

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARCOS GUSTAVO ARAUJO SCHWARZ

Impacto funcional de pequenas mutações em *Mycobacterium bovis* BCG Moreau em
comparação com *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Orientadora: Dra. Leila de Mendonça Lima

RIO DE JANEIRO

2019

Araujo Schwarz, Marcos Gustavo.

Impacto funcional de pequenas mutações em *Mycobacterium bovis* BCG Moreau em comparação com *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv / Marcos Gustavo Araujo Schwarz. - Rio de Janeiro, 2019.

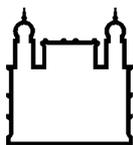
171 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Leila de Mendonça Lima.

Bibliografia: f. 137-143

1. *Mycobacterium bovis* BCG Moreau. 2. Tuberculose. 3. Impacto funcional. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MARCOS GUSTAVO ARAUJO SCHWARZ

IMPACTO FUNCIONAL DE PEQUENAS MUTAÇÕES EM *Mycobacterium bovis*
BCG MOREAU EM COMPARAÇÃO COM *Mycobacterium tuberculosis* CEPA
H37Rv

ORIENTADORA: Dra. Leila de Mendonça Lima

Aprovada em: 13 de agosto de 2019

EXAMINADORES:

Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani (IOC/FIOCRUZ) – Presidente

Dr. Odir Antonio Dellagostin (UFPEL) – Titular

Dra. Bianca Cruz Neves (UFRJ) – Titular

Dr. Luis Caetano Martha Antunes (ENSP/FIOCRUZ) – Suplente e Revisor

Dra. Rafaela Vieira Bruno (IOC/FIOCRUZ) – Suplente

Rio de Janeiro, 13 de agosto de 2019



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Celular e Molecular de **Marcos Gustavo Araujo Schwarz**, sob orientação da Dr^a. Leila de Mendonça Lima. Ao décimo terceiro dia do mês de agosto de dois mil e dezenove, realizou-se às nove horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: “**Impacto funcional de pequenas mutações em *Mycobacterium bovis* BCG Moreau em comparação com *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv**”, no programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração: Biologia Celular e Molecular, na linha de pesquisa: Genoma, transcrito, proteoma e metaboloma de organismos. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Maria Cristina Vidal Pessolani - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Odir Antonio Dellagostin - UFPEL/RS, Dr^a. Bianca Cruz Neves - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr. Luis Caetano Martha Antunes – ENSP/FIOCRUZ e Dr^a. Rafaela Vieira Bruno – IOC/FIOCRUZ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutor em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a coordenadora do Programa, Dr^a. Leila de Mendonça Lima, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 13 de agosto de 2019.

Dr^a. Maria Cristina Vidal Pessolani (Presidente da Banca):

Dr. Odir Antonio Dellagostin (Membro da Banca):

Dr^a. Bianca Cruz Neves (Membro da Banca):

Dr^a. Leila de Mendonça Lima (Coordenadora do Programa):

Trabalho realizado no Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática (LAGFB), sob a orientação da doutora Leila de Mendonça Lima.

Dedico este trabalho a minha
esposa.

“Il y a plus de philosophie dans une bouteille de vin
que dans tous les livres.”

(Louis Pasteur)

Inicialmente agradeço a Deus por ter me dado a vida e a capacidade de aprender, crescer e me desenvolver, além de permitir realizar meus sonhos, principalmente nesse momento tão importante da minha vida que foi o período do desenvolvimento da minha tese de doutorado.

Agradeço a minha esposa, por ser minha melhor amiga, sempre disposta a me ouvir, dar conselhos bem pensados e construídos para a minha pessoa naquela situação específica. Por estar presente em todas as etapas prévias e durante o desenvolvimento dessa tese, me suportando e ajudando, sou grato. Obrigado Livia.

Agradeço a minha família e amigos, por todo apoio durante minha vida. Apoio esse que me permitiu chegar nesse momento e ser quem sou.

A minha orientadora Leila, agradeço pela confiança para o desenvolvimento desse trabalho, desde a concepção do projeto até a confecção dos experimentos. Obrigado por me ajudar a realizar sonhos profissionais de longa data.

Aos participantes da sala 101 do Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática (LAGFB), obrigado pelos bons momentos, risadas, cantorias e conversas científicas importantes. Todos foram e são importantes, alguns ainda presentes e outros já seguiram para outras aventuras. Grato à Paloma, Renata, Leandro, Juliana (é da 101 de coração), Alessandra, Sindy, Bianca, Paula, Mayra e Marlon.

Por toda ajuda essencial para a realização dos experimentos aqui desenvolvidos, assim como para o meu bem-estar durante as longas estadias no laboratório, agradeço à Dona Neiva e Dona Sônia. Muito obrigado.

Agradeço a todos que ajudaram nos diferentes experimentos desenvolvidos em colaboração. Pela modelagem da fumarato redutase, agradeço a Ernesto Raúl Caffarena e Deborah Antunes dos Santos, ambos do PROCC; pela modelagem da dodecina, obrigado a Lucas de Almeida Machado e Ana Carolina Ramos Guimarães (a esta também agradeço pelas análises da reconstrução metabólica), ambos do LAGFB.

Para a parte de bancada molhada, agradeço à Amanda Mendes Rêgo e Duanne Alves da Silva, pela cultura e preparo das amostras de *Mycobacterium tuberculosis* em ambiente NB3, ambas do Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Pela produção dos soros policlonais, agradeço a Antonio José da Silva Gonçalves, do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas.

Pelas análises proteômicas e preparo das amostras, agradeço a Richard Hemmi Valente e todos outros participantes do Laboratório de Toxinologia, principalmente Joelma Saldanha e Giselle Villa Flor Brunoro.

Agradeço às plataformas RPT01A – Sequenciamento de DNA e RPT01D – Análise de Fragmentos pelas análises de sequência desenvolvidas durante a maior parte da tese.

Essa tese não seria a mesma, tanto no quesito científico quanto de desenvolvimento pessoal, se não houvesse o doutorado sanduíche em Toulouse, França. Agradeço inicialmente à CAPES pela concessão da bolsa e por permitir a realização desse estágio e sonho profissional. Aproveito para reiterar um agradecimento à Leila por toda ajuda nesse processo.

Agradeço todos participantes do grupo de Patogenia Molecular de Micobactérias (PMM), do Instituto de Farmacologia e Biologia Estrutural (IPBS). Inicialmente agradeço ao chefe do grupo, Christophe Guilhot, por ter me recebido no laboratório e, juntamente com Wladimir Malaga, ter me ensinado tudo que aprendi sobre criação de *knockouts* em micobactérias e análises lipídicas.

Agradeço todos os colegas de laboratório adquiridos em Toulouse: Aideen, Laurie, Celia, Yassmina, Jean Batiste, Gautier, Alice, Cathy, Kaymeuang e Christian.

Je remercie mon co-directeur de thèse et toutes les personnes au laboratoire, qui m'ont beaucoup enseigné et m'ont bien accueilli pendant mon stage à Toulouse. Je vous remercie de faire partie de mon histoire...

Aproveito para agradecer ao meu novo amigo pessoal e profissional que tive o prazer de encontrar e conviver durante esses meses de isolamento físico e linguístico que foi minha estadia na França. Ao Gustavo só tenho que agradecer pela paciência, carinho e amizade.

Agradeço à Fiocruz e ao PGBCM pela oportunidade de desenvolver esse projeto e de ter acrescentado muito a minha vida profissional.



Ministério da Saúde

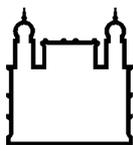
FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

IMPACTO FUNCIONAL DE PEQUENAS MUTAÇÕES EM *Mycobacterium bovis* BCG MOREAU EM COMPARAÇÃO COM *Mycobacterium tuberculosis* CEPA H37Rv

RESUMO

A tuberculose continua sendo uma doença relevante no que diz respeito à saúde mundial. A doença é causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* e a única medida profilática disponível é a vacinação com BCG, uma cepa atenuada derivada de *M. bovis*. BCG é uma família de diferentes cepas que possuem diferenças genéticas entre si. Pequenas mutações em sequências codificantes podem causar impactos funcionais relevantes, modificando drasticamente a função/estrutura da proteína ou até alterando o nível de expressão, devido à modificação de processos de transcrição/tradução. Para melhor compreender o impacto dessa categoria de mutação na biologia do BCG, identificamos e selecionamos casos de mutação em três *loci* preditos de estarem envolvidos em processos biológicos importantes para micobactérias, como metabolismo redox (dodecina – *rv1498A*), metabolismo lipídico (homólogo de *rv1371/2/3*) e respiração anaeróbica (fumarato redutase). Essas mutações foram identificadas pela análise de genômica comparativa entre *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau. Análises de RT-PCR e *western blotting* mostram que a transcrição e tradução desses genes não foram afetadas pelas mutações. Modelagem estrutural das proteínas mutadas indica um drástico impacto na atividade de dodecina, corroborado por nossos ensaios funcionais, diferentemente do complexo da fumarato redutase. Mutantes *knockout* foram criados e resultados preliminares mostram que o *operon* da fumarato redutase é funcional em BCG Moreau, já que o mutante Δfrd possui um fenótipo diferencial no crescimento quando comparado com a cepa selvagem. Já para $\Delta rv1371/2/3$ não foi observado tal padrão. Complementação da cepa selvagem com alelos de *rv1371/2/3* de *M. tuberculosis* e BCG corrobora a hipótese de não-funcionalidade da cópia de BCG, já que identificamos lipídeos diferentes quando ambas as cepas foram comparadas. Não foi viável a inativação do gene codificante para dodecina, nem a construção da cepa de *knockdown* condicional, que seria utilizada para analisar a essencialidade desse gene. Complementação de *M. smegmatis* com os alelos de *rv1498A* de *M. tuberculosis* e BCG mostram que ambas as cópias resultaram em maior crescimento das cepas em meio axênico, em uma magnitude similar para ambos os alelos em comparação com a cepa selvagem. Análises proteômicas revelam que diversos genes com pequenas mutações que possuem diferenças em seu nível de expressão quando comparadas as diferentes fases de crescimento estão envolvidos em metabolismo lipídico, revelando a importância de se investigar tal característica. Nossos resultados mostram que algumas mutações preditas podem não causar o impacto funcional esperado, provavelmente porque forças seletivas podem estar atuando sob esses *loci*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNCTIONAL IMPACT OF SMALL MUTATIONS IN *Mycobacterium bovis* BCG MOREAU IN COMPARISON TO *Mycobacterium tuberculosis* STRAIN H37Rv

ABSTRACT

Tuberculosis remains a very important health issue worldwide. The disease is caused by *Mycobacterium tuberculosis* and the available prophylaxis is vaccination with BCG, an attenuated strain derived from *M. bovis*. BCG comprises a family of different strains with significant genetic differences. Small mutations in coding sequences may cause huge functional impacts, drastically modifying the function/structure of the protein or even altering expression levels due to the modification of transcription/translation processes. To better understand the impact of this type of mutations in BCG biology, we identified and selected mutations in three *loci* predicted to be involved in important biological processes for mycobacteria, such as redox (dodecin – *rv1498A*) and lipid metabolism (*rv1371/2/3* ortholog), and anaerobic respiration (fumarate reductase). These mutations were identified by comparing the *M. tuberculosis* H37Rv and *M. bovis* BCG Moreau genomes. We showed by RT-PCR and western blotting analysis that transcription and translation of these genes were not hampered by the mutations. Structural modeling of the mutated proteins predicts a drastic impact on dodecin activity, corroborated by our functional assays, but not on the activity of the fumarate reductase complex. Knockouts were created, and preliminary results show that the fumarate reductase operon is active in BCG Moreau, as a Δfrd mutant shows a drastic growth phenotype when compared to the wild-type strain. On the other hand, a $\Delta rv1371/2/3$ strain does not show any growth phenotypes when compared to the wildtype. Complementation of the wild-type strain with both *M. tuberculosis* and BCG *rv1371/2/3* alleles corroborates the non-functionality of the BCG gene, as we identified different lipids when comparing both bacterial strains. Neither the inactivation of the gene encoding dodecin nor the construction of a conditional knockdown strain, which would be used to assess gene essentiality, were successful. Complementation of *M. smegmatis* with the two *rv1498A* alleles (*M. tuberculosis* and BCG) resulted in increased growth of both strains on axenic medium, to a similar extent, when compared to the wild-type strain. Proteomics analyses were performed and showed that several genes with small mutations and that had different expression levels when comparing growth phases were involved in lipid metabolism, showing that this phenomenon should be further investigated. Our results show that some predicted mutations may not have the expected functional impact, probably due to the selective forces that act on these *loci*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taxa de incidência estimada de tuberculose em 2017.....	2
Figura 2 – Relações filogenéticas entre os diferentes componentes do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	5
Figura 3 – Genealogia histórica da disseminação das cepas de BCG ao redor do mundo.	7
Figura 4 – Genealogia das diferentes cepas da família BCG baseada nas diferenças genotípicas.	9
Figura 5 – Organização e componentes da cadeia de transporte de elétrons em micobactérias.	15
Figura 6 – Esquema mostrando a estrutura do substrato de troca alélica e como funciona o processo para obtenção dos mutantes <i>knockouts</i> após eventos de recombinação homóloga e seleção em meio com antibióticos específicos.....	31
Figura 7 – Estrutura genética almejada para os mutantes condicionais para o gene da dodecina.	40
Figura 8 – Distribuição dos casos de INDELS identificados em <i>M. bovis</i> BCG Moreau comparando com <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv.	50
Figura 9 – Análise da mutação presente no gene homólogo a <i>rv1371</i> presente em <i>M. bovis</i> BCG Moreau.	53
Figura 10 – Análise da mutação presente no gene homólogo a <i>rv1373</i> presente em <i>M. bovis</i> BCG Moreau.	54
Figura 11 – Filogenia do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , mostrando o surgimento da mutação presente em <i>rv1371</i> e <i>rv1373</i> de BCG Moreau.....	55
Figura 12 – Análise de sintenia do <i>locus rv1371/2/3</i> em diferentes espécies dentro do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	56
Figura 13 – Análise do conteúdo GC na região do operon <i>rv1371/2/3</i>	56
Figura 14 – Análise da transcrição e de co-transcrição dos genes do operon <i>rv1371/2/3</i> nas fases lag, log e estacionária (EST) em <i>M. bovis</i> BCG Moreau. ...	57
Figura 15 – Resultados gerais da clonagem, expressão e purificação de Rv1371 de BCG Moreau.	58
Figura 16 – Resultados gerais da clonagem, expressão e purificação de Rv1373 de BCG Moreau.	59
Figura 17 – Análise da expressão de Rv1371 e Rv1373.....	60

Figura 18 – Análise da hidrofobicidade/associação com membranas de Rv1371 e Rv1373.....	61
Figura 19 – Análise da termoestabilidade de Rv1371 e Rv1373 nativas.....	62
Figura 20 – Caracterização inicial do mutante $\Delta rv1371/2/3$ em <i>M. bovis</i> BCG Moreau.....	63
Figura 21 – Curva de crescimento comparativa de <i>M. bovis</i> BCG Moreau selvagem e do <i>knockout</i> no locus <i>rv1371/2/3</i>	64
Figura 22 – Caracterização inicial das cepas de <i>M. bovis</i> BCG Moreau:: <i>rv1371/2/3</i> (complementadas com o próprio alelo e o de <i>M. tuberculosis</i>).....	65
Figura 23 – Curva de crescimento comparativa de <i>M. bovis</i> BCG Moreau selvagem e complementados com o operon <i>rv1371/2/3</i> de <i>M. bovis</i> BCG Moreau e <i>M. tuberculosis</i>	66
Figura 24 – Curvas de crescimento das cepas selvagem e complementadas com os alelos de <i>rv1371/2/3</i> , focando nas fases iniciais (até 4 dias) de cultivo e na fase estacionária (entre 10 e 18 dias).....	67
Figura 25 – Análise da mutação presente na região intergênica entre os genes homólogos a <i>rv1553 (frdB)</i> e <i>rv1554 (frdC)</i> presente em <i>M. bovis</i> BCG Moreau.....	69
Figura 26 – Filogenia do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , mostrando o surgimento da mutação presente em <i>frdABCD</i> de BCG Moreau.....	70
Figura 27 – Análise da transcrição e de co-transcrição dos genes do operon da fumarato redutase nas fases lag, log e estacionária (EST) em <i>M. bovis</i> BCG Moreau.....	71
Figura 28 – Resultados gerais da clonagem, expressão e purificação da FrdB de BCG Moreau.....	72
Figura 29 – Análise da expressão de FrdB.....	73
Figura 30 – Análise do polipeptídeo codificado pela sequência <i>frdBCD</i> dependendo do número de Gs adicionados na região homopolimética no final de <i>frdB</i>	74
Figura 31 – Análise da hidrofobicidade/associação com membranas de FrdB.....	74
Figura 32 – Análise da termoestabilidade de FrdB nativa.....	75
Figura 33 – Caracterização inicial do mutante Δfrd em <i>M. bovis</i> BCG Moreau.....	76
Figura 34 – Curva de crescimento comparativa de <i>M. bovis</i> BCG Moreau selvagem e do <i>knockout</i> no locus do operon da fumarato redutase.....	77

Figura 35 – Caracterização inicial do mutante <i>M. bovis</i> BCG Moreau:: <i>frdABCD</i> (próprio alelo e o de <i>M. tuberculosis</i>).....	78
Figura 36 – Curvas de crescimento das cepas selvagem e complementadas com os alelos de <i>frdABCD</i> , focando nas fases iniciais (até 4 dias) de cultivo e na fase estacionária (entre 10 e 18 dias).	79
Figura 37 – Estrutura tridimensional dos complexos da fumarato redutase de <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv e <i>M. bovis</i> BCG Moreau inseridos na bicamada lipídica.	80
Figura 38 – Detalhe da estrutura tridimensional dos complexos fumarato redutase de <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv e <i>M. bovis</i> BCG Moreau.....	81
Figura 39 – Superfície eletroestática dos complexos da fumarato redutase de <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv e <i>M. bovis</i> BCG Moreau.....	82
Figura 40 – Detalhe nas cavidades dos complexos da fumarato redutase (<i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv e <i>M. bovis</i> BCG Moreau) que interagem diretamente com seus cofatores.....	83
Figura 41 – Mapa de interação das coenzimas FAD e menaquinona, e do inibidor oxaloacetato, com os complexos da fumarato redutase (<i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv e <i>M. bovis</i> BCG Moreau).....	84
Figura 42 – Análise da mutação presente no gene homólogo a <i>rv1498A</i> (dodecina) presente em <i>M. bovis</i> BCG Moreau.	86
Figura 43 – Filogenia do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , mostrando o surgimento da mutação presente em <i>rv1498A</i> de BCG Moreau.	87
Figura 44 – Análise da transcrição do gene <i>rv1498A</i> (dodecina) nas fases lag, log e estacionária (EST) em <i>M. bovis</i> BCG Moreau.....	88
Figura 45 – Resultados gerais da clonagem, expressão e purificação da dodecina de BCG Moreau.....	89
Figura 46 – Resultados gerais da clonagem, expressão e purificação da dodecina de <i>M. tuberculosis</i>	90
Figura 47 – Análise da expressão de dodecina.....	91
Figura 48 – Análise da hidrofobicidade/associação com membranas de dodecina.....	92
Figura 49 – Ensaios em gel com as dodecinas recombinantes de <i>M. bovis</i> BCG Moreau e <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv.	93

Figura 50 – Análise do impacto da mutação na capacidade de ligação à riboflavina das dodecinas.	94
Figura 51 – Análise da termoestabilidade da dodecina nativa.....	95
Figura 52 – Esquema da organização gênica do <i>locus</i> de <i>rv1498A</i> (e genes circundantes) na cepa selvagem e no <i>knockout</i>	96
Figura 53 – Esquema da organização gênica do <i>locus</i> de <i>rv1498A</i> na cepa selvagem e no mutante <i>knockdown</i>	97
Figura 54 – Estrutura tridimensional das dodecinas na forma dodecamérica de <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv (Mtb) e <i>M. bovis</i> BCG Moreau (BCG).	98
Figura 55 – Detalhe da interação de dois monômeros nos modelos das dodecinas de <i>M. tuberculosis</i> (Mtb) e <i>M. bovis</i> BCG Moreau (BCG).	98
Figura 56 – Energia de interação intercadeia nos modelos de dodecina de <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv (Mtb) e <i>M. bovis</i> BCG Moreau (BCG).	99
Figura 57 – Superfície eletrostática do sítio de ligação da riboflavina dos modelos de dodecina de <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv e <i>M. bovis</i> BCG Moreau.	100
Figura 58 – Resultados gerais da complementação de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 com os alelos de dodecina de <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv e <i>M. bovis</i> BCG Moreau.	101
Figura 59 – Curva de crescimento comparativa de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 portando o plasmídeo vazio (pUS972) ou complementada com o gene da dodecina de <i>M. tuberculosis</i> (pUS972_DodMtb) ou de <i>M. bovis</i> BCG Moreau (pUS972_DodBCG).	102
Figura 60 – Análise do acúmulo de dodecina nas cepas complementadas de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 com os alelos de <i>rv1498A</i> em diferentes fases do cultivo em meio axênico.	103
Figura 61 – Curva de crescimento comparativa de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 portando o plasmídeo vazio (pUS972) ou complementada com o gene da dodecina de <i>M. tuberculosis</i> (pUS972_DodMtb) ou de <i>M. bovis</i> BCG Moreau (pUS972_DodBCG) após a adição (H ₂ O ₂) ou não (Controle) de 15 mM de peróxido de hidrogênio.	105
Figura 62 – Análise do acúmulo de dodecina nas cepas complementadas de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 com os alelos de <i>rv1498A</i> após 2 e 8 h da adição (H ₂ O ₂) ou não (C) de 15 mM de peróxido de hidrogênio.	106

Figura 63 – Análise do número de proteínas identificadas na abordagem de proteômica de alta vazão.....	107
Figura 64 – Análise quantitativa dos alvos diferencialmente expressos entre as fases de crescimento (log e estacionária) (A e B) e bactérias (<i>M. tuberculosis</i> e <i>M. bovis</i> BCG Moreau) (C e D) analisadas.	108
Figura 65 – Reconstrução do metabolismo de riboflavina em <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv nas fases logarítmica e estacionária de crescimento em meio axênico.....	110
Figura 66 – Parte da reconstrução do metabolismo de biossíntese de ubiquinona e outras quinonas-terpenóides em <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv nas fases logarítmica e estacionária de crescimento em meio axênico.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da solução de ADC utilizada na suplementação do meio 7H9.	18
Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento e confirmação da mutação presente no gene da dodecina em <i>M. bovis</i> BCG Moreau e <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	19
Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a análise de fragmentos por eletroforese capilar e confirmação da mutação presente nos genes da fumarato redutase em <i>M. bovis</i> BCG Moreau e <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	20
Tabela 4 – Ciclagem utilizada nas PCRs.	20
Tabela 5 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para os ensaios de RT-PCR com os diferentes alvos gênicos.	22
Tabela 6 – Ciclagem utilizada nas PCRs realizadas para amplificar e criar o inserto para a clonagem e produção das proteínas recombinantes.	23
Tabela 7 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a clonagem dos genes estudados de <i>M. bovis</i> BCG Moreau e <i>M. tuberculosis</i> H37Rv em plasmídeo pET28a(+), visando a produção das proteínas recombinantes correspondentes, sem ou com (revH) a cauda de 6 histidinas na porção carboxi-terminal. Mostra-se o sítio de restrição (em destaque na sequência) para as enzimas indicadas.	23
Tabela 8 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento e confirmação da identidade das sequências presentes nos plasmídeos selecionados por PCR de colônia.	24
Tabela 9 – Composição do tampão de amostra para SDS-PAGE utilizado nesse trabalho.	25
Tabela 10 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para construção do substrato de troca alélica usado na metodologia do <i>recombineering</i> e transdução especializada. A sequência sublinhada indica aquela que é homóloga ao fragmento que se deseja amplificar; em negrito tem-se aquelas que foram adicionadas à extremidade 5' do iniciador, homólogas (mesma cor) a sequência da extremidade do fragmento “vizinho”.	32
Tabela 11 – Ciclagem utilizada nas reações de PCR realizadas com a enzima PrimeSTAR GXL.	33

Tabela 12 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento e confirmação da identidade das sequências dos clones portando os substratos de troca alélica.	34
Tabela 13 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a confirmação da identidade dos clones de mutantes (<i>knockout</i>) de <i>M. bovis</i> BCG Moreau obtidos após o cultivo em meio seletivo.	35
Tabela 14 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar o substrato de troca alélica com extremidades homólogas a partes da sequência do gene <i>ampR</i> . .	35
Tabela 15 – Composição do <i>soft</i> ágar utilizado.....	36
Tabela 16 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a construção dos plasmídeos (baseados em pMV361K ou H) de complementação dos mutantes e da cepa selvagem. Mostra-se o sítio de restrição (em destaque na sequência) para as enzimas indicadas.....	38
Tabela 17 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento e confirmação da identidade das sequências usadas para a confecção dos plasmídeos de complementação.	38
Tabela 18 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para construção do substrato de troca alélica usado na criação do mutante condicional para o gene da dodecina. A sequência sublinhada indica aquela que é homóloga ao fragmento que se deseja amplificar; em negrito tem-se aquelas que foram adicionadas a extremidade 5´ do iniciador, homólogas (mesma cor) a sequência da extremidade do fragmento “vizinho”. A tríade em destaque corresponde ao códon iniciador mutado do gene da dodecina em <i>M. bovis</i> BCG Moreau.	39
Tabela 19 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a confirmação da identidade dos clones de mutantes condicionais para o gene da dodecina obtidos após o plaqueamento em meio seletivo.....	40
Tabela 20 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a construção do plasmídeo, baseado em pUS972, para expressão heteróloga do gene da dodecina de <i>M. bovis</i> BCG Moreau e <i>M. tuberculosis</i> H37Rv em <i>M. smegmatis</i> mc ² 155. Mostra-se o sítio de restrição para as enzimas indicadas e a sequência codificante para a cauda de 6 histinas (ambas em destaque).	43
Tabela 21 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento e confirmação da identidade das sequências dos plasmídeos recombinantes para	

expressão heteróloga do gene da dodecina de <i>M. bovis</i> BCG Moreau e <i>M. tuberculosis</i> H37Rv em <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.	43
Tabela 22 – Anotação dos genes do operon <i>rv1371/2/3</i> e se essa função biológica já foi corroborada por experimentos <i>in vitro</i>	51
Tabela 23 – Anotação dos genes do operon da fumarato redutase (<i>rv1552/3/4/5</i>)...68	
Tabela 24 – Resumo das tentativas de obtenção de mutantes com deleção no gene da dodecina em <i>M. bovis</i> BCG Moreau utilizando o protocolo de transdução especializada. Os valores correspondem ao número de colônias obtidas depois de cultivo em meio seletivo, que eram triadas por PCR para caracterizar como um <i>knockout</i> verdadeiro (+) ou frutos de recombinação ilegítima (-).	96
Tabela 25 – Lista dos alvos obtidos a partir da análise de genômica comparativa que apresentaram expressão diferencial entre as fases de cultivo na análise proteômica. Observa-se o identificador do gene em <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. bovis</i> BCG Moreau, além da anotação do produto codificado pelo gene e sua classe funcional.....	108
Tabela 26 – Lista dos alvos obtidos a partir da análise de genômica comparativa que apresentaram expressão diferencial entre as bactérias estudadas na análise proteômica. Observa-se o identificador do gene em <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. bovis</i> BCG Moreau, além da anotação do produto codificado pelo gene e sua classe funcional.	109
Tabela 27 – Resumo das características das proteínas recombinantes produzidas nesse trabalho. Indica-se o organismo hospedeiro e o plasmídeo usado, além da massa molar (kDa) das formas recombinante e nativa dos alvos estudados.....	144
Tabela 28 – Plasmídeos comerciais ou cedidos por outros grupos de pesquisa usados nesse trabalho.....	144
Tabela 29 – Cepas micobacterianas produzidas nesse trabalho. Indica-se o organismo original, o plasmídeo usado para produção do clone, o genótipo final e a resistência a antibiótico adquirida.	145
Tabela 30 – Plasmídeos produzidos durante esse trabalho. Mostra-se o arcabouço e os insertos usados, além de um resumo de como foi produzida a molécula final e para qual fim esta foi usada.	146

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ADC – Mistura de albumina, dextrose e catalase
- AES – *Allelic exchange substrate* (substrato de troca alélica)
- ATC – Anidrotetraciclina
- ATP – Adenosina trifosfato
- BCG – Bacilo de Calmette e Guérin
- CDS – Coding sequence (sequência codificante)
- CHAPS – 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato
- CID – *Collision-induced dissociation* (dissociação induzida por colisão)
- D.O. – Densidade ótica
- DDA – *Data-dependent acquisition* (aquisição dependente do dado)
- DEPC – Dietil pirocarbonato
- DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- DTT – Ditioneitol
- DU – Duplicação
- E.C. – *Enzyme commission*
- ESI – *Electrospray ionization* (ionização do tipo *electrospray*)
- FAD – Flavina adenina dinucleotídeo
- FASP – *Filter Assisted Sample Preparation* (preparação de amostra em filtro)
- FMN – Flavina mononucleotídeo
- FRD – *False discovery rate*
- FRD – Fumarato redutase
- HIV – *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)
- HQNO - 2-Heptil-4-hidroxiquinolina
- IEF - Isoeletrofocalização
- INDEL – Inserção/deleção
- IPTG – Tio-β-D-galactopiranosídeo de isopropila
- KEGG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
- LB – Luria Bertani
- LTQ – *Linear trap quadrupole*
- M.tb* – *Mycobacterium tuberculosis*
- MS – *Mass spectrometry* (espectrometria de massas)
- nLC – *Nano liquid chromatography* (nano cromatografia líquida)

