Depleted Cells Are Aromatic Amino Acid Auxotrophs in Mycobacterium smegmatis. *Microbiol Spectr* 9.
 29. Parish T. 2003. Starvation Survival Response of Mycobacterium tuberculosis. *J Bacteriol* 185:6702–6706.
 30. Borah K, Beyß M, Theorell A, Wu H, Basu P, Mendum TA, Nöh K, Beste DJV, McFadden J. 2019. Intracellular Mycobacterium tuberculosis Exploits Multiple Host Nitrogen Sources during Growth in Human Macrophages. *Cell Rep* 29:3580-3591.e4.
 31. Gouzy A, Larrouy-Maumus G, Bottai D, Levillain F, Dumas A, Wallach JB, Caire-Brandli I, de Chastellier C, Wu T Di, Poincloux R, Brosch R, Guerquin-Kern JL, Schnappinger D, Sório de Carvalho LP, Poquet Y, Neyrolles O. 2014. Mycobacterium tuberculosis Exploits Asparagine to Assimilate Nitrogen and Resist Acid Stress during Infection. *PLoS Pathog* 10.
 32. Beste DJV, Nöh K, Niedenföhr S, Mendum TA, Hawkins ND, Ward JL, Beale MH, Wiechert W, McFadden J. 2013. ¹³C-flux spectral analysis of host-pathogen metabolism reveals a mixed diet for intracellular mycobacterium tuberculosis. *Chem Biol* 20:1012–1021.

33. Zhang YJ, Reddy MC, Ioerger TR, Rothchild AC, Schuster BM, Trauner A, Wallis D, Galaviz S, Sacchettini JC, Behar SM, Rubin EJ. 2014. Tryptophan biosynthesis protects mycobacteria from CD4 T cell- mediated killing 155:1296–1308.

Table 1: Oligonucleotides used for sgRNA CRISPRi system

| PAM sequence and fold repression | Primers Forward | Primers Reverse |
|----------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Mtb</i> PAM1_NNGGAAG (145,2x) | 5' gggagtgttcgaggcagtcgagcagcg 3' | 5'-aaaccgctgccgactgacctgcaacac-3' |
| <i>Mtb</i> PAM2_NNAGCAG (42,2x) | 5' ggaaatgtctcagcgcagtcgccgcct 3' | 5'-aaacagggcggcgactgagctgagacatt-3' |
| <i>Mtb</i> PAM3_NNGGCAG (4,0x) | 5' gggagcgtccagtcgtgttcgaggtcag 3' | 5'-aacctgacctgcaacacgactggacgc-3' |
| <i>Msg</i> PAM1_NNGGAAC (51,5x) | 5' gggagcgcagtcaccgccctgcag 3' | 5'-aacctgcagggcggtgactgagc-3' |
| <i>Msg</i> PAM2_NNAGGAC (25,5x) | 5' gggaggtgaccggcggcacgctct 3' | 5'-aacagagcgtgccccggcacc-3' |
| <i>Msg</i> PAM3_NNAGCAC (11,9x) | 5' ggaaccggcatgctgcgccgtagg 3' | 5'-aacctacggcgcgagcatgccggt-3' |
| <i>inhA</i> _NNAGAAT (216,2x) | 5' gggagtcggtgatgattccgctaa 3' | 5' aaactagcggaatcatcaccgac 3' |
| <i>mmpL3</i> _NNAGAAA (158,1x) | 5' gggagcgacagatggctgccctctgc 3' | 5' aaacgacgagggcagccagctctctgc 3' |

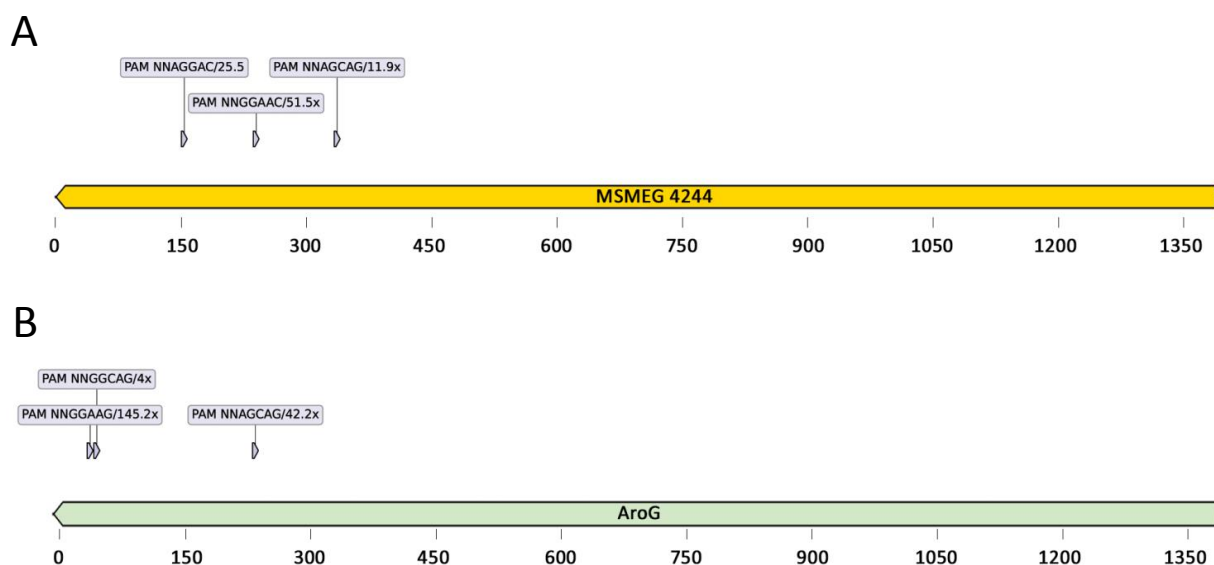


Figure 1. Location of PAM sequences inside *MSMEG_4244* and *aroG* locus used in this study. a) from left to right: 5'-NNAGGAC-3', 5'-NNGGAAC-3', 5'-NNAGCAG-3'.

b) from left to right: 5'-NNGGAAG-3', 5'-NNAGCAG-3', and 5'-NNGGCAG-3'. The repression strength of each PAM sequence, according to Rock et al. (2017) is also described.

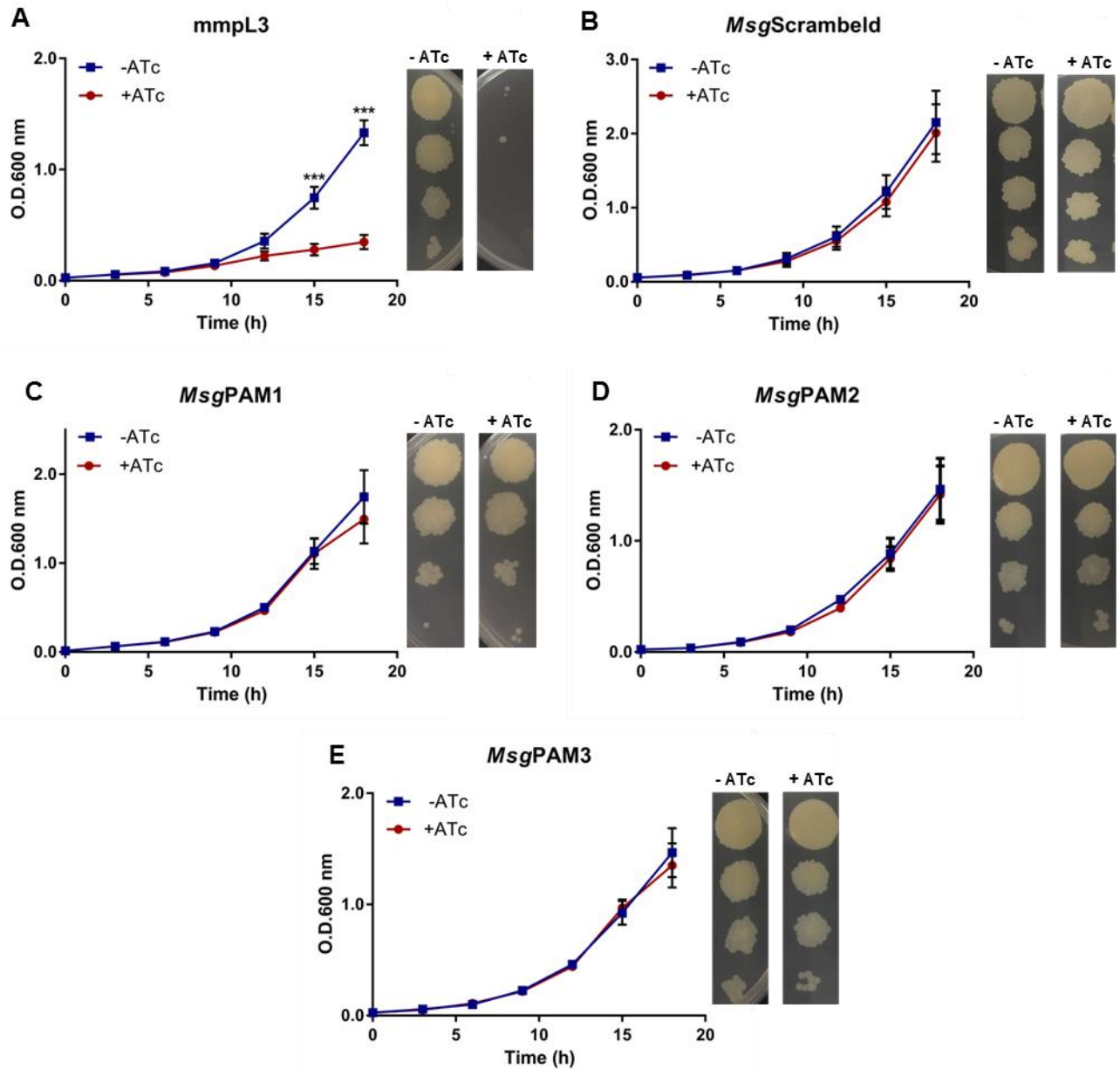


Figure 2. *aroG* silencing in *M. smegmatis* does not affect growth *in vitro*. (A-E). *M. smegmatis* growth curves and dilution spots in the presence or absence of Atc 100 ng/mL. *mmpL3* (A) and scrambled sgRNAs were used as positive and negative controls respectively (B). Three different *aroG* sequences were used *MsgPAM1*, *MsgPAM2* and *MsgPAM3* (C-E). Growth curves of *M. smegmatis* at 37°C in 7H9-

OADC medium containing Atc 100 ng/mL. Cultures were inoculated to a starting A_{600} of 0.07. Data are the mean \pm standard deviation from biological and technical duplicates. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA analysis followed by Bonferroni's post-test. For ***=P value <0.001.

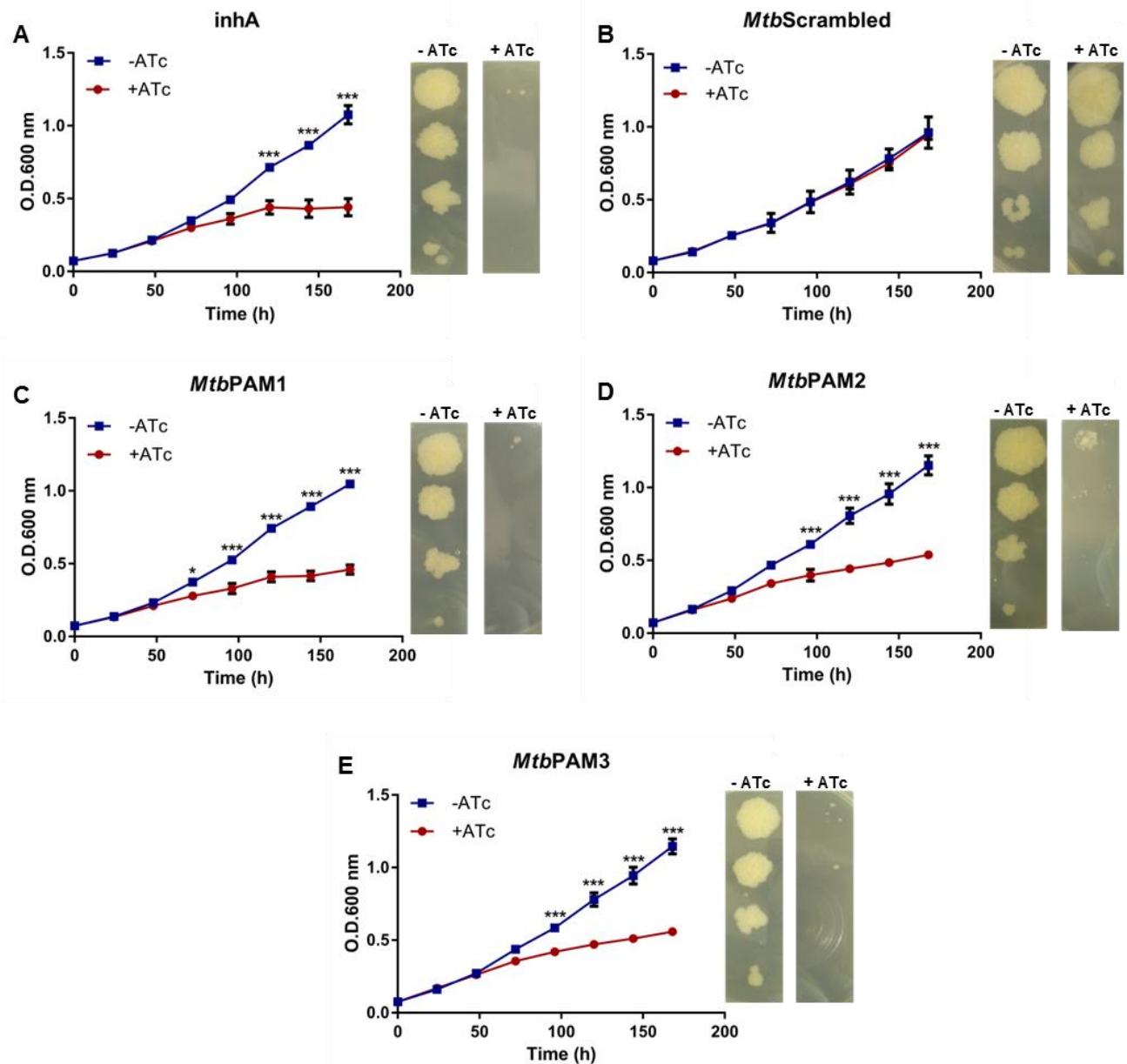


Figure 4. *aroG* silencing in *M. tuberculosis* results in growth perturbation *in vitro*. (A-E). *M. tuberculosis* growth curves and dilution spots in the presence or absence of Atc 100 ng/mL. *inhA* (A) and scrambled sgRNAs were used as positive and negative control respectively (B). (C-E) *aroG* was silenced using three different PAM sequences (*MtbPAM1*, *MtbPAM2* and *MtbPAM3*). Growth curves of *M.*

tuberculosis at 37°C in 7H9-OADC medium containing Atc 100 ng/mL. Cultures were inoculated to a starting A_{600} of 0.07. Data are the mean \pm standard deviation from biological and technical duplicates. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA analysis followed by Bonferroni's post-test. For *=P value <0.03, **=P value <0.002 and ***=P value <0.001.