OAA – Oxaloacetato
°C – Graus Celsius
OMS – *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)
PAGE – Polyacrylamide gel electrophoresis (Eletroforese em gel de poliacrilamida)
PAPS – *3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate* (3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato)
pb – Pares de bases
PBS – *Phosphate buffered saline* (Salina tamponada com fosfato)
PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
PDB – *Protein data bank* (banco de dados de proteína)
PDIM – *Phthiocerol dimycocerosate* (dimicocerosato ftiocerol)
PE/PPE - *Proline-glutamic acid/proline-proline-glutamic acid*
PGL – *Phenolic glycolipids* (glicolípido fenólico)
pH – Potencial hidrogeniônico
Pks – *Polyketide synthase* (policetídeo sintase)
q.s.p. – Quantidade suficiente para
RBS – *Ribosome binding site* (sítio de ligação ribossomal)
RD – *Region of Difference* – Região de diferença
RMSD - *Root Mean Square deviation*
RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)
rpm – Rotações por minuto
RT-PCR – *Reverse transcriptase-PCR* (PCR com transcrição reversa)
SDH – Succinato desidrogenase
SDS – *Sodium dodecyl sulphate* (Dodecil sulfato de sódio)
SNP – *Single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleotídeo único)
TAG – Triacilglicerol
TB – Tuberculose
TCA – Ácido tricloroacético
TEA – Trietanolamina
TFA – Ácido trifluoroacético
TLC – *Thin layer chromatography* (cromatografia em camada delgada)
Tm – Temperatura de *melting*
Tris – Tris-hidroxi-metil-amino-metano
V – Volume

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XV
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XVIII
<u>1. INTRODUÇÃO.....</u>	<u>1</u>
1.1. TUBERCULOSE	1
1.1.1. EPIDEMIOLOGIA	1
1.1.2. A DOENÇA	3
1.1.3. O AGENTE ETIOLÓGICO.....	4
1.2. VACINA BCG.....	6
1.2.1. HISTÓRICO.....	6
1.2.2. DIFERENÇAS GENOTÍPICAS	8
1.3. METABOLISMO MICOBACTERIANO	10
1.3.1. ESTRESSE OXIDATIVO	11
1.3.2. METABOLISMO LIPÍDICO.....	12
1.3.3. RESPIRAÇÃO ANAERÓBICA	14
1.4. JUSTIFICATIVA	15
<u>2. OBJETIVOS.....</u>	<u>16</u>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
<u>3. METODOLOGIA</u>	<u>17</u>

3.1. IDENTIFICAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENOMA DE <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU ATRAVÉS DE GENÔMICA COMPARATIVA	17
3.2. CULTIVO DE <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU, <i>M. TUBERCULOSIS</i> CEPA H37RV E <i>M. SMEGMATIS</i> MC ² 155.....	18
3.3. CONFIRMAÇÃO DAS MUTAÇÕES POR SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DE FRAGMENTOS.....	19
3.4. ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DOS ALVOS	21
3.4.1. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA.....	21
3.4.2. RT-PCR.....	21
3.5. PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	22
3.5.1. CLONAGEM DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES EM PET28A(+)	22
3.5.2. INDUÇÃO DA EXPRESSÃO E ANÁLISE POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES DESNATURANTES E REDUTORAS (SDS-PAGE).....	24
3.5.3. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE POR ÍONS IMOBILIZADOS E PROCESSAMENTO DA AMOSTRA.....	26
3.6. PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL.....	27
3.7. ANÁLISE DOS EXTRATOS PROTEICOS DE <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU E <i>M. TUBERCULOSIS</i> H37RV	28
3.7.1. PRESENÇA DOS ALVOS NAS DIFERENTES FASES DE CULTIVO AXÊNICO	28
3.7.2. ANÁLISE DA TERMOESTABILIDADE DOS ALVOS.....	28
3.7.3. ANÁLISE DA SOLUBILIDADE POR EXTRAÇÃO DIFERENCIAL COM TRITON X-114.....	29
3.8. ANÁLISE FUNCIONAL DAS DODECINAS RECOMBINANTES	29
3.8.1. ENSAIOS EM GEL PARA ANÁLISE DO IMPACTO NA OLIGOMERIZAÇÃO, TERMO- E HALOESTABILIDADE	29
3.8.2. ENSAIOS DE LIGAÇÃO À RIBOFLAVINA EM SOLUÇÃO	30
3.9. CRIAÇÃO DOS MUTANTES (<i>KNOCKOUT</i>) EM <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU	30
3.9.1. CONSTRUÇÃO DO SUBSTRATO DE TROCA ALÉLICA PARA <i>RECOMBINEERING</i> E TRANSDUÇÃO ESPECIALIZADA	30
3.9.2. TRANSFORMAÇÃO DE <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU COM O SUBSTRATO DE TROCA ALÉLICA (<i>RECOMBINEERING</i>) E SELEÇÃO/CARACTERIZAÇÃO DOS CLONES	34
3.9.3. TRANSDUÇÃO ESPECIALIZADA COM <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU	35
3.10. COMPLEMENTAÇÃO DOS MUTANTES E DA CEPA SELVAGEM	37
3.11. CRIAÇÃO DO MUTANTE CONDICIONAL PARA O GENE DA DODECINA EM <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU.....	38
3.12. ANÁLISE DO CRESCIMENTO DE CEPAS MUTANTES E COMPLEMENTADAS EM MEIO AXÊNICO.....	41
3.13. ANÁLISE LIPÍDICA.....	41
3.13.1. EXTRAÇÃO TOTAL DE LIPÍDEOS E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (TLC).....	41
3.13.2. ENRIQUECIMENTO DA AMOSTRA EM LIPÍDEOS NEGATIVAMENTE CARREGADOS (QMA)	42
3.14. COMPLEMENTAÇÃO DE <i>M. SMEGMATIS</i> MC ² 155 COM ALELOS DE DODECINA	42
3.14.1. CRIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS CLONES.....	42
3.14.2. ANÁLISE DO CRESCIMENTO EM MEIO AXÊNICO	43

3.14.3.	EFEITO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NO CRESCIMENTO EM MEIO AXÊNICO	44
3.15.	ANÁLISE PROTEÔMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	44
3.15.1.	EXTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS E PROCESSAMENTO POR FASP	44
3.15.2.	ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ANÁLISE DE DADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	45
3.15.3.	RECONSTRUÇÃO METABÓLICA A PARTIR DAS IDENTIFICAÇÕES PROTEÔMICAS	47
3.16.	MODELAGEM POR HOMOLOGIA	48
3.16.1.	DODECINA	48
3.16.2.	FUMARATO REDUTASE	48
3.16.3.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
4.	<u>RESULTADOS.....</u>	50
4.1.	IDENTIFICAÇÃO DE CASOS DE PEQUENAS MUTAÇÕES ATRAVÉS DA ABORDAGEM DE GENÔMICA COMPARATIVA	
	50	
4.2.	OPERON <i>RV1371/2/3</i>	51
4.2.1.	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS SEQUÊNCIAS DE <i>M. TUBERCULOSIS H37RV</i> E <i>M. BOVIS BCG MOREAU</i> E DE POSSÍVEL IMPACTO FUNCIONAL DA MUTAÇÃO	51
4.2.2.	ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES ESTUDADOS POR RT-PCR EM <i>M. BOVIS BCG MOREAU</i>	57
4.2.3.	PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES (<i>RV1371</i> E <i>RV1373</i> DE <i>M. BOVIS BCG MOREAU</i>) E DE SORO POLICLONAL.....	57
4.2.4.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE <i>RV1371</i> E <i>RV1373</i> NATIVAS EM <i>M. TUBERCULOSIS H37RV</i> E <i>M. BOVIS BCG MOREAU</i> NAS DIFERENTES FASES DE CULTIVO AXÊNICO.....	60
4.2.5.	ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DE <i>RV1371</i> E <i>RV1373</i> NATIVAS DE <i>M. BOVIS BCG MOREAU</i> POR EXTRAÇÃO DIFERENCIAL COM TRITON X-114	61
4.2.6.	ANÁLISE DO IMPACTO DAS MUTAÇÕES NA TERMOESTABILIDADE DE <i>RV1371</i> E <i>RV1373</i> NATIVAS.....	61
4.2.7.	MUTANTE $\Delta RV1371/2/3$ EM <i>M. BOVIS BCG MOREAU</i> : GENOTIPAGEM E CARACTERIZAÇÃO	62
4.2.8.	ANÁLISE DO IMPACTO DA DELEÇÃO NO CRESCIMENTO EM MEIO AXÊNICO	64
4.2.1.	CRIAÇÃO DE <i>BCG MOREAU::RV1371/2/3</i> (ALELOS DE <i>M. TUBERCULOSIS H37RV</i> E PRÓPRIO ALELO), CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS COLÔNIAS E ANÁLISE DO IMPACTO DA COMPLEMENTAÇÃO NO PERFIL LIPÍDICO DAS CEPAS	64
4.2.2.	ANÁLISE DO IMPACTO DA COMPLEMENTAÇÃO NO CRESCIMENTO EM MEIO AXÊNICO	65
4.3.	OPERON DA FUMARATO REDUTASE	68
4.3.1.	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS SEQUÊNCIAS DE <i>M. TUBERCULOSIS H37RV</i> E <i>M. BOVIS BCG MOREAU</i> E DO POSSÍVEL IMPACTO FUNCIONAL DA MUTAÇÃO	68
4.3.2.	ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES ESTUDADOS POR RT-PCR EM <i>M. BOVIS BCG MOREAU</i>	71

4.3.3.	PRODUÇÃO DE FRDB RECOMBINANTE DE <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU E DE SORO POLICLONAL	71
4.3.4.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE FRDB EM <i>M. TUBERCULOSIS</i> H37RV E <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU NAS DIFERENTES FASES DE CULTIVO AXÊNICO	73
4.3.5.	ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DE FRDB NATIVA DE <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU POR EXTRAÇÃO DIFERENCIAL COM TRITON X-114	74
4.3.6.	ANÁLISE DO IMPACTO DA MUTAÇÃO NA TERMOESTABILIDADE DE FRDB NATIVA.....	74
4.3.7.	MUTANTE Δ FRD EM <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU: GENOTIPAGEM E CARACTERIZAÇÃO.....	75
4.3.8.	ANÁLISE DO IMPACTO DA DELEÇÃO NO CRESCIMENTO EM MEIO AXÊNICO	77
4.3.9.	CRIAÇÃO DE BCG MOREAU:: <i>FRD</i> (ALELOS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> H37RV E PRÓPRIO ALELO) E ANÁLISE DO IMPACTO NO CRESCIMENTO EM MEIO AXÊNICO	77
4.3.10.	MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA FUMARATO REDUTASE DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> H37RV E <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU, E ANÁLISES COMPARATIVAS	80
4.4.	DODECINA.....	85
4.4.1.	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS SEQUÊNCIAS DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> H37RV E <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU E DO POSSÍVEL IMPACTO FUNCIONAL DA MUTAÇÃO	85
4.4.2.	ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES ESTUDADOS POR RT-PCR EM <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU.....	88
4.4.3.	PRODUÇÃO DE DODECINA RECOMBINANTE DE <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU E DE SORO POLICLONAL	88
4.4.4.	PRODUÇÃO DE DODECINA RECOMBINANTE DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> H37RV.....	90
4.4.5.	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE DODECINA EM <i>M. TUBERCULOSIS</i> H37RV E <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU NAS DIFERENTES FASES DE CULTIVO AXÊNICO	90
4.4.6.	ANÁLISE DA SOLUBILIDADE DE DODECINA NATIVA DE <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU POR EXTRAÇÃO DIFERENCIAL COM TRITON X-114	91
4.4.7.	ANÁLISE DO IMPACTO DA MUTAÇÃO NA ESTRUTURA, TERMO E HALOESTABILIDADE DAS DODECINAS RECOMBINANTES	92
4.4.8.	ANÁLISE DO IMPACTO DA MUTAÇÃO NA CAPACIDADE DE LIGAÇÃO À RIBOFLAVINA DAS DODECINAS RECOMBINANTES E EXTRATOS PROTEICOS MICOBACTERIANOS	94
4.4.9.	ANÁLISE DO IMPACTO DA MUTAÇÃO NA TERMOESTABILIDADE DA DODECINA NATIVA	95
4.4.10.	MUTANTE Δ DOD EM <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU	95
4.4.11.	MUTANTE CONDICIONAL Δ DOD EM <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU.....	97
4.4.12.	MODELAGEM POR HOMOLOGIA DA DODECINA DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> H37RV E <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU, E ANÁLISES COMPARATIVAS	97
4.4.13.	COMPLEMENTAÇÃO DE <i>M. SMEGMATIS</i> MC ² 155 COM ALELOS DE DODECINA DE <i>M. TUBERCULOSIS</i> H37RV E <i>M. BOVIS</i> BCG MOREAU: IMPACTO NO CRESCIMENTO EM MEIO AXÊNICO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA DODECINA RECOMBINANTE.....	100
4.4.14.	IMPACTO DA COMPLEMENTAÇÃO NA RESPOSTA AO ESTRESSE OXIDATIVO EM <i>M. SMEGMATIS</i> MC ² 155	104

4.5. ANÁLISE PROTEÔMICA	106
4.6. ANÁLISE DO METABOLISMO ATRAVÉS DAS IDENTIFICAÇÕES ORIUNDAS DA ANÁLISE PROTEÔMICA	109
<u>5. DISCUSSÃO</u>	<u>112</u>
<u>6. CONCLUSÕES</u>	<u>134</u>
<u>7. BIBLIOGRAFIA</u>	<u>137</u>
<u>8. ANEXOS</u>	<u>144</u>

1. Introdução

1.1. Tuberculose

A tuberculose (TB) é atualmente a primeira doença infectocontagiosa em número de óbitos no mundo. O quadro mundial da TB começou a tornar-se mais alarmante desde o relatório de 2015 da Organização Mundial da Saúde (OMS), no qual essa doença estava atrás, em número de mortes, somente da infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2018). Seu agente etiológico é o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) que, nas fases iniciais da infecção, se apresenta como uma bactéria metabolicamente ativa. Em pacientes sem comprometimento imune, o bacilo converte-se na forma latente, podendo permanecer nesse estágio por diversos anos, e ser reativado e causar a doença ativa caso haja comprometimento imune (FOGEL, 2015). Embora haja cura para a TB, estima-se que 1,3 milhão de pessoas morram de TB por ano (WHO, 2018).

A TB é considerada uma doença antiga – estudos apontam que em esqueletos humanos datados de milhares de anos atrás pode-se identificar sinais da infecção (HERSHKOVITZ, *et al.*, 2015). A causa da patologia ficou desconhecida por muito tempo, sendo elucidada em 24 de março de 1882, quando Robert Koch anunciou a caracterização de *M.tb* (KOCH, 1882).

1.1.1. Epidemiologia

Por volta de 1800, os dados de saúde de diversos países europeus mostravam que a TB era uma das principais causas de morte. Com o desenvolvimento social e econômico, e a consequente melhora em questões nutricionais e de habitação da população, o número de casos e mortes começou a diminuir (de 1-2% por ano) na Europa ocidental, América do Norte e diversas outras partes do mundo na virada do século XX. A partir de 1940, com a descoberta, desenvolvimento e uso de drogas eficazes contra a bactéria, essa diminuição ocorria em velocidades maiores, chegando a uma redução de 10% por ano no número de casos, com valores mais expressivos quando se analisa a taxa de morte (BARBIER e WIRTH, 2016). Nos países que tiveram tal redução e que apresentam quadros de 10 ou menos casos e cerca de 1 morte por 100.000 habitantes, a TB é considerada uma doença do passado. Mas, por

outro lado, em vários países a realidade é diferente e a erradicação da TB no quadro de saúde pública ainda é algo distante. Mesmo com a possibilidade de diagnóstico precoce e a cura da doença com o tratamento correto, em 1993, a OMS declarou a TB como uma emergência de saúde global (DOLIN, RAVIGLIONE e KOCHI, 1993).

Mundialmente, a TB é uma das 10 principais causas de morte e a primeira quando são consideradas mortes causadas por um único agente infeccioso (acima da infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana – HIV). Em 2017, estima-se que 1,3 milhão de mortes entre a população HIV-negativa tenha sido devido à TB, adicionando mais 300.000 mortes se considerarmos a população HIV-positiva. A nível global, acredita-se que 10 milhões de pessoas desenvolveram a patologia em 2017. Houve casos em todos os países e em todos os grupos etários, mas cerca de 90% foram em adultos (>15 anos) e dois terços foram em oito países: Índia (27%), China (9%), Indonésia (8%), Filipinas (6%), Paquistão (5%), Nigéria (4%), Bangladesh (4%) e África do Sul (3%). Esses e outros 22 países da lista da OMS somaram 87% dos casos mundiais. Somente 6% dos casos foram na região europeia e Américas (WHO, 2018).

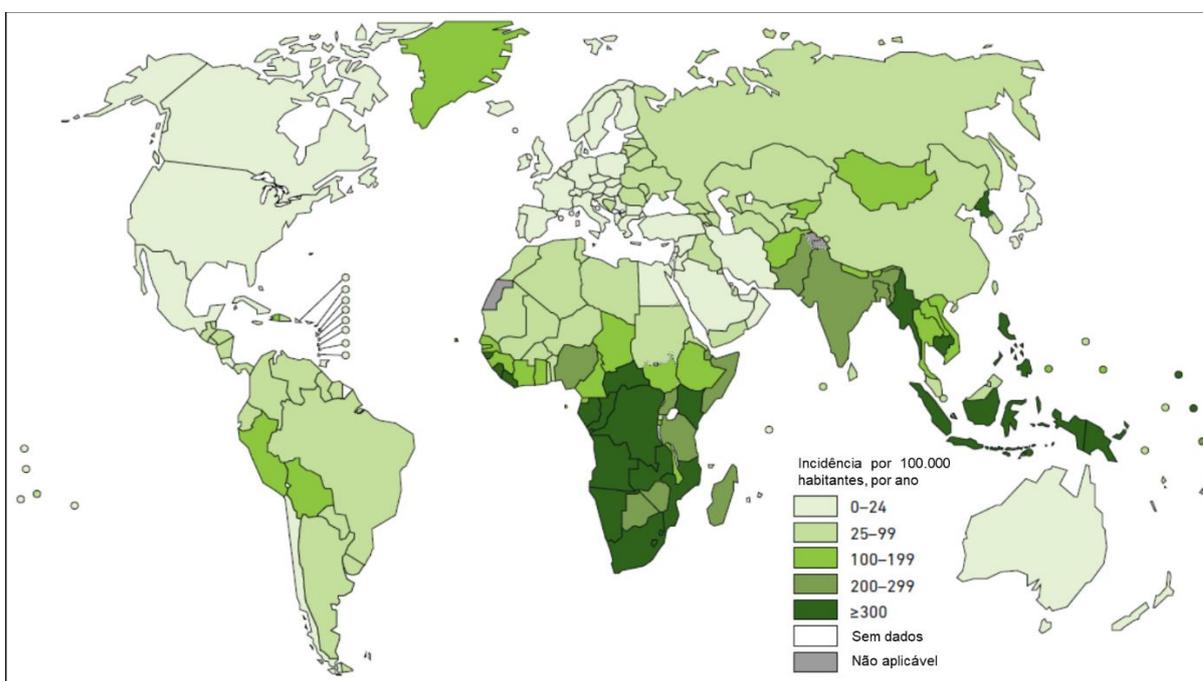


Figura 1 – Taxa de incidência estimada de tuberculose em 2017. A gradação do verde reflete diferentes taxas de incidência, indo da taxa menor (verde claro) à maior (verde escuro). Adaptado de WHO (2018).

A abrangência de epidemias nacionais varia grandemente entre os países analisados (Figura 1). Em 2017, houve menos de 10 novos casos por 100.000

habitantes em países desenvolvidos, 150-400 nos 30 países de lista de alta incidência de TB da OMS, e mais de 500 em alguns países como Moçambique, Filipinas e África do Sul (MOGASHOA, *et al.*, 2019).

Mesmo a TB sendo uma doença que possua uma vacina como método de prevenção e um coquetel de fármacos como tratamento que leva à cura, o quadro atual da doença continua sendo alarmante. Diversos fatores conseguem explicar tal fato. Dentre eles pode-se citar a epidemia de HIV, que gera atualmente um problemático quadro de coinfeção, trazendo a TB de volta ao círculo de pesquisa em países que a consideravam como enfermidade do passado (LAI, MEINTJES e WILKINSON, 2015).

Além disso, devido ao longo período do tratamento com antibióticos, muitos pacientes interrompem por conta própria o uso dos remédios, devido a uma visível melhora do quadro clínico já nas primeiras semanas, facilitando assim o surgimento de cepas da bactéria resistentes aos compostos usados atualmente. Em países mais pobres, vinculam-se regiões com grande número de casos da TB à falta de acesso ao sistema de saúde e aglomerações humanas (MENDES e FENSTERSEIFER, 2004). Com isso, cria-se um quadro no qual a TB se torna uma doença reemergente.

1.1.2. A doença

Como já dito, a TB é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *M.tb*. Essa bactéria pode infectar qualquer órgão ou tecido do organismo humano, mas a grande maioria dos casos da doença está vinculada à forma pulmonar. Nesse quadro, pacientes infectados que estão na fase de disseminação podem transmitir a bactéria pela tosse, fala ou espirro, nos quais gotas com o bacilo alcançam uma outra pessoa. Nesse novo organismo, algumas bactérias, podendo ser até uma ou duas, sobrevivem à defesa imune e chegam aos alvéolos da periferia pulmonar, local no qual infectam macrófagos circundantes (LESLEY e RAMAKRISHNAN, 2008).

Dentro dessas células, vários mecanismos do macrófago serão ativados para tentar destruir a bactéria, assim como para atrair outras células do sistema imune para o local da infecção. Do outro lado, a bactéria também influenciará no comportamento do macrófago, retardando, dificultando ou anulando diferentes ações microbidas da célula eucariótica, como o retardamento ou falha na fusão do fagossomo com o lisossomo (HMAMA, *et al.*, 2015).

Com o decorrer do processo e a persistência da bactéria no macrófago, outras células do sistema imune formam ao redor da célula infectada um cordão, isolando-a e com isso diminuindo a chance de disseminação da bactéria pelo corpo. Nesta etapa do processo infeccioso a bactéria passa para um estado de baixo nível metabólico. Nesse ponto, alcança-se a fase latente da doença, na qual a micobactéria pode permanecer por muitos anos até que, por exemplo, o sistema imune sofra uma queda e sinais bioquímicos estimulem essa bactéria a voltar a um fenótipo de crescimento e altas taxas metabólicas. Nesse ponto, ocorre a proliferação bacteriana e a re-ativação da doença (SALGAME, *et al.*, 2015).

1.1.3. O agente etiológico

Sabe-se, atualmente, que a TB pode ser causada por diversas espécies de micobactérias, sendo a mais comum *M.tb*, que se apresenta como uma espécie com inúmeras cepas espalhadas pelo globo (representadas pelas linhagens 1, 2, 3 e 4). Além disso, outras espécies de animais podem desenvolver essa doença. Este grupo de bactérias que causa essa enfermidade é denominado complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Todas as espécies deste complexo são consideradas micobactérias de crescimento lento, diferente de algumas micobactérias ambientais, denominadas de crescimento rápido (BRITES e GAGNEUX, 2017).

Análises filogenéticas mostram as relações existentes entre os participantes do complexo e ajudam a entender a evolução que ocorre nesse clado, além de auxiliar na explicação de quais eventos ocorreram para que micobactérias ambientais do passado evoluíssem até ao patógeno adaptado que conhecemos atualmente.

Como pode-se observar na Figura 2, os integrantes desse complexo se dividem entre representantes antigos e modernos. Além disso, nota-se a presença de clados, sendo que cada uma das linhagens aparenta possuir uma disseminação geográfica específica ao redor do globo. Dentro das cepas ditas como “animais” encontram-se aquelas que causam doenças em animais não-humanos preferencialmente, como *M. bovis* e *M. caprae* (COMAS e GAGNEUX, 2009).

Independente da espécie em questão, todas essas e outras micobactérias apresentam características gerais em comum. Como já dito, são bactérias que se apresentam na forma de bacilos e são aeróbios estritos. Quando expostas a situações de microaerofilia iniciam diferentes processos dentro da célula que levam a mesma

ao estado de latência, no qual o metabolismo é reduzido ao extremo, mecanismos são ativados para a defesa contra estresse oxidativo, a parede celular é espessada, etc. (EOH, *et al.*, 2017)

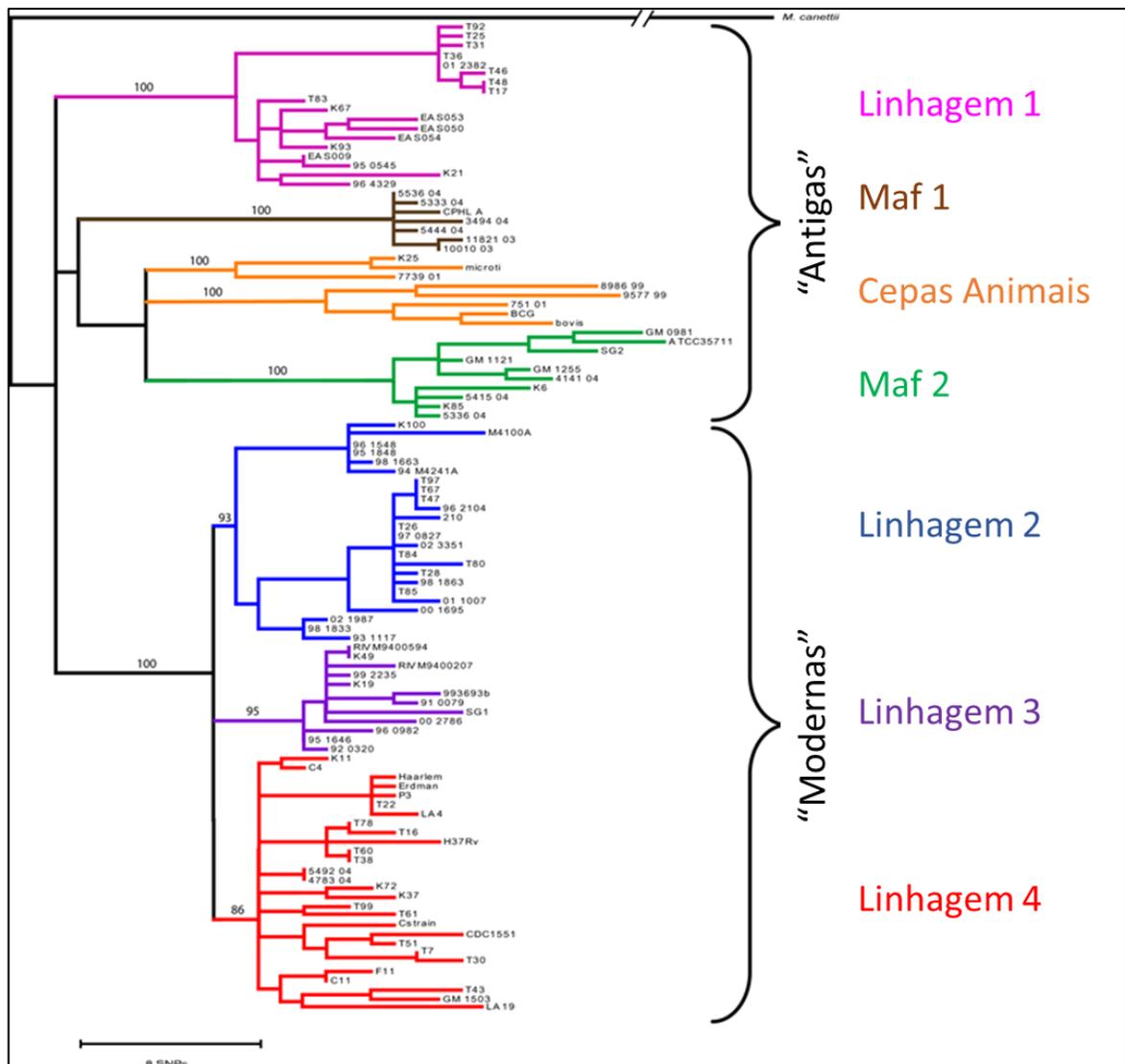


Figura 2 – Relações filogenéticas entre os diferentes componentes do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Mostra-se as diversas linhagens (1, 2, 3 e 4) que possuem associação íntima com a distribuição geográfica das mesmas, além dos clados de *M. africanum* e das cepas animais. Observa-se a presença de clados ditos como antigos e outros modernos. A árvore filogenética foi construída a partir de SNPs identificados a partir do sequenciamento de 89 genes de 108 espécies pertencentes ao complexo. Adaptado de Comas e Gagneux (2009). (COMAS e GAGNEUX, 2009).