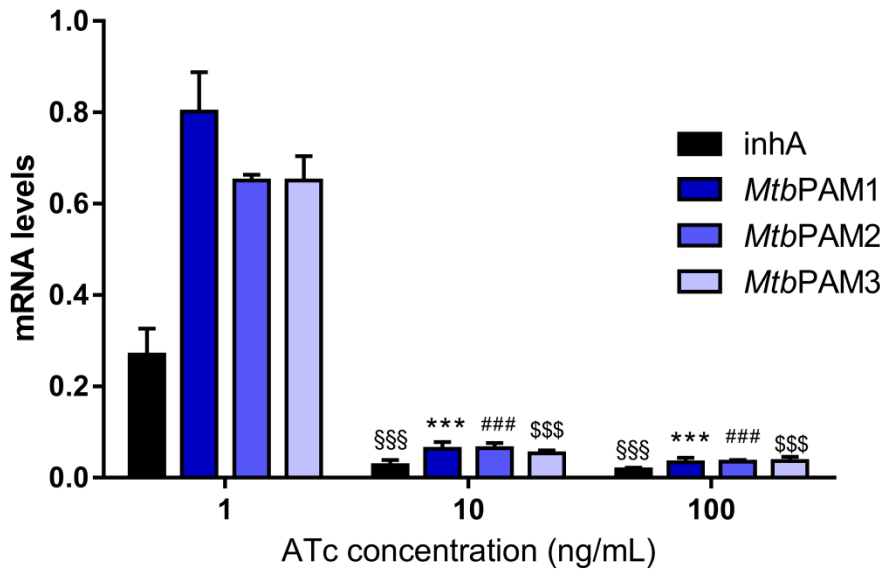


Figure 3. mRNA levels in cultures expressing *inhA*, (control) or *aroG*-targeting sgRNAs induced with different levels of ATc. mRNA levels are expressed relative to a scrambled sgRNA control with 100 ng/ml ATc in *M. tuberculosis*. Results are the mean \pm standard deviation of two experimental duplicates from two biological replicates. *** =P value <0.001.

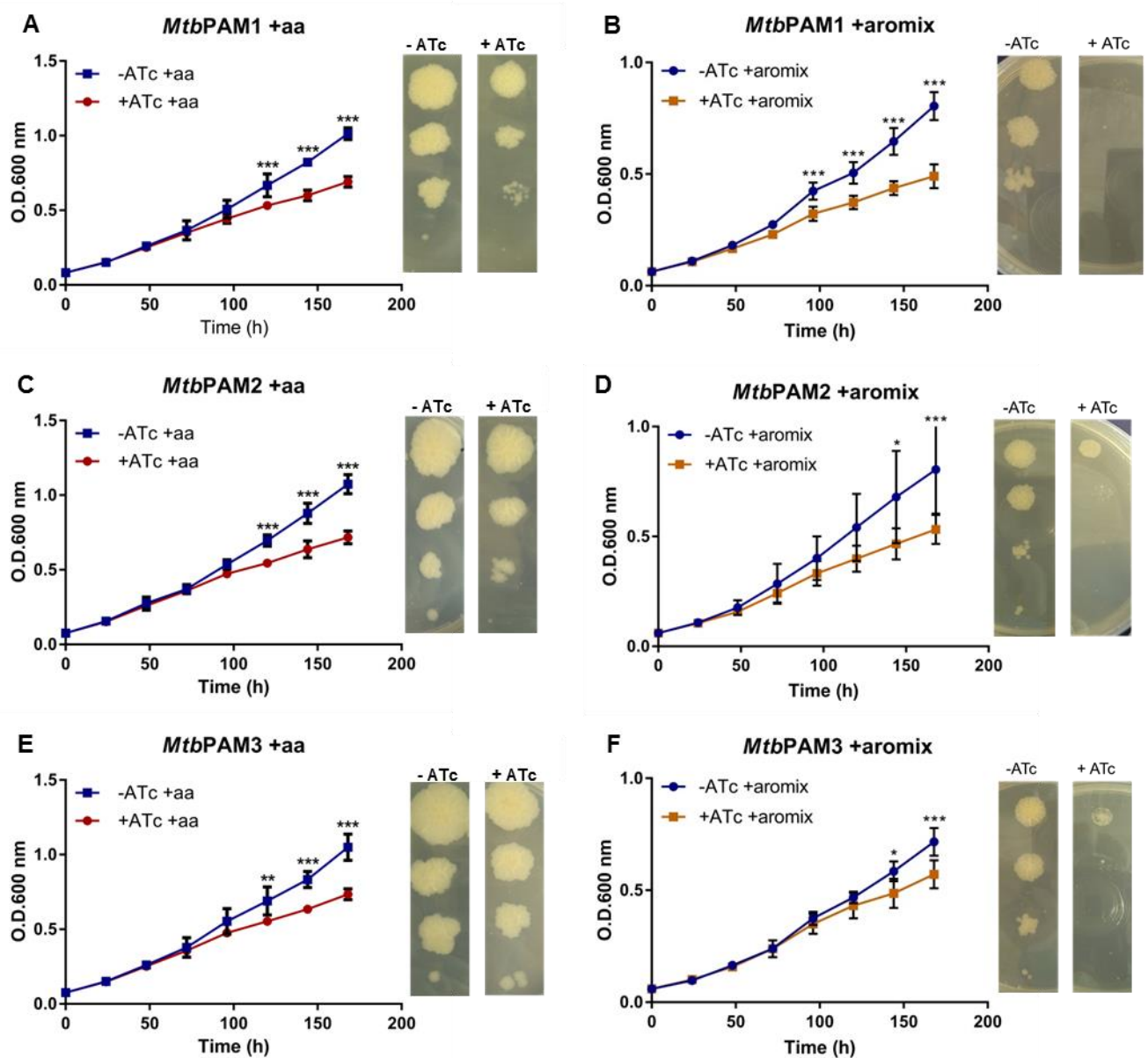


Figure 5. Effect of *aroG* silencing on *M. tuberculosis* in supplemented media. (A, C, E). *M. tuberculosis* growth curves and dilution spots in the presence or absence of Atc 100 ng/mL with aa supplement. (B, D, F) *M. tuberculosis* growth curves and dilution spots in the presence or absence of Atc 100 ng/mL with the aromix supplement. Cultures were inoculated to a starting A_{600} of 0.07. Data are the mean \pm standard deviation from biological and technical duplicates. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA analysis followed by Bonferroni's post-test. For *=P value <0.03, **=P value <0.002 and *=P value <0.001.**

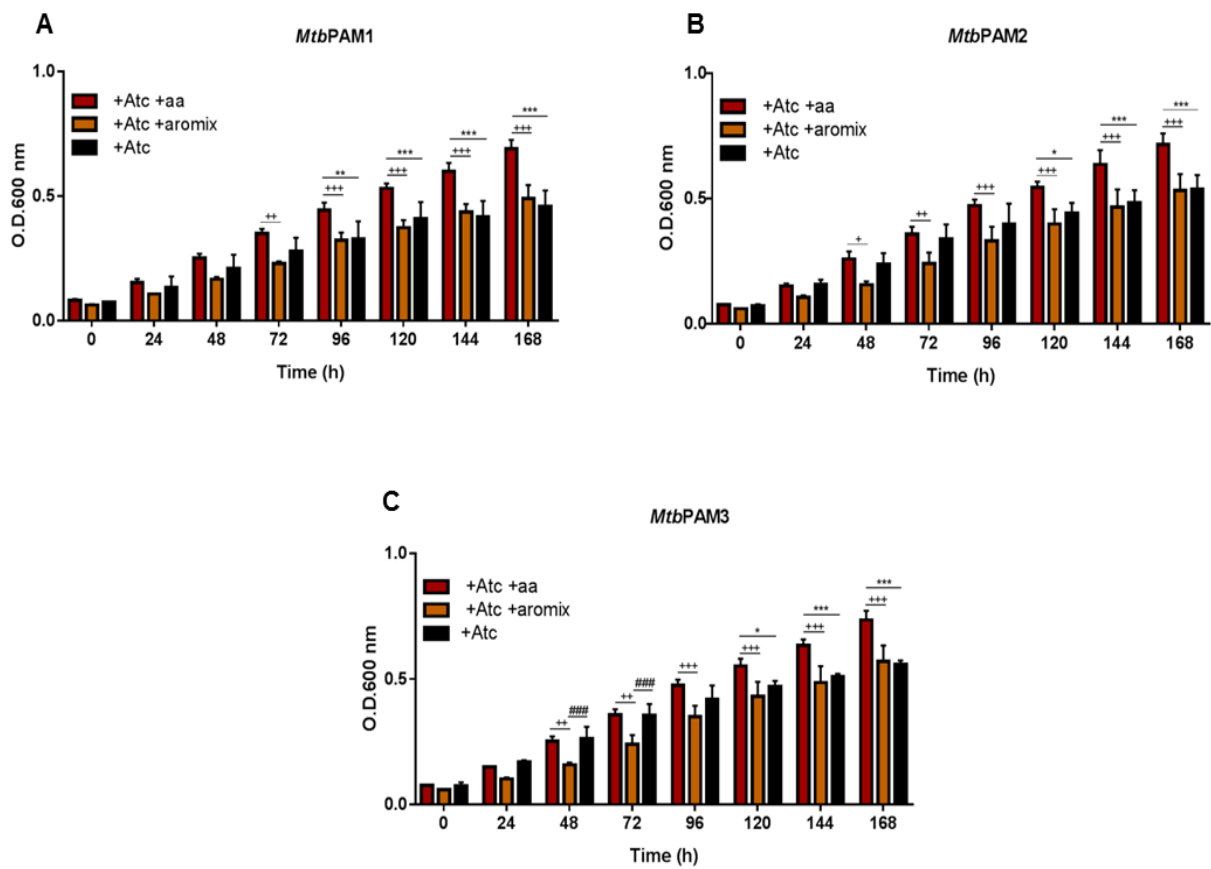


Figure 6: Comparison of *aroG*-silencing cultures growth in presence of ATc 100ug/mL in medium supplemented with amino acids or aromamix knockdown (A-C). Mean \pm standard deviation from biological and technical duplicates. For *=P value < 0.05, **=P value < 0.002 and ***=P value < 0.001.

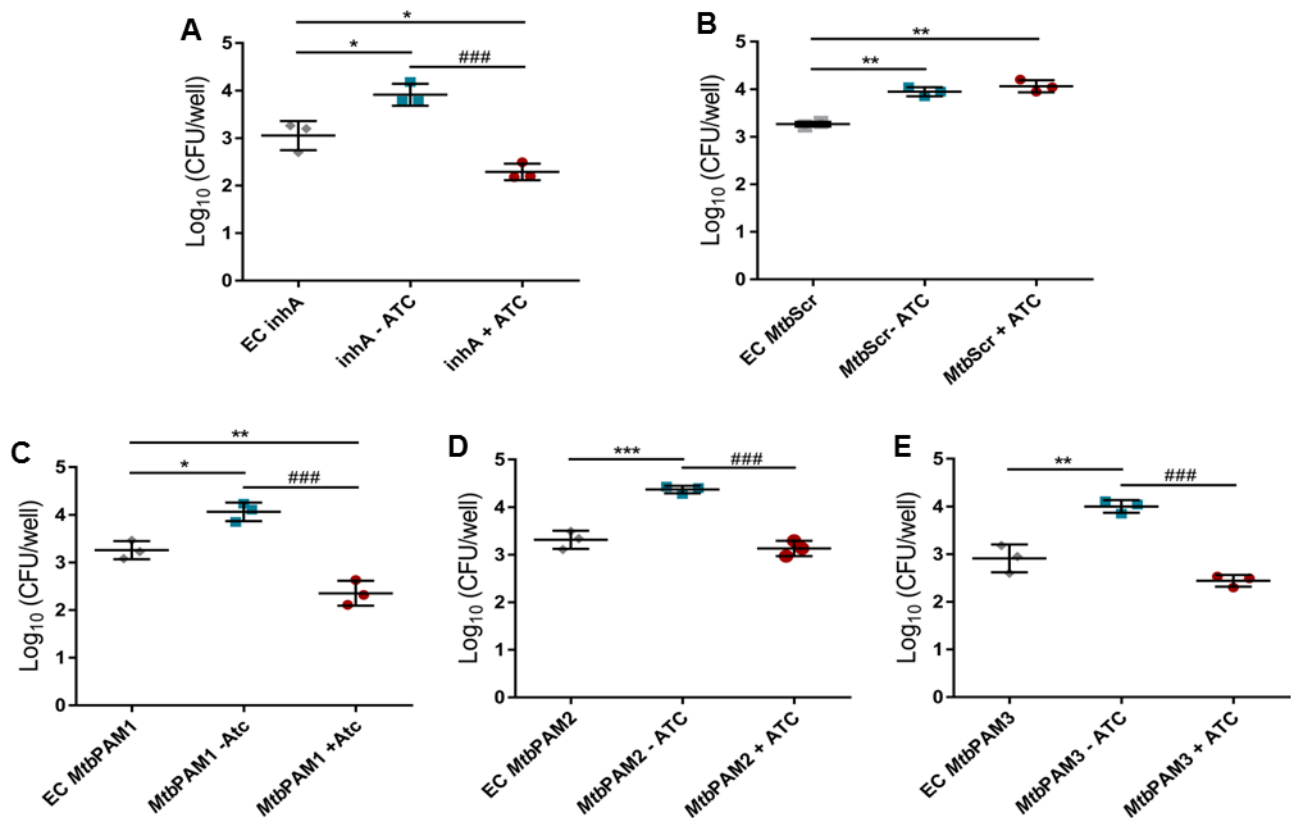


Figure 7. Evaluation *M. tuberculosis aroG* silencing in macrophages. Comparative analysis of intracellular growth profile of controls (A-B) and *aroG* knockdown strains of *M. tuberculosis* (C-E). Intracellular bacterial load was determined by counting viable bacteria (CFUs). EC = early control; *MtbScr* = Scrambled. Error bars represent the SD from at least three measurements. Statistical significance is determined by using one-way ANOVA analysis followed by Bonferroni's post-test. For *=P value <0.03, **=P value <0.002 and ###=P value <0.001.

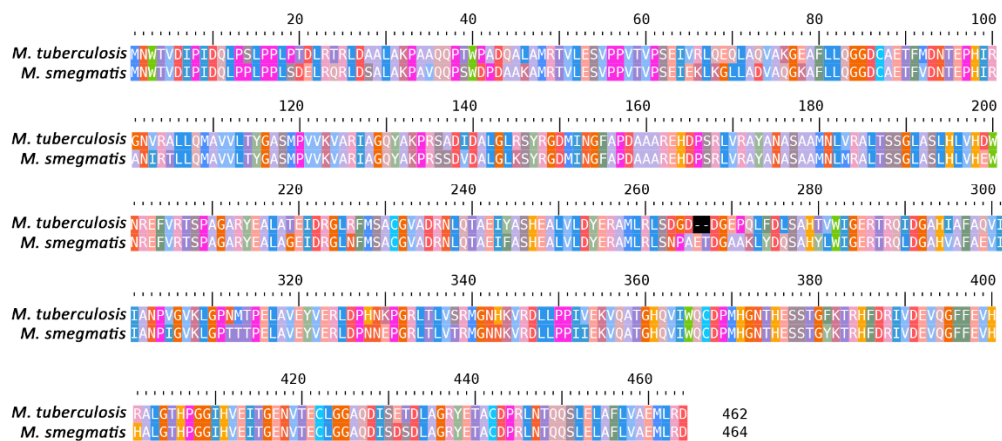


Figure S1: Pairwise alignment of *aroG* from *M. tuberculosis* and MSMEG_4244 from *M. smegmatis*. Identity: 405/464 (87.3%). Similarity: 436/464 (94.0%). Gaps: 2/464 (0.4%). Alignment parameters: Matrix: EBLOSUM62; Gap penalty: 10.0; Extend penalty: 0.5.

Table S1: qQT-PCR primers and probes used in this study.

| Target | Primer Forward | Primer Reverse | Probe |
|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|---|
| Rv2178c | 5' ctacagaccgccgaaatctatg 3' | 5' gtgcggacagggtcaaaca 3' | /56-FAM/catgttgag/ Zen/gtgtccgacggtga/3IABkFQ/ |
| MSMEG_4244 | 5' ggtacaagaccaggcacttc 3' | 5' cgagacattcggtgacgttt 3' | /56-FAM/tcgacgagg/ Zen/tgcagggttt/3IABkFQ/ |
| SigA (M. tuberculosis) | 5' catgtgcaggtgatcaacaa 3' | 5' gggtgatgtccatctctttgg 3' | /56-FAM/cattcaacg/ Zen/cgagctgctgca/3IABkFQ/ |
| SigA (M. smegmatis) | 5' cgagaagttcgactacaccaag 3' | 5' ccatgtgcaccgggatac 3' | /56-FAM/tggcgtagg/Zen/ tcgagaactgtagc/3IABkFQ/ |
| inhA | 5' gcattcgattgggtcatgc 3' | 5' atacgaatacggcgatgtg 3' | 56-FAM/atgggcatc/Zen/aaccggt tcttcga/3IABkFQ/ |
| mmpL3 | 5' ctggtcaacgctgctgatgaa 3' | 5' ggcaggtatttctgctgatac 3' | /56-FAM/tggtggtga/Zen/tggtgct gctgat/3IABkFQ/ |

CAPÍTULO III

Nocaute do gene *aroG*

Expressão e Purificação da proteína *MtbDAHPS*

4. Nocaute do gene *aroG*

O nocaute gênico por recombinação homóloga é uma ferramenta genética importante que permite a obtenção de mutações definidas em um gene específico, onde ocorre a substituição do alelo selvagem por um alelo mutado. Essa substituição visa caracterizar as funções de proteínas e identificar fatores de virulência, além de ser uma abordagem usada para medir qualitativa e quantitativamente uma determinada atividade biológica (JACKSON, M., *et al.*, 2001).

A recombinação homóloga em micobactérias ocorre numa frequência baixa, na ordem de 10^{-3} eventos por célula, o que dificulta a obtenção de mutantes definidos em *M. tuberculosis*. Dessa forma, o isolamento de mutantes é dependente da habilidade de técnicas e protocolos utilizados para compensar a baixa eficiência de transformação e possibilitar a seleção de mutantes de troca alélica entre a população total de transformantes. O plasmídeo pPR27 $xyIE$ possui algumas características importantes que favorecem a recombinação homóloga e a seleção dos mutantes, como o gene contra-seletivo *sacB* (sac^R), cuja expressão é letal à micobactéria na presença de sacarose devido a formação e o acúmulo de polímeros de frutose no espaço periplasmático que provocam a lise da bactéria (PELICIC, V., *et al.*, 1997; PARISH, T. & STOKER, N., 2001), a origem de replicação termosensível, a qual é inibida a 39°C, e o gene repórter *xyIE*, o qual codifica a proteína catechol dioxigenase que converte catecol em um produto amarelo, conferindo esta cor às colônias que possuem o plasmídeo íntegro, garantindo uma seleção eficiente das células transformadas (CURCIC, R., 1994; JACKSON, M. *et al.*, 2001). O protocolo e os resultados parciais obtidos na tentativa de realizar o nocaute do gene *aroG* estão descritos abaixo.

4.1 Construção de plasmídeos e de cepas *M. tuberculosis* H37Rv Δ *aroG* complementadas

Caso o gene *aroG* seja, de fato, essencial para a sobrevivência do bacilo, após a sua deleção não seria possível obter cepas viáveis; portanto, foi necessário fornecer as cópias extras (selvagem e mutantes) do gene *aroG* antes do processo de nocaute gênico.

Para a construção do plasmídeo da cepa complementada com uma cópia funcional do gene *aroG* (1.389 pb) selvagem (WT), a região codificadora do gene foi amplificada por PCR a partir do genoma da cepa laboratorial de *M. tuberculosis* H37Rv. Para amplificar a sequência do gene foram usados um oligonucleotídeo direto, contendo o sítio para a enzima de restrição NdeI, e um oligonucleotídeo reverso, contendo os sítios para as enzimas de restrição BamHI e XbaI (vide Tabela 1). O produto da PCR foi primeiramente clonado no vetor pCR-Blunt (Invitrogen). Uma vez obtido o vetor pCR-Blunt::*aroG*_WT, este foi digerido com as enzimas NdeI e BamHI, e o inserto liberado foi subclonado no vetor pET23a(+), gerando o plasmídeo pET::*DAHPS*(WT). Este plasmídeo recombinante foi utilizado como molde da reação de mutagênese (descrito no item 4.3 deste capítulo) e para a expressão da enzima selvagem e mutantes (descrito no item 6.1 deste capítulo). Todas as construções plasmidiais realizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1.

O fragmento contendo o gene *aroG*_WT foi extraído do vetor pET23a(+), utilizando as enzimas NdeI e BamHI, e clonado no vetor pMVHG1 (PAN, F., *et al.*, 2001) a jusante do promotor Phsp60. O fragmento Phsp60_*aroG*_WT foi extraído do vetor pMVHG1 usando a enzima de restrição XbaI, e purificado do gel de agarose 1%, utilizando o kit de extração de gel QIAquick (Qiagen). O inserto purificado foi clonado no vetor micobacteriano integrativo denominado pNIP40/b, previamente linearizado com a enzima XbaI, gerando o plasmídeo pNIP40::*aroG*_WT. As construções plasmidiais foram submetidas ao sequenciamento automatizado de DNA, no qual foi possível confirmar sua identidade e integridade.

Para obter a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv complementada com a cópia funcional do gene *aroG* selvagem, células de *M. tuberculosis* eletrocompetentes foram transformadas com a construção pNIP40::*aroG*_WT, seguindo-se o protocolo descrito por PARISH, T. & STOKER, N., 1998. Uma segunda cepa foi transformada com o vetor pNIP40::∅, a qual foi utilizada para comprovar a essencialidade do gene. As bactérias foram semeadas em meio de cultura Middlebrook 7H10 sólido (Becton Dickinson, BD, USA), suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) contendo 50 µg/mL de higromicina (Invitrogen, USA) e incubadas a 37°C. Depois de três semanas de crescimento, uma única colônia

(Hyg⁺) foi cultivada em 5 mL de meio líquido Middlebrook 7H9 contendo 0,05% de Tween80 e 10% de ADC, com 50 µg/mL de higromicina e incubadas a 37°C (100 rpm), para que as células fossem preparadas para um novo ciclo de eletroporação.

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos usados:

| NOME | SEQUÊNCIA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS | FINALIDADE |
|--|---|--|
| COMPL_aroG_WT_F COMPL_aroG_WT_R | 5'-TTTCATATGAACTGGACCGTCGACAT-3' 5'-TTTGGATCCTCTAGACTAGTCCCCGAGCATCTCC-3' | Amplificar o gene <i>aroG</i> a partir do genoma purificado do <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. Contém os sítios para as enzimas NdeI e BamHI |
| MUT_aroG_K306A_F MUT_aroG_K306A_R MUT_aroG_R337A_F MUT_aroG_R337A_R MUT_aroG_W280A_F MUT_aroG_W280A_R MUT_aroG_R171A_F MUT_aroG_R171A_R MUT_aroG_R256A_F MUT_aroG_R256A_R | 5'-GTTGGGGCCCAACGCGACCCCGACCGGA-3' 5'-TCCGGTCGGGGTCGCGTTGGGCCCAAC-3' 5'-CTTGTGGTTGCCCATCGCGCTACCAACGTCAGC-3' 5'-CTGACGTTGGTGAGCGCGATGGGCAACCACAAG-3' 5'-CGCACACACCGTGGCGATCGGCGAGCGG-3' 5'-CCGCTCGCCGATCGCCACGGTGTGTGCG-3' 5'-GTTAGCGTAAGCCGCGACCAGCCGCGAC-3' 5'-GTCGCGGCTGGTCGCGGCTTACGCTAAC-3' 5'-GTGCTCGACTACGAGGCCGCCATGTTGAGGTT-3' 5'-AACCTCAACATGGCGGCCTCGTAGTCGAGCAC-3' | Realizar as reações de mutagenese usando o pET-23a(+)_aroG_WT como molde |
| PCR_UP_aroG_F PCR_UP_aroG_R PCR_DOWN_aroG_F PCR_DOWN_aroG_R | 5'-TTTGGTACCACTAGTGGATTGGTCTTGACGTTGCC-3' 5'-TTTTCTAGAAGCTGGTCGATCGGTATGTC-3' 5'-TTTTCTAGAGGAGATGCTGCGGACTAG-3' 5'-TTTAAGCTTACTAGTACGTCGTTCTTTGTCGGGAT-3' | Amplificar o gene <i>aroG</i> a partir do genoma purificado do <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. Contém os sítios para as enzimas KpnI, SpeI, XbaI e HindIII |
| PCR_DCO_F PCR_DCO_R | 5'-ATCTTCTTCCTGCCGGTTTCG-3' 5'-TCCTTGGGCTTCGATTTGG-3' | Confirmar o <i>double-crossover</i> nas cepas complementadas e nocaute |

4.2 Construção de plasmídeos e cepas *M. tuberculosis* H37Rv nocaute para o gene *aroG*

Para a construção do plasmídeo responsável por fazer o nocaute do gene *aroG*, um fragmento da região *upstream* (± 1.000 pb) e um fragmento da região *downstream* (± 1.000 pb) do gene *aroG* (Rv2178c) foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir do genoma da cepa laboratorial de *M. tuberculosis* H37Rv, utilizando um par de oligonucleotídeos para cada região. Para amplificar a sequência *upstream*, foram utilizados o oligonucleotídeo iniciador direto com os sítios para as enzimas de restrição KpnI e SpeI, e o oligonucleotídeo

iniciador reverso com o sítio para a enzima de restrição XbaI. Para amplificar a região *downstream* foram utilizados um oligonucleotídeo iniciador direto, contendo o sítio para a enzima de restrição XbaI, e um oligonucleotídeo iniciador reverso, contendo os sítios para as enzimas HindIII e SpeI. Ambos os fragmentos foram primeiramente clonados no vetor pUC19. Depois, um cassete contendo o gene de resistência à canamicina (Can^R), proveniente do vetor pUC4K, foi inserido exatamente entre os fragmentos *upstream* e *downstream*, através do sítio de restrição XbaI. O inserto (upstream::CanR::downstream) foi liberado do vetor pUC19 pela digestão com a enzima de restrição SpeI, e clonado no vetor pPR27xylE previamente linearizado com a enzima de restrição SpeI (DRUMOND VILLELA, A., *et al.*, 2017) resultando no vetor pPR27xylE::ΔaroG (Tabela 2). As construções plasmidiais foram submetidas ao sequenciamento para confirmar sua identidade e integridade.