Outro ponto importante nessas bactérias é a presença de uma espessa e diferente parede celular, composta de uma camada de peptidoglicana conectada por açúcares a uma membrana lipídica externa que possui longos e diferentes lipídeos chamados de ácidos micólicos (BHAT, *et al.*, 2017). Além desses, dependendo da espécie analisada pode-se encontrar outras moléculas hidrofóbicas, algumas vinculadas

diretamente com a virulência do microrganismo, como o PDIM (dimicocerosato ftiocerol) e PGL (glicolípido fenólico) (ARBUES, *et al.*, 2014).

1.2. Vacina BCG

A vacina BCG é uma das mais antigas usadas em humanos e confere proteção contra a TB. Estudos de caso-controle demonstram que ela está associada com a proteção de crianças contra a forma disseminada da doença, incluindo meningite. No entanto, sua eficácia contra TB pulmonar em adultos varia substancialmente, podendo alcançar valores de até 80% de proteção. Existem diversas explicações para essa grande variação nos valores de proteção, algumas delas ligadas à diversidade genética das cepas bacterianas usadas para confecção da vacina, e outras estando relacionadas a diferenças das populações humanas usadas nos estudos. Esse último se deve ao fato de que o estado do sistema imune do paciente e sua pré-exposição a micobactérias ambientais podem alterar consideravelmente os índices de proteção (BENÉVOLO-DE-ANDRADE, *et al.*, 2005).

1.2.1. Histórico

O termo BCG significa Bacilo de Calmette e Guérin, em homenagem aos dois pesquisadores responsáveis pelo desenvolvimento da vacina, Albert León Charles Calmette e Jean Marie Camille Guérin. Desde 1900 eles pesquisavam *M. bovis*, uma micobactéria responsável por causar TB em gado. Nocard isolou essa bactéria do leite de uma vaca com mastite e iniciou seus trabalhos com a mesma no Instituto Pasteur de Paris, em 1902. Para trabalhar com esse organismo em ambiente laboratorial como um modelo para compreender mais sobre a TB humana, Calmette e Guérin necessitavam de um meio de cultivo para obter o crescimento disperso da bactéria. Para isso, os pesquisadores iniciaram seus trabalhos cultivando a cepa de *M. bovis* em meio com batata glicerinada, mas obtiveram a bactéria na forma de aglomerados de difícil desagregação, dificultando assim a criação dos inóculos necessários para seus estudos de infecção. Assim, eles decidiram adicionar bile bovina na composição do meio como agente surfactante, e dessa forma, obtiveram uma suspensão homogênea. Após algumas passagens nesse novo meio, observaram modificações morfológicas nas colônias obtidas e descobriram que a bactéria era menos virulenta que a original isolada por Nocard (ABDALLAH e BEHR, 2017).

Com isso, permaneceram cultivando essa cepa no novo meio de cultivo e observando a virulência com o passar do tempo. Após 231 passagens durante 13 anos no Instituto Pasteur de Lille, França, eles obtiveram uma cepa atenuada, com características protetivas contra TB. Esta cepa foi primeiramente usada na vacinação da população em 1921 na França, após testes de segurança da vacina terem sido realizados. Com a verificação inicial de sua eficácia, a BCG foi distribuída por todo o mundo (Figura 3) e foi mantida em cultura até a criação dos lotes sementes na década de 1960 (RITZ e CURTIS, 2009). Devido às diferentes metodologias de cultivo usadas nas localidades e a outras condições ambientais a que essas bactérias foram expostas, além da precariedade dos sistemas de armazenamento dos lotes sementes, atualmente a BCG é considerada uma família de diferentes cepas que possuem diferenças ao nível de genoma, o que altera o seu fenótipo e consequentemente sua eficácia e características como vacina (BROSCH, *et al.*, 2007).

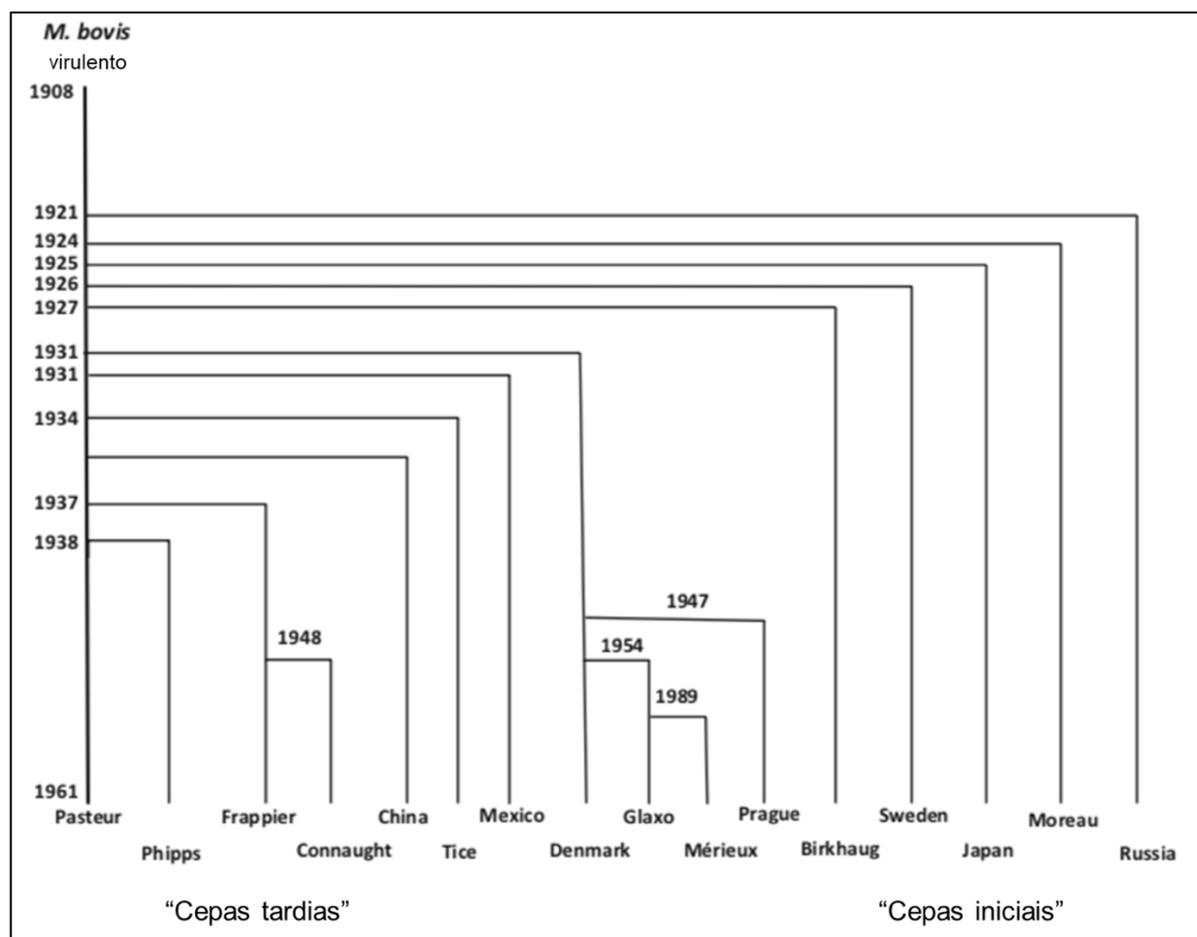


Figura 3 – Genealogia histórica da disseminação das cepas de BCG ao redor do mundo. O esquema apresenta o ano de obtenção das diferentes cepas, destacando os dois grandes grupos de BCG: iniciais e tardias. As cepas iniciais foram obtidas antes de 1927 e as tardias após esse período, sendo caracterizadas pela perda da região RD2. Adaptado de Abdallah e Behr (2017). (ABDALLAH e BEHR, 2017).

1.2.2. Diferenças genotípicas

As diferenças genotípicas entre as cepas de BCG permitem agrupá-las em grupos que possuem características similares entre si. Além disso, o entendimento das relações genéticas entre elas permite compreender a história evolutiva dessa família, um bom exemplo de evolução *in vitro* em curto período de tempo na escala em que costumamos estudar tais eventos. Essas grandes regiões de polimorfismos, normalmente inserções e deleções, foram denominadas de regiões de diferença (RD), causando grandes modificações no genoma. Estudos mostram que tais alterações ocorreram na linhagem ancestral uma única vez, e devido à característica clonal de micobactérias permaneceram em todas as linhagens derivadas (COMAS e GAGNEUX, 2009).

Dentre as mutações ocorridas em BCG relativas à atenuação da bactéria destaca-se a perda da região de diferença 1 (RD1), que é caracterizada como a principal região para conferir a atenuação ao bacilo, mas não a única, já que a reposição dessa parte do genoma em bactérias avirulentas não retoma a virulência compatível com a de *M. bovis* (TRAN, LIU e BEHR, 2014).

Essas diferenças ao nível genômico permitem dividir a família BCG em dois grandes grupos: cepas tardias, com alto número de mutações comparado com a BCG original, como BCG Pasteur e Praga, e que possuem em comum a região de diferença RD2; e cepas iniciais, mais similares com a original, como Rússia e Moreau, sendo esta última a cepa utilizada para a produção da vacina no Brasil. Dentre as características fenotípicas correspondentes de cada grupo, sabe-se que cepas iniciais tendem a ser mais imunogênicas, o que pode conferir uma melhor proteção contra TB (JOUNG e RYOO, 2013).

Além dessas grandes mutações no genoma, vários polimorfismos de nucleotídeo únicos (do inglês, *single nucleotide polymorphism*, SNP), e inserções e deleções (INDEL) conferem a diversidade genética presente nas cepas de BCG e, conseqüentemente, os distintos fenótipos dessas bactérias. Tais classes de mutação, quando ocorrem em regiões codificantes, podem gerar diferentes efeitos na proteína a ser produzida. No caso de SNPs, pode-se ter a mudança de um aminoácido ou até o surgimento de um códon de parada. Já quando se analisa INDELS não-múltiplas de três nucleotídeos é normal que ocorra a mudança do quadro de leitura. Tal evento pode levar à alteração da sequência proteica a partir do ponto da mutação, o

transcrito policistrônico podem alterar a posição do códon de parada, dificultando assim o acoplamento traducional e cessando a expressão dos genes a jusante do operon (TIAN e SALIS, 2015).

Analisando somente BCG Moreau, a cepa usada para vacinação no Brasil, observa-se diferentes mutações quando comparada com outras cepas de BCG, como a duplicação da região DU2-I, a deleção (976 pb) cepa-específica na região que compreende os genes *fadD26-ppsA*, e a região de diferença RD16 (deleção de 7608 pb, comparado a *M.tb* H37Rv). A deleção no operon que contém o gene *fadD26* acarreta na não-expressão dos genes a jusante da mutação (devido a um evento de desacoplamento traducional), fazendo com que essa bactéria não produza lipídeos importantes para virulência, como PDIM e PGL, já que ambos utilizam o mesmo core lipídico produzido pelas proteínas desse operon (SIMEONE, *et al.*, 2010). Já no caso da região RD16, além da perda dos genes internos tem-se a perda de função do produto de *rv3405c*, um regulador transcricional já observado como regulador de *rv3406* (GALVÃO, *et al.*, 2014). Análises das diferenças genéticas, tanto grandes como pequenas, e seus impactos para o bacilo se mostram essenciais para melhor compreensão dos diferentes fenótipos existentes nas cepas de BCG (ABDALLAH, *et al.*, 2015).

1.3. Metabolismo micobacteriano

Atualmente entende-se que as micobactérias são representantes diferenciados dentro do seu clado. Mesmo possuindo diversos representantes de vida livre e que não causam danos a outros animais, alguns outros evoluíram para se tornar patógenos potentes e com alta capacidade de evasão dos sistemas de proteção do hospedeiro. Além disso, mesmo sendo um organismo aeróbio estrito, na redução da disponibilidade de oxigênio consegue orquestrar suas vias metabólicas para entrar no estado de latência, mas mantendo uma produção mínima de energia (a partir de oxidação de lipídeos, principalmente) enquanto permanece se protegendo dos ataques da célula eucariótica e dos danos por estar em um estágio não-replicativo, como o estresse oxidativo inerente (TRIVEDI, *et al.*, 2012).

Todas essas características distintas e específicas de algumas micobactérias podem ser explicadas por um arsenal metabólico diverso e característico dessas bactérias. Muitos dos fenótipos observados se relacionam com sua parede celular e

sua permanente modificação de acordo com os estímulos que recebe. Essas alterações permeiam o metabolismo lipídico, já que essa classe de moléculas é de suma importância para essa estrutura.

1.3.1. Estresse oxidativo

Muitos dos estudos que concernem esse tópico foram feitos observando a infecção por *M.tb*, mas os resultados podem muitas vezes serem expandidos para outros representantes dentro do complexo. Sabe-se que durante a interação com o macrófago a micobactéria sofre ataques da célula eucariótica, na forma de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, por exemplo. Durante o desenvolvimento dentro do fagossomo e devido à queda da tensão de oxigênio, a bactéria encontra-se em um ambiente microaerofílico, o que acabaria por causar mais estresse devido ao acúmulo de formas reduzidas de cofatores, sem a posterior reoxidação dos mesmos, o que impediria o metabolismo energético e aumentaria o estresse oxidativo. Essa alteração no equilíbrio entre as formas oxidadas e reduzidas de diferentes cofatores pode levar à inativação de diversas enzimas vitais que contenham cofatores sensíveis ao ambiente redox, como centros ferro-enxofre (na aconitase) e o grupo heme (no citocromo c) (TRIVEDI, *et al.*, 2012).

Além das fontes externas geradoras de estresse oxidativo também existem as reações intracelulares que acarretam no desbalanço redox. Dentre elas pode-se citar a maioria das reações de transferência de elétrons, principalmente aquelas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons. Além disso, alguns cofatores usados nessas reações, como por exemplo as flavinas, são moléculas sensíveis a diferentes fatores ambientais, como alteração da intensidade luminosa, e podem sofrer reações redox espontâneas devido a essas condições. Com isso, atualmente procura-se entender também como a célula se protege de tais fenômenos naturais, principalmente através da ligação de tais moléculas potencialmente danosas com proteínas que as armazenam, protegendo o ambiente celular de seus possíveis efeitos. Nesse contexto, pode-se citar a dodecina, proteína conhecida por armazenar flavinas.

Visto a diversidade de fontes de estresse oxidativo que há nesse grupo evoluiu-se nessas bactérias maneiras de detectar (“sentir”) o ambiente redox e com isso modificar suas vias metabólicas, por exemplo, através do sistema de dois componentes DosS e DosT, de modo que o organismo possa sobreviver em um

ambiente pobre em nutrientes, ácido e hipóxico encontrado dentro dos macrófagos e nos granulomas. A bactéria então utiliza-se de enzimas protetoras, como a superóxido dismutase (Sod), catalase (KatG) e alquil hidropoxidase (AhpC), para neutralizar o estresse gerado pelo sistema imune do hospedeiro (CUMMING, *et al.*, 2014).

Além disso, a bactéria permanece com seu metabolismo ativo em latência, mesmo que em níveis mínimos. Com isso, o ambiente intracelular deve permanecer sob certa homeostase redox de forma a conseguir realizar reações catabólicas, como as do metabolismo energético, e anabólicas, como a síntese de diferentes biomoléculas, como DNA, lipídeos e proteínas (TRIVEDI, *et al.*, 2012).

1.3.2. Metabolismo lipídico

Lipídeos pertencem a uma classe de biomoléculas com diferentes funções biológicas intrinsecamente ligadas à sua estrutura. Sabe-se que esses podem ser usados como reserva energética, fonte de carbono para produção de energia (normalmente em condições aeróbicas) e serem parte estrutural de membranas e parede celulares. Além disso, muitos lipídeos bacterianos são moléculas imunoestimuladoras, sendo considerados antígenos importantes e passíveis de serem utilizados como vacina ou aditivos em outras formulações. Em micobactérias, essa classe de biomolécula apresenta uma grande importância, principalmente nos eventos de interação entre o microrganismo e a célula eucariótica (GOKHALE, *et al.*, 2006).

O importante papel dos lipídeos como fonte de carbono e energia em micobactérias é corroborado por diversas evidências, como o fato de *M.tb* poder sobreviver no interior de adipócitos (AYYAPPAN, *et al.*, 2019), além de conseguir importar triacilglicerol (TAG) de macrófagos infectados e utilizá-lo como fonte energética (PEAN, *et al.*, 2017). Outro fator interessante é que o genoma dessa bactéria codifica cerca de 20 lipases, que normalmente são secretadas e têm seus níveis de expressão aumentados em condições de crescimento *in vivo* (RAMESHWARAM, *et al.*, 2018).

Outra observação feita é que quando expostas à hipóxia, mimetizando a tensão de oxigênio dentro do granuloma durante a infecção, micobactérias induzem a síntese de TAG no ambiente intracelular. Além de servir como uma reserva energética e ser uma molécula eletricamente neutra, o que permite o seu acúmulo sem afetar a

homeostase redox, a síntese desse composto desvia o fluxo do ciclo de Krebs. Isso acarreta na menor produção de energia por essa via, diminuindo a taxa de crescimento da bactéria, iniciando os eventos que levam à latência (MALI e MEENA, 2018).

Além da função de reserva, lipídeos micobacterianos auxiliam diretamente em diversos passos da interação com as células do hospedeiro. Como exemplos temos o PDIM e PGL em *M.tb*, que alteram a permeabilidade da membrana do fagolisosomo e auxiliam na permanência da bactéria nessas condições adversas. Já outros lipídeos, como os ácidos micólicos, são importantes constituintes da parede celular, conferindo suas características de resistência e permitindo o sucesso da infecção (SIMEONE, *et al.*, 2010).

A importância desses lipídeos que não são usados para fins energéticos pode ser observada pela diversidade de enzimas que participam do metabolismo anabólico, sendo muitas dessas proteínas conservadas entre diferentes espécies micobacterianas. Dentre as enzimas importantes para a síntese lipídica pode-se citar as policetídeos sintases (do inglês, *polyketide synthase*, Pks). Estas são estrutural- e funcionalmente similares à enzima ácido graxo sintase mas, devido a alterações nos módulos de atividade e nível de capacidade redutora, podem estar envolvidas em diferentes modificações de ácidos graxos, como seu alongamento, adição de instaurações, ciclização, etc (HERBST, TOWNSEND e MAIER, 2018).

Energeticamente, lipídeos se mostram importantes para micobactérias quando estas entram em condição de microaerofilia, momento no qual a fonte de carbono preferencial se altera de carboidrato para lipídeos. Do ponto de vista evolutivo, isso pode ser explicado pela escassez de açúcares e aminoácidos dentro do ambiente fagossomal, que entretanto possui ácidos graxos, tanto provenientes da membrana da organela como dos rejeitos celulares (WALPOLE, GRINSTEIN e WESTMAN, 2018).

Para o metabolismo dessa classe de biomoléculas em condições de baixa tensão de oxigênio, as micobactérias precisam utilizar quatro vias essenciais: β -oxidação, parte do ciclo de Krebs, via do glioxilato e de detoxificação de propionato. Essas vias são induzidas em condições de baixa concentração de oxigênio, corroborando a importância desse metabolismo para a sobrevivência do microrganismo nessa condição. Parte dos elétrons obtidos a partir da oxidação dessas moléculas é usada para suprir a cadeia de transporte de elétrons, que está modificada

sob essas condições, e propulsionar a síntese de ATP pela ATP sintase (TRIVEDI, *et al.*, 2012).

Mesmo com a grande importância desse metabolismo para micobactérias, vários quadros abertos de leitura anotados como codificantes para enzimas atuantes em lipídeos e que são observados no genoma desses microrganismos não são propriamente caracterizados. Com isso, há ainda uma potencial diversidade de lipídeos, com estruturas e funções desconhecidas, para ser descoberta no grupo das micobactérias. Como exemplo pode-se citar o operon *rv1371/2/3* em *M.tb*, que codifica diferentes enzimas teoricamente envolvidas em metabolismo de lipídeos carregados negativamente, mas sem nenhum trabalho na literatura o descrevendo propriamente.

1.3.3. Respiração anaeróbica

Estudos mostram que mesmo sendo organismos aeróbios estritos, micobactérias mantêm o potencial de membrana e a síntese de ATP através da cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa durante a hipóxia, e que essas vias são essenciais para a sobrevivência do microrganismo e para a manutenção e progressão do processo infeccioso. Logo, a transição que ocorre do estágio metabolicamente ativo para o latente é ligada diretamente a uma flexibilidade metabólica que permite que essa bactéria produza uma quantidade mínima de ATP para sobreviver, mesmo na ausência de oxigênio (SERSHEN, PLIMPTON e MAY, 2016).

Como já visto, os lipídeos são os principais doadores de elétrons para manter o potencial de membrana e guiar a síntese de ATP, mas na ausência de oxigênio deve-se utilizar outras moléculas como aceptores finais. Durante esse momento, micobactérias podem usar nitrato ou fumarato para manter o fluxo elétrico pela cadeia de transporte (COOK, *et al.*, 2014).

Uma enzima importante para tal evento, contribuindo assim para a manutenção da respiração anaeróbica, é a fumarato redutase, que transfere elétrons da menaquinona (oxidando-a) para o fumarato, convertendo-o em succinato. Vale a pena lembrar que diferentemente de outras bactérias que possuem ubiquinona e menaquinona para serem usadas como carreadores de elétrons em diferentes condições metabólicas, *M.tb* e outras micobactérias somente possuem enzimas para

síntese de menaquinona, com o potencial de redução menor do que a ubiquinona (UNDEN e BONGAERTS, 1997).

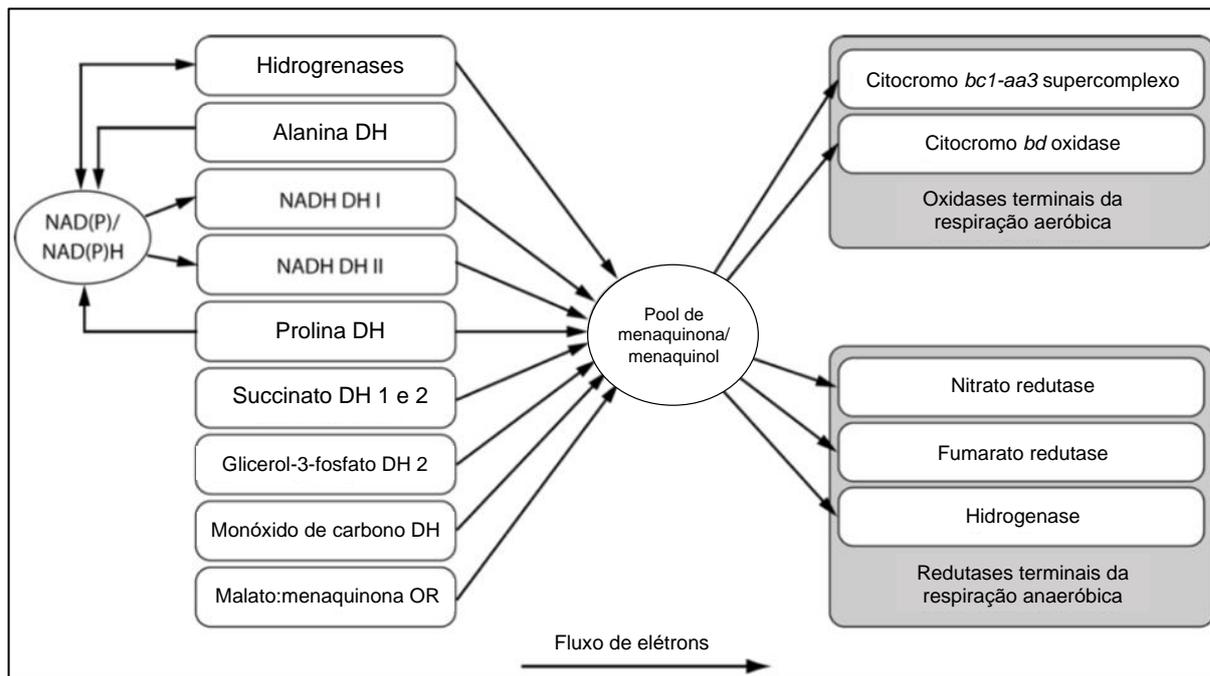


Figura 5 – Organização e componentes da cadeia de transporte de elétrons em micobactérias. Esquema representativo do fluxo de elétrons, destacando a organização e os componentes da cadeia de transporte de elétrons em micobactérias, no contexto de respiração aeróbica e anaeróbica. Adaptado de Cook *et al.* (2014). (COOK, *et al.*, 2014).

1.4. Justificativa

Com o quadro alarmante da TB ao redor do mundo procura-se atualmente obter novos fármacos e/ou novos métodos profiláticos, além de melhorar e caracterizar os já existentes. Sob esse escopo, mostra-se importante o estudo genético da vacina BCG, focando-se na cepa Moreau, cepa vacinal brasileira contra TB. Devido ao grande destaque previamente dado à análise das grandes regiões de diferenciação presentes nessa cepa, identifica-se o estudo das pequenas mutações (SNPs e INDELS) como um campo promissor para a melhor compreensão da biologia da vacina brasileira. Dessa maneira, o trabalho aqui descrito foi focado em analisar o impacto funcional de mutações, na comparação entre *M.tb* e BCG Moreau, que ocorrem em genes envolvidos em metabolismos já conhecidos como importantes para a interação da bactéria com a célula eucariótica, como o metabolismo redox (*rv1498A*), lipídico (operon *rv1371/2/3*) e a respiração anaeróbica (operon da fumarato redutase).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Identificar casos de pequenas mutações no genoma de *M. bovis* BCG Moreau comparando com *M. tuberculosis* cepa H37Rv e analisar seus impactos funcionais para a biologia do bacilo.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar casos de pequenas mutações em *M. bovis* BCG Moreau comparando com *M. tuberculosis* cepa H37Rv a partir de análises de genômica comparativa;
- Analisar o impacto funcional das mutações na transcrição dos genes afetados em *M. bovis* BCG Moreau por RT-PCR;
- Produzir proteínas recombinantes dos alvos afetados pelas mutações estudadas para produção de soro policlonal e análises bioquímicas comparativas com os polipeptídeos produzidos;
- Analisar o impacto funcional das mutações na expressão e em determinadas características das proteínas codificadas pelos genes afetados através de ensaios de *western blotting*;
- Criar mutantes *knockout* e complementá-los com os alelos de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau de maneira a analisar diferentes fenótipos, caracterizando assim uma possível função dos genes e o impacto das mutações;
- Criar clones de *M. smegmatis* mc²155 expressando os alelos do gene da dodecina de *M. tuberculosis* H37Rv e de *M. bovis* BCG Moreau, a partir do próprio promotor, e analisar diferentes fenótipos;
- Criar modelos do complexo da fumarato redutase e da dodecina de ambos microrganismos e procurar indícios *in silico* que corroborem ou não um possível impacto funcional da mutação;
- Realizar análise proteômica com extratos de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau e analisar os alvos encontrados, proteínas diferencialmente expressas e fazer uma reconstrução metabólica com as identificações.

3. Metodologia

3.1. Identificação de mutações no genoma de *M. bovis* BCG Moreau através de genômica comparativa

Utilizando o programa para visualização de genomas e anotações Artemis (Sanger Institute) comparou-se manualmente os genomas de *M. bovis* BCG Moreau (BCG Moreau) e *M.tb* cepa H37Rv. Procurou-se por SNPs e INDELS não-múltiplas de três, de até 10 nucleotídeos, em sequências codificantes (do inglês, *coding sequence*, CDS). Das mutações identificadas em BCG Moreau foi analisado se: (1) o gene mutado pode estar envolvido em um caso de acoplamento traducional; (2) o gene mutado ou os genes afetados por um possível desacoplamento traducional possuem função já descrita; (3) ocorre alteração no quadro de leitura, causando ganho ou perda de regiões da proteína, e/ou fusão/cisão das mesmas. A partir da listagem dos genes mutados foram selecionados alvos que, além das três características já citadas, possuam importância já descrita na literatura para a biologia do bacilo.

As sequências dos genes estudados foram analisadas utilizando o programa de alinhamento local Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), comparando com aquela obtida de *M.tb* cepa H37Rv para analisar pontualmente os efeitos teóricos da mutação.

Para realizar análises de sintonia do operon *rv1371/2/3* utilizou-se o programa SyntTax (<http://archaea.u-psud.fr/synttax/>).

Para estudar a possível origem filogenética das mutações estudadas alinhou-se as sequências de diferentes representantes dentro do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Dentre elas podem-se citar: *M. bovis* BCG Pasteur, *M. bovis*, *M. caprae* (representantes da linhagem de cepas animais), *M. africanum* cepas K85 (linhagem Maf 2) e CPHL_A (linhagem Maf 1), *M.tb* cepas T17, T92 (ambas da linhagem 1), EAI_OSDD271 (linhagem 2), Erdman e Haarlem (ambas da linhagem 4). Para o alinhamento local utilizou-se a ferramenta de alinhamento do programa Clone Manager.

3.2. Cultivo de *M. bovis* BCG Moreau, *M. tuberculosis* cepa H37Rv e *M. smegmatis* mc²155

Nos experimentos com BCG Moreau realizados no Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática (LAGFB) utilizou-se a cepa vacinal oriunda da Fundação Ataufo de Paiva – FAP. Já os ensaios realizados no Instituto de Farmacologia e Biologia Estrutural (IPBS; criação dos mutantes e análises lipídicas) utilizaram a cepa oriunda da coleção de micobactérias do Instituto Pasteur, Paris.