Para a obtenção das cepas nocaute do gene *aroG*, células de *M. tuberculosis* complementadas e eletrocompetentes, foram transformadas por eletroporação com a construção plasmidial pPR27xylE::ΔaroG. As bactérias foram semeadas em placas contendo meio 7H10 sólido, suplementado com 10% de OADC e 25 µg/mL de canamicina (Gibco, USA), e incubadas a 32 °C (temperatura permissiva), sem agitação. Após seis semanas, 1% (w/v) de pirocatecol (Sigma-Aldrich, USA) foi adicionado sobre as colônias para selecionar aquelas que apresentaram coloração amarela (Can^R e xylE⁺). Três colônias amarelas foram escolhidas e, então, cultivadas em 5 mL de meio de cultura 7H9 completo, contendo 50 µg/mL de higromicina, 25 µg/mL de canamicina, a 32°C por quatro semanas. Após esse período, as culturas foram diluídas (0, 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³) em meio de cultura, semeadas (100 µL) individualmente em meio sólido, contendo 25 µg/mL de canamicina e 2% de sacarose (Fisher Scientific, USA), e foram cultivadas a 39°C (temperatura não-permissiva), de três a quatro semanas. Para a determinação das unidades formadoras de colônias por mL (CFU/mL) do inóculo semeado, foram feitas diluições de 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷ e semeadas (100 µL) individualmente em meio sólido contendo 50 µg/mL de higromicina e 25 µg/mL de canamicina, e cultivadas a 32°C. Após aproximadamente um mês, foi observado o crescimento de colônias nas placas. A coloração das colônias foi testada novamente com pirocatecol. As colônias brancas (Can^R, Sac^R e xylE⁻) foram cultivadas e seus DNAs genômicos

foram extraídos, para que os eventos de recombinação fossem confirmados por PCR. Para isso, foram utilizados dois oligonucleotídeos iniciadores que anelam fora da região clonada no vetor pPR27xylE em uma reação de PCR. As PCRs poderiam apresentar três diferentes resultados, dependendo do tipo de evento de recombinação ocorrido: I) em um evento de *single-crossover* indesejado entre o gene selvagem e o alelo mutante não seria observado nenhuma amplificação devido à inserção do corpo do vetor completo no genoma; II) em uma recombinação ilegítima (também indesejada) entre o plasmídeo e o cromossomo de forma não homóloga seria observado um fragmento de 3.459 pb referente as regiões *upstream* e *downstream* e ao gene *aroG* selvagem; e III) um evento de *double-crossover* (DCO), no qual o gene selvagem é trocado com sucesso pelo alelo mutante por recombinação homóloga, seria observada uma banda de 3.319 pb, correspondente as regiões *upstream* e *downstream* e ao cassete de canamicina (1.252 pb) interrompendo o gene *aroG*. Uma vez que as diferenças entre a recombinação ilegítima e o DCO são muito pequenas para serem diferenciadas pelo gel de agarose (140 pb), a confirmação do DCO foi realizada através da clivagem dos amplicons gerados utilizando a enzima de restrição XhoI, a qual cliva o sítio presente apenas na sequência do cassete de canamicina. Como controle negativo foi utilizando a amplificação do gene *aroG* selvagem a partir do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv.

4.3 Geração de mutantes pontuais do gene *aroG*

As reações de mutagênese sítio direcionada foram realizadas de acordo com as instruções do kit QuickChange II XL da Agilent Technologies. A construção plasmidial pET::DAHPS(WT) foi utilizada como molde para a reação de mutagênese.

Os primers mutagênicos foram projetados usando-se o Programa de Projeto QuickChange Primer disponível online em www.agilent.com/genomics/qcpd. Diferentes mutações foram introduzidas na sequência codificadora do gene *aroG*, de forma que os resíduos de aminoácidos lisina306, arginina337, triptofano280, arginina171 e arginina256 fossem substituídos por um resíduo de alanina. Os produtos resultantes da reação de mutagênese foram tratados com a endonuclease

DpnI para deleção dos plasmídeos moldes e seleção dos plasmídeos contendo a mutação desejada. Os plasmídeos contendo os genes mutantes foram transformados por choque térmico em células competentes de *Escherichia coli* XL10-Gold, que foram semeadas em placas de meio sólido LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, por 16h a 37°C. Os plasmídeos mutantes também foram utilizados para construção das cepas complementares com o vetor pNIP40, seguindo os mesmos protocolos descritos acima.

5. Resultados parciais do nocaute do gene *aroG*

5.1 Construção de plasmídeos

As construções de todos os plasmídeos utilizados foram realizadas de acordo com as metodologias citadas acima. O vetor pET23a(+):*aroG* foi utilizado como molde para reação de mutagênese utilizando o kit QuickChange II XL. Das cinco mutações de resíduos de aminoácidos propostas foi possível obter as mutações Lisina306, Arginina337 e Triptofano280 (Tabela 2). Foram realizadas três tentativas de transformação com as mutações Arginina171 e Arginina256, mas até o momento não foi possível obter os mutantes. A confirmação da integridade dos plasmídeos e das sequências clonadas foram realizadas por digestão e análise em gel agarose e através do sequenciamento de DNA, confirmando que todos os vetores foram construídos com sucesso.

Tabela 2: Lista das construções plasmidiais realizadas neste trabalho.

| PLASMÍDEO | ABREVIATURA NO TEXTO | FINALIDADE |
|--|---|--|
| | | EXPRESSÃO DE PROTEÍNA |
| pET23a(+):vazio | pET:: Ø | Controle de expressão |
| pET23a(+): <i>aroG</i> (WT) | pET::DAHPS(WT) | Expressão da proteína selvagem |
| pET23a(+): <i>aroG</i> (W280A) pET23a(+): <i>aroG</i> (R337A) pET23a(+): <i>aroG</i> (K306A) | pET::DAHPS(W280A) pET::DAHPS(R337A) pET::DAHPS(K306A) | Expressão das proteínas mutantes |
| | | COMPLEMENTAÇÃO |
| pMVG11::_ <i>aroG</i> _WT | - | Adição e extração do promotor Phsp60 junto à sequência do gene <i>aroG</i> |

| | | |
|--|------------------|--|
| pNIP40::vazio | pNIP40:: ∅ | Complementação sem o fornecimento de uma cópia extra do gene para avaliar sua essencialidade – não é esperado obter colônias caso o gene seja essencial |
| pNIP40::aroG(WT) | - | Fornecer uma cópia extra do gene <i>aroG</i> selvagem - é esperado obter colônias mesmo se o gene for essencial |
| pNIP40::aroG(W280A) pNIP40::aroG(R337A) pNIP40::aroG(K306A) | - | Fornecer uma cópia do gene <i>aroG</i> com mutações pontuais – não é esperado obter colônias caso os resíduos de aminoácidos mutados sejam essenciais à função da proteína |
| NOCAUTE | | |
| pUC4K | - | Extração do gene de resistência à canamicina |
| pUC19::aroG_UP pUC19::aroG_UP_DOWN pUC19::aroG_UP_Can ^R _DOWN | - - - | Obter a sequência <i>upstream</i> e <i>downstream</i> do gene <i>aroG</i> interrompida pelo gene de resistência à canamicina |
| pPR27xyIE::aroG_Can ^R | pPR27xyIE::ΔaroG | Nocaute do gene <i>aroG</i> por recombinação homóloga |

5.2 Complementação e nocaute

Para obtenção da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv complementada com uma cópia extra do gene *aroG* selvagem, células de *M. tuberculosis* eletrocompetentes foram transformadas com a construção pNIP40::aroG_WT. Outra cepa de *M. tuberculosis* H37Rv foi transformada com o vetor pNIP40::∅, a qual foi utilizada como controle do experimento. Uma vez obtidas as cepas complementadas (Hyg⁺), estas foram transformadas com o vetor de nocaute pPR27xyLE::ΔaroG.

Para que pudéssemos selecionar um mutante que sofreu um evento de duplo *crossover* (DCO), ou seja, que realizou a troca do gene selvagem pelo cassete de canamicina, foram utilizados os marcadores contra-seletivos presentes no plasmídio pPR27xyIE. Primeiramente, 1% de pirocatecol foi adicionado sobre as colônias para selecionar aquelas que apresentassem coloração amarela, fenômeno que somente ocorre devido à presença do gene *xyIE*. Três colônias amarelas foram escolhidas e cultivadas a 32°C por quatro semanas. Após esse período, as culturas foram semeadas individualmente em meio sólido contendo higromicina, canamicina e 2%

de sacarose e foram incubadas a 39°C. Para confirmar a viabilidade das culturas e realizar a contagem de CFUs, também foram semeadas placas sem sacarose e mantidas a 32°C. Nessa etapa, a origem de replicação termossensível do plasmídeo pPR27xylE, a qual não permite a replicação do plasmídeo à temperatura de 39°C, e a presença da sacarose no meio de cultura, que confere um fenótipo letal às células que ainda possuam o corpo do vetor, agem como uma pressão contra-seletiva, ou seja, favorecem a seleção das bactérias que sofreram o evento de DCO e que, portanto, perderam o corpo do plasmídeo em decorrência do evento de recombinação. O resultado esperado para um gene não-essencial é que, ao final da etapa de contra-seleção, tanto a cepa que recebeu o vetor vazio quanto a cepa que recebeu o vetor com a cópia extra do gene apresentem colônias brancas (xylE⁻, Hyg⁺, Kan⁺, Sac^R). No caso de um gene essencial, é esperado que a cepa que recebeu o vetor vazio não gere colônias viáveis ou somente colônias que não fizeram o DCO corretamente (xylE⁺) e mantiveram o corpo do vetor.

Para investigar se os resíduos de aminoácidos W280, R337 e K306 são essenciais à atividade da enzima MtDAHPs *in vitro*, cepas de *M. tuberculosis* foram complementadas com as construções plasmidiais pNIP40::aroG(W280A), pNIP40::aroG(R337A) e pNIP40::aroG(K306A). As cepas complementadas com os genes mutantes pontuais foram submetidas às etapas de nocaute e contra-seleção.

O resultado deste experimento foi inconclusivo. Apenas as cepas CO_K306_KO_2, CO_K306_KO_3, CO_vazio_KO e CO_WT_KO apresentaram colônias após a última etapa de seleção do nocaute. Porém, essas poucas colônias complementadas brancas obtidas na presença da sacarose não eram mutantes DCO, pois quando os produtos das PCR de confirmação foram submetidos a uma reação de clivagem com a enzima XhoI. A atividade da enzima foi confirmada através de uma reação de clivagem controle (dado não mostrado). Após a digestão com a enzima XhoI, nenhum dos amplicons foi cortado, como era esperado caso o cassete de canamicina estivesse presente (Figura 13 e 14).

A dificuldade de obtenção das cepas nocaute pode ser explicada pelo fato de que a técnica utilizada possui muitas etapas de seleção, é possível que a complementação das cepas tenha sido ineficiente. Além disso, os eventos de recombinação homóloga em micobactérias são raros, com uma frequência inferior a

10^{-3} eventos/célula. Diante disso, novos experimentos de nocaute deverão ser conduzidos para confirmar a essencialidade do gene selvagem e dos resíduos de aminoácidos mutados.

Figura 13. Aparência das colônias brancas obtidas pelo nocaute do gene *aroG*.