A partir dos estoques criopreservados em cada laboratório, cultivou-se as bactérias em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 (DifcoTM) contendo Tween 80 (0,05% v/v) e glicerol, suplementado com 10% de ADC (albumina, dextrose e catalase). O tempo de cultivo foi de uma semana, sob agitação constante (200 rpm) no caso dos experimentos no LAGFB e em condição estática naqueles realizados no IPBS, e à temperatura de 37 °C, com passagens semanais na diluição 1:10.

Tabela 1 – Composição da solução de ADC utilizada na suplementação do meio 7H9.

Albumina fração V	50 g
Catalase	0,03 g
Dextrose	20 g
NaCl	8,5 g
H ₂ O Milli-Q	q.s.p. 1000 mL

Para o cultivo em meio sólido utilizou-se o meio Middlebrook 7H11 (DifcoTM) contendo glicerol e suplementado com 10% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase).

Ao atingir a densidade ótica (DO_{600nm}) de aproximadamente 1,0 (correspondente à fase exponencial do crescimento micobacteriano), o cultivo foi interrompido, as células recolhidas por centrifugação e aliquoteadas em 15% glicerol (Sigma), sendo o lote semente estocado a -70 °C. Este estoque foi utilizado nos experimentos que se seguiram, sempre seguindo as condições de cultivo previamente descritas.

O cultivo de *M.tb* cepa H37Rv foi realizado no Centro de Referência Professor Hélio Fraga em laboratório de nível de Biossegurança 3 (NB3), sob as mesmas condições descritas para os experimentos realizados no LAGFB.

Bactérias foram cultivadas a partir do estoque armazenado a -70 °C e, após a terceira passagem, a cultura foi utilizada para confeccionar uma curva de crescimento em triplicata, iniciando-se em DO_{600nm} de 0,1, e acompanhando o crescimento bacteriano diariamente através de turbidimetria. Dessa forma, convencionou-se os dias de cultura para obter células na fase LAG (dia 2), LOG (dia 5) e estacionária (dia 7).

Nos experimentos com *M. smegmatis* mc²155, as células foram cultivadas em meio LB suplementado com Tween 80 (0,05 % v/v) ou em meio LB sólido contendo ágar.

3.3. Confirmação das mutações por sequenciamento e análise de fragmentos

Após a identificação e seleção dos casos de mutação que seriam estudados com mais detalhes confirmou-se a presença das mutações através de sequenciamento de DNA, utilizando-se como molde o DNA genômico de BCG Moreau.

Seguiram-se as recomendações da reação de sequenciamento da Plataforma de Sequenciamento de DNA – RPT01A, da Fiocruz. Resumidamente, usou-se para cada reação cerca de 1 µg de DNA genômico, 3,2 pmoles de oligonucleotídeo iniciador, em volume final de 7,5 µL. As amostras foram entregues e processadas pela plataforma segundo protocolo padrão.

No caso de *rv1371*, utilizou-se os oligonucleotídeos Rv1371_for e Rv1371_revH e para *rv1373* os oligonucleotídeos Rv1373_for e Rv1373_revH (Tabela 7). Para sequenciar a mutação presente no gene da dodecina utilizou-se os iniciadores descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento e confirmação da mutação presente no gene da dodecina em *M. bovis* BCG Moreau e *M. tuberculosis* H37Rv.

Nome	Sequência (5´-3´)
Dod_SeqStart_for	TTCTGGTCGAAGGTCGCAAT
Dod_SeqStart_rev	TATCGGCCGCGCTTGAAGGT

Para confirmar a mutação presente na região entre *frdB* e *frdC* em BCG Moreau utilizou-se a análise de fragmentos de DNA por eletroforese capilar, na plataforma de

Análise de Fragmento – RPT01D, da Fiocruz. Para tal, utilizou-se os iniciadores descritos na Tabela 3, sendo que o reverso estava marcado com o fluoróforo 6FAM.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a análise de fragmentos por eletroforese capilar e confirmação da mutação presente nos genes da fumarato redutase em *M. bovis* BCG Moreau e *M. tuberculosis* H37Rv.

Nome	Sequência (5'-3')
FrdBC_micro_for	GGTGGGCGAATGTTTCGACGG
FrdBC_micro(6FAM)_rev	6FAM - GTCCAAAACCGCTGGTAGGAATT

Procedeu-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar essa região, usando-se o DNA genômico de *M.tb* cepa H37Rv como controle. Usou-se a enzima de alta fidelidade da Invitrogen (*Invitrogen Platinum SuperFi DNA polymerase*), seguindo-se as condições recomendadas pelo fabricante e utilizando 200 ng de cada iniciador.

Mostra-se na Tabela 4 as condições de ciclagem utilizadas para a amplificação da região desejada.

Tabela 4 – Ciclagem utilizada nas PCRs.

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
94	2 min	1
94	30 sec	35
60	30 sec	
72	1 min/kb	
72	2 min	1
4	∞	1

Após a amplificação, o produto foi purificado usando-se o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System*, da Promega, seguindo as recomendações do fabricante. Após esse procedimento, obteve-se a concentração de ácidos nucleicos através da leitura de absorvância à 260 nm em equipamento NanoDrop. A amostra foi enviada para a plataforma de Análise de Fragmento – RPT01D, da Fiocruz, e processada segundo protocolo padrão próprio.

3.4. Análise da transcrição dos alvos

3.4.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA

As células bacterianas ($\sim 10^7$ ressuspensas em Trizol [Invitrogen]) foram rompidas por lise mecânica na presença de pérolas de zircônio em equipamento Bead Beater (Biospec Products INC.). Após clarificação, a fração solúvel da lise foi submetida à extração com clorofórmio e precipitação com etanol, e o RNA foi ressuspendido em 50 μ L de água DEPC. A contaminação com DNA foi removida através da digestão com RNase-free Turbo-DNase (Ambion-Life) de acordo com as especificações do fabricante. A ausência de contaminação com DNA foi confirmada através de PCR diretamente sobre o RNA, em amostras não submetidas à reação com transcriptase reversa. A concentração do RNA extraído, após tratamento com DNase, foi determinada pelo kit Qubit (Ambion-Life) e a pureza avaliada pela relação de $DO_{260/280nm}$.

As reações de transcrição reversa foram feitas utilizando 1000 ng de RNA total, iniciadores randômicos (0,5 μ g/reação, Invitrogen) e o sistema de *SuperScript III First-Strand Synthesis* (Invitrogen) para RT-PCR seguindo as especificações do fabricante.

3.4.2. RT-PCR

Para essa análise, utilizou-se os pares de iniciadores indicados na Tabela 5 para amplificação de cada alvo e a ciclagem previamente descrita. Usou-se o *locus sigA* como controle de gene constitutivamente transcrito. Utilizou-se a enzima *GoTaq DNA polymerase*, da Promega, seguindo as indicações do fabricante.

Os resultados foram visualizados após a realização de eletroforese em gel de agarose 1 % com 5 μ L de cada reação e revelados com solução de brometo de etídeo sob luz ultravioleta.

Tabela 5 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para os ensaios de RT-PCR com os diferentes alvos gênicos.

Nome		Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)
frdA	for	ACAACATCGTGGTTATCGGC	100
	rev	ACCTTGAAACGATCGCCAC	
frdBC	for	TGAAGAAGTTGCTGTTCCCT	111
	rev	GCATGAATCGCAGGTAAGAA	
frdD	for	AAGCTTGTTGTGCTGGTCCT	122
	rev	TAACACCACAGGGCGATCACT	
frdA_BC	for	ATAGAGAAAGCGACGGAACG	231
	rev	TCGAGGTGATCCTTGATGTA	
frdBC_D	for	ATGGTGATTCAGGTTTCGC	328
	rev	AGGACCAGCACACAAGCTT	
rv1371	for	TTGTCAGACGTGTGGGTTTA	95
	rev	TTGGTCCGCCCAATGAAGAA	
rv1372	for	TGTATCAAACCTCGCGGATC	119
	rev	TTCGTAGAACAGATGCATCC	
rv1373	for	TTGTGTATCGATCGTTGATG	136
	rev	TCGAACACCAGCAGGGACAC	
rv1371_2	for	TGTGTCGGAAGTATCTGTTG	202
	rev	AAGGCCAACCTCATGCCTCT	
rv1372_3	for	TAGAGACGATGGTGCAGCAG	235
	rev	CGGCGCCGAGATAATGATGT	
Dodecina	for	ATCGAGATCGTCGGGACCTC	111
	rev	AATTGACTGTACTTCGAACC	

3.5. Produção das proteínas recombinantes

3.5.1. Clonagem das sequências codificantes em pET28a(+)

Inicialmente amplificou-se as regiões codificantes para as proteínas de interesse através de PCR (usando a enzima *Invitrogen Platinum SuperFi DNA polymerase*), utilizando-se os pares de iniciadores descritos na Tabela 7 para cada alvo. No caso da dodecina de *M.tb*, utilizou-se o mesmo iniciador *reverse* do alvo de BCG, mas com um *forward* específico. A reação foi igual à descrita na seção 3.3 para a análise de fragmentos, mas a ciclagem foi diferente e está mostrada na Tabela 6.

Tabela 6 – Ciclagem utilizada nas PCRs realizadas para amplificar e criar o inserto para a clonagem e produção das proteínas recombinantes.

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
94	2 min	1
94	30 sec	5
Tm1	30 sec	
72	1 min/kb	
94	30 sec	30
Tm2	30 sec	
72	1 min/kb	
72	2 min	1
4	∞	1

O valor de Tm foi calculado segundo a quantidade e distribuição de nucleotídeos presentes em cada iniciador, segundo a equação: $T_m = \{[2 \times (\text{quantidade de A e T})] + [4 \times (\text{quantidade de C e G})]\} \text{ } ^\circ\text{C}$, sendo que Tm1 só considera os nucleotídeos homólogos ao alvo genômico, enquanto Tm2 analisa todas as bases do iniciador. Calculou-se os valores de Tm para cada oligonucleotídeo e testou-se o valor médio entre o par usado e os valores adicionando e subtraindo 5 °C.

Tabela 7 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a clonagem dos genes estudados de *M. bovis* BCG Moreau e *M. tuberculosis* H37Rv em plasmídeo pET28a(+), visando a produção das proteínas recombinantes correspondentes, sem ou com (revH) a cauda de 6 histidinas na porção carboxi-terminal. Mostra-se o sítio de restrição (em destaque na sequência) para as enzimas indicadas.

	Nome		Sequência (5'-3')	Enzima de restrição
BCG Moreau	Rv1371	for	AA <u>CCATGG</u> TGACAAACGACCTCC	NcoI
		revH	TTT <u>CTCGAG</u> CTCACCAGAAGCAAG	XhoI
	Rv1373	for	AA <u>CCATGG</u> CCAATTGACAACACCCG	NcoI
		revH	TGC <u>CTCGAG</u> GGAGCGATTTCTGACG	XhoI
	FrdB	for	AA <u>CCATGG</u> ATCGAATTGTCATGG	NcoI
		revH	TTT <u>CTCGAG</u> GAACAGCAACTTCTT	XhoI
	Dod	for	AA <u>CCATGG</u> TGATCGAGATCGTC	NcoI
		revH	TGC <u>CTCGAG</u> GGAATCCTCCAGGCG	XhoI
		rev	TTTT <u>CTCGAG</u> TCAGGAATCCTCCAG	XhoI
	DodTB	for	AA <u>CCATGG</u> CGAGCAATCACACCTA	NcoI

Após a purificação dos produtos de PCR pelo kit já descrito, digeriu-se o plasmídeo pET28a(+) e os insertos com as enzimas de restrição NcoI e XhoI, usando-

se protocolo descrito pelo fabricante, por 2 h a 37 °C. Após purificação e dosagem, cada inserto foi ligado ao plasmídeo digerido usando a enzima T4 DNA ligase, da Invitrogen, segundo condições descritas pelo fabricante.

A reação de ligação foi diluída 5 vezes em água MiliQ e 5 µL foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *Escherichia coli* cepa TOP10. Para tal eletroporou-se o DNA em equipamento *GenePulser*, usando as seguintes condições elétricas: 25 µF, 2,5 kV e 200 Ω. Após o pulso, adicionou-se 1 mL de meio LB e incubou-se as bactérias a 37 °C sob leve agitação (100 rpm) por 1 h.

Depois, inoculou-se 100 e 900 µL da suspensão bacteriana em placas de Petri contendo meio LB com ágar e o antibiótico canamicina (25 µg/mL). Incubou-se as culturas a 37 °C por cerca de 16 h.

As colônias obtidas após a seleção em meio com antibiótico foram testadas para a presença do inserto através de PCR de colônia, utilizando as condições de PCR descritas na Tabela 4 e os iniciadores específicos descritos na Tabela 7. Extraiu-se os plasmídeos dos clones positivos usando-se o kit *Wizard SV Minipreps*, da Promega, seguindo as recomendações do fabricante. Os DNAs plasmidiais foram dosados e enviados para sequenciamento, como descrito na seção 3.3, usando-se os iniciadores mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento e confirmação da identidade das sequências presentes nos plasmídeos selecionados por PCR de colônia.

Nome	Sequência (5´-3´)
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

3.5.2. Indução da expressão e análise por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE)

Após a confirmação da sequência, transformou-se os plasmídeos selecionados em células eletrocompetentes de *E. coli* cepa BL21(DE3), seguindo protocolo já descrito para a cepa TOP10. A partir desse momento, todas as incubações foram a 37 °C e com canamicina (25 µg/mL).

Após a seleção em meio com antibiótico, selecionou-se uma colônia isolada e procedeu-se a indução da expressão da proteína recombinante. Para tal, a partir de um inóculo saturado (cerca de 16 h de cultivo) preparou-se um novo inóculo diluindo-

se 1:100 em meio LB com antibiótico. Ao atingir a $DO_{600nm} \sim 0,4-0,6$, separou-se uma alíquota para o controle da cultura não induzida e, ao restante do cultivo, adicionou-se o indutor IPTG na concentração final de 1 mM. Incubou-se por 3 h, mediu-se a absorbância das culturas a 600 nm e depois coletou-se as células por centrifugação.

Realizou-se também a lise das bactérias para determinar se a proteína recombinante estava sendo produzida na fração solúvel ou em corpos de inclusão. Para tal, ressuspendeu-se o sedimento em 1 mL de tampão de lise para *E. coli* (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 0,5% [v/v] Triton X-100), adicionou-se a suspensão em tubo com rosca contendo pérolas de vidro e procedeu-se a lise no equipamento *Bead Beater* com 3 pulsos de 1 min cada, com intervalos de 1 min no gelo para evitar o aquecimento excessivo da amostra.

O lisado total foi recuperado e centrifugado (15.000 x g por 10 min), com a posterior precipitação das proteínas do sobrenadante com ácido tricloroacético (TCA) na concentração final de 17%. O precipitado proteico foi lavado com trietanolamina (TEA) 1% em acetona gelada, seguido de uma lavagem com acetona 100% gelada. Deixou-se a amostra secar até a evaporação de toda acetona residual.

As amostras foram ressuspensas em volume de tampão de amostra para SDS-PAGE desnaturante e redutor de modo a se obter uma solução contendo 0,1 DO / 10 μ L de solução, em referência à quantidade bacteriana final de cada cultivo.

Tabela 9 – Composição do tampão de amostra para SDS-PAGE utilizado nesse trabalho.

Componente	Concentração
Tris-HCl (pH 6,8)	62,5 mM
SDS	2 % (p/v)
β-mercaptoetanol	5 % (v/v)
Azul de bromofenol	0,002 % (p/v)
glicerol	10 % (v/v)

Para análise da complexidade proteica das amostras foram realizadas eletroforeses em condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970). Os géis de separação foram preparados com acrilamida a 12% T / 2,67% C ou a 15% T / 2,67% C e os géis de empilhamento a 4% T, e corridos sob voltagem constante (200 V), por aproximadamente 45 min, utilizando sistemas *Mini-Protean II*

(Bio-Rad Laboratories). A revelação do gel se deu pela técnica de Coomassie Blue R-250 (RABILLOUD, 2000).

Para confirmar a presença da cauda de 6 histidinas nas proteínas recombinantes fez-se ensaios de *western blotting*. Proteínas resolvidas em géis SDS-PAGE foram eletro-transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham Pharmacia) em equipamento *Mini Transblot* (BioRad), a 100 V durante 1 h, segundo especificações do fabricante. Após a transferência, a membrana foi corada com o corante reversível *MemCode* (Pierce) para visualização e verificação da qualidade da transferência. Após descoloração da membrana a mesma foi bloqueada em leite 10% em TBS contendo 0,05% Tween 20 (TBS-T) por uma noite a 4 °C.

Após o bloqueio a membrana foi lavada com TBS 1X (3 vezes por 5 min) e, em seguida, incubada durante 2 h, com agitação suave, com o anticorpo primário anti-His (1:2.500) (GE Healthcare) em leite 5% em TBS-T. A membrana foi então lavada sequencialmente com TBS-T (3 vezes por 5 min) e TBS (3 vezes por 5 min) e então incubada por 1 h na presença do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:10.000) (Pierce) em leite 5% em TBS-T e novamente lavada como descrito acima. Para revelar as membranas utilizou-se o *Kit Super Signal*® (Pierce) conforme as instruções do fabricante.

3.5.3. Purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade por íons imobilizados e processamento da amostra

Após a confirmação dos clones que expressavam a proteína de interesse e em qual fração essa estava sendo obtida, preparou-se cultivos de 500 mL. Procedeu-se o protocolo padrão de indução e lise, como descrito na seção 3.5.2. Para o caso de proteínas recombinantes solúveis, o lisado total é clarificado por centrifugação e já pode ser usado na cromatografia para purificação.

No caso de proteínas em corpos de inclusão, após a centrifugação do lisado total conservou-se o precipitado e lavou-se o mesmo 3 vezes com auxílio de Douncer e com 10 mL de solução de lavagem (50 mM Tris-HCl pH 8,5; 0,5% [v/v] Triton X-100; 5 mM EDTA; 150 mM NaCl).

Após as lavagens, as proteínas insolúveis foram ressuspensas em 10 mL de solução desnaturante (8 M ureia; 0,3 M NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8,5) e incubadas

sob leve agitação por cerca de 16 h a 4 °C. Antes de proceder para a purificação, a solução proteica foi diluída para 4 M de ureia e clarificada por centrifugação.

A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade por íons imobilizados, usando o sistema cromatográfico *Akta Purifier* e a coluna HiTrap IMAC HP (GEHealthcare), à temperatura ambiente, com absorbância monitorada no comprimento de onda de 280 nm.

O tampão A foi composto de 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl e 5 mM imidazol, e o B consistiu do tampão A com concentração de imidazol de 0,5 M. No caso da purificação de proteínas em corpos de inclusão os tampões continham também 4 M de ureia. A taxa de fluxo utilizada durante toda a corrida foi de 1,0 mL/min. A corrida foi realizada com injeção da amostra, seguida de lavagem do *loop* com 10 mL de tampão A. Depois eluiu-se as proteínas em um gradiente em etapas (5 volumes de coluna cada) de 10, 20, 30, 40 e 100% de tampão B. Frações de 1 mL cada foram coletadas durante a eluição. Analisou-se cada uma por SDS-PAGE.

Juntaram-se as frações com a proteína purificada, dialisou-se contra PBS 1X e dosou-se as proteínas totais nessa amostra final.

3.6. Produção de soro policlonal

Realizou-se a imunização dos camundongos Balb/c com as proteínas recombinantes purificadas. Para cada caso se utilizou seis camundongos fêmeas. Foram inoculadas três doses em cada animal, sendo que as duas primeiras eram com adjuvante incompleto de Freund, e a última foi diluída em PBS 1X.

Preparou-se as doses de maneira que cada camundongo fosse inoculado com 10 µg de proteína em volume final de 100 µL de dose. Para tal, adicionou-se até 500 µL de proteína e misturou-se com 500 µL de adjuvante incompleto de Freund (doses 1 e 2) ou PBS 1X (dose 3).

Um volume de 100 µL das doses foram administradas via intraperitoneal com intervalo de duas semanas entre elas. Após a última administração realizou-se a sangria pelo globo ocular após a anestesia com colírio anestésico para coletar o soro e testar o mesmo para a produção de anticorpos específicos através de ensaios de *western blotting* contra as proteínas recombinantes purificadas.

Após a confirmação da produção de anticorpos específicos, realizou-se a sangria total do animal através de punção cardíaca. Incubou-se o sangue a 4 °C por 30 min e

procedeu-se centrifugação a 2000 rpm por 10 min para coletar o soro policlonal. Este foi aliqotado e armazenado a -20 °C. (Licença CEUA/IOC L-020/2016)

3.7. Análise dos extratos proteicos de *M. bovis* BCG Moreau e *M. tuberculosis* H37Rv

3.7.1. Presença dos alvos nas diferentes fases de cultivo axênico

Para esses ensaios, coletaram-se as células micobacterianas (BCG Moreau e *M.tb* H37Rv) de 10 mL de cultivo por centrifugação nas diferentes fases de crescimento. Após a lavagem do sedimento bacteriano com PBS 1X, procedeu-se a ruptura das bactérias por lise mecânica em equipamento *Bead Beater*, com modificações em relação ao exposto na seção 3.5.2: Ressuspendeu-se o sedimento em tampão de lise para micobactérias (50 mM HEPES/KOH pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 60 mM NH₄Cl; 10% [v/v] glicerol), as pérolas utilizadas eram de zircônio e usou-se 5 pulsos de 1 min cada.

As proteínas do lisado clarificado foram precipitadas pelo protocolo de TCA, como já descrito, mas após a evaporação da acetona residual, o precipitado proteico foi ressuspenso em volume suficiente de tampão para focalização isoeétrica (IEF) (8 M ureia; 2% [p/v] CHAPS) e a concentração de proteínas totais foi obtida através de leitura a 280 nm em equipamento NanoDrop. Nas análises em gel que se seguiram, utilizou-se 20 µg de cada amostra.

As amostras foram resolvidas em SDS-PAGE 15%, seguido da transferência para membrana de nitrocelulose. Os ensaios de *western blotting* foram realizados usando os soros policlonais na diluição de 1:1000 para as proteínas analisadas, exceto para a dodecina, na qual se usou 1:100.

3.7.2. Análise da termoestabilidade dos alvos

Esse experimento foi realizado de maneira similar ao descrito na seção 3.7.1., com a exceção de que os lisados totais foram incubados a 40, 80 e 100 °C por 30 min previamente à centrifugação.

3.7.3. Análise da solubilidade por extração diferencial com Triton X-114

Esse protocolo foi adaptado daquele descrito na literatura (MÅLEN, *et al.*, 2010). O experimento foi realizado de maneira similar ao descrito na seção 3.7.1., com a modificação de que após a centrifugação do lisado total o sobrenadante foi separado e adicionou-se Triton X-114 10% (v/v) para concentração final de 2% (v/v). Extraíu-se as proteínas sob agitação por cerca de 16 h a 4 °C. Depois, incubou-se a mistura a 37 °C por 40 min, seguido de centrifugação (1000 x g por 20 min). A fase inferior (com detergente) e a superior (aquosa) foram separadas, e precipitou-se as proteínas totais da fase aquosa com o protocolo do TCA já descrito e as da fase de detergente com acetona 100% gelada, adicionando 4 vezes o volume de acetona, incubando a -20 °C por 1 h, seguido de centrifugação a 15.000 x g por 10 min.

Os precipitados proteicos obtidos foram posteriormente processados como descrito na seção 3.7.2.

3.8. Análise funcional das dodecinas recombinantes

3.8.1. Ensaios em gel para análise do impacto na oligomerização, termo- e haloestabilidade

Para essas análises utilizou-se o lisado total clarificado da *E. coli* BL21(DE3) expressando a dodecina recombinante específica. Para todos os ensaios, após o tratamento prévio, as amostras foram dosadas em equipamento *NanoDrop* e utilizou-se 5 µg (proteínas totais) de cada em SDS-PAGE. O *western blotting* foi realizado usando como anticorpo primário o soro policlonal produzido contra a dodecina (com a cauda de histidinas) de BCG Moreau na diluição de 1:100.

Para o ensaio de oligomerização utilizou-se o lisado de células expressando as dodecinas de *M.tb* H37Rv e BCG Moreau, ambas com cauda de histidina, e células que expressavam a versão sem a cauda de histidina de BCG. A partir dos próximos experimentos, utilizaram-se somente as proteínas com a cauda.

No ensaio de termoestabilidade, incubou-se o lisado total de cada clone a 25, 40, 80, 100 e 120 °C por 30 min previamente à centrifugação. No caso do experimento com a variável de haloestabilidade, as incubações prévias à clarificação foram feitas em diferentes concentrações de NaCl: 0, 1, 2 e 5 M.

3.8.2. Ensaios de ligação à riboflavina em solução

O lisado clarificado das bactérias utilizadas nessa análise (*E. coli* BL21(DE3) expressando ou não as dodecinas recombinantes de diferentes espécies de micobactérias) foi obtido como descrito previamente. Cerca de 1 mL de cada lisado foi adicionado às unidades filtrantes em tubos de microcentrífuga, com filtros com corte a partir de 10 kDa (AmiconUltra – 10K, da Millipore). Centrifugou-se o material segundo indicações do fabricante, de modo a se concentrar a amostra, mas sem secá-la.

Lavou-se as amostras três vezes com PBS 1X e depois adicionou-se às unidades filtrantes solução saturada de riboflavina. Incubou-se os sistemas sob leve agitação por 2 h. Após esse período, centrifugou-se as unidades e lavou-se as amostras três vezes com PBS 1X.

Mediu-se a absorvância de cada amostra retida no filtro a 450 nm, um dos λ_{\max} do espectro de absorção da riboflavina.

3.9. Criação dos mutantes (*knockout*) em *M. bovis* BCG Moreau

3.9.1. Construção do substrato de troca alélica para *recombineering* e transdução especializada

Para a criação dos mutantes, escolheu-se fazer a deleção da região codificante dos genes estudados. No caso dos operons, retirou-se do início da primeira CDS até o códon de término da última.

Decidiu-se testar duas metodologias para a criação dos *knockouts* em BCG Moreau: *recombineering* (KESSEL e HATFULL, 2007) e transdução especializada (BARDAROV, *et al.*, 2002). Para ambas, era necessário iniciar com a construção do substrato de troca alélica (do inglês, *allelic exchange substrate*, AES). Para tal, constrói-se um DNA recombinante linear contendo nas suas extremidades regiões de cerca de 1 kb homólogas às regiões fronteiriças à região do DNA genômico que se deseja retirar. Depois, por recombinação homóloga, haverá a criação de um clone sem o gene de interesse, que poderá ser selecionado por incubação em meio com antibiótico específico. Vide a Figura 6.

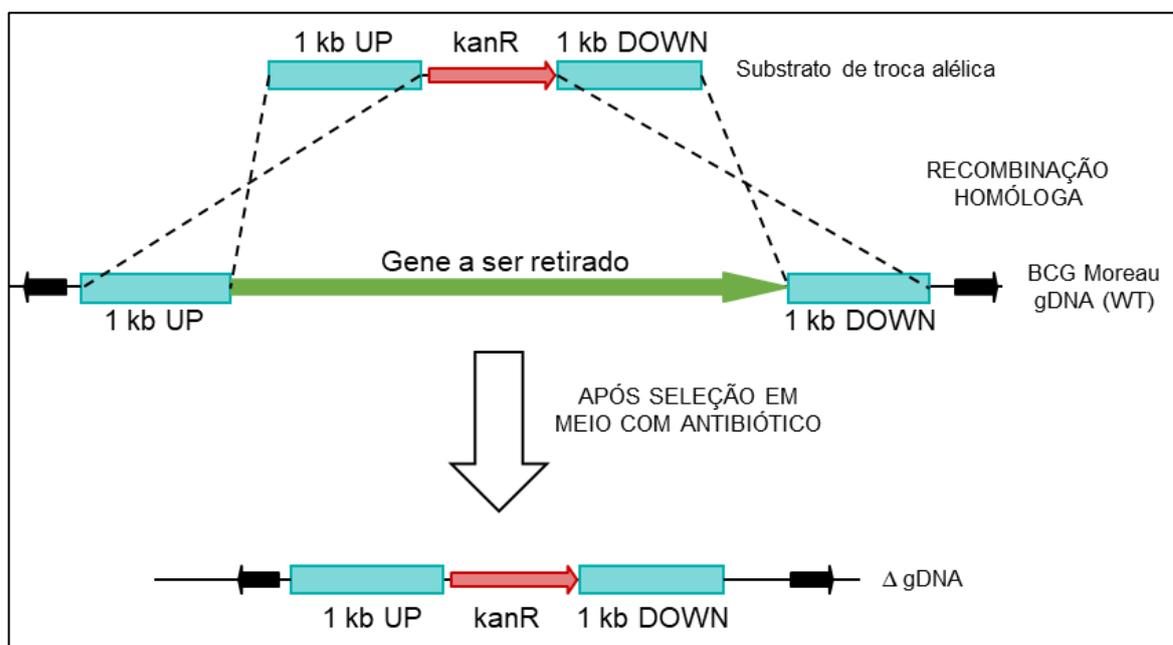


Figura 6 – Esquema mostrando a estrutura do substrato de troca alélica e como funciona o processo para obtenção dos mutantes *knockouts* após eventos de recombinação homóloga e seleção em meio com antibióticos específicos. Também está demonstrada a estrutura teórica do DNA genômico da cepa selvagem e do mutante.