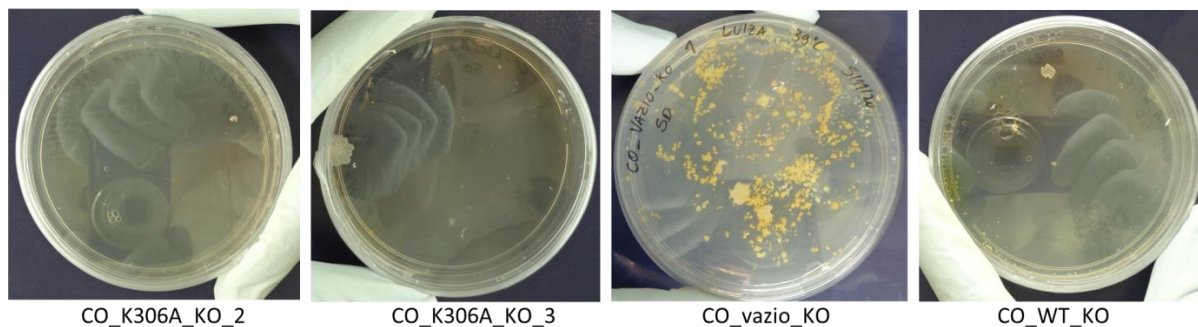
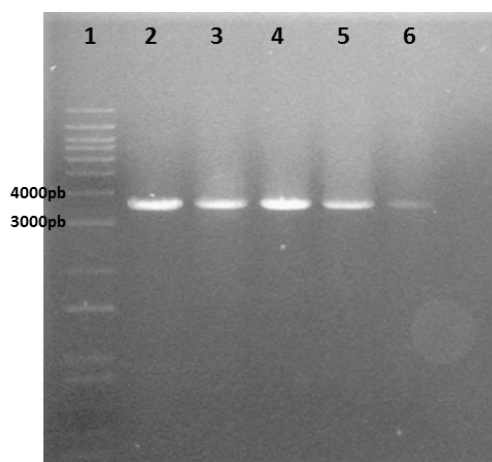


Figura 14. Produtos de PCR obtidos a partir dos genomas extraídos das colônias brancas geradas na última etapa do nocaute gênico clivadas com a enzima de restrição *XhoI*.



Nota: Nenhuma das amostras apresenta a clivagem. Legenda: 1 – Marcador de peso molecular 1 kb Plus, 2 – controle *aroG* selvagem, 3 – KO_WT_CO, 4 – KO_vazio_CO, 5 – KO_K306A_CO_2 6 – KO_K306A_CO_3.

6. Expressão e purificação da proteína *MtbDAHPs*

Com o intuito de avaliar se as mutações pontuais geradas interferem na atividade enzimática da proteína *MtbDAHPs*, foram realizados esforços para expressar e purificar a *MtbDAHPs* selvagem e as três *MtbDAHPs* com mutações

pontuais. Os protocolos desenvolvidos bem como os resultados gerados estão descritos abaixo.

6.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes com mutações pontuais

Para expressar e purificar a proteína *MtbDAHPs_WT* e as proteínas *MtbDAHPs* mutantes pontuais, inicialmente foram utilizados os protocolos descritos por Rizzi, C. et al 2005. Em resumo, células *E. coli* Rosetta-gami (DE3) foram crescidas em meio LB (Lysogeny Broth) a 37°C sob agitação de 180 rpm, por 24h sem adição de isopropyl- β -D- thiogalactopyranoside (IPTG) (RIZZI, C., *et al.*, 2005). No entanto, não foi possível obter a proteína na fração solúvel do extrato celular. Desta forma, novos testes de expressão foram realizados. Além destes, protocolos de purificação das proteínas recombinantes foram otimizados.

A expressão da proteína foi testada em cepas de *E. coli* Rosetta (DE3), Rosetta-gami II (DE3) e C41 (DE3) eletrocompetentes transformadas com as construções plasmidiais pET::DAHPS(WT), pET::DAHPS(R337A), pET::DAHPS(W280A) e pET::DAHPS(K306A). Células transformadas com o vetor pET23a(+) vazio (pET:: \emptyset) foram utilizadas como controle-negativo do experimento. As células foram crescidas em placas com meio LB contendo os antibióticos apropriados para cada cepa. Uma única colônia foi selecionada e inoculada em pré-inóculo com meio LB ou TB (Terrific Broth) contendo antibióticos e foram crescidas em *shaker* (180 rpm), *overnight*, a 37°C. O pré-inóculo foi utilizado para inocular dois erlenmeyers contendo 50 mL de meio LB ou TB e antibióticos, e as culturas foram cultivadas até atingir uma OD_{600nm} entre 0,4-0,6. Após esta etapa, um frasco de cultura foi induzido com IPTG, e foram realizadas coletas de 3, 6, e 24 horas após a indução. A coleta das células foi realizada por centrifugação e estas foram estocadas a -20°C. O controle do experimento foi feito com inóculos contendo apenas o plasmídeo pET23a(+) vazio (pET:: \emptyset). As células coletadas foram rompidas por sonicação e as frações solúvel e insolúvel foram analisadas em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), no qual se esperava observar uma banda de aproximadamente 51 kDa correspondente à proteína de interesse.

Para purificar as enzimas recombinantes foi utilizado o sistema de purificação ÄKTA, seguindo primeiramente o protocolo descrito por Rizzi, et al., 2005. As células foram ressuspensas em tampão 50 mM Tris-HCl, pH 7,8 (tampão A) contendo 1 mM de β -mercaptoetanol (β -Me, Sigma-Aldrich) e 0,2 mg/mL de lisozima e mantidos sob agitação no gelo por 30 min. As células foram rompidas por ultrassom e os restos celulares foram removidos por centrifugação (48.000 g, por 30 min, a 4°C). O sobrenadante foi incubado com 1% de sulfato de estreptomicina para a retirada de ácidos nucleicos por 15 min e centrifugado (48.000 g por, 30 min, a 4°C). Em seguida, o sobrenadante foi incubado com 25% de sulfato de amônio por 30 min e centrifugado (48.000 g, por 30 min, a 4°C). O pellet resultante foi ressuspensão com 70 mL do tampão A, contendo 1 mM de β -mercaptoetanol, e dialisado em três trocas de 2 L contra o mesmo tampão. A amostra foi centrifugada e colocada na coluna de troca aniônica Q- Sepharose Fast Flow (2.6 cm x 8.2 cm) (Amersham Biosciences) previamente equilibrada com o tampão A e fracionada utilizando 600 mL de NaCl 1M em um gradiente linear de 0 - 0,6 M. As frações selecionadas de acordo com o pico no cromatograma foram analisadas em gel de poliacrilamida 12% contendo dodecil sulfato de sódio (SDS- PAGE). Entretanto, houve algumas dificuldades em reproduzir o protocolo já descrito, o que causou um baixo rendimento de amostra tratada.

Diante de dificuldades em reproduzir o protocolo de purificação, foi desenvolvido um novo protocolo para obter a proteína *Mtb*DAHPs na sua forma homogênea. Cinco gramas de células descongeladas foram ressuspensas em Tris HCl 50 mM pH 7,5 (5 mL/g) e tratadas com lisozima 0,2 mg/mL. As células foram rompidas com 10 pulsos de ultrassom (amplitude de 21%) de 10 segundos cada, com um intervalo de 1 minuto entre os pulsos. Após o rompimento por ultrassom, as frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação a 18.000 RPM por 30 min a 4°C. A fração solúvel foi tratada com DNase 5 mg/mL (Sigma-Aldrich), novamente centrifugada, e então aplicada na coluna de troca aniônica Q Sepharose FF. As amostras resultantes dos picos do cromatograma foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%. As amostras contendo a proteína de interesse foram selecionadas e aplicadas na coluna Q Sepharose HP. As amostras eluídas foram analisadas e selecionadas e por último, aplicadas na coluna Sephacryl S-200 26/60 HR. As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%.

6.2 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC- MS/MS)

A presença da proteína *MtbDAHPs* foi investigada por LC-MS/MS. Amostras de extratos proteicos de cada cepa foram analisadas por SDS-PAGE, e as porções do gel de aproximadamente 51 kDa, correspondente ao peso molecular da enzima de interesse, foram recortadas e submetidas à digestão, de acordo com protocolo proposto por SHEVCHENKO, A., *et al.*, 2007.

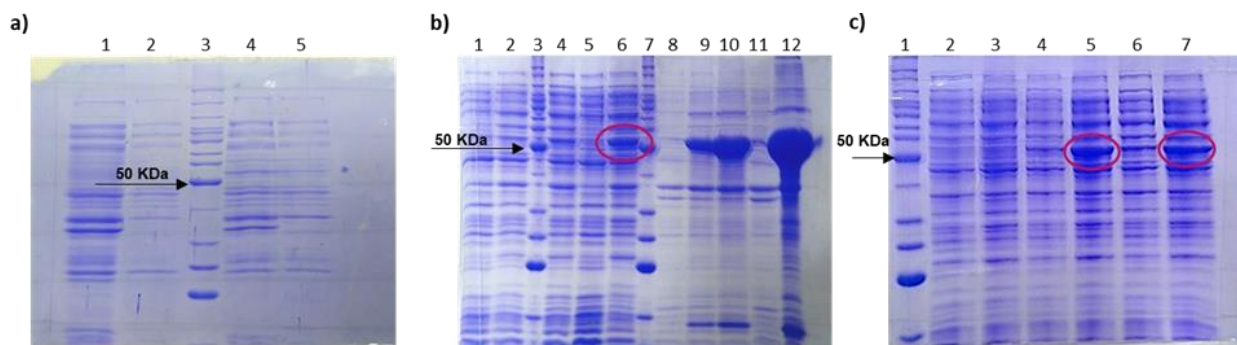
A análise dos peptídeos por LC-MS/MS foi realizada com um Eksigent nanoLC Ultra 1D plus, com AS-2 autosampler, acoplado ao LTQ-XL Orbitrap Discovery (Thermo Scientific, USA). A mistura de peptídeos do gel SDS-PAGE foi separada em gradientes pela coluna de fase reversa C18 (5 μ M ODS-AQ C18 Yamamura Chemical Lab). As amostras foram analisadas em triplicatas. Os espectros de massa foram adquiridos de maneira top-8 dependente de dados, com exclusão dinâmica aplicada, e foram pesquisados contra um banco de dados não-redundantes de *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* para a identificação dos peptídeos com o software Comet, na plataforma PatterLab para Proteômica (ENG, J., *et al.*, 2012; CARVALHO, P., *et al.*, 2016). A validade das combinações de espectros peptídicos foi avaliada usando o módulo Search Engine Processor da Patternlab for Proteomics, com uma taxa de descoberta falsa de 1%. Os peptídeos identificados como pertencentes à *MtbDAHPs* foram validados manualmente e as áreas dos picos dos peptídeos selecionados foram calculadas com o programa Skyline.

7. Resultados parciais da expressão e purificação da proteína *MtbDAHPs* selvagem e mutante

Primeiramente, foi realizado o teste de expressão da proteína *MtbDAHPs* seguindo exatamente o protocolo descrito por Rizzi *et al.*, 2005. No entanto, não foi possível obter a proteína na fração solúvel do extrato celular (Figura 15a). Portanto, novos testes de expressão utilizando diferentes cepas de *Escherichia coli* (DE3) foram realizados. Através destes testes, foi definido que a melhor condição para expressão da proteína *MtbDAHPs* selvagem (\pm 51 KDa), na fração solúvel do extrato celular, foi em células *E. coli* C41 (DE3), em meio TB, à temperatura de 30°C, após 24h da indução com 0,1 mM de IPTG. As mesmas condições foram

eficazes para a expressão das proteínas mutantes R337A e K306A (\pm 51 KDa). Ainda será necessário realizar novos testes de expressão a fim de conseguir expressar a proteína DAHPS mutante W280A (Figura 15c).

Figura 15. Análise de amostras de extrato celular dos testes de expressão por SDS-PAGE 12%.



Legenda: a) 1 – pET:: \emptyset , 24h, solúvel; 2 – pET:: \emptyset , 24h insolúvel; 3 – Marcador de peso molecular Page Ruler; 4 – pET::DAHPS(WT), 24h solúvel; 5 – pET::DAHPS(WT), 24h, insolúvel. b) 1 – pET:: \emptyset , 3h, solúvel; 2 – pET::DAHPS(WT), 3h, solúvel; 3 – Marcador de peso molecular Page Ruler; 4 – pET::DAHPS(WT), 6h, solúvel; 5 – pET:: \emptyset , 24h, solúvel; 6 – pET::DAHPS(WT), 24h, solúvel; 7 – Marcador de peso molecular Page Ruler; 8 – pET:: \emptyset , 3h, insolúvel; 9 – pET::DAHPS(WT), 3h, insolúvel; 10 – pET::DAHPS(WT), 6h, insolúvel; 11 – pET:: \emptyset , 24h, insolúvel; 12 – pET::DAHPS(WT), 24h, insolúvel. c) 1 – Marcador de peso molecular Page Ruler; 2 – pET::DAHPS(W280A), 6h, solúvel; 3 – pET::DAHPS(W280A), 24h, solúvel; 4 – pET::DAHPS(R337A), 6h, solúvel; 5 – pET::DAHPS(R337A), 24h, solúvel; 6 – pET::DAHPS(K306A), 6h, solúvel; 7 – pET::DAHPS(K306A), 24h, solúvel.

A identificação da proteína *Mtb*DAHPS selvagem e mutantes (R337A e K306A) foi realizada por LC-MS/MS. Para a proteína selvagem, foi possível obter uma cobertura de 88% da sequência, confirmando de maneira inequívoca a expressão da proteína *Mtb*DAHPS selvagem recombinante. Além disso, a análise das amostras contendo as enzimas mutantes, também por LC-MS/MS, permitiu confirmar a introdução das mutações desejadas nestas proteínas (Figura 16).

Figura 16. Análise por LC-MS/MS da proteína DAHPS selvagem e mutante K306A e R337A.

a) DAHPS selvagem

```

001 MNWTVDIPID QLPSLPLPT DLRTRLDAAL AKPAAQQPTW PADQALAMRT VLESVPPVTV 060
061 PSEIVRLQEQ LAQVAKGEAF LLQGGDCAET FMDNTEPHIR GNVRRALLQMA VVLTYGASMP 120
121 VVKVARIAGQ YAKPRSADID ALGLRSYRGD MINGFAPDAA AREHDPSRLV RAYANASAAM 180
181 NLVRALTSSG LASLHLVHDW NREFVRTSPA GARYEALATE IDRGLRFMSA CGVADRNLQT 240
241 AEIYASHEAL VLDYERAMLR LSDGDDGEPQ LFDLSAHTVW IGERTRQIDG AHIAFAQVIA 300
301 NPVGKLGPN MTPELAVEYV ERLDPHNKPG RLTLVSRMGN HKVRDLLPPI VEKVQATGHQ 360
361 VIWQCDFMHG NTHESSTGFK TRHFDRIVDE VQGFFEVRHA LGTHPGGIHV EITGENVTEC 420
421 LGGAQDISET DLAGRYETAC DPLRLNTQQSL ELAFLVAEML RD

```

b) Mutante K306A

```

001 MNWTVDIPID QLPSLPPLPT DLRTRLDAAL AKPAAQQPTW PADQALAMRT VLESVPPVTV 060
061 PSEIVRLQEQ LAQVAKGEAF LLQGGDCAET FMDNTEPHIR GNVRALLOMA VVLTYGASMP 120
121 VVKVARIAGQ YAKPRSADID ALGLRSYRGD MINGFAPDAA AREHDPSRLV RAYANASAAM 180
181 NLVRALTSSG LASLHLVHDW NREFVRTSPA GARYEALATE IDRGLRFMSA CGVADRNLQT 240
241 AEIYASHEAL VLDYERAMLR LSDGDDGEPQ LFDLSAHTVW IGERTRQIDG AHIAFAQVIA 300
301 NPVGVA LGPN MTPELAVEYV ERLDPHNKPG RLTLVSRMGN HKVRDLLPPI VEKVQATGHQ 360
361 VIWQCDEPMHG NTHESSTGFK TRHFDRIVDE VQGFVEVHRA LGTHPGGIHV EITGENVTEC 420
421 LGGAQDISET DLAGRYETAC DPLRLNTQQSL ELAFLVAEML RD

```

c) Mutante R337A

```

001 MNWTVDIPID QLPSLPPLPT DLRTRLDAAL AKPAAQQPTW PADQALAMRT VLESVPPVTV 060
061 PSEIVRLQEQ LAQVAKGEAF LLQGGDCAET FMDNTEPHIR GNVRALLOMA VVLTYGASMP 120
121 VVKVARIAGQ YAKPRSADID ALGLRSYRGD MINGFAPDAA AREHDPSRLV RAYANASAAM 180
181 NLVRALTSSG LASLHLVHDW NREFVRTSPA GARYEALATE IDRGLRFMSA CGVADRNLQT 240
241 AEIYASHEAL VLDYERAMLR LSDGDDGEPQ LFDLSAHTVW IGERTRQIDG AHIAFAQVIA 300
301 NPVGKVLGPN MTPELAVEYV ERLDPHNKPG RLTLVSRMGN HKVRDLLPPI VEKVQATGHQ 360
361 VIWQCDEPMHG NTHESSTGFK TRHFDRIVDE VQGFVEVHRA LGTHPGGIHV EITGENVTEC 420
421 LGGAQDISET DLAGRYETAC DPLRLNTQQSL ELAFLVAEML RD

```

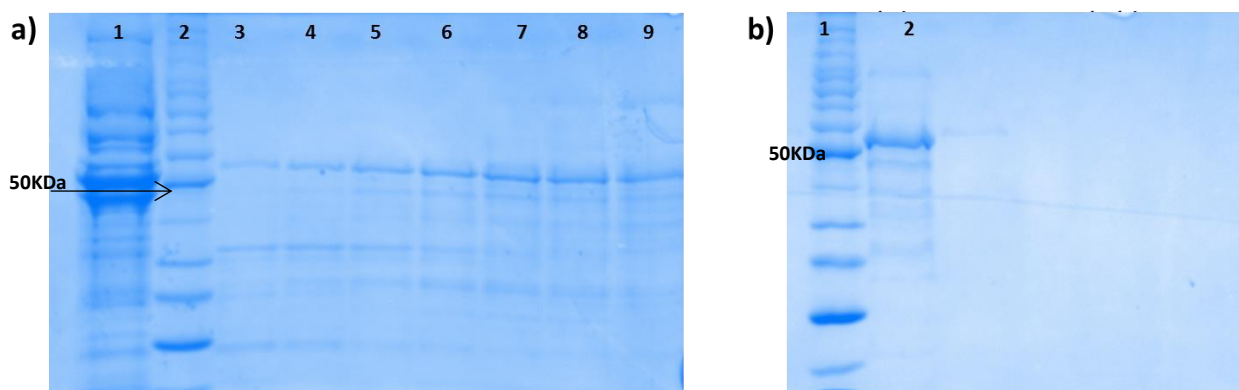
Legenda: a) Leitura espectral da proteína *MtDAHPs* selvagem mostrando 88% de cobertura de sequência (peptídeos em azul), sublinhado em vermelho os resíduos que foram mutados (K306 e R337); b) Leitura espectral da proteína *MtDAHPs* mutante K306A com destaque ao aminoácido alanina 306; c) Leitura espectral da proteína *MtDAHPs* mutante R337A com destaque ao aminoácido alanina 337.

Para purificação da proteína DAHPs selvagem, primeiramente foi testado o protocolo descrito por Rizzi, C., *et al.*, 2005, onde foi utilizado 5 g de células ressuspensas em Tris HCl 50 mM contendo β -Me 1 mM pH 7,8 (5 mL/g). As células foram tratadas com lisozima 0,2 mg/mL e rompidas por ultrassom, com 10 pulsos de 10 segundos, a uma amplitude de 21%, com intervalo de 1 minuto em gelo entre os pulsos. Em seguida, as frações solúvel e insolúvel foram separadas, e a fração solúvel foi tratada com sulfato de estreptomicina 1% e sulfato de amônio 25% da saturação (1M). Entretanto, foi possível observar que a proteína precipita na presença do sulfato de estreptomicina 1% e, diferente do que está descrito no protocolo de referência, a proteína não precipita na presença de sulfato de amônio 25%. Foram realizados testes de precipitação com diferentes concentrações de sulfato de amônio, mas também sem sucesso. Além disso, a amostra não interagiu com a coluna Q- Sepharose, pois o gel de SDS-PAGE não apresentou nenhuma banda referente ao tamanho molecular da proteína (51KDa).

Diante desses resultados um novo protocolo de purificação da enzima *MtbDAHPs* selvagem está sendo estabelecido. Cinco gramas de células

descongeladas foram ressuspensas em Tris HCl 50 mM pH 7,5 (5 mL/g) e tratadas com lisozima 0,2 mg/mL. As células foram rompidas com 10 pulsos de ultrassom (amplitude de 21%) de 10 segundos cada, com um intervalo de 1 minuto entre os pulsos. Após o rompimento das células, as frações solúvel e insolúvel foram separadas por centrifugação. A fração solúvel foi tratada com DNase 5 mg/mL (Sigma-Aldrich), e então aplicada na coluna de troca aniônica Q Sepharose FF. As amostras eluídas foram analisadas em gel de poliacrilamida 12%, no qual foi possível observar que a proteína eluiu no início do gradiente, porém ainda com muitos contaminantes. Diante deste resultado, adicionamos as amostras na coluna Q Sepharose HP. As amostras eluídas dessa coluna ainda estavam com muitos contaminantes e então as alíquotas selecionadas foram aplicadas na coluna Sephacryl S-200 para a retirada dos contaminantes, a fim de obter a proteína selvagem na forma homogênea para os ensaios posteriores. Entretanto esse protocolo não se mostrou eficiente, visto que ainda havia contaminantes na amostra e uma quantidade significativa da proteína de interesse foi perdida durante o processo. Mais esforços deverão ser feitos a fim de estabelecer o protocolo de purificação desta enzima. Uma vez que protocolo de purificação da proteína selvagem esteja pronto, o mesmo será testado nas proteínas mutantes e, se necessário, ajustes serão feitos para obtenção das proteínas mutantes nas suas formas homogêneas (Figura 17).

Figura 17. Análise por SDS-PAGE 12% das amostras tratadas da proteína DAHPs.



Legenda: a) Amostras eluídas da coluna Sephacryl S-200. Legenda: 1 – Amostra aplicada na coluna (obtida da passagem pela coluna Q Sepharose HP), 2- Marcador de peso molecular Page Ruler, 3-9 – Frações eluídas ao longo gradiente. b) Pool das frações resultantes da coluna Sephacryl S-200. Legenda: 1- Marcador de peso molecular Page Ruler, 2 – seleção das frações eluídas ao longo gradiente, ainda com contaminantes.

CAPÍTULO IV

Considerações finais

Perspectivas

Referências

Anexos

8. Considerações Finais

A TB é a segunda maior causa de morte por um único agente infeccioso no mundo, ficando atrás apenas do vírus da COVID-19. Apesar de haver a disponibilidade de tratamento este está longe de ser ideal, devido ao seu longo tempo de duração, custo elevado e alta taxa de abandono. A situação se torna ainda mais grave com o surgimento de cepas resistentes aos fármacos de primeira linha, sendo necessário o uso de outros medicamentos que, além de prolongar o tempo de tratamento, são caros e provocam diversos efeitos colaterais. Diante desse cenário, faz-se urgente o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para controlar a incidência da doença.

A estratégia de desenvolvimento de fármacos anti-TB baseado no alvo requer a identificação e validação de genes e proteínas que apresentem função vital para a sobrevivência do patógeno. Além da essencialidade, a vulnerabilidade é uma das principais características que um potencial alvo molecular deve possuir. Alvos muito vulneráveis são aqueles que com baixo grau de inibição são capazes de gerar um fenótipo letal. As proteínas que compoem a via metabólica do chiquimato se apresentam como alvos interessantes para o desenvolvimento de fármacos, uma vez que essa via é essencial para o *M. tuberculosis* e está ausente em humanos. Diferentes ferramentas moleculares são utilizadas para a identificação e avaliação da essencialidade e vulnerabilidade de alvos. O nocaute gênico consiste na inativação de um gene específico e na observação do fenótipo gerado pela perda completa da função deste gene. Desta forma, é possível identificar genes que são essenciais ao bacilo. O sistema CRISPRi é utilizado tanto para a avaliação da essencialidade quanto da vulnerabilidade de genes, permitindo que seja possível observar o fenótipo gerado a partir de diferentes níveis de interferência na expressão do gene alvo.

Recentemente, BOSCH, B. *et al.*, 2021, desenvolveram uma ferramenta baseada no sistema CRISPRi capaz de titular em escala genômica, a expressão dos genes anotados de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, e de inferir o grau de vulnerabilidade de cada gene. Pelas predições encontradas nessa plataforma o gene *MSMEG_4244* de *M. smegmatis* não é vulnerável, enquanto que o gene *aroG*

de *M. tuberculosis* apresentou alto grau de vulnerabilidade, inclusive superior ao grau de vulnerabilidade dos genes *inhA* e *rpoB*, por exemplo, que codificam os alvos dos dois medicamentos de primeira linha mais potentes para TB, isoniazida (*inhA*) e rifampicina (*rpoB*). Esse dado reforça a indicação do gene *aroG* de *M. tuberculosis* com um alvo promissor para o desenvolvimento de inibidores.

Devido ao fato de que o *M. tuberculosis* encontra diferentes tipos de estresse impostos pelos mecanismos de defesa do sistema imune do hospedeiro como, por exemplo, a privação de nutrientes, baixo pH e condições de baixa oxigenação (YUAN, T. & SAMPSON, N., 2018), é fundamental investigar se a vulnerabilidade de um alvo é mantida em diferentes cenários. Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que nas curvas de crescimento em meio suplementado foi possível recuperar parcialmente o crescimento da bactéria, sugerindo que o gene é vulnerável, mas dependente do contexto e da concentração. Esses resultados indicam que a vulnerabilidade desse gene é também fortemente dependente do contexto nutricional. A inibição da expressão do gene *aroG* de *M. tuberculosis* além de promover o prejuízo no desenvolvimento do bacilo em condições ótimas de crescimento (meio de cultivo, temperatura, e aeração adequados) *in vitro*, demonstrou também, e de fundamental importância, que o crescimento da bactéria é afetado durante a infecção de macrófagos murinos, sugerindo que esse gene continua sendo vulnerável no contexto de infecção intracelular.

Experimentos em condição de hipóxia e em modelos animais devem ser realizados para avaliar a vulnerabilidade do gene *aroG* de *M. tuberculosis* em diferentes condições ambientais. A partir dessa informação, o desenho e síntese de compostos químicos que tenham a enzima *MtbDAHPs* como alvo pode ser realizado para prospecção de novos fármacos anti-TB, uma vez que a repressão do gene *aroG* foi capaz de reduzir a viabilidade do bacilo, é esperado que a inibição do produto do gene afete o crescimento bacteriano.

Para *M. smegmatis*, apesar de ter havido a redução na expressão dos níveis de mRNA do gene de interesse, o silenciamento gerado não provocou prejuízos no desenvolvimento das culturas. Esse resultado aponta diferenças importantes nos metabolismos de compostos aromáticos entre as duas micobactérias, embora isso não tenha sido completamente caracterizado. Nossos resultados também fomentam

a discussão sobre o uso da micobactéria *M. smegmatis* como modelo experimental para *M. tuberculosis*, uma vez que efeitos obtidos na bactéria modelo podem não ser reprodutíveis na bactéria alvo.