Para criar o substrato, decidiu-se utilizar uma PCR de fusão, na qual se produz os três fragmentos separadamente por PCR para que depois, usando-se os iniciadores específicos, se crie o substrato completo em uma segunda reação. Para tal, os iniciadores foram criados para que os fragmentos adjacentes possuíssem 20 nucleotídeos complementares nas suas extremidades. Dessa forma, adicionou-se na extremidade 5' do iniciador 10 nucleotídeos correspondentes à sequência da extremidade do fragmento vizinho, e o mesmo foi feito para o iniciador usado para amplificar esse último fragmento.

Inicialmente amplificou-se os fragmentos a montante (1 kb *UP*) e a jusante (1 kb *DOWN*) da região gênica que se deseja retirar do genoma, além do fragmento correspondente ao gene de resistência à canamicina, *kanR*, com seu promotor. Para cada alvo utilizou-se os pares de iniciadores 1-2 (a-b) para o fragmento 1 kb *UP*, 3-4 (c-d) para *kanR* e 5-6 (e-f) para 1 kb *DOWN*, mostrados na Tabela 10.

Tabela 10 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para construção do substrato de troca alélica usado na metodologia do *recombineering* e transdução especializada. A sequência sublinhada indica aquela que é homóloga ao fragmento que se deseja amplificar; em negrito tem-se aquelas que foram adicionadas à extremidade 5' do iniciador; cores indicam homologia à sequência da extremidade do fragmento "vizinho".

Nome	Sequência (5'-3')	Fragmento
Dod1	<u>AGGCTTTGTCGGCATCTACC</u>	Dod-UP
Dod2	ATTGTT CATG CGATAACTGA GGTGCATCATT	
Dod3	TCAGTTATCG CATGAACAATAAACTGTCTGC	Dod-kanR
Dod4	GGGACACGA CATGAATTAAATTCTTAGAAAACTC	
Dod5	TTAATTCATG <u>TCGTGTC</u> CCCTCACATTCTT	Dod-DOWN
Dod6	<u>AACCAGTAATCTGCCACAGAC</u>	
Dod7	AACTTACTTCTGACAACGAT <u>CGCAAGCGTGGTTACCAGC</u>	DodAES-flanqueado com <i>ampR</i>
Dod8	TTAGCTCCTTCGGTCCTCCGCAATCGAAAGTTCACGCTCC	
Frd1	<u>GGTGGACCTTGCATCAGATG</u>	Frd-UP
Frd2	ATTGTT CATG GGTTCACGCT TCGTGATCGC	
Frd3	AGCGTGAACC CATGAACAATAAACTGTCTGCT	Frd-kanR
Frd4	CGTACCGTGC CATGAATTAAATTCTTAGAAAACTC	
Frd5	TTAATTCATG <u>GCACGGTACGGTACGGACC</u>	Frd-DOWN
Frd6	<u>TGTGGCATCCACGTCCAGAT</u>	
Frd7	AACTTACTTCTGACAACGAT <u>GCGTGGTGAGTGTCTACGAC</u>	FrdAES-flanqueado com <i>ampR</i>
Frd8	TTAGCTCCTTCGGTCCTCCGTGATCGTTGCCACGGTCCG	
73a	<u>TTGGATAACAAAGGCTGAACAT</u>	71/2/3-UP
73b	ATTGTT CATG TGGTATTCCT CCAGGTCTTTC	
73c	AGGAATACCA CATGAACAATAAACTGTCTGC	71/2/3-kanR
73d	GCAGCAACTG CATGAATTAAATTCTTAGAAAACTC	
73e	TTAATTCATG <u>CAGTTGCTGCACTTTAGACG</u>	71/2/3-DOWN
73f	<u>TCCGCAGACCCTAATACAC</u>	
73g	AACTTACTTCTGACAACGAT <u>TGGCTTGATCTCACAAGCGT</u>	71/2/3AES-flanqueado com <i>ampR</i>
73h	TTAGCTCCTTCGGTCCTCCGCGACAACACACCTGTCGTCCG	

Utilizou-se como molde o DNA genômico de BCG Moreau e para amplificação por PCR usou-se a enzima *PrimeSTAR GXL DNA polymerase* (Takara) na ciclagem descrita na Tabela 11. Para as amplificações feitas para a criação de todos os substratos de troca alélica e dos plasmídeos de complementação usou-se essa enzima de alta fidelidade. Para todas outras PCRs feitas, usou-se a *GoTaq DNA polymerase*, da Promega.

Tabela 11 – Ciclagem utilizada nas reações de PCR realizadas com a enzima PrimeSTAR GXL.

Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
98	30 seg	1
98	10 seg	30
68	30 seg/kb	
4	∞	1

Após a confirmação da amplificação, purificou-se os produtos de PCR, dosou-se em equipamento NanoDrop e misturou-se, no caso dos substratos para a dodecina e o complexo fumarato redutase, os fragmentos *UP*, *DOWN* e *kanR* em uma solução de 10 ng/μL de cada. Usando essa mistura como molde, amplificou-se todo o substrato (~3 kb) utilizando-se os iniciadores 7-8.

No caso do operon *rv1371/2/3*, preparou-se 2 misturas (10 ng/μL de cada fragmento): *UP* + *kanR* e *DOWN* + *kanR*. Para a primeira mistura, amplificou-se utilizando os iniciadores a-d, e para a segunda os oligonucleotídeos c-f, ambos fornecendo produtos de cerca de 2 kb. Após a confirmação da amplificação e purificação dos produtos, preparou-se uma nova mistura com a mesma concentração de fragmentos, só que sendo *UP-kanR* e *DOWN-kanR*. Essa mistura foi usada como molde para amplificar o substrato completo (~3 kb), usando-se os iniciadores g-h.

Para facilitar a produção do micobacteriófago necessário para o protocolo de transdução especializada, decidiu-se clonar o substrato completo no meio do gene de resistência à ampicilina (*ampR*) presente no plasmídeo pUC18. Dessa forma, os pares de iniciadores 7-8 e g-h possuem em suas extremidades 20 nucleotídeos homólogos às extremidades do pUC18 digerido com PvuI.

Logo, após a digestão do plasmídeo pWM370 (uma versão do pUC18 modificado para não ter o gene *lacZ*) seguindo as condições descritas pelo fabricante, procedeu-se à clonagem usando o kit *In-Fusion HD Cloning* (Takara), sem a necessidade de ligase. Cerca de 1-2 μL da reação foi usada para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* cepa DH5α, preparadas segundo protocolo já descrito na literatura (CHUNG, NIEMELA e MILLER, 1989).

Após cultivo em meio seletivo com canamicina (40 μg/mL), expandiu-se colônias isoladas e extraiu-se os plasmídeos, que foram enviados para sequenciamento pela empresa Eurofins, seguindo protocolos próprios, com os iniciadores descritos na Tabela 12.

Tabela 12 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento e confirmação da identidade das sequências dos clones portando os substratos de troca alélica.

Nome	Sequência (5´-3´)
Ap1	CGGTTCCCAACGATCAAGG
Ap2	GATGGCATGACAGTAAGAGAA
KmF	GCCATCCTATGGAACTGCC
KmR	GCCTAGAGCAAGACGTTTCC

3.9.2. Transformação de *M. bovis* BCG Moreau com o substrato de troca alélica (*recombineering*) e seleção/caracterização dos clones

Amplificou-se o substrato completo a partir dos plasmídeos com sequência com 100% de identidade ao esperado, usando-se os iniciadores 7-8 ou g-h. O produto foi purificado e dosado.

Cultivou-se a cepa BCG Moreau que contém o plasmídeo pJV53H (contendo as recombinases gp60 e gp61 do micobacteriófago Che9c sob controle do promotor do operon da amidase) em meio com higromicina B (50 µg/mL) até a $DO_{600nm} \sim 0,4-0,6$. Nesse ponto, procedeu-se à indução da expressão das recombinases adicionando acetamida na concentração final de 0,02% (p/v) e incubando-se por 24 h.

Após esse período, preparou-se células eletrocompetentes, segundo o protocolo padrão. Procedeu-se então a transformação por eletroporação das células induzidas com 150 ng do substrato de troca alélica. Incubou-se as células em meio líquido sem antibiótico por 24 h, seguido de cultivo em meio sólido com canamicina (40 µg/mL).

Após cerca de 3-6 semanas, dependendo do clone, expandiu-se colônias isoladas em meio líquido, extraiu-se DNA genômico de cada e usou-se o mesmo como molde na PCR para confirmar a estrutura genética presente nos clones mutantes. Para tal, utilizaram-se os pares de iniciadores descritos na Tabela 13. Usou-se DNA genômico de BCG Moreau selvagem como controle negativo.

Tabela 13 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a confirmação da identidade dos clones de mutantes (*knockout*) de *M. bovis* BCG Moreau obtidos após o cultivo em meio seletivo.

Nome	Sequência (5'-3')		Tamanho (pb)
Frd9	AAAGACATGGAATTCGTCCAAT	WT	424
Frd10	CGTTGATATCGGTGTGAACG		
73i	ATGAACGTCTCAGCTGAGAG		514
73j	AATTGACCACGACACGTGATA		
73a/KmR		$\Delta rv1371/2/3$	1088
73f/KmF			1111
Frd1/KmR		Δfrd	1175
Frd6/KmF			1177

Após a confirmação da identidade genética dos mutantes, eles foram curados do plasmídeo pJV53K através de dois cultivos sequenciais em meio líquido sem seleção com antibiótico. Após esse período, confirmou-se a sensibilidade dos clones à higromicina através de cultivo pareado em meio sólido contendo canamicina e higromicina.

3.9.3. Transdução especializada com *M. bovis* BCG Moreau

Inseriu-se o substrato de troca alélica no genoma do micobacteriófago termosensível phAE87 através de recombinação homóloga na sequência do gene *ampR* presente no DNA viral. Para tal, amplificou-se o substrato a partir dos plasmídeos selecionados na seção 3.9.1., usando o par de iniciadores descritos na Tabela 14, adicionando a cada extremidade do produto de PCR cerca de 500 pb de sequência homóloga a *ampR*.

Tabela 14 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar o substrato de troca alélica com extremidades homólogas a partes da sequência do gene *ampR*.

Nome	Sequência (5'-3')
Amp3	GCGTTTAAACGTCAGGTGGCACTTTTCG
Amp4	GCGTTTAAACGGGATTTTGGTCATGAGATTATC

Para realizar a recombinação homóloga utilizou-se a cepa de *E. coli* DY380, que contém o sistema Red de recombinação do profago λ (recombinases *gam*, *bet* e *exo*) inserido no seu genoma. Esse sistema está sob controle de um repressor termosensível (SHARAN, *et al.*, 2009).

A cepa contendo o fago foi incubada a 30 °C em meio com ampicilina (200 µg/mL) até início da fase logarítmica, quando se incubou a cultura a 42 °C por 15 min para induzir o sistema Red. Após esse período, preparou-se células eletrocompetentes que foram transformadas com 100 ng do substrato. Após 2 h de incubação a 30 °C, inoculou-se em meio sólido com canamicina (40 µg/mL) e incubou-se na mesma temperatura por cerca de 2 dias.

Colônias isoladas foram expandidas, o DNA viral foi extraído e a inserção do substrato foi confirmada por reação de digestão com a enzima de restrição *PacI*.

O DNA viral selecionado foi transformado (~100 ng) por eletroporação em células eletrocompetentes de *M. smegmatis* mc²155, que foi posteriormente incubada a 30 °C por 1 h. Após esse período, o volume foi misturado com *soft* ágar suplementado com CaCl₂ (2 mM) e glicose (0,5% p/v), e inoculado sobre LB sólido também suplementado com os aditivos descritos. As placas foram incubadas a 30 °C por cerca de 2 dias, até observar-se a formação de placas de lise.

Tabela 15 – Composição do *soft* ágar utilizado.

LB powder (Merck)	5 g
Agar-Agar	1,4 g
H ₂ O Milli-Q	q.s.p. 200 mL

Extraiu-se as partículas virais adicionando-se tampão para micobacteriófagos (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM CaCl₂) sobre a placa e incubando-se a 4 °C por 2 h. A suspensão viral foi filtrada com filtro de 0,2 µm de modo a retirar restos bacterianos e do meio de cultura, e o título da amostra final foi mensurado a partir de ensaios de infecção em *M. smegmatis* mc²155 com diferentes diluições da suspensão, com contagem do número de placas de lise observadas após o cultivo em temperatura permissiva (30 °C).

Com suspensão de fagos com título entre 10⁸ e 10⁹, procedeu-se o protocolo de transdução especializada com células de BCG Moreau. Para tal, culturas da bactéria com DO_{600nm} entre 0,4-0,6 foram centrifugadas e lavadas três vezes com tampão para micobacteriófagos aquecido a 37 °C, seguido de incubação com 1 mL da suspensão viral a 37 °C por 3 h.

Após esse período, recuperou-se as células e essas foram incubadas em meio líquido sem antibiótico por 24 h a 37 °C, seguido de cultivo em meio sólido com canamicina (40 µg/mL) na mesma temperatura.

3.10. Complementação dos mutantes e da cepa selvagem

Para complementar as cepas utilizou-se como base o vetor integrativo pMV361 (STOVER, *et al.*, 1991). Para a cepa selvagem utilizou-se o plasmídeo que continha gene de resistência à canamicina (pMV361K) e para os mutantes usou-se aquele com gene de resistência à higromicina (pMV361H). Para todos os casos de complementação, usou-se o DNA genômico de *M. tb* cepa H37Rv e BCG Moreau para amplificar os alelos correspondentes.

Para criar o plasmídeo de complementação da cepa selvagem contendo os genes do operon da fumarato redutase (pMV361K_frd) amplificou-se todos os genes do operon mais 1 kb a montante do códon de início de tradução de *frdA* com os iniciadores Frd11 e Frd12 (Tabela 16). O plasmídeo pMV361K foi digerido com as enzimas XbaI e NheI (retirando o promotor pBlaF*) e o produto da PCR com SpeI (compatível com as enzimas usadas para digerir o vetor). Ambos fragmentos foram ligados, usados para transformar *E. coli* DH5α, e colônias isoladas em meio contendo canamicina (40 µg/mL) tiveram seu DNA plasmidial extraídos e tiveram a sequência confirmada por sequenciamento usando os iniciadores descritos na Tabela 17.

Após a confirmação, criou-se o plasmídeo de complementação contendo o gene de resistência à higromicina (pMV361H_frd). Para tal, digeriu-se inicialmente pMV361K_frd com SspI. Para obter o gene *hygR*, digeriu-se o plasmídeo pUC Hygro com a enzima PstI, seguido de criação de extremidades cegas através da ação exonucleásica 5´-3´ da enzima Klenow. Ambos fragmentos foram ligados, usados para transformar *E. coli* DH5α, e colônias isoladas em meio contendo higromicina (150 µg/mL) tiveram seu DNA plasmidial extraídos.

Para criar o plasmídeo de complementação contendo os genes do operon *rv1371/2/3* (pMV361K_71/2/3) amplificou-se somente os genes do operon com os iniciadores 73l e 73m (Tabela 16). Os plasmídeos pMV361K, pMV361H e o produto da PCR foram digeridos com as enzimas NdeI e HindIII (mantendo e utilizando o promotor pBlaF* dos plasmídeos para expressar o operon em questão). O inserto e o plasmídeo digeridos foram ligados, usados para transformar *E. coli* DH5α, e colônias

isoladas em meio contendo canamicina (40 µg/mL; para pMV361K_71/2/3) ou higromicina (150 µg/mL; pMV361H_71/2/3) tiveram seu DNA plasmidial extraídos e tiveram a sequência confirmada por sequenciamento usando os iniciadores pJET1.2 *for* e *rev* descritos na Tabela 17.

Tabela 16 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a construção dos plasmídeos (baseados em pMV361K ou H) de complementação dos mutantes e da cepa selvagem. Mostra-se o sítio de restrição (em destaque na sequência) para as enzimas indicadas.

Nome	Sequência (5´-3´)	Enzima de restrição
Frd11	TTT <u>ACTAGT</u> CGTGGTGAGTGTCTACGACG	SpeI
Frd12	TTT <u>ACTAGT</u> ACAGGTCCGTACCGTACCGT	SpeI
73l	AA <u>CATATG</u> ACAAACGACCTCCCAGACGT	NdeI
73m	TTT <u>AAGCTT</u> GCGACTGAACCTCAGTTGGC	HindIII

Tabela 17 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento e confirmação da identidade das sequências usadas para a confecção dos plasmídeos de complementação.

Nome	Sequência (5´-3´)
pJET1.2 <i>for</i>	C G A C T C A C T A T A G G G A G A G C G G C
pJET1.2 <i>rev</i>	A A G A A C A T C G A T T T T C C A T G G C A G
Frd13	A C A T C G A G C G C G A C G A C G A A G
Frd14	C C G C T A C C T C C A G G A T T A C G
Frd15	T C G A C G C C T T T C G G A C A A G C

Cerca de 100 ng do plasmídeo específico foi usado para transformar células eletrocompetentes correspondentes.

3.11. Criação do mutante condicional para o gene da dodecina em *M. bovis* BCG Moreau

Procedeu-se à criação do substrato de troca alélica de forma similar ao descrito na seção 3.9.1., usando-se os iniciadores descritos na Tabela 18. Para tal, inseriu-se o cassete de *knockdown* condicional (TEXIER, *et al.*, 2018) antes do códon de início do gene da dodecina de BCG Moreau, de modo a trocar o promotor natural desse gene por um promotor regulado por TetR. A estrutura genética almejada para esse mutante está esquematizada na Figura 7.

Tabela 18 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para construção do substrato de troca alélica usado na criação do mutante condicional para o gene da dodecina. A sequência sublinhada indica aquela que é homóloga ao fragmento que se deseja amplificar; em negrito tem-se aquelas que foram adicionadas à extremidade 5' do iniciador; cores indicam homologia à sequência da extremidade do fragmento "vizinho". A tríade em destaque corresponde ao códon iniciador mutado do gene da dodecina em *M. bovis* BCG Moreau.

Nome	Sequência (5'-3')	Fragmento
cKD1	<u>GCAATCGAAAGTTCACGCTC</u>	cKD-UP
cKD2	<u>TTCGTTTTATCGTGTCCCCTCACATTCTTT</u>	
cKD3	<u>AGGGGACACGATAAAACGAAAGGCCAGTCT</u>	cKD-cassette(<i>hygR</i>)
cKD4	<u>GATTGCTCGTGGTGAATCCTCCTGAGGTG</u>	
cKD5	<u>AGGATTCACCACGAGCAATCACACCTACCG</u>	cKD-DOWN
cKD6	<u>GGAAGCTTAGGTGTGGTTCC</u>	

O substrato completo foi clonado em vetor pJET e colônias isoladas após cultivo em meio contendo higromicina (150 µg/mL) foram usadas para extração de DNA plasmidial, que foi sequenciado usando os iniciadores pJET1.2 *for* e *rev* descritos na Tabela 17. Após a confirmação da sequência, amplificou-se todo o substrato com os iniciadores cKD1-6 e usou-se 100 ng do mesmo para transformar células eletrocompetentes de BCG Moreau contendo o plasmídeo pJV53K (após a indução com acetamida, como descrito na seção 3.9.2.). A partir desse momento, todos os cultivos possuíam anidrotetraciclina (ATC, repressor de TetR) na concentração final de 250 ng/mL. Por conseguinte, todos os cultivos e manipulações eram realizadas protegidos da luz. Após 24 h de cultivo em meio líquido sem antibiótico, cultivou-se em meio sólido contendo higromicina (50 µg/mL).

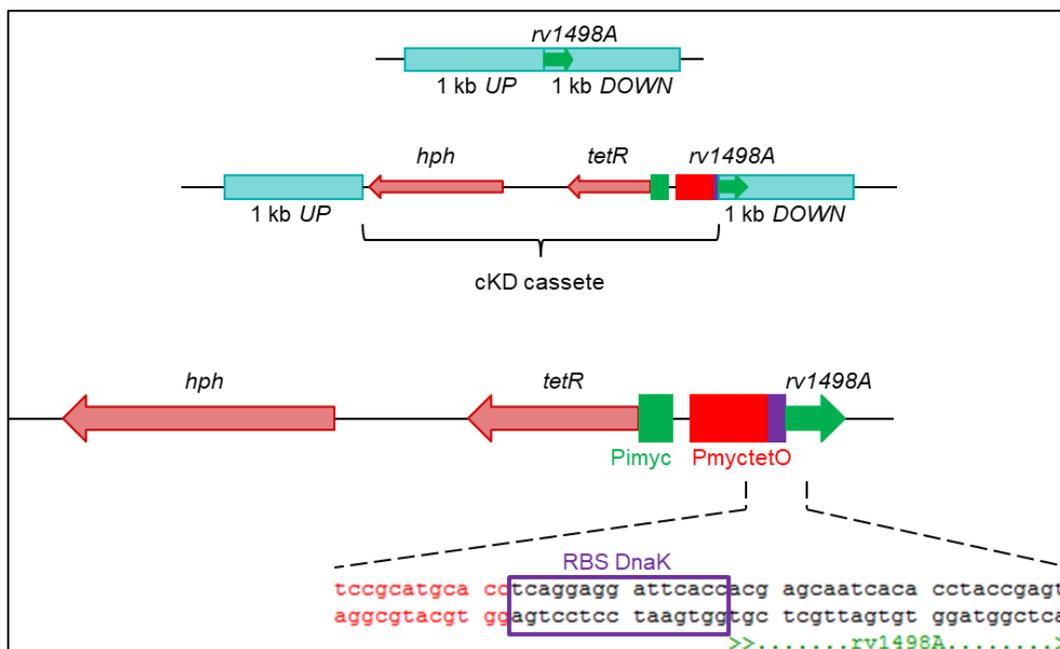


Figura 7 – Estrutura genética almejada para os mutantes condicionais para o gene da dodecina. A seta em verde corresponde ao gene da dodecina, que terá seu promotor trocado por aquele mostrado em vermelho (PmyctetO), regulado pelo produto gênico de *tetR*, produzido constitutivamente através do promotor Pimyc. Nesse sistema, utiliza-se o sítio de ligação ribossomal presente no gene *dnaK* (RBS DnaK) e seleciona-se os clones em meio seletivo contendo higromicina (*hph*).

Colônias isoladas foram usadas para extração de DNA genômico e este foi usado como molde na PCR para confirmar a estrutura genética nos mutantes. Para tal, utilizaram-se os pares de iniciadores descritos na Tabela 19. Usou-se DNA genômico de BCG Moreau selvagem como controle negativo.

Tabela 19 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a confirmação da identidade dos clones de mutantes condicionais para o gene da dodecina obtidos após o plaqueamento em meio seletivo.

Nome	Sequência (5'-3')		Tamanho (pb)
cKD7	ACAGCACGCTACCTGTGAC	WT	616
cKD8	GCGTCAGGATGTTCTGGAA		
cKD9	TAAACGTGTATGTGGTCGTT	cKD+	1222
cKD10	AACTGGCGCAGTTCCTCTGG		
cKD11	ATGAGCACGATCCGCATGCA		1157
cKD12	CTAATCTGCCCGCCTAATCG		

3.12. Análise do crescimento de cepas mutantes e complementadas em meio axênico

Para análise de crescimento de BCG Moreau e seus mutantes derivados em meio axênico fez-se uma diluição de um pré-cultivo saturado para obter uma cultura na $DO_{600nm} \sim 0,05$. O experimento foi realizado em triplicata e a medição do crescimento foi feita a partir de leituras de absorbância a 600 nm. Quando necessário, o pré-cultivo era realizado na presença do antibiótico específico, mas o cultivo não apresentava seleção.

3.13. Análise lipídica

Para as análises lipídicas as bactérias foram crescidas em meio líquido, como descrito na seção 3.2., mas omitindo-se do meio o Tween 80. Incubou-se 200 mL de cada cultivo a 37 °C, sem agitação, até saturação (4-6 semanas).

3.13.1. Extração total de lipídeos e análise por cromatografia em camada delgada (TLC)

Após o cultivo, as bactérias foram recuperadas por centrifugação e ressuspensas em 120 mL de mistura metanol/clorofórmio (2:1). Extraíu-se os lipídeos mais polares sob essas condições por 2 dias, à temperatura ambiente. Após esse período, recuperou-se o primeiro extrato e evaporou-se o solvente em sistema rotavapor. Ao sedimento bacteriano restante adicionou-se 60 mL de mistura metanol/clorofórmio (1:2) para extração de lipídeos mais hidrofóbicos. Incubou-se à temperatura ambiente por 1 dia e depois coletou-se o segundo extrato no frasco contendo os lipídeos do primeiro extrato e evaporou-se o solvente.

Lavou-se os lipídeos extraídos três vezes com água Mili-Q, seguido de centrifugação a 1.000 x g, por 20 min a 5 °C. A cada lavagem retirava-se a fase aquosa (superior) juntamente com a interfase de proteínas. Depois secou-se a fase orgânica, pesou-se os tubos e calculou-se a massa de lipídeos obtida. Posteriormente, analisou-se a integridade e diversidade dos lipídeos através de cromatografia em camada delgada (do inglês, *Thin Layer Chromatography*, TLC).

As amostras de lipídeos foram ressuspensas em volume de clorofórmio necessário para que todas tivessem a mesma concentração (m/v) e depois foram

aplicadas em placa de sílica (*Pre-coated TLC-plates* DURASIL-25, *layer*: 0,25 mm/sílica gel 60, Macherey-Nagel). As placas foram desenvolvidas em sistema solvente composto de uma mistura de clorofórmio/metanol/água (65:25:4), e as bandas foram reveladas após incubação com solução de CuSO₄ em H₃PO₄ e metanol e aquecidas a 100 °C.

3.13.2. Enriquecimento da amostra em lipídeos negativamente carregados (QMA)

De modo a enriquecer a amostra em lipídeos carregados negativamente, realizou-se uma cromatografia em coluna pré-empacotada trocadora aniônica (*Sep-Pak Accell Plus QMA Plus Short Cartridge*, 360 mg sorbent per cartridge, 37-55 μm particle size). Para tal usou-se 10 mg de lipídeos totais em um volume final de 200 μL e procedeu-se com o protocolo padrão descrito pelo fabricante, eluindo os lipídeos em diferentes frações: 100% de clorofórmio; 10% de metanol em clorofórmio; 50% de metanol em clorofórmio. A fração desejada foi eluída com 195 mM de acetato de amônio em 50% de metanol/clorofórmio. Depois de seca, a amostra foi analisada por TLC como previamente descrito.

3.14. Complementação de *M. smegmatis* mc²155 com alelos de dodecina

3.14.1. Criação e caracterização dos clones

Inicialmente construiu-se os plasmídeos contendo a sequência do gene da dodecina de *M.tb* cepa H37Rv e BCG Moreau mais 200 pb a montante do códon de início, provavelmente contendo o promotor nativo desse gene. Previamente, analisou-se a sequência não-codificante a procura de sequências típicas de sítio de ligação de reguladores transcricionais, utilizando a ferramenta *Virtual Footprint* (<http://www.prodoric.de/vfp/>).

Utilizou-se o plasmídeo pUS972 (MEDEIROS, *et al.*, 2002), que apresenta origem de replicação para *E. coli* e micobactérias, além do gene que confere resistência à canamicina. Amplificou-se os alelos usando a enzima *Invitrogen Platinum SuperFi DNA polymerase* e o par de iniciadores descritos na Tabela 20.

Tabela 20 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a construção do plasmídeo, baseado em pUS972, para expressão heteróloga do gene da dodecina de *M. bovis* BCG Moreau e *M. tuberculosis* H37Rv em *M. smegmatis* mc²155. Mostra-se o sítio de restrição para as enzimas indicadas e a sequência codificante para a cauda de 6 histinas (ambas em destaque).

Nome	Sequência (5´-3´)	Enzima de restrição
Dod_pUS972_for	AAATCTAGATCGAAGGTCGCAATCCCGACG	XbaI
Dod_pUS972_rev	TTTAAGCTTTCAGTGATGGTGATGGTGATG GGAATCCTCCAGGCGGAA	HindIII

Digeriu-se tanto o produto de PCR quanto o plasmídeo pUS972 com as enzimas XbaI e HindIII. Após ligação e transformação de *E. coli* cepa TOP10, colônias isoladas obtidas após cultivo em meio com canamicina foram expandidas e o DNA plasmidial extraído para confirmação da identidade por PCR (para diferenciar o plasmídeo vazio dos demais) e sequenciamento (para diferenciar os plasmídeos com os genes das dodecinas) usando os iniciadores descritos na Tabela 21.

Tabela 21 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento e confirmação da identidade das sequências dos plasmídeos recombinantes para expressão heteróloga do gene da dodecina de *M. bovis* BCG Moreau e *M. tuberculosis* H37Rv em *M. smegmatis* mc²155.