A realização deste trabalho também contribuiu para a implementação do sistema CRISPRi no nosso grupo de pesquisa. O emprego dessa técnica possibilitará o avanço de outros projetos e estudos realizados no laboratório de forma eficiente, robusta e reprodutível. Como não foi possível atingir todos os objetivos propostos no projeto desde trabalho, esforços deverão ser empreendidos no futuro próximo para sua execução. A utilização de técnicas mais modernas de nocaute gênico, como por exemplo, o sistema ORBIT (MURPHY, K. *et al.*, 2018) poderá ser empregada para a determinação da essencialidade do gene *aroG* selvagem e dos mutante pontuais, a fim de averiguar a importância dos resíduos de aminoácidos mutados no mecanismo funcional da enzima. A expressão das proteínas selvagem e mutantes pontuais, assim como a obtenção das proteínas nas suas formas homogêneas deverão ser obtidas para realização dos ensaios cinéticos e avaliação de parâmetros catalíticos.

9. Perspectivas

- Determinar a vulnerabilidade do gene *aroG* em macrófagos humanos (THP-1), em condições de hipóxia e em modelos animais.
- Realizar nocaute do gene *aroG* a fim de verificar a essencialidade do gene utilizando diferentes ferramentas moleculares.
- Estabelecer o protocolo para expressão da proteína mutante *aroG_W280A*.
- Finalizar o protocolo de purificação das proteínas selvagem e mutantes pontuais.
- Avaliar os parâmetros cinéticos da proteína selvagem em comparação com as proteínas mutantes pontuais a fim de compreender o papel funcional dos resíduos de aminoácidos mutados no processo catalítico da enzima *MtDAHPs*.
- Realizar triagens *in silico* e *in vitro* de bibliotecas químicas tendo como alvo a enzima *MtbDAHPs*.
- Sintetizar compostos químicos que tenham como alvo a enzima *MtbDAHPs*.
- Realizar ensaios de concentração inibitória mínima, genotoxicidade e citotoxicidade dos compostos selecionados.

10. Referências

ANDRIES, K. *et al.* A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, [s. l.], v. 307, n. 5707, p. 223–227, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1106753>

BENTLEY, R. The shikimate pathway—a metabolic tree with many branches. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 307–383, 1990. Available at: <https://doi.org/10.3109/10409239009090615>

BESTE, D. J. V. *et al.* ¹³C-flux spectral analysis of host-pathogen metabolism reveals a mixed diet for intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry and Biology**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 1012–1021, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.06.012>

BLACKMORE, N. J. *et al.* Three sites and you are out: Ternary synergistic allostery controls aromatic amino acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 425, n. 9, p. 1582–1592, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.12.019>

BOLDRIN, F. *et al.* The phosphatidyl-myo-inositol mannosyltransferase PimA is essential for *Mycobacterium tuberculosis* growth in vitro and in vivo. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 196, n. 19, p. 3441–3451, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.01346-13>

BORAH, K. *et al.* Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* Exploits Multiple Host Nitrogen Sources during Growth in Human Macrophages. **Cell Reports**, [s. l.], v. 29, n. 11, p. 3580-3591.e4, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.037>

BOSCH, B. *et al.* Genome-wide gene expression tuning reveals diverse vulnerabilities of *Mycobacterium tuberculosis*. **Cell**, [s. l.], v. 184, n. 17, p. 4579-4592.e24, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.033>

BUCHMEIER, N. *et al.* A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 1375–1382, 2000. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01797.x>

CARROLL, P.; FARAY-KELE, M. C.; PARISH, T. Identifying vulnerable pathways in *Mycobacterium tuberculosis* by using a knockdown approach. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 77, n. 14, p. 5040–5043, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1128/AEM.02880-10>

CARVALHO, P. C. *et al.* Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. **Nature protocols**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 102–117, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.133>. Acesso em: 27 jun. 2018.

CHOUDHARY, E. *et al.* Conditional silencing by CRISPRi reveals the role of DNA gyrase in formation of drug-tolerant persister population in *Mycobacterium tuberculosis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. MAR, p. 1–13, 2019. Available at: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00070>

COHEN, K. A.; BISHAI, W. R.; PYM, A. S. Molecular Basis of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Genetics of Mycobacteria**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 413–429, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0036-2013>. Correspondence

COLE, S. T. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, [s. l.], v. 396, n. 6707, p. 190–190, 1998. Available at: <https://doi.org/10.1038/24206>. Acesso em: 4 set. 2018.

CURCIC, R.; DHANDAYUTHAPANI, S.; OERETIC, V. Gene expression in mycobacteria: transcriptional fusions based on xyle and analysis of the promoter region of the response regulator mtrA from *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1057–1064, 1994. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00496.x>

DALBERTO, Pedro F. *et al.* Handling the Hurdles on the Way to Anti-tuberculosis Drug Development. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 8, n. November, p. 1–27, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.586294>

DALBERTO, Pedro Ferrari *et al.* Assessing the role of deoD gene in *Mycobacterium tuberculosis* in vitro growth and macrophage infection. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 119, n. February, p. 60–64, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.056>

DAVOODI, S. *et al.* Correlating Drug-Target Residence Time and Post-antibiotic Effect: Insight into Target Vulnerability. **ACS Infectious Diseases**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 629–636, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00484>

DRUMOND VILLELA, A. *et al.* Characterisation of iunH gene knockout strain from *Mycobacterium tuberculosis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, [s. l.], v. 112, n. 3, p. 203–208, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1590/0074-02760160462>. Acesso em: 21 jun. 2018.

DUCATI, R G; BASSO, L. a; SANTOS, D. S. Mycobacterial shikimate pathway enzymes as targets for drug design. **Current drug targets**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 423–435, 2007. Available at: <https://doi.org/10.2174/138945007780059004>

DUCATI, Rodrigo Gay *et al.* The resumption of consumption - A review on tuberculosis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 101, n. 7, p. 697–714, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000700001>

DUQUE-VILLEGAS, M. A. *et al.* EPSP Synthase-Depleted Cells Are Aromatic Amino Acid Auxotrophs in *Mycobacterium smegmatis*. **Microbiology Spectrum**, [s. l.], v. 9, n. 3, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00009-21>

EHLERS, S.; SCHAIBLE, U. E. The Granuloma in Tuberculosis: Dynamics of a Host–Pathogen Collusion. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 3, p. 411, 2013. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00411>. Acesso em: 10 jul. 2018.

ENG, J. K.; JAHAN, T. A.; HOOPMANN, M. R. Comet: An open-source MS/MS sequence database search tool. **PROTEOMICS**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 22–24, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1002/pmic.201200439>. Acesso em: 27 jun. 2018.

FALCÃO, V. C. A. *et al.* Validation of *Mycobacterium tuberculosis* dihydroneopterin

aldolase as a molecular target for anti-tuberculosis drug development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 485, n. 4, p. 814–819, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.137>

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. E. *Mycobacterium tuberculosis*: Success through dormancy. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 514–532, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00331.x>

GORDON, S. *et al.* Selective *Mycobacterium tuberculosis* shikimate kinase inhibitors as potential antibacterials. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 7, p. 9–20, 2015. Available at: <https://doi.org/10.4137/PMC.S13212>

GOUZY, A. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* Exploits Asparagine to Assimilate Nitrogen and Resist Acid Stress during Infection. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 2, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003928>

GUPTA, R. S.; LO, B.; SON, J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. FEB, p. 1–41, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>

HARRISON, J. *et al.* Lcp1 is a phosphotransferase responsible for ligating arabinogalactan to peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*. **mBio**, [s. l.], v. 7, n. 4, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.00972-16>

HERRMANN, K. M.; WEAVER, L. M. the Shikimate Pathway. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 473–503, 1999. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.473>

HINGLEY-WILSON, S. M.; SAMBANDAMURTHY, V. K.; JACOBS, W. R. Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 4, n. 10, p. 949–955, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni981>

HOAGLAND, D. *et al.* Tuberculosis. **Adv Drug Deliv Rev.**, [s. l.], p. 55–72, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.026>.New

JACKSON, M., CAMACHO, L. R., GCQUEL, B. AND GUILHOT, C. *Mycobacterium tuberculosis* Protocols (chapter 5). *In*: PARISH, T.; STOKER, N. G. (org.). **Mycobacterium tuberculosis Protocols**. Totowa: Humana Press, 2001. p. 59–75.

JIAO, W. *et al.* Quaternary structure is an essential component that contributes to the sophisticated allosteric regulation mechanism in a key enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1–21, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180052>

KAUFMANN, S. H. E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 20–30, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1038/35095558>

KOLLY, G. S. *et al.* Assessing the essentiality of the decaprenyl-phospho-d-arabinofuranose pathway in *Mycobacterium tuberculosis* using conditional mutants. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 194–211, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.12546>

KORB, V. C.; CHUTURGOON, A. A.; MOODLEY, D. *Mycobacterium tuberculosis*: Manipulator of protective immunity. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 3, 2016. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms17030131>

LECHARTIER, B. *et al.* Tuberculosis drug discovery in the post-post-genomic era. **EMBO Molecular Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 158–168, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1002/emmm.201201772>

LEE, J. Y. Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. **Tuberculosis and Respiratory Diseases**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 47–55, 2015. Available at: <https://doi.org/10.4046/trd.2015.78.2.47>

LIGHT, S. H.; ANDERSON, W. F. The diversity of allosteric controls at the gateway to aromatic amino acid biosynthesis. **Protein Science**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 1–50, 2013. Available at: <https://doi.org/10.1002/pro>

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

MADEIRA, F. *et al.* The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 47, n. W1, p. W636–W641, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>

MATSUMOTO, M. *et al.* OPC-67683, a nitro-dihydro-imidazooxazole derivative with promising action against tuberculosis in vitro and in mice. **PLoS Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 2131–2144, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030466>

MCNEIL, M. B. *et al.* CRISPR interference identifies vulnerable cellular pathways with bactericidal phenotypes in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 116, n. 4, p. 1033–1043, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1111/mmi.14790>

MCNEIL, M. B.; COOK, G. M. Utilization of CRISPR Interference To Validate MmpL3 as a Drug Target in *Mycobacterium tuberculosis*. [s. l.], n. May, p. 1–7, 2019.

MINATO, Y. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* folate metabolism and the mechanistic basis for para-aminosalicylic acid susceptibility and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 59, n. 9, p. 5097–5106, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00647-15>

MUNACK, S. *et al.* Remote Control by Inter-Enzyme Allostery: A Novel Paradigm for Regulation of the Shikimate Pathway. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 428, n. 6, p. 1237–1255, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.01.001>

MURPHY, K. C. *et al.* ORBIT: a new paradigm for genetic engineering of mycobacterial chromosomes. **bioRxiv**, [s. l.], p. 249292, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1101/249292>

NIRMAL, C. R.; RAO, R.; HOPPER, W. Inhibition of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*: In silico screening and in vitro validation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 105, p. 182–193, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.10.014>

NUNES, J. E. S. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* shikimate pathway enzymes as targets for the rational design of anti-tuberculosis drugs. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 6, 2020. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules25061259>

PAI, M. *et al.* Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 2, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>

PAN, F. *et al.* Erratum: Cell wall core galactofuran synthesis is essential for growth of mycobacteria (Journal of Bacteriology (2001) 183:13 (3991-3998)). **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 183, n. 23, p. 6971, 2001. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6971-6971.2001>

PARISH, T. Starvation Survival Response of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 185, n. 22, p. 6702–6706, 2003. Available at: <https://doi.org/10.1128/JB.185.22.6702-6706.2003>

PARISH, T.; STOKER, N. G. The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, [s. l.], v. 1414, n. 148, p. 36–3069, 2002.

PAWLOWSKI, A. *et al.* Tuberculosis and HIV co-infection. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 8, n. 2, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002464>

PELICIC, V. *et al.* Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, [s. l.], v. 94, p. 10955–10960, 1997. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23543/pdf/pq010955.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2018.

RAKESH, DAVID F. BRUHN, MICHAEL S. SCHERMAN, AMAN P. SINGH, LEI YANG, JIUYU LIU, ANNE J. LENAERTS, and R. E. L. Synthesis and evaluation of Pretomanid (PA-824) oxazolidinone hybrids. **Physiology & behavior**, [s. l.], v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

RAWAL, T.; BUTANI, S. Combating Tuberculosis Infection: A Forbidding Challenge. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 8–16, 2016. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27168676>. Acesso em: 8 jun. 2018.

REDDY, B. K. K. *et al.* Assessment of *Mycobacterium tuberculosis* Pantothenate Kinase Vulnerability through Target Knockdown and Mechanistically Diverse Inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy p.**, [s. l.], 2014. Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.00140-14>. Acesso em: 7 ago. 2018.

REICHAU, S. *et al.* Potent inhibitors of a shikimate pathway enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*: Combining mechanism- and modeling-based design. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 286, n. 18, p. 16197–16207, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.211649>

RIZZI, C. *et al.* DAHP synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Cloning, expression, and purification of functional enzyme. **Protein Expression and Purification**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 23–30, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.06.040>

ROCK, J. M. *et al.* Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. **Nature microbiology**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 16274, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.274>. Acesso em: 7 jun. 2018.