Nome	Sequência (5´-3´)
Seq_pUS_for	TGGGCTGGGAATTCGAGCTC
Seq_pUS_rev	ATGGCTCATAACACCCCTTG

Os plasmídeos selecionados e o plasmídeo “vazio” (pUS972) foram usados para transformar células eletrocompetentes de *M. smegmatis* mc²155, que foram cultivadas em meio sólido com canamicina. Colônias isoladas foram expandidas em meio líquido com antibiótico e usadas nos experimentos seguintes. Além disso, proteínas totais de culturas saturadas foram extraídas e usadas em experimento de *western blotting* usando anticorpo primário α -his (1:3.000) ou α -dodecina (1:100) para confirmação da expressão da proteína recombinante.

3.14.2. Análise do crescimento em meio axênico

Para análise de crescimento dos clones de *M. smegmatis* em meio axênico fez-se uma diluição de um pré-cultivo saturado de forma ao cultivo em questão ter DO_{600nm} ~0,1. O experimento foi realizado em triplicata e a medição do crescimento foi feita a

partir de leituras de absorbância a 600nm. Quando necessário, o pré-cultivo era realizado na presença do antibiótico específico, mas o cultivo não apresentava seleção.

Proteínas totais de bactérias obtidas de cultivos de 2, 16 e 24 h foram extraídas e usadas em experimento de *western blotting* usando anticorpo primário α -dodecina (1:100) para análise do nível de expressão dessa proteína nas diferentes fases do cultivo.

3.14.3. Efeito de peróxido de hidrogênio no crescimento em meio axênico

Após 16 h de cultivo, adicionou-se 15 mM de peróxido de hidrogênio a uma cultura, mantendo uma sem adição do composto como controle. Acompanhou-se o crescimento a partir de leituras espectrofotométricas a 600nm, em triplicata, e amostras de bactérias foram coletadas para extração de proteínas totais e realização de ensaios de *western blotting* usando anticorpo primário α -dodecina (1:100) para análise do nível de expressão dessa proteína nas diferentes condições de cultivo.

3.15. Análise proteômica por espectrometria de massas

3.15.1. Extração total de proteínas e processamento por FASP

As proteínas totais de BCG Moreau e *M.tb* H37Rv na fase LOG e estacionária coletadas como previamente descrito foram extraídas com um protocolo adaptado do exposto na seção 3.7.1. O tampão de lise de micobactérias usado nesse caso possuía SDS e DTT nas concentrações finais de 1% (p/v) e 50 mM, respectivamente. As proteínas totais do lisado obtido foram quantificadas pelo *kit 2D-Quantikit* (GE), usando albumina de soro bovino como padrão.

Após a dosagem, realizou-se a tripsinização das proteínas presentes na amostra utilizando a metodologia de *Filter Assisted Sample Preparation* (FASP) adaptada. Para tal, inicialmente aqueceu-se 30 μ L da amostra clarificada a 100 °C por 5 min, seguido de incubação a 25 °C por 15 min e centrifugação a 16.000 x g por 10 min.

Transferiu-se a amostra para a unidade filtrante, previamente lavada com 200 µL de água, e procedeu-se duas lavagens com 200 µL cada de solução UA (8M ureia em Tris-HCl 0,1 M pH 8,5), seguida de centrifugação a 10.000 x g.

Posteriormente, alquilou-se as proteínas adicionando 100 µL de solução de iodoacetamida 0,05 M em UA, seguido de incubação sob agitação por 15 min, 600 rpm, à temperatura ambiente no escuro. A unidade filtrante foi centrifugada a 10.000 x g por 10 min, seguido de três lavagens com 100 µL cada de UA e três lavagens com 100 µL cada de DB (Tris-HCl 0,05 M pH 8,5).

Procedeu-se a tripsinização das proteínas presentes na unidade filtrante adicionando-se 40 µL de DB com tripsina, na proporção de 1 µg de tripsina para cada 100 µg de proteínas totais na amostra (razão enzima/proteína de 1:100). As unidades foram gentilmente agitadas antes de serem incubadas em sistema de câmara úmida a 37 °C por 12-24 h, sob agitação (500 rpm).

Após a incubação com a enzima, transferiu-se as unidades filtrantes para novos tubos coletores e centrifugou-se a 10.000 x g por 5 min. Extraiu-se mais peptídeos lavando-se o filtro duas vezes com 100 µL cada de DB, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 15 min.

A amostra com os peptídeos foi concentrada para cerca de 50 µL em sistema SpeedVac e posteriormente acidificada com solução de ácido trifluoroacético (TFA) 10% (v/v) para concentração final de TFA de 1%.

Os peptídeos acidificados foram dessalinizados com colunas preparadas em ponteiras de 10 µL com resina POROS R2, segundo as indicações do fabricante. Eluiu-se a amostra diretamente no vial do tubo de *autosampler* do espectrômetro de massas Orbitrap XL com 4 lavagens de 20 µL de TFA 0,1% em acetonitrila 70%.

Os peptídeos acidificados e dessalinizados foram secos em SpeedVac e posteriormente ressuspensos em 20 µL de solução de ácido fórmico 1%. Quantificou-se os peptídeos totais através da leitura de absorvância a 280 nm em equipamento NanoDrop.

3.15.2. Espectrometria de massas e análise de dados para identificação das proteínas

Cada amostra foi analisada em triplicata técnica em espectrômetro nanoESI LTQ XL/Orbitrap acoplado a um sistema cromatográfico Easy-nLC II (Thermo

Scientific, EUA). Inicialmente, adicionou-se às amostras 10 μL de ácido fórmico 1% (v/v), seguido de incubação em ultrassom por 10 minutos à temperatura ambiente. Para cada réplica técnica, injetou-se 2 μL (0,8 μg) de amostra em coluna *trap* (2 cm x 100 μm), empacotada com matriz Magic C18 AQ 5 μm 200 Å (Michrom Bioresources, EUA), para dessalinização e concentração prévia. Em seguida, os peptídeos foram submetidos ao fracionamento em coluna analítica (20 cm x 75 μm) empacotada com a matriz acima descrita. A separação foi realizada sob fluxo de 200 nL/min, tendo por fase móvel A uma solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) em água e por fase móvel B uma solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) em acetonitrilo. O gradiente usado para a separação dos peptídeos foi: 2-40% B em 162 minutos; 40-80% B em 4 minutos e 80% B por 2 minutos.

Os peptídeos eluídos da coluna foram diretamente introduzidos no espectrômetro para análise. À fonte nanoelectrospray aplicou-se uma voltagem de 1,9 kV, enquanto o capilar de entrada foi ajustado para 100 V e uma temperatura de 200 °C. Os espectros dos peptídeos eluídos foram adquiridos de maneira dado-dependente: primeiramente, foi feita a aquisição de um espectro MS completo de m/z 300 até 1.700 no analisador Orbitrap com resolução de 60.000; para cada espectro MS, os dez íons mais intensos foram então submetidos à fragmentação por CID (energia de colisão normalizada em 35%; sinal mínimo requerido de 10.000; janela de isolamento de 2,0 m/z ; ativação Q de 0,25 e tempo de ativação de 30 ms) e os espectros MS/MS foram adquiridos no analisador do tipo armadilha de íons (*linear trap*). Somente íons com carga ≥ 2 foram selecionados para fragmentação.

Todos os dados gerados foram analisados pelo software comercial PEAKS versão 10.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canada). Primeiramente, os dados brutos foram submetidos à função de refinamento, na qual procedeu-se à correção para massa do precursor e aos processos de *peak centroiding*, *charge deconvolution* e *deisotoping*. Para as análises posteriores, utilizou-se 10 ppm e 0,6 Da como limites de tolerância de erro para os valores da massa dos íons precursores e íons-fragmento, respectivamente. Além disso, considerou-se que a digestão enzimática foi do tipo semi-tríplica e que houve um máximo de duas clivagens perdidas pela enzima por molécula de substrato (proteína). Todos os dados foram submetidos inicialmente à busca pela ferramenta De Novo, atribuindo-se modificações fixas em cisteína (carbamidometilação) e variáveis em metionina (oxidação), glutamina (piroglutâmico), lisina (formilação) e ácidos aminados N-terminais (acetilação), sendo um máximo de

três modificações por peptídeo aceito. Em seguida, procedeu-se à busca pela ferramenta PEAKS DB, com os mesmos parâmetros acima elencados, estabelecendo-se ainda a massa do precursor como monoisotópica. Todas as buscas foram feitas contra bancos de dados do UniProt *Proteomes* (<https://www.uniprot.org/proteomes/>): UP000032723 (*Taxon identifier* 413996; *Mycobacterium tuberculosis* variant bovis BCG str. Moreau RDJ; 3.911 entradas) ou UP000001584 (*Taxon identifier* 83332; *Mycobacterium tuberculosis* (strain ATCC 25618 / H37Rv); 3.993 entradas). A taxa de falsa descoberta (FDR – *False Discovery Rate*) foi estimada através do uso de sequências *decoy*, aceitando-se apenas proteínas identificadas para uma $FDR \leq 1\%$ e com ao menos 2 peptídeos únicos.

Para realizar as análises quantitativas usou-se o parâmetro de *spectral counting*, ou seja, o número de espectros obtidos para cada identificação. De modo a se comparar amostras diferentes, usou-se o valor normalizado de *spectral counts* para cada identificação em relação ao número total de espectros da amostra. Estes experimentos foram realizados em colaboração com Richard Hemmi Valente, do Laboratório de Toxinologia, IOC, Fiocruz.

3.15.3. Reconstrução metabólica a partir das identificações proteômicas

As análises de reconstrução metabólica foram baseadas nos mapas de referência presentes no banco de dados do KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<https://www.genome.jp/kegg/>). Os números E.C. das proteínas identificadas por espectrometria de massa foram recuperados da anotação funcional do genoma de *M. bovis* BCG Moreau e *M. tuberculosis* cepa H37Rv, com base nos identificadores das sequências genômicas, usando scripts em Perl.

Todas as atividades enzimáticas diferencialmente expressas e identificadas para cada estágio (fase logarítmica e estacionária) em cada uma das bactérias foram comparadas entre si para geração dos mapas metabólicos. Foram feitas duas comparações: (i) MTB_LOG x MTB_EST; (ii) BCG_LOG x BCG_EST. A ferramenta KEGG Mapper foi utilizada para mapear as vias metabólicas do KEGG, assinalando as atividades enzimáticas obtidas nas comparações. Estes experimentos foram realizados em colaboração com Ana Carolina Ramos Guimarães, do LAGFB, IOC, Fiocruz.

3.16. Modelagem por homologia

3.16.1. Dodecina

Para a realização da modelagem dos complexos das dodecinas a estrutura cristalográfica da proteína Rv1498A de *M. tuberculosis* cepa H37Rv depositada no *protein data bank* (PDB) sob o código 3OQT foi utilizada como molde. A modelagem comparativa foi realizada utilizando o software Modeller 9.18 (FISER e SALI, 2003). Para tal, foram gerados vinte modelos para cada uma das variantes; durante a geração dos modelos foi utilizado um protocolo de otimização empregando 300 iterações de minimização de energia por gradiente conjugado com o método de *variable target function* implementado no Modeller.

Após a minimização foi utilizada a rotina de dinâmica molecular presente no modeller. Para cada modelo, a rotina de otimização foi repetida ao menos duas vezes ou até a função de densidade de probabilidade (molpdf) retornar valores maiores que 10^6 . Foram analisados os modelos com menor DOPE *score* de cada um dos complexos, e os mesmos foram validados utilizando os servidores ERRAT (COLOVOS e YEATES, 1993) e verify3D (EISENBERG, LUTHY e BOWIE, 1997).

Os modelos validados foram posteriormente utilizados para análise da energia de interação inter-cadeias, que foi realizada utilizando o servidor INTAA (GALGONEK, *et al.*, 2017), empregando o campo de forças AMBER parm99 (CHEATHAM, CIEPLAK e KOLLMAN, 1999). Foi também realizada análise da superfície eletrostática utilizando o software APBS (BAKER, *et al.*, 2001). Para isso, os prováveis estados de protonação dos complexos em pH 7,0 foram calculados utilizando o software propka (OLSSON, *et al.*, 2010), e as cargas dos átomos calculadas utilizando o software pdb2pqr (DOLINSKY, *et al.*, 2004). Estes experimentos foram realizados em colaboração com Lucas de Almeida Machado e Ana Carolina Ramos Guimarães, ambos do LAGFB, IOC, Fiocruz.

3.16.2. Fumarato redutase

O programa BLASTP (ALTSCHUL, *et al.*, 1997) foi usado para selecionar sequências de fumarato reductase com estruturas disponíveis no PDB que seriam usadas como moldes para modelagem por homologia. O complexo Quinol-Fumarato

Redutase de *E. coli* com o inibidor HQNO, FAD, oxaloacetato e centros ferro/enxofre (PDB ID: 1KF6 (IVERSON, *et al.*, 2002)) foi selecionado para ambos casos estudados.

As sequências alvo e do molde foram alinhadas usando o programa T-Coffee, no modo PSI-Coffee (TOMMASO, *et al.*, 2011). Para cada alvo (*M. tuberculosis* cepa H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau) foram criados quinhentos modelos usando a rotina padrão '*auto model*' do Modeller, com heteroátomos. Cada modelo foi criado e otimizado de maneira similar ao modelo da dodecina.

Os modelos foram avaliados usando-se os servidores DOPE e QMean, enquanto que os passos de análise pelo ERRAT e do plot de Ramachandran foram realizados com o servidor SAVES do UCLA-DOE Lab (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>). A orientação da fumarato reductase na membrana foi predita usando o *PPM server* no banco de dados da *OPM* (<https://opm.phar.umich.edu/server>). As figuras tridimensionais foram geradas através do software UCSF ChimeraX software (GODDARD, *et al.*, 2018) e Pymol.

Os mapas de interação 2-D entre os ligantes e as proteínas foram analisados usando a ferramenta *PoseView* (STIERAND e RAREY, 2009) do servidor *Proteins Plus* (<https://proteins.plus/>). Estes experimentos foram realizados em colaboração com Ernesto Raúl Caffarena e Deborah Antunes dos Santos, ambos do PROCC, Fiocruz.

3.16.3. Análises estatísticas

Os resultados numéricos foram representados como média \pm desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism 5, utilizando o teste t não-pareado. Utilizou-se para tais experimentos três replicatas experimentais independentes. O valor de significância obtido com os testes está especificado na legenda e nas figuras.

4. Resultados

4.1. Identificação de casos de pequenas mutações através da abordagem de genômica comparativa

Dentre as 3930 CDSs preditas no genoma de BCG Moreau (GOMES, *et al.*, 2011) caracterizou-se, analisando a anotação dos genomas, que 273 destas (~7 %) estão preditas possuindo pequenas mutações das classes SNP e INDEL quando comparadas com o genoma de *M.tb* cepa H37Rv. Na análise inicial utilizou-se a anotação de BCG Moreau de abril de 2011, e dos casos identificados 47 estavam em proteínas codificadas descritas como conservadas e/ou de função desconhecida. Destas, 9 já possuíam função descrita na literatura no final do ano de 2018.

Dentre os 273 casos de INDELS identificados pode-se observar na Figura 8 que a maior parte deles ocorre em genes que codificam proteínas: (1) envolvidas em processos celulares e de parede celular, (2) da família das PE/PPE, (3) hipotéticas conservadas e (4) envolvidas em metabolismo intermediário e respiração.

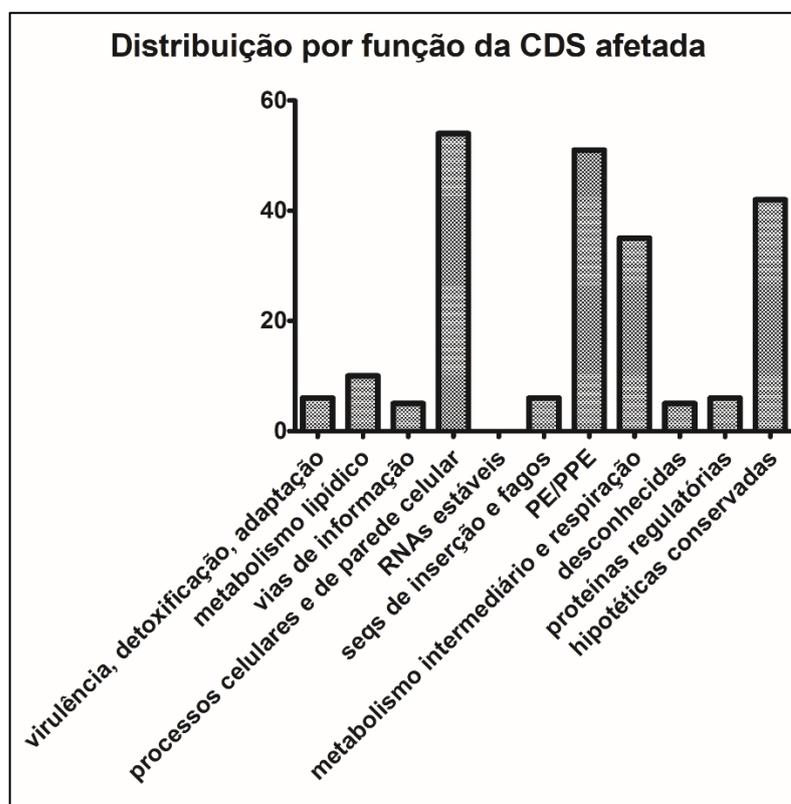


Figura 8 – Distribuição dos casos de INDELS identificados em *M. bovis* BCG Moreau comparando com *M. tuberculosis* cepa H37Rv. Tal análise foi realizada levando em consideração a classificação funcional da CDS afetada, disponível no banco de dados do TubercuList (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>).

Além disso, dentre todas essas CDS afetadas, observa-se que cerca de 4% codificam proteínas envolvidas diretamente com metabolismo lipídico.

Dos casos de INDELS identificados, 44 foram separados como promissores devido a: (1) o gene mutado ou os genes afetados por um possível desacoplamento traducional possuírem função já descrita; (2) a função do gene mutado já estar descrita na literatura como importante para a biologia do bacilo. Destes, 19 ocorrem em genes que podem estar envolvidos em caso de acoplamento traducional.

Da listagem de INDELS promissores separou-se 4 alvos para seguir o estudo de impacto funcional, devido à importância descrita na literatura dos metabolismos nos quais as proteínas codificadas estão envolvidas. São eles: Rv1371/BCG_M1398 e BCG_M1399 (pertencente ao operon *rv1371/2/3*, provavelmente envolvido em metabolismo lipídico); Rv1553 e Rv1554 /BCG_M1572 (pertencentes ao operon da fumarato redutase, envolvido no processo de respiração anaeróbica); Rv1498A/BCG_M1530c (dodecina, possivelmente envolvido no metabolismo redox e armazenamento de cofatores).

4.2. Operon *rv1371/2/3*

4.2.1. Análise *in silico* das sequências de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau e de possível impacto funcional da mutação

A anotação fornecida para cada um destes genes no genoma de *M.tb* cepa H37Rv está descrita na Tabela 22, indicando se existe ou não comprovação de experimentos para corroborá-la.

Tabela 22 – Anotação dos genes do operon *rv1371/2/3* e se essa função biológica já foi corroborada por experimentos *in vitro*.

Gene	Função predita	Experimentos <i>in vitro</i>
<i>rv1371</i>	Desaturase de ácido graxo	*
<i>rv1372</i>	Policetídeo sintase de síntese de alfa-pironas (Pks18)	(SANKARANARAYANAN, <i>et al.</i> , 2004)
<i>rv1373</i>	Glicolípídeo sulfotransferase	(RIVERA-MARRERO, <i>et al.</i> , 2002)

Analisando-se as sequências homólogas obtidas do genoma de *M.tb* H37Rv e BCG Moreau correspondente ao gene *rv1371* (Figura 9) pode-se observar que existe

uma inserção de adenina entre duas timinas sequenciais em BCG. Dessa forma, altera-se o quadro de leitura a jusante, acarretando em uma porção C-terminal não-homóloga nas proteínas codificadas. Além disso, a inserção acarreta no aparecimento de um códon de parada prematuro na sequência de BCG Moreau, tornando a proteína desse organismo menor que a contrapartida de *M.tb*.

Alinhando as sequências homólogas de alguns representantes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* pode-se observar que a mutação previamente descrita é específica da linhagem das cepas que infectam animais não-humanos preferencialmente (Figura 11).

Quando se analisa o caso de *rv1373* (Figura 10) observa-se que existe uma região homopolimérica de citosinas, de tamanho variável dependendo da bactéria analisada. Por exemplo, em *M. bovis* e BCG Moreau temos a inserção de uma citosina, enquanto em Rússia temos a inserção de duas e em Pasteur temos três. Exceto em Pasteur, as inserções causam uma mudança no quadro de leitura e um códon de parada prematuro. Já em Pasteur, a adição de uma tríade de citosinas só adiciona um aminoácido à sequência, mantendo o restante da região C-terminal homóloga à de *M.tb*.

O alinhamento das sequências homólogas obtidas de diferentes representantes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* mostra que a diversidade genética presente nessa região homopolimérica parece estar restrita à linhagem de *M. bovis*, não tendo sido encontrada diversidade nos outros representantes do complexo (Figura 11).

Em uma escala maior, pode-se observar pela análise de sintenia mostrada na Figura 12 que existe uma diversidade de organização do operon em diferentes espécies dentro do complexo. Por exemplo, em *M. marinum* existe uma duplicação de *rv1373* que aparenta ser específica desse organismo. Além disso, pode-se observar que em *M.tb* há a inserção de sequências móveis e outros genes a jusante de *rv1373*, assim como a montante de *rv1371*.

Para investigar a possibilidade de que esse operon tenha sido adquirido por transferência lateral analisou-se o conteúdo GC dessa sequência e de sua vizinhança. Como mostrado na Figura 13, não há diferença significativa entre essa região e a média do genoma de BCG Moreau (~65%).

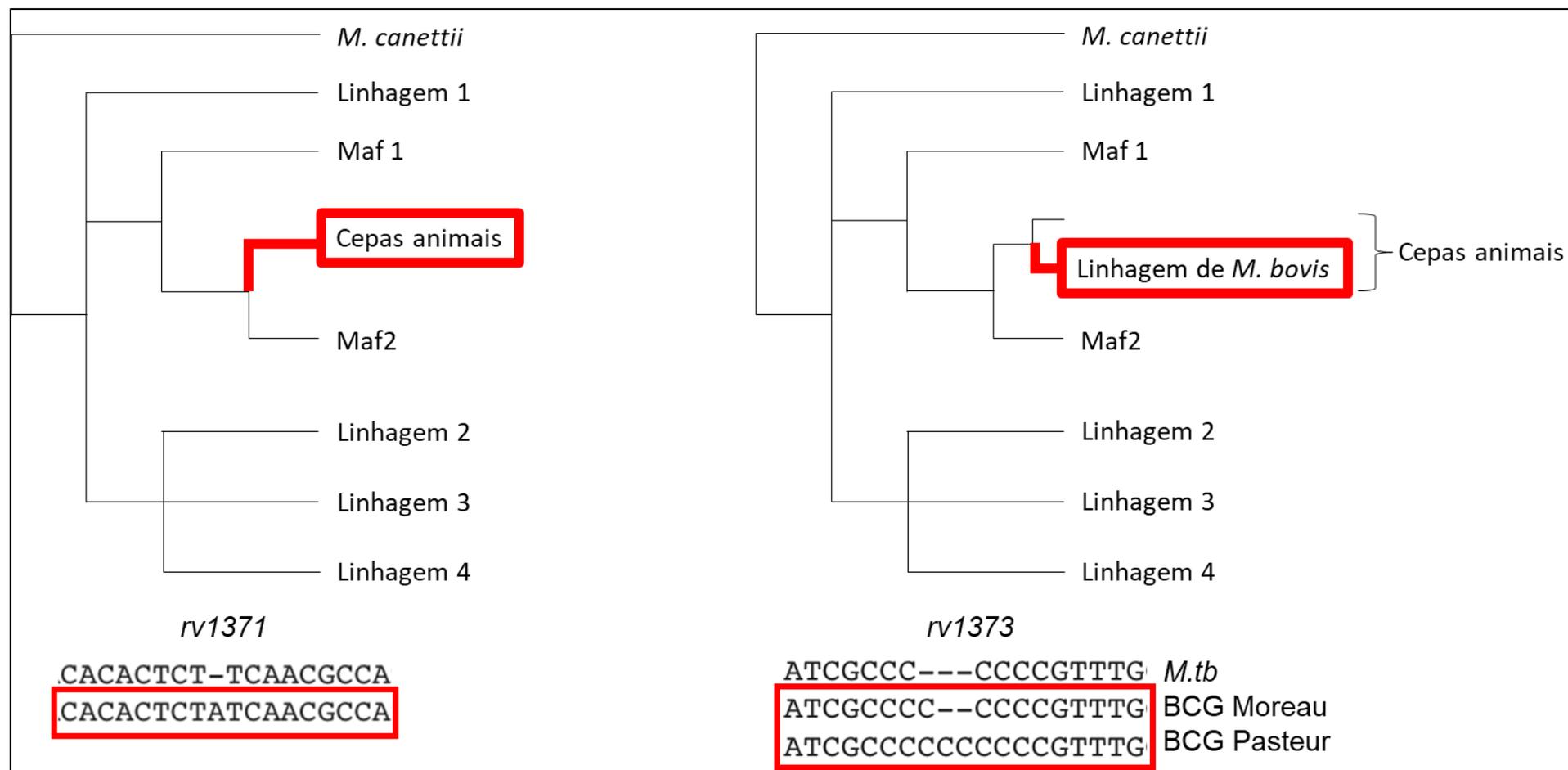


Figura 11 – Filogenia do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, mostrando o surgimento da mutação presente em *rv1371* e *rv1373* de BCG Moreau. Tal resultado foi obtido a partir do alinhamento local das seqüências homólogas a *rv1371* e *rv1373* de diferentes representantes do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, e mostra que no primeiro caso a mutação encontrada em *M. bovis* BCG Moreau é específica às linhagens do complexo ditas como cepas animais, enquanto no segundo, a mutação é restrita à linhagem de *M. bovis*. Abaixo mostra-se parte do alinhamento, focando na região com a mutação.

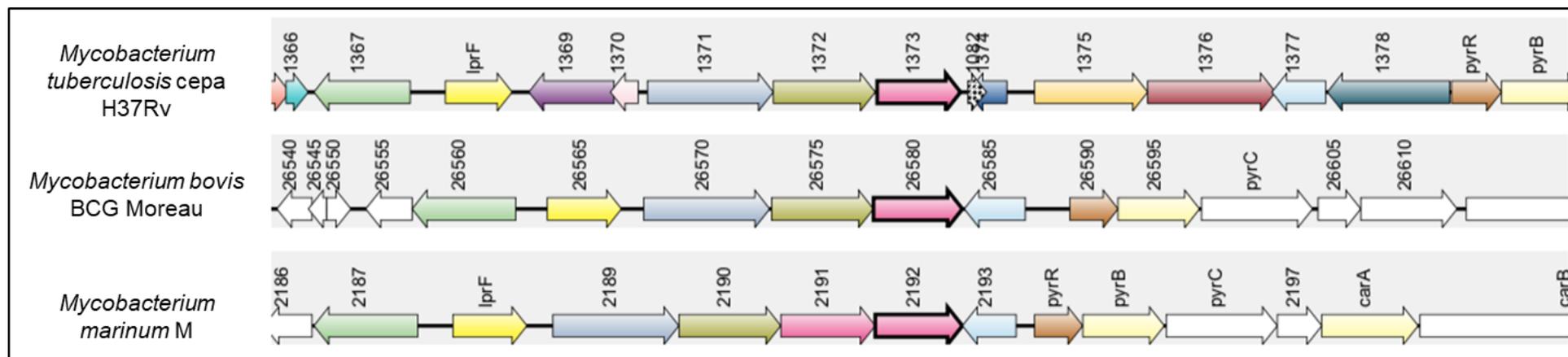


Figura 12 – Análise de sintenia do locus *rv1371/2/3* em diferentes espécies dentro do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Nesse caso, o padrão observado em *M. bovis* BCG Moreau é idêntico ao mostrado para *M. kansasii*. Observa-se a uma duplicação de *rv1373* específica em *M. marinum*, assim como a inserção de uma sequência móvel e diversos outros genes a montante e a jusante do operon em *M. tuberculosis* H37Rv.

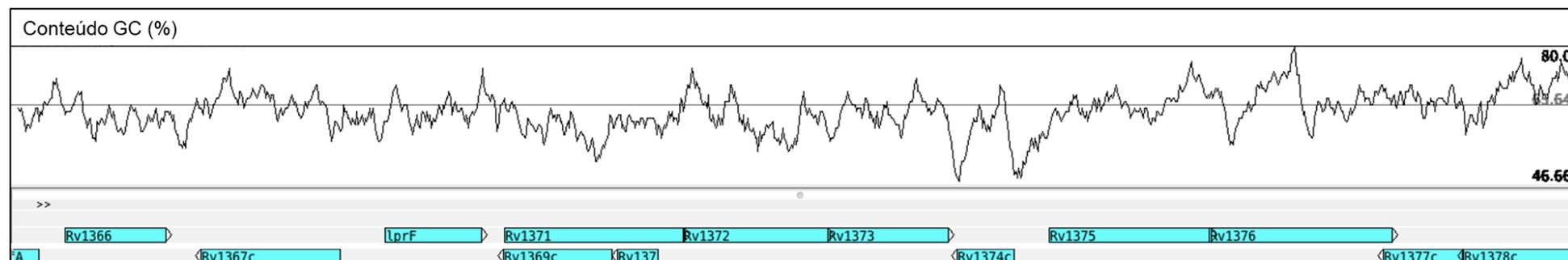


Figura 13 – Análise do conteúdo GC na região do operon *rv1371/2/3*. Os resultados mostram que não há diferenças significativas no conteúdo desses nucleotídeos na região do operon e nem em sua vizinhança em relação à média do genoma de *M. bovis* BCG Moreau (~65%).

4.2.2. Análise da transcrição dos genes estudados por RT-PCR em *M. bovis* BCG Moreau

Após ensaios de RT-PCR pode-se identificar transcritos correspondentes aos homólogos de *rv1371*, *rv1372* e *rv1373* em amostras de RNA total de BCG Moreau obtido de cultivo axênico (item 3.2). Além disso, usando iniciadores específicos para amplificar as regiões intergênicas pode-se observar que os genes analisados estão em um transcrito policistrônico, corroborando a ideia de que estes compõem um operon. Os resultados não apresentam variação de acordo com a fase de cultivo do microrganismo.

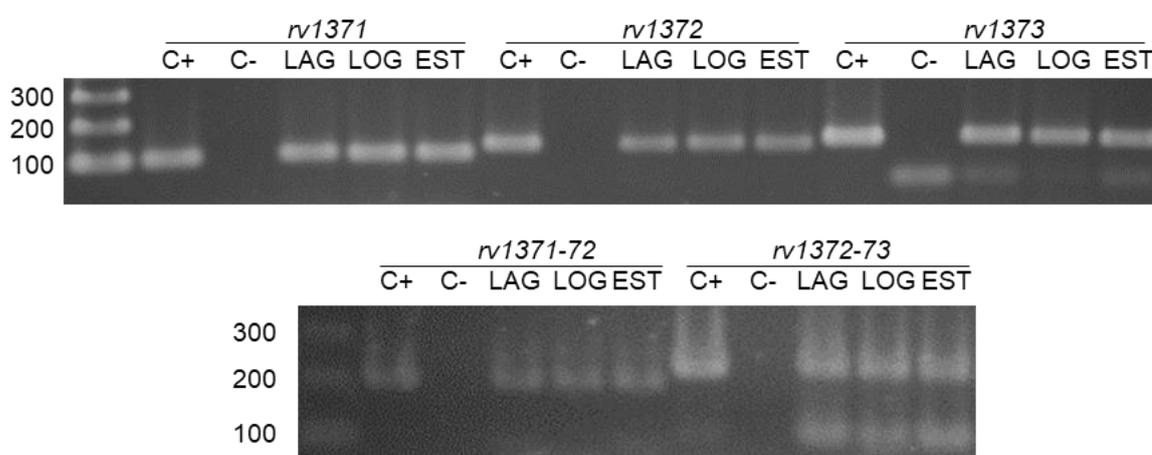


Figura 14 - Análise da transcrição e de co-transcrição dos genes do operon *rv1371/2/3* nas fases lag, log e estacionária (EST) em *M. bovis* BCG Moreau. Para cada reação realizou-se um controle positivo (C+, com DNA genômico) e um negativo (C-, usando RNA sem tratamento com a transcriptase reversa). Cada gel é representativo dos resultados de uma triplicata biológica (n=3).

4.2.3. Produção das proteínas recombinantes (Rv1371 e Rv1373 de *M. bovis* BCG Moreau) e de soro policlonal

Após realizados os procedimentos descritos para a produção das proteínas recombinantes conseguiu-se obter com sucesso Rv1371 e Rv1373 de BCG Moreau, ambas na fração de corpos de inclusão. Além disso, confirmou-se a presença da cauda de histidina C-terminal através de ensaios de *western blotting* e com isso pode-se purificar a proteína e usá-la para produção do soro policlonal (Figuras 15 e 16).

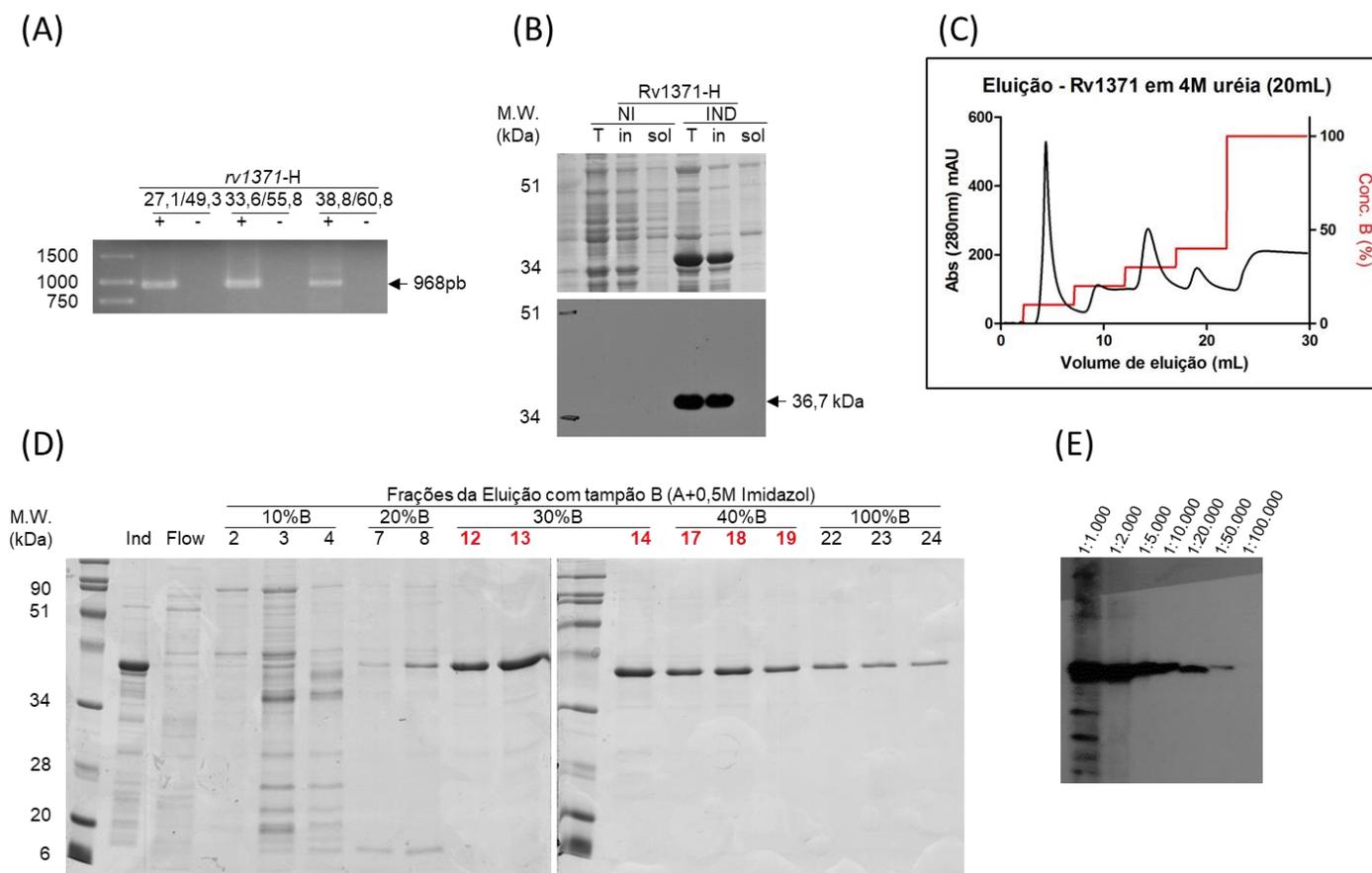


Figura 15 – Resultados gerais da clonagem, expressão e purificação de Rv1371 de BCG Moreau. (A) Padronização da PCR para o gene *rv1371*, mostrando resultado positivo para as três combinações de temperatura de anelamento usadas, sendo C– o controle negativo sem DNA; (B) extrato proteico de culturas induzidas (IND) ou não (NI) a expressar a proteína recombinante resolvidas por SDS-PAGE 15%, analisando-se a fração de proteínas totais (T), insolúveis (in) e solúveis (sol) após a lise e clarificação, e *western blotting* com anticorpo primário anti-6His de proteínas fracionadas em gel equivalente; (C) cromatograma obtido durante a purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade por metais imobilizados, mostrando a absorbância a 280 nm (curva preta) e a concentração teórica de imidazol no tampão de eluição (tampão B; curva vermelha); (D) proteínas resolvidas em géis SDS-PAGE 15%, mostrando a amostra aplicada na coluna (Ind), proteínas não-ligadas (Flow) e as frações da eluição com o tampão B nas suas diferentes concentrações; (E) titulação do soro policlonal obtido contra a proteína recombinante purificada (*pool* das frações em destaque em vermelho em D).

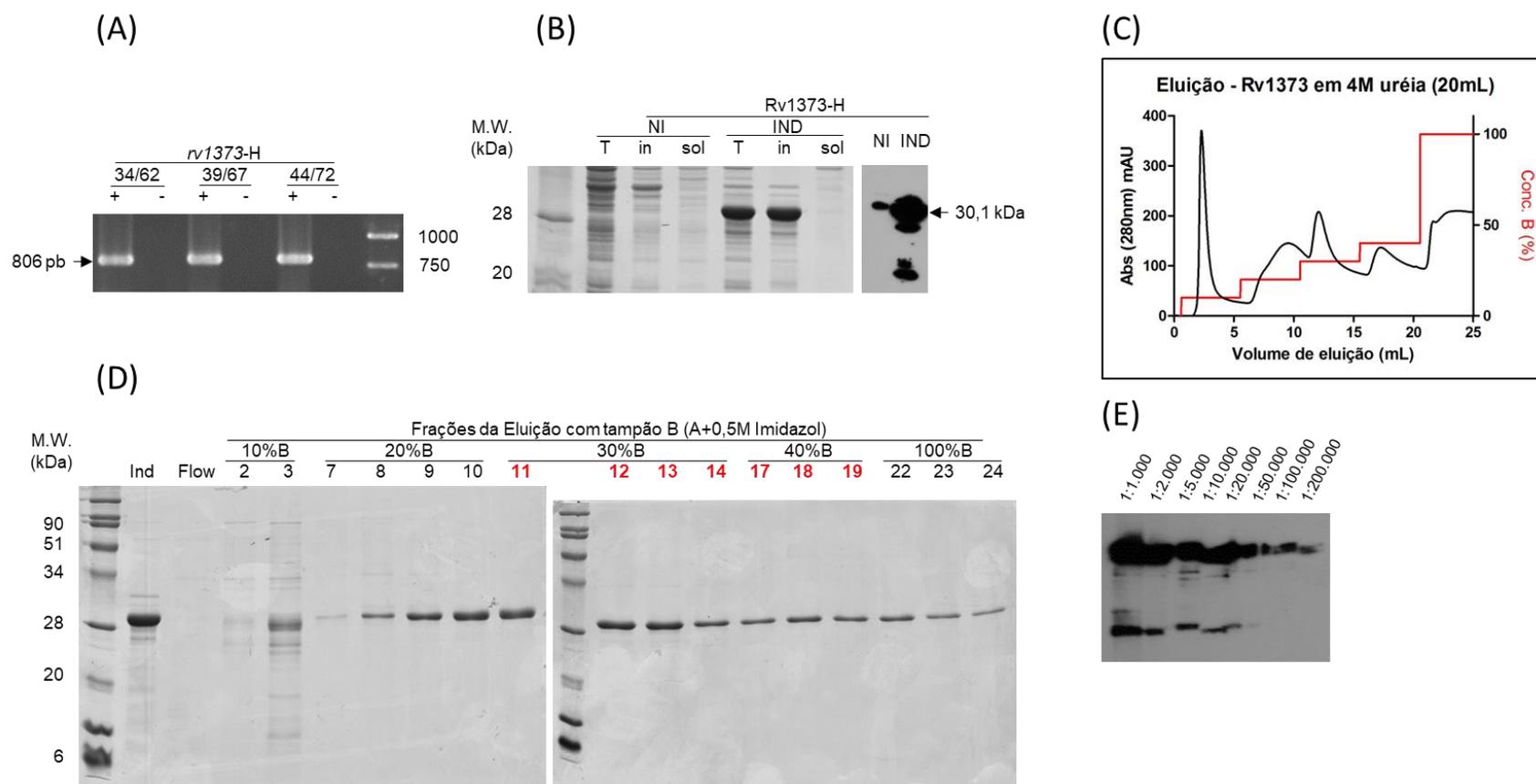


Figura 16 – Resultados gerais da clonagem, expressão e purificação de Rv1373 de BCG Moreau. (A) Padronização da PCR para o gene *rv1373*, mostrando resultado positivo para as três combinações de temperatura de anelamento usadas, sendo C- o controle negativo sem DNA; (B) extrato proteico de culturas induzidas (IND) ou não (NI) a expressar a proteína recombinante resolvidas por SDS-PAGE 15%, analisando-se a fração de proteínas totais (T), insolúveis (in) e solúveis (sol) após a lise e clarificação, e *western blotting* com anticorpo primário anti-6His de proteínas fracionadas em gel equivalente; (C) cromatograma obtido durante a purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade por metais imobilizados, mostrando a absorbância a 280 nm (curva preta) e a concentração teórica de imidazol no tampão de eluição (tampão B; curva vermelha); (D) proteínas resolvidas em géis SDS-PAGE 15%, mostrando a amostra aplicada na coluna (Ind), proteínas não-ligadas (Flow) e as frações da eluição com o tampão B nas suas diferentes concentrações; (E) titulação do soro policlonal obtido contra a proteína recombinante purificada (*pool* das frações em destaque em vermelho em D).

4.2.4. Análise da expressão de Rv1371 e Rv1373 nativas em *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau nas diferentes fases de cultivo axênico

Utilizando-se dos soros policlonais obtidos, conseguiu-se identificar Rv1371 e Rv1373 nos extratos proteicos de BCG Moreau e *M.tb* cepa H37Rv nas diferentes fases de crescimento *in vitro*.

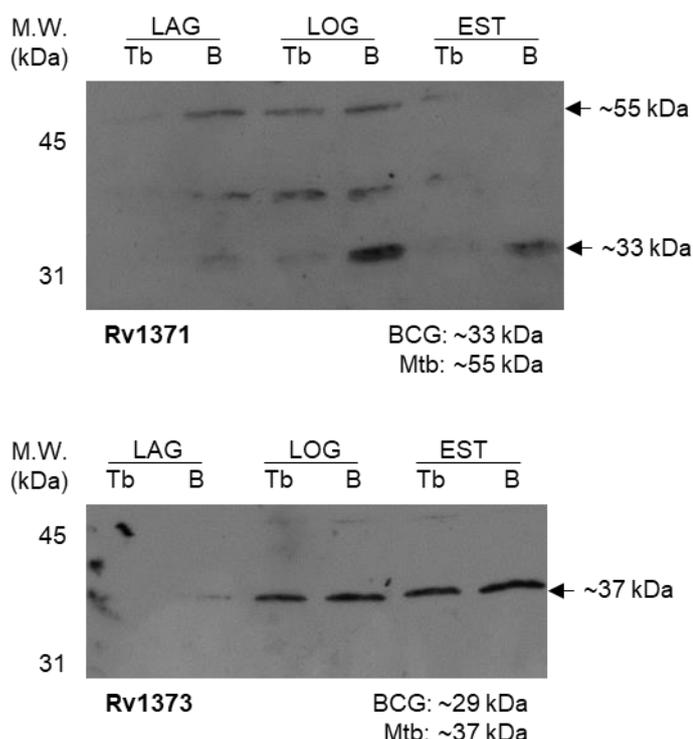


Figura 17 - Análise da expressão de Rv1371 e Rv1373. Extrato proteico total de culturas de *M. bovis* BCG Moreau (B) e *M. tuberculosis* cepa H37Rv (Tb) nas três fases de crescimento *in vitro* (LAG, LOG e EST) foi resolvido em géis SDS-PAGE 15%. Experimentos de *western blotting* foram realizados usando o soro policlonal contra as proteínas recombinantes. Cada imagem é representativa dos resultados de uma triplicata biológica (n=3).

De acordo com as análises *in silico*, a mutação presente em *rv1371* faz com que a proteína gerada em Moreau tenha uma massa molecular de cerca de 33 kDa, enquanto a homóloga em *M.tb* tenha cerca de 55 kDa. Observando-se o resultado mostrado na Figura 17 pode-se perceber que uma banda correspondente à proteína de Moreau é encontrada majoritariamente na fase log de crescimento dessa bactéria, diminuindo consideravelmente na fase estacionária. Além disso, observa-se bandas correspondentes a uma proteína de cerca de 55 kDa nas amostras de *M.tb* e BCG Moreau, principalmente na fase log.

Como observado na Figura 17, tanto BCG Moreau quanto *M.tb* produzem uma proteína com massa condizente com a forma sem mutação de Rv1373. Essa expressão se inicia na fase log, se mantendo na amostra correspondente à fase estacionária.

4.2.5. Análise da solubilidade de Rv1371 e Rv1373 nativas de *M. bovis* BCG Moreau por extração diferencial com Triton X-114

Como pode-se observar na Figura 18, tanto Rv1371 como Rv1373 de BCG Moreau foram recuperadas na fração Triton, correspondente a proteínas com maior caráter hidrofóbico. Mas, nota-se também que se consegue recuperar Rv1371 também na fração hidrossolúvel.

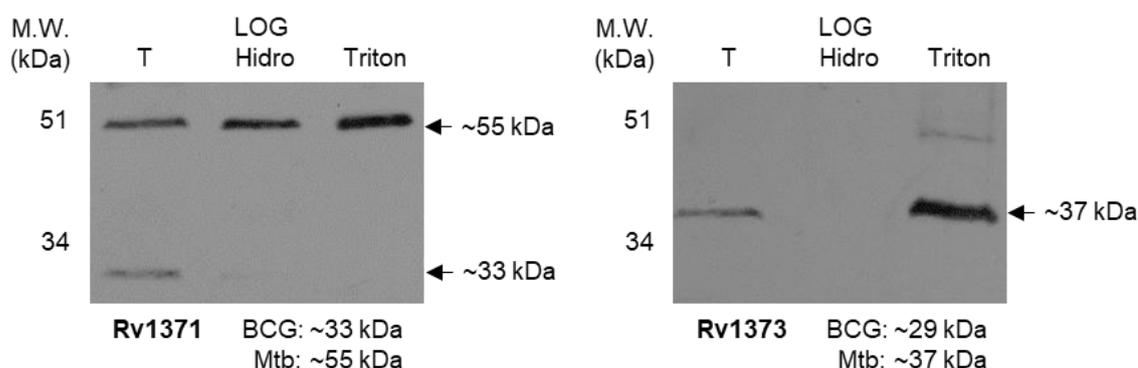


Figura 18 - Análise da hidrofobicidade/associação com membranas de Rv1371 e Rv1373. Extrato diferencial das proteínas de *M. bovis* BCG Moreau na fase log com o uso de Triton X-114, assim como descrito em Malen *et al.*, 2010. Proteínas do extrato total (T) e da fração aquosa (Hidro) e hidrofóbica (Triton) após o protocolo de extração diferencial foram resolvidas em SDS-PAGE 15%. Experimentos de *western blotting* foram realizados usando o soro policlonal contra as proteínas recombinantes, conforme indicado. Cada imagem é representativa dos resultados de uma triplicata biológica (n=3).

4.2.6. Análise do impacto das mutações na termoestabilidade de Rv1371 e Rv1373 nativas

Como mostrado na Figura 19, Rv1371 e Rv1373 de ambos organismos apresentam padrões de estabilidade térmica similares, permanecendo majoritariamente em solução após incubações de 30 min até 80 °C.

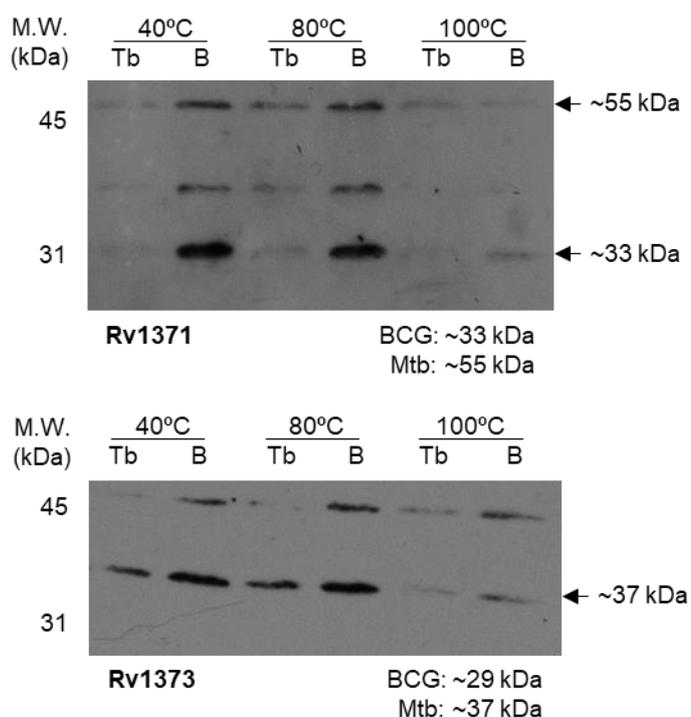
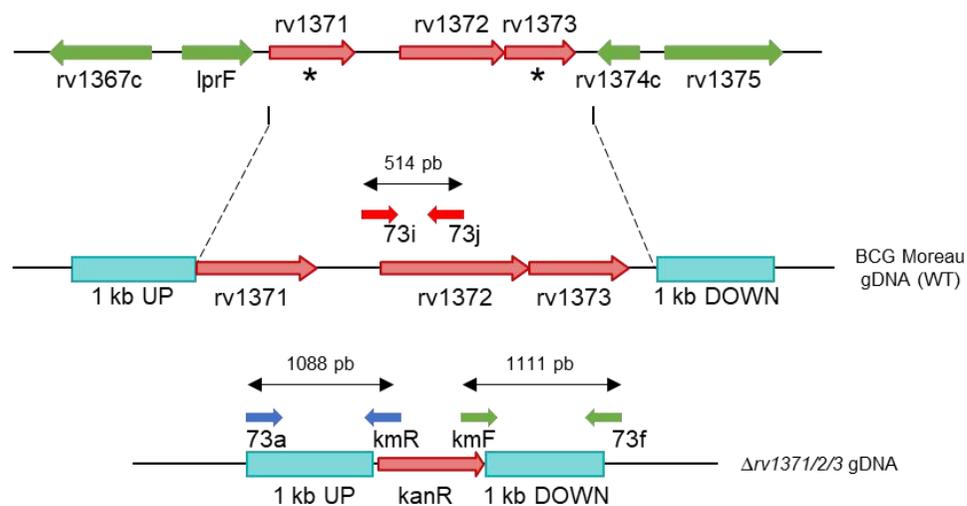


Figura 19 – Análise da termoestabilidade de Rv1371 e Rv1373 nativas. Proteínas que permaneceram solúveis após incubação em diferentes temperaturas (40, 80 e 100 °C) do extrato proteico total de culturas de *M. bovis* BCG Moreau (B) e *M. tuberculosis* cepa H37Rv (Tb) na fase LOG de crescimento foram resolvidas em géis SDS-PAGE 15%. Experimentos de *western blotting* foram realizados usando o soro policlonal contra as proteínas recombinantes. Cada imagem é representativa dos resultados de uma triplicata biológica (n=3).

4.2.7. Mutante $\Delta rv1371/2/3$ em *M. bovis* BCG Moreau: genotipagem e caracterização

Após a realização do protocolo de *recombineering* (descrito no ítem 3.9) obtiveram-se colônias resistentes no meio seletivo. Não se obteve colônias pelo método de transdução especializada. Como mostrado na Figura 20, após o teste por PCR com os iniciadores descritos e análise dos fragmentos obtidos, confirmou-se a presença da deleção desejada. Tal mutante não apresenta diferenças na morfologia de colônia quando comparado com a cepa selvagem (Fig 20C).

(A)



(B)



(C)

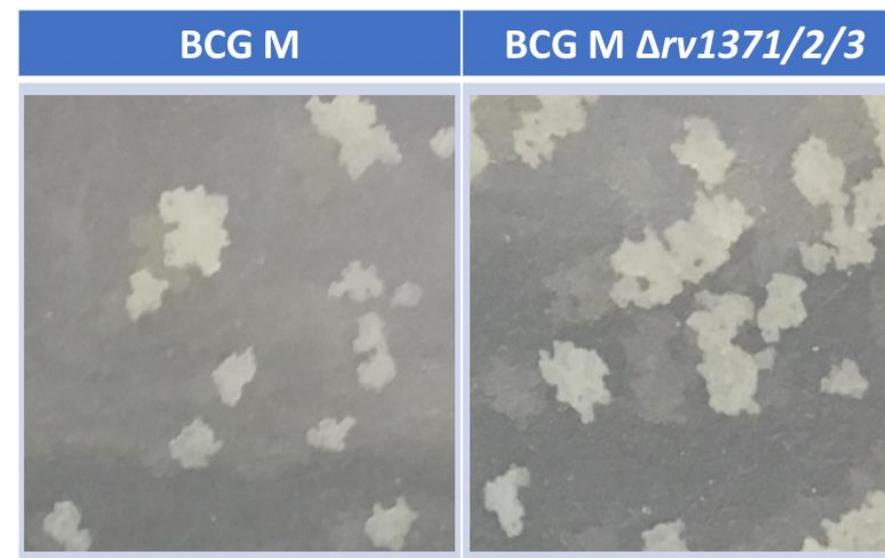


Figura 20 – Caracterização inicial do mutante $\Delta rv1371/2/3$ em *M. bovis* BCG Moreau. (A) Esquema da organização gênica do locus do operon *rv1371/2/3* na cepa selvagem e no *knockout*. No topo, mostra-se o contexto gênico próximo ao operon, onde os asteriscos mostram genes que possuem mutações quando comparados os genomas de *M.tb* e BCG Moreau. Para genotipagem dos clones utilizou-se os iniciadores mostrados em (A) e pode-se observar em (B) o padrão de bandas da cepa selvagem e do *knockout*. (C) Morfologia de colônia de ambas cepas analisadas.

4.2.8. Análise do impacto da deleção no crescimento em meio axênico

Cresceu-se o mutante e a cepa selvagem em meio axênico para observar se a mutação geraria alguma diferença de fenótipo sob essa variável. Como pode-se observar na Figura 21, não há diferenças significativas entre o crescimento de ambas bactérias.

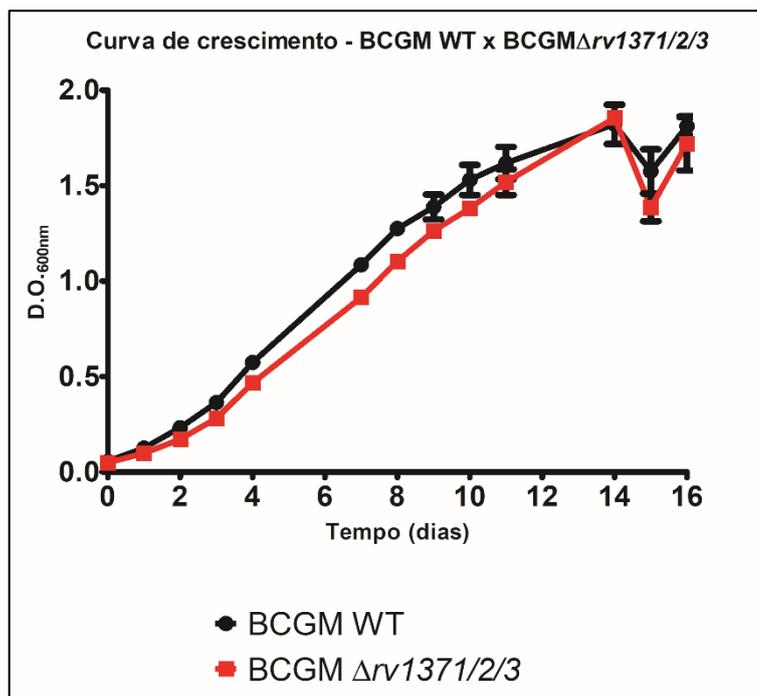


Figura 21 – Curva de crescimento comparativa de *M. bovis* BCG Moreau selvagem e do *knockout* no locus *rv1371/2/3*. Os pontos no gráfico representam a média \pm o desvio padrão de uma triplicata biológica (n=3).

4.2.1. Criação de BCG Moreau::*rv1371/2/3* (alelos de *M. tuberculosis* H37Rv e próprio alelo), caracterização morfológica das colônias e análise do impacto da complementação no perfil lipídico das cepas

De modo a estudar possíveis funções do operon no contexto da bactéria, complementou-se a cepa selvagem com a sequência completa do operon, sob controle do promotor pBlaF* no vetor integrativo pMV361K. Pode-se observar que as cepas complementadas com o alelo de BCG Moreau e *M.tb* apresentam morfologias de colônia similares (Figura 22).

Após cultivo em meio sem detergente, extração dos lipídeos totais, enriquecimento em moléculas carregadas negativamente e análise por TLC, pode-se

observar que existem algumas bandas mais próximas à origem de aplicação que são diferenciais entre as duas cepas complementadas analisadas (Figura 22).