RODRIGUES-JUNIOR, V. S. *et al.* IQG-607 abrogates the synthesis of mycolic acids and displays intracellular activity against *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 82–85, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.08.021>

RUSSELL, D. G. *et al.* Foamy macrophages and the progression of the human TB granuloma. **Nature immunology**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 943–948, 2010. Available at: <https://doi.org/10.1038/ni.1781.Foamy>

SALA C.; RUBEN C, H. Tuberculosis drugs: new candidates and how to find more. **Future microbiology**, [s. l.], 2011. Available at: <https://doi.org/10.2217/FMB.11.46>. Acesso em: 1 ago. 2018.

SASSO, S. *et al.* Structure and function of a complex between chorismate mutase and DAHP synthase: Efficiency boost for the junior partner. **EMBO Journal**, [s. l.], v. 28, n. 14, p. 2128–2142, 2009. Available at: <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.165>

SHEERIN, D. *et al.* Systematic evaluation of transcriptomic disease risk and diagnostic biomarker overlap between COVID-19 and tuberculosis: a patient-level meta-analysis. **medRxiv: the preprint server for health sciences**, [s. l.], 2020. Available at: <https://doi.org/10.1101/2020.11.25.20236646>

SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. [s. l.], 2007. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>. Acesso em: 27 jun. 2018.

SINGH, V.; MIZRAHI, V. Identification and validation of novel drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 503–509, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.09.010>. Acesso em: 6 set. 2018.

SIPOS, A. *et al.* Lead selection and characterization of antitubercular compounds using the Nested Chemical Library. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 95, n. S1, p. S200–S206, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.028>

SPROUFFSKE, K.; WAGNER, A. Growthcurver: An R package for obtaining interpretable metrics from microbial growth curves. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 17–20, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12859-016-1016-7>

SUNDARSINGH, J. A. T. *et al.* Features of the biochemistry of *Mycobacterium smegmatis*, as a possible model for *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Infection and Public Health**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 1255–1264, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.023>

TZIN, V.; GALILI, G.; AHARONI, A. Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis. **eLS**, [s. l.], n. December 2017, 2012. Available at: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001315.pub2>

ULRICHS, T.; KAUFMANN, S. H. E. New insights into the function of granulomas in

human tuberculosis. **Journal of Pathology**, [s. l.], v. 208, n. 2, p. 261–269, 2006. Available at: <https://doi.org/10.1002/path.1906>

VILCHÈZE, C. *et al.* Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl-acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASII end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of bacteriology**, [s. l.], v. 182, n. 14, p. 4059–4067, 2000. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869086>. Acesso em: 7 ago. 2018.

WEBBY, C. J. *et al.* Synergistic allostery, a sophisticated regulatory network for the control of aromatic amino acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 285, n. 40, p. 30567–30576, 2010a. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.111856>. Acesso em: 12 jun. 2018.

WEBBY, C. J. *et al.* Synergistic allostery, a sophisticated regulatory network for the control of aromatic amino acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 285, n. 40, p. 30567–30576, 2010b. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.111856>

WEBBY, C. J.; PATCHETT, M. L.; PARKER, E. J. Characterization of a recombinant type II 3-deoxy-D- arabino -heptulosonate-7-phosphate synthase from *Helicobacter pylori*. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 390, n. 1, p. 223–230, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1042/bj20050259>

WEI, J.-R. *et al.* Depletion of antibiotic targets has widely varying effects on growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 108, n. 10, p. 4176–4181, 2011. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1018301108>

WEI, J. R.; RUBIN, E. J. The many roads to essential genes. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 88, n. SUPPL. 1, 2008. Available at: [https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(08\)70033-7](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(08)70033-7)

WHO. **Global tuberculosis report 2021**. [S. l.: s. n.], 2021.

YAMADA, H. *et al.* *Mycobacterium smegmatis*, Basonym *Mycobacterium smegmatis*, Expresses Morphological Phenotypes Much More Similar to *Escherichia coli* Than *Mycobacterium tuberculosis* in Quantitative Structome Analysis and CryoTEM Examination. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. SEP, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01992>

YUAN, T.; SAMPSON, N. S. Hit Generation in TB Drug Discovery: From Genome to Granuloma. **Chemical Reviews**, [s. l.], v. 118, n. 4, p. 1887–1916, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00602>

ZHANG, Y. J. *et al.* Tryptophan biosynthesis protects mycobacteria from CD4 T cell-mediated killing. [s. l.], v. 155, n. 6, p. 1296–1308, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.045>.Tryptophan

ZHONG, W. *et al.* Pyruvate Kinase Regulates the Pentose-Phosphate Pathway in Response to Hypoxia in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 431, n. 19, p. 3690–3705, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.07.033>

11. Anexos

Confirmação de submissão do artigo



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

[PUBLICATIONS](#) [EVENTS](#) [SCIENCE SKILLS](#) [CAREERS](#) [MEMBERSHIP](#) [PUBLIC POLICY](#)



Manuscript Submission
and Peer Review System

[Home](#) [Help for Authors](#) [Help for Reviewers](#) [Contact Us](#) [Logout](#)

<https://journals.asm.org/journal/mbio>

ASM is committed to [sharing research](#) relevant to the SARS-CoV-2 outbreak and to making published content [accessible and reusable](#). All published papers relevant to SARS-CoV-2 will be free to read and available for text and data mining via PubMed Central. Our global scientific community is impacted daily by the pandemic and this may lead to some delays in editorial decisions. Please contact the journal office if you have questions.

To allow for the increased research related to the COVID-19 pandemic, AAM Fellows will be allowed to submit one additional AAM Contribution annually that is SARS-CoV-2 related. If you have already submitted an AAM Contribution in 2020, then staff will need to update the system to allow this additional submission. E-mail mBio@asmusa.org for additional information.

| | |
|-------------------------------|--|
| Manuscript # | mBio00510-22 |
| Current Revision # | 0 |
| Submission Date | 2022-02-22 22:17 |
| Current Stage | Initial Quality Check Started |
| Title | Evaluation of 3-deoxy-D-arabino-heptulosnate-7-phosphate synthase (DAHPS) as a vulnerable target in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |
| Running Title | DAHPS enzyme as a vulnerable target in <i>M. tuberculosis</i> |
| Manuscript Type | Research Article |
| Special Section | N/A |
| Corresponding Author | Prof. Cristiano Valim Bizarro (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul) Luiza Galina , Mx. Fernanda Souza Macchi Hopf , Bruno Lopes Abbad , Dr. Nathalia Denise de Moura Sperotto , Mx. Alexia de Matos Czczot , Mario Alejandro Duque-Villegas , Márcia Alberton Perello , Dr. Leticia Beatriz Matter , Eduardo Vieira de Souza , Prof. Tanya Parish , Dr. Pablo Machado , Dr. Luiz A Basso , Prof. Cristiano Valim Bizarro (corr-auth) |
| Contributing Authors | |

Colaborações



Review

Mycobacterium tuberculosis Shikimate Pathway Enzymes as Targets for the Rational Design of Anti-Tuberculosis Drugs

José E. S. Nunes ^{1,2,†}, Mario A. Duque ^{1,3,†}, Talita F. de Freitas ^{1,2}, **Luiza Galina** ^{1,2}, Luis F. S. M. Timmers ⁴, Cristiano V. Bizarro ^{1,3}, Pablo Machado ^{1,3}, Luiz A. Basso ^{1,2,3,*} and Rodrigo G. Ducati ^{1,4,5,*}

¹ Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil; jeduardo.sacconi@gmail.com (J.E.S.N.); alejandro.duquevillegas@gmail.com (M.A.D.); talita.freitas@acad.pucrs.br (T.F.d.F.); luizagalina89@gmail.com (L.G.); cristiano.bizarro@pucrs.br (C.V.B.); pablo.machado@pucrs.br (P.M.)

² Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), Universidade do Vale do Taquari (Univates), Lajeado, RS 95914-014, Brazil; luis.timmers@univates.br

⁵ Centro de Ciências Médicas (CCM), Univates, Lajeado, RS 95914-014, Brazil

* Correspondence: luiz.basso@pucrs.br (L.A.B.); rodrigo.ducati@univates.br (R.G.D.);

Tel.: +(55)(51)33203629 (L.A.B.); +(55)(51)997609299 (R.G.D.)

† They are equal-contributing first authors.

Academic Editor: Laurent Chiarelli

Received: 27 December 2019; Accepted: 10 February 2020; Published: 11 March 2020



Abstract: Roughly a third of the world's population is estimated to have latent *Mycobacterium tuberculosis* infection, being at risk of developing active tuberculosis (TB) during their lifetime. Given the inefficacy of prophylactic measures and the increase of drug-resistant *M. tuberculosis* strains, there is a clear and urgent need for the development of new and more efficient chemotherapeutic agents, with selective toxicity, to be implemented on patient treatment. The component enzymes of the shikimate pathway, which is essential in mycobacteria and absent in humans, stand as attractive and potential targets for the development of new drugs to treat TB. This review gives an update on published work on the enzymes of the shikimate pathway and some insight on what can be potentially explored towards selective drug development.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; human tuberculosis; shikimate pathway; enzyme drug target; enzyme inhibition; rational drug design

1. Introduction

1.1. Tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis is the main causative agent of human tuberculosis (TB). In 2018, approximately 10 million people developed TB, which resulted in 1.3 million deaths in HIV-negative and 300,000 deaths in HIV-positive patients. This recent report from the World Health Organization (WHO) indicated that, worldwide, approximately 400,000 people developed multidrug-resistant TB (MDR-TB), where *M. tuberculosis* strains are resistant to isoniazid and rifampicin, two of the most effective TB first-line drugs [1]. Even more concerning was the fact that 8.5% of MDR-TB patients were infected with extensively drug-resistant strains of *M. tuberculosis* (XDR-TB), MDR-TB strains that are



EPSP Synthase-Depleted Cells Are Aromatic Amino Acid Auxotrophs in *Mycobacterium smegmatis*

AQ: au Mario Alejandro Duque-Villegas,^{a,b} Bruno Lopes Abbadi,^a Paulo Ricardo Romero,^a Leticia Beatriz Matter,^a Luiza Galina,^{a,c} Pedro Ferrari Dalberto,^{a,b} Valnês da Silva Rodrigues-Junior,^a Rodrigo Gay Ducati,^{a,d} Candida Deves Roth,^a Raoni Scheibler Rambo,^a Eduardo Vieira de Souza,^{a,b} Marcia Alberton Perello,^a Héctor Ricardo Morbidoni,^a Pablo Machado,^{a,b} Luiz Augusto Basso,^{a,b,c} Cristiano Valim Bizarro^{a,b}

^aInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Partenon, Porto Alegre, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Partenon, Porto Alegre, Brazil

^cPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Partenon, Porto Alegre, Brazil

^dPrograma de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Do Vale Do Taquari - Univates, Universitário, Lajeado, Brazil

^eLaboratorio de Microbiologia Molecular, Facultad de Ciencias Medicas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina

ABSTRACT The epidemiological importance of mycobacterial species is indisputable, and the necessity to find new molecules that can inhibit their growth is urgent. The shikimate pathway, required for the synthesis of important bacterial metabolites, represents a set of targets for inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* growth. The *aroA*-encoded 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) enzyme catalyzes the sixth step of the shikimate pathway. In this study, we combined gene disruption, gene knockdown, point mutations (D61W, R134A, E321N), and kinetic analysis to evaluate *aroA* gene essentiality and vulnerability of its protein product, EPSPS, from *Mycobacterium (Mycobacterium) smegmatis* (MsEPSPS). We demonstrate that *aroA*-deficient cells are auxotrophic for aromatic amino acids (AroAAs) and that the growth impairment observed for *aroA*-knockdown cells grown on defined medium can be rescued by AroAA supplementation. We also evaluated the essentiality of selected MsEPSPS residues in bacterial cells grown without AroAA supplementation. We found that the catalytic residues R134 and E321 are essential, while D61, presumably important for protein dynamics and suggested to have an indirect role in catalysis, is not essential under the growth conditions evaluated. We have also determined the catalytic efficiencies (K_{cat}/K_m) of recombinant wild-type (WT) and mutated versions of MsEPSPS (D61W, R134A, E321N). Our results suggest that drug development efforts toward EPSPS inhibition may be ineffective if bacilli have access to external sources of AroAAs in the context of infection, which should be evaluated further. In the absence of AroAA supplementation, *aroA* from *M. smegmatis* is essential, its essentiality is dependent on MsEPSPS activity, and MsEPSPS is vulnerable.

IMPORTANCE We found that cells from *Mycobacterium smegmatis*, a model organism safer and easier to study than the disease-causing mycobacterial species, when depleted of an enzyme from the shikimate pathway, are auxotrophic for the three aromatic amino acids (AroAAs) that serve as building blocks of cellular proteins: L-tryptophan, L-phenylalanine, and L-tyrosine. That supplementation with only AroAAs is sufficient to rescue viable cells with the shikimate pathway inactivated was unexpected, since this pathway produces an end product, chorismate, that is the starting compound of essential pathways other than the ones that produce AroAAs. The depleted enzyme, the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), catalyzes the sixth step of shikimate pathway. Depletion of this enzyme inside cells was performed by disrupting or silencing the EPSPS-encoding *aroA* gene. Finally, we evaluated the essentiality of specific residues

Editor Amanda G. Ogleby, University of Maryland School of Pharmacy

Copyright © 2021 Duque-Villegas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Cristiano Valim Bizarro, cristiano.bizarro@pucrs.br.

The authors declare no conflicts of interest.

Received 7 April 2021

Accepted 17 November 2021

Published 15 December 2021

AQ: A



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br