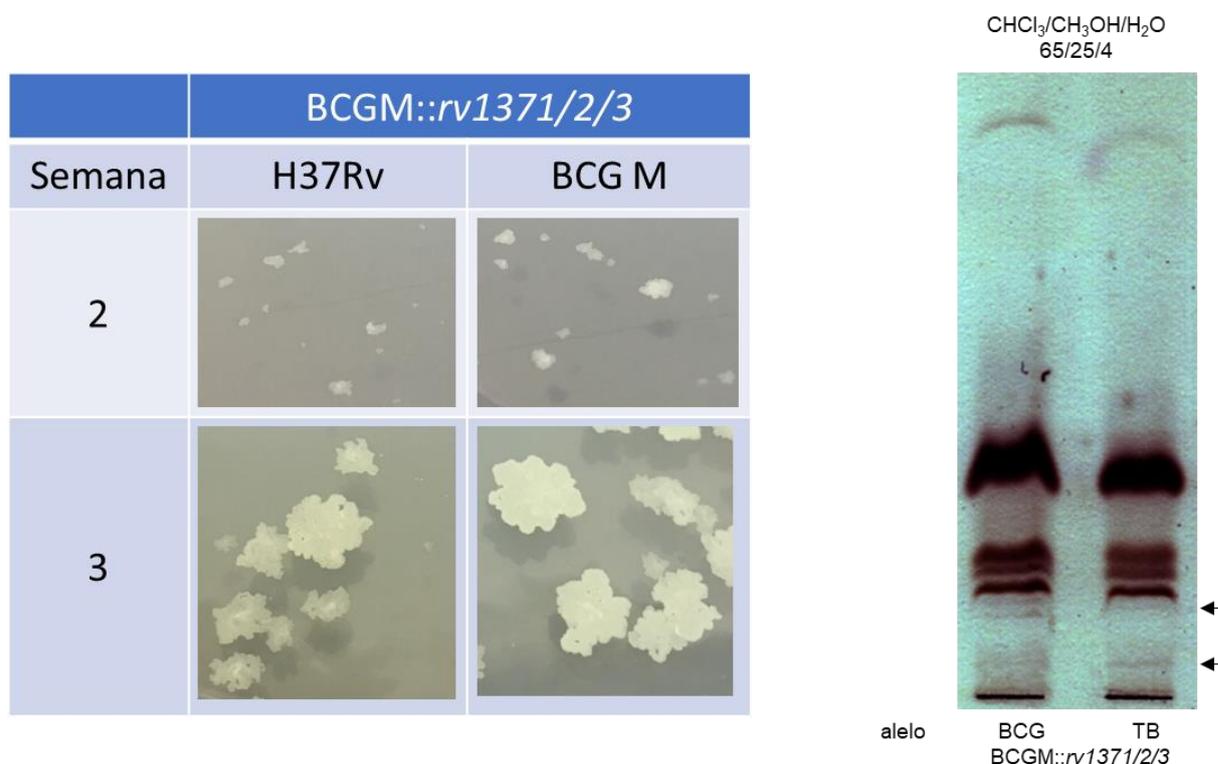


Figura 22 - Caracterização inicial das cepas de *M. bovis* BCG Moreau::*rv1371/2/3* (complementadas com o próprio alelo e o de *M. tuberculosis*). No quadro da esquerda mostra-se a morfologia de colônia de ambas cepas analisadas após 2 e 3 semanas de cultivo em meio sólido. À direita mostra-se a TLC com amostras enriquecidas em lipídeos negativamente carregados. Utilizou-se o sistema de solventes de clorofórmio, metanol e água (65/25/4) e revelaram-se as bandas com solução de CuSO_4 após aquecimento. As setas indicam bandas diferenciais entre as amostras analisadas.

4.2.2. Análise do impacto da complementação no crescimento em meio axênico

Ambas cepas complementadas com os alelos de BCG Moreau e *M.tb* foram crescidas em meio axênico e, como mostrado nas Figuras 23 e 24, observa-se uma pequena diferença com significância estatística na fase inicial de crescimento. Nesse contexto, a bactéria complementada com o alelo de H37Rv apresenta um maior crescimento.

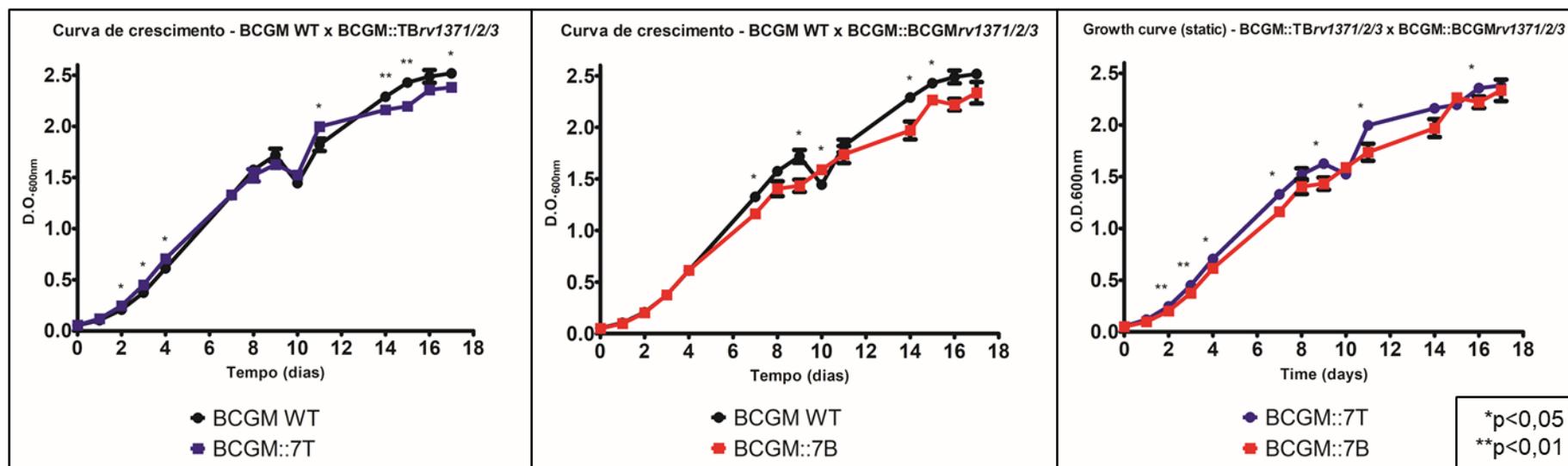
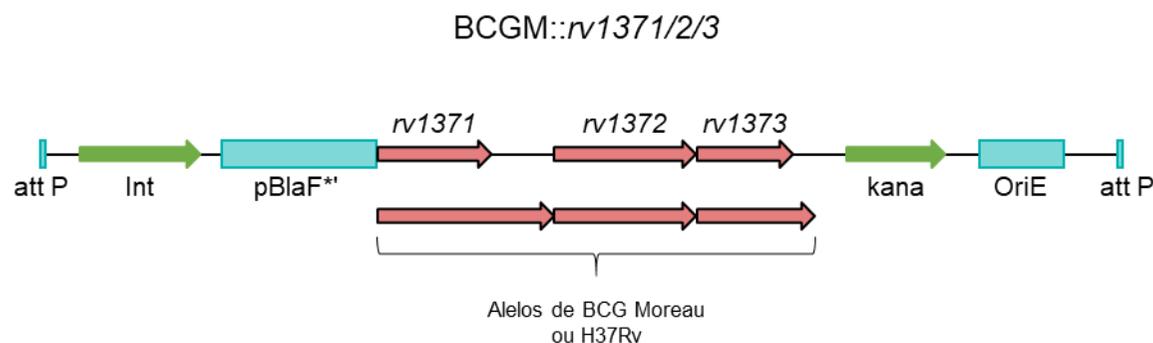


Figura 23 - Curva de crescimento comparativa de *M. bovis* BCG Moreau selvagem e complementados com o operon *rv1371/2/3* de *M. bovis* BCG Moreau e *M. tuberculosis*. No topo mostra-se o esquema do plasmídeo de complementação após a inserção no genoma. Na base mostra-se as curvas de crescimento comparativas das cepas selvagens e complementadas. Os pontos no gráfico representam a média \pm o desvio padrão de uma triplicata biológica (n=3). A análise estatística foi realizada por teste t não-pareado. *p<0,05, **p<0,01.

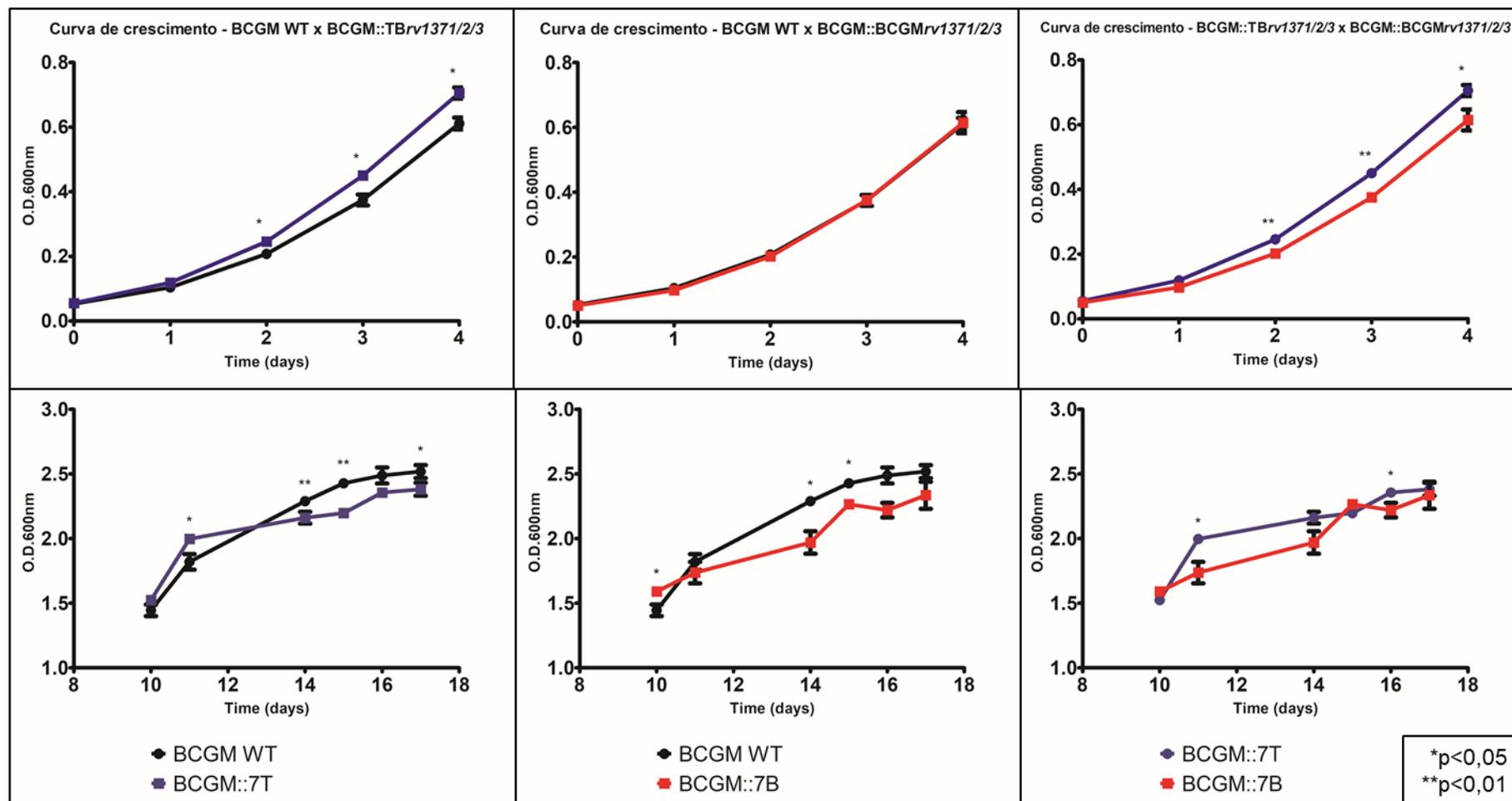


Figura 24 – Curvas de crescimento das cepas selvagem e complementadas com os alelos de *rv1371/2/3*, focando nas fases iniciais (até 4 dias) de cultivo e na fase estacionária (entre 10 e 18 dias). Os pontos no gráfico representam a média +/- o desvio padrão de uma triplicata biológica (n=3). A análise estatística foi realizada por teste t não-pareado. *p<0,05, **p<0,01.

4.3. Operon da fumarato redutase

4.3.1. Análise *in silico* das sequências de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau e do possível impacto funcional da mutação

Após análises *in silico*, pode-se observar que os genes preditos como possuindo mutações pertencem ao operon da fumarato redutase. Especificamente, a sequência mutada em BCG Moreau afeta parte de *rv1553* e *rv1554*. É uma sequência homopolimérica de guanosinas, compreendendo o final de *rv1553*. Devido à mutação, o códon de parada desse gene é perdido, e a fase de leitura é fusionada com a fase do gene a jusante, *rv1554* (Figura 25). Essa fusão se dá no mesmo quadro de leitura de *Rv1554* de *M.tb*, fazendo com que a proteína fusionada em BCG Moreau possua a porção N-terminal similar à *FrdB* e a C-terminal à *FrdC*. A anotação fornecida para cada um dos genes no genoma de *M.tb* cepa H37Rv está descrita na Tabela 23.

Tabela 23 – Anotação dos genes do operon da fumarato redutase (*rv1552/3/4/5*).

	Gene		Subunidade
Complexo fumarato redutase	<i>frdA</i>	<i>rv1552</i>	Flavoproteína (catalítica)
	<i>frdB</i>	<i>rv1553</i>	Centro ferro-enxofre
	<i>frdC</i>	<i>rv1554</i>	Âncora de membrana
	<i>frdD</i>	<i>rv1555</i>	

Quando se compara a sequência de diferentes componentes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* pode-se observar que as mutações nessa região homopolimérica que levam à fusão das proteínas codificadas por esses genes é específica à linhagem de *M. bovis*, com diferenças no número de nucleotídeos inseridos dependendo da espécie analisada (Figura 26).

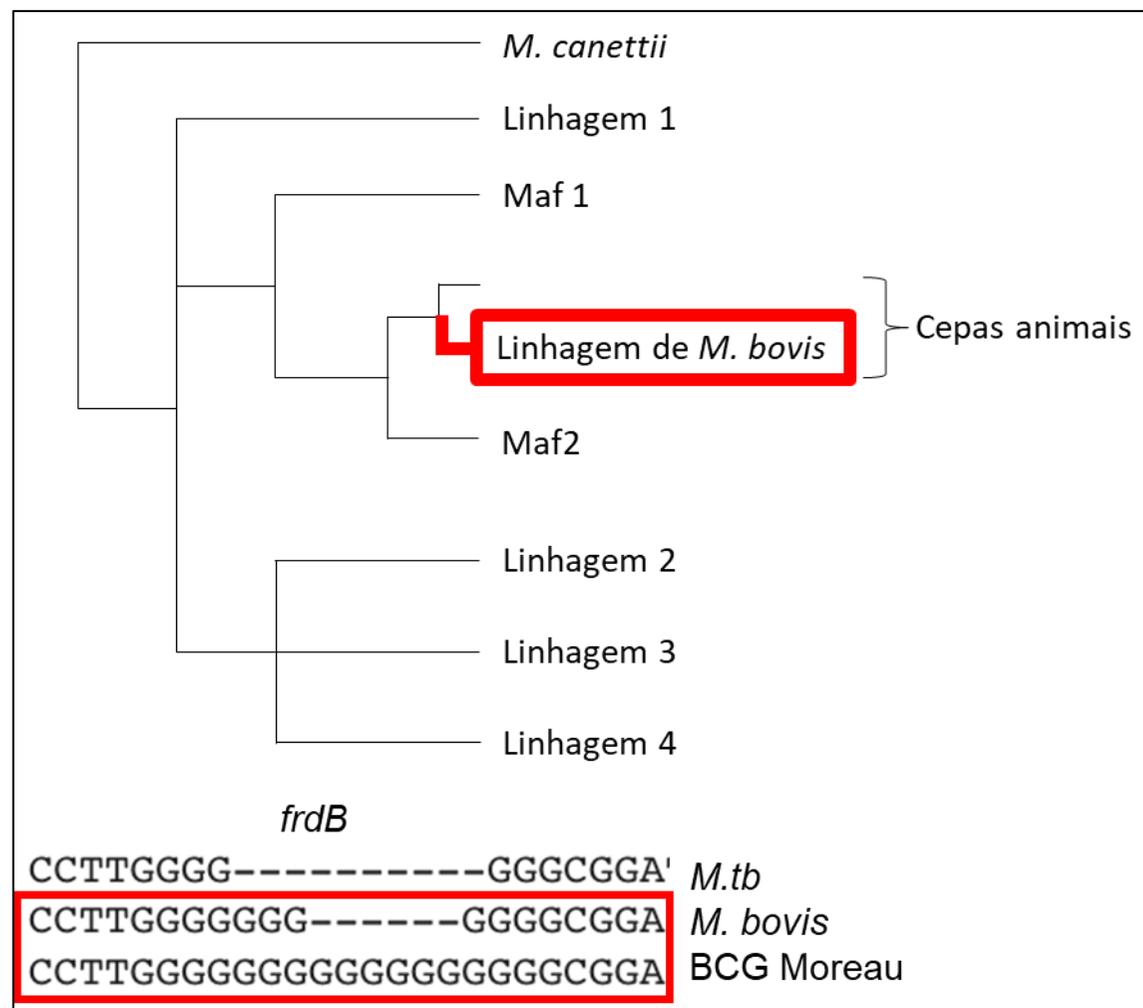


Figura 26 - Filogenia do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, mostrando o surgimento da mutação presente em *frdABCD* de BCG Moreau. Tal resultado foi obtido a partir do alinhamento local das sequências homólogas de diferentes representantes do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, e mostra que a mutação encontrada em *M. bovis* BCG Moreau é restrita à linhagem de *M. bovis*. Abaixo mostra-se parte do alinhamento, focando na região com a mutação.

4.3.2. Análise da transcrição dos genes estudados por RT-PCR em *M. bovis* BCG Moreau

Após ensaios de RT-PCR pode-se identificar transcritos correspondentes aos genes codificantes para as proteínas do complexo da fumarato redutase em amostras de RNA total de BCG Moreau (Figura 27). Além disso, usando iniciadores específicos para amplificar as regiões intergênicas pode-se observar que os genes analisados estão em um transcrito policistrônico, corroborando a ideia de que estes compõem um operon. Os resultados mostram que a transcrição dos genes não parece variar de acordo com a fase de cultivo do microrganismo.

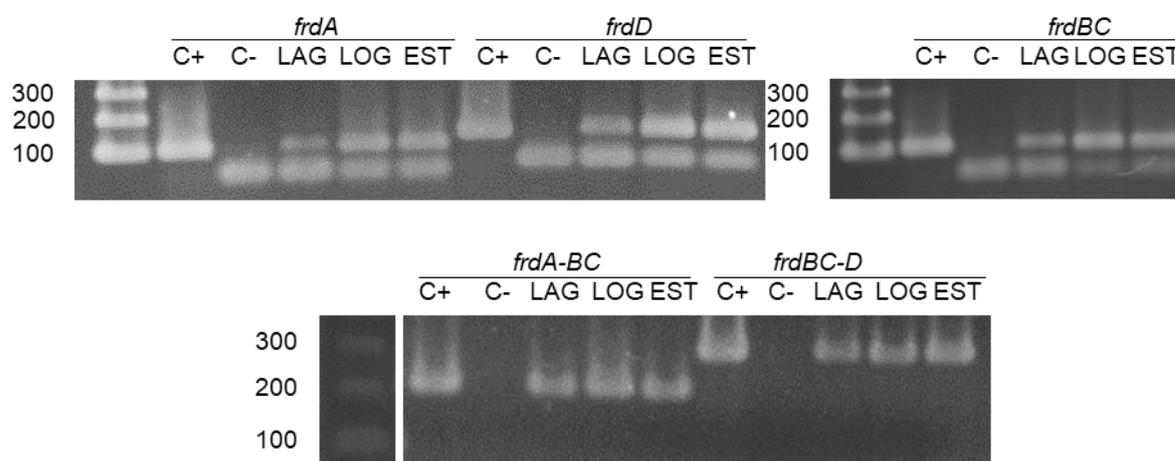


Figura 27 - Análise da transcrição e de co-transcrição dos genes do operon da fumarato redutase nas fases lag, log e estacionária (EST) em *M. bovis* BCG Moreau. Para cada reação realizou-se um controle positivo (C+, com DNA genômico) e um negativo (C-, usando RNA sem tratamento com a transcriptase reversa). Cada gel é representativo dos resultados de uma triplicata biológica (n = 3).

4.3.3. Produção de FrdB recombinante de *M. bovis* BCG Moreau e de soro policlonal

Pode-se observar na Figura 28 que se obteve com sucesso a proteína FrdB recombinante, na fração dos corpos de inclusão. Tal polipeptídeo possui a cauda de histidina C-terminal, o que permitiu sua correta purificação para seguir com a produção do soro policlonal.

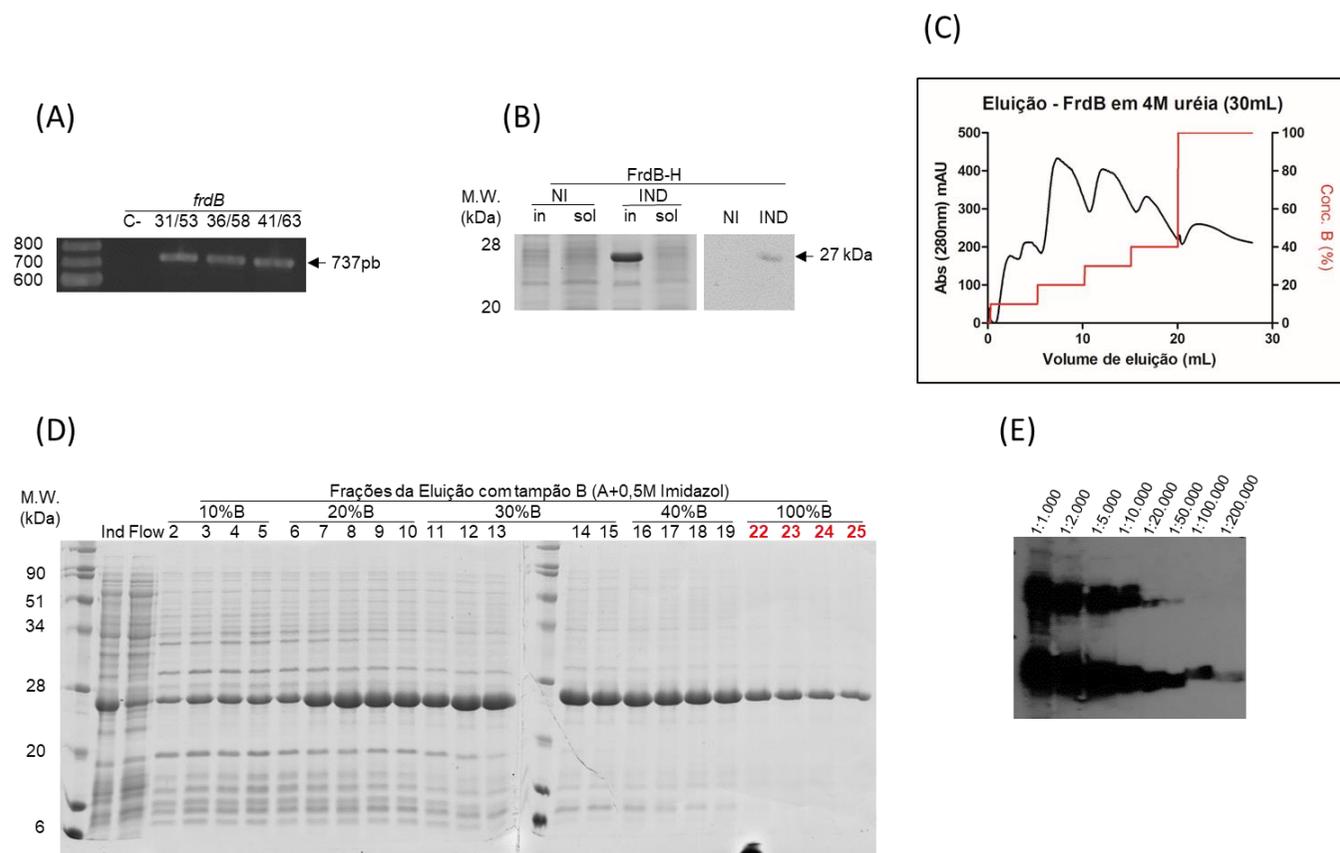


Figura 28 - Resultados gerais da clonagem, expressão e purificação da FrdB de BCG Moreau. (A) Padronização da PCR para parte do gene *frdB* (sequência equivalente a *frdB*), mostrando resultado positivo para as três combinações de temperatura de anelamento usadas, sendo C- o controle negativo sem DNA; (B) extrato proteico de culturas induzidas (IND) ou não (NI) a expressar a proteína recombinante resolvidas por SDS-PAGE 15%, analisando-se a fração de proteínas insolúveis (in) e solúveis (sol) após a lise e clarificação, e *western blotting* com anticorpo primário anti-6His de proteínas fracionadas em gel equivalente; (C) cromatograma obtido durante a purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade por metais imobilizados, mostrando a absorbância a 280 nm (curva preta) e a concentração teórica de imidazol no tampão de eluição (tampão B; curva vermelha); (D) proteínas resolvidas em géis SDS-PAGE 15%, mostrando a amostra aplicada na coluna (Ind), proteínas não-ligadas (Flow) e as frações da eluição com o tampão B nas suas diferentes concentrações; (E) titulação do soro policlonal obtido contra a proteína recombinante purificada (*pool* das frações em destaque em vermelho em D).

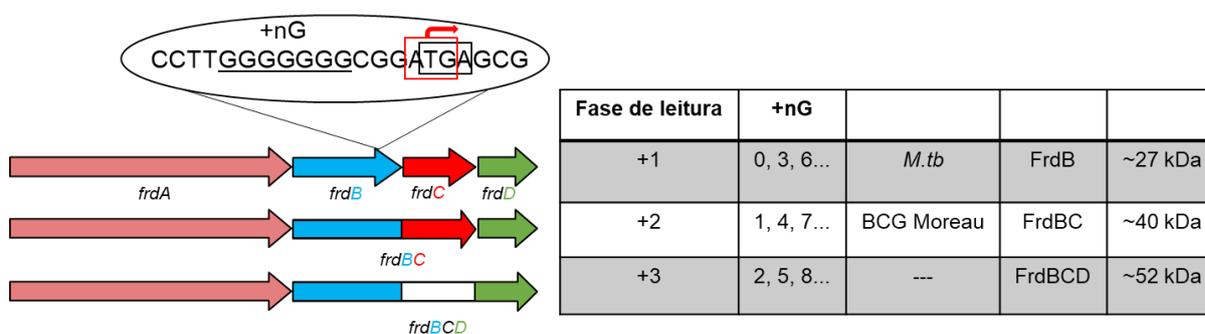


Figura 30 – Análise do polipeptídeo codificado pela sequência *frdBCD* dependendo do número de Gs adicionados na região homopolimérica no final de *frdB*. Observa-se que dependendo do número de nucleotídeos adicionados, tem-se a codificação da região a jusante em três fases de leitura, gerando proteína de 27, 40 ou 52 kDa, com diferentes graus de homologia com as subunidades independentes.

4.3.5. Análise da solubilidade de FrdB nativa de *M. bovis* BCG Moreau por extração diferencial com Triton X-114

Experimentos de extração diferencial com Triton X-114 mostram que proteínas com homologia a FrdB são passíveis de serem extraídas na fração hidro e lipossolúvel, sendo que nessa última se encontra como uma banda de massa aproximada de 52 kDa.

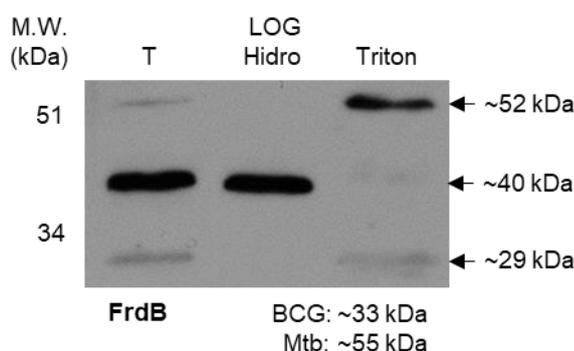


Figura 31 - Análise da hidrofobicidade/associação com membranas de FrdB. Extrato diferencial das proteínas de *M. bovis* BCG Moreau na fase log com o uso de Triton X-114, assim como descrito em Malen *et al.*, 2010. Proteínas do extrato total (T) e da fração aquosa (Hidro) e hidrofóbica (Triton) após o protocolo de extração diferencial foram resolvidas em SDS-PAGE 15%. Experimentos de *western blotting* foram realizados usando o soro policlonal contra a proteína recombinante. A imagem é representativa dos resultados de uma triplicata biológica (n=3)

4.3.6. Análise do impacto da mutação na termoestabilidade de FrdB nativa

Na análise da termoestabilidade mostrada na Figura 32 observa-se que FrdB permanece em solução após aquecimento até 100 °C na forma do polipeptídeo de 27

kDa, não sendo observado sinal significativo para as bandas de 40 e 52 kDa nessa temperatura mais elevada.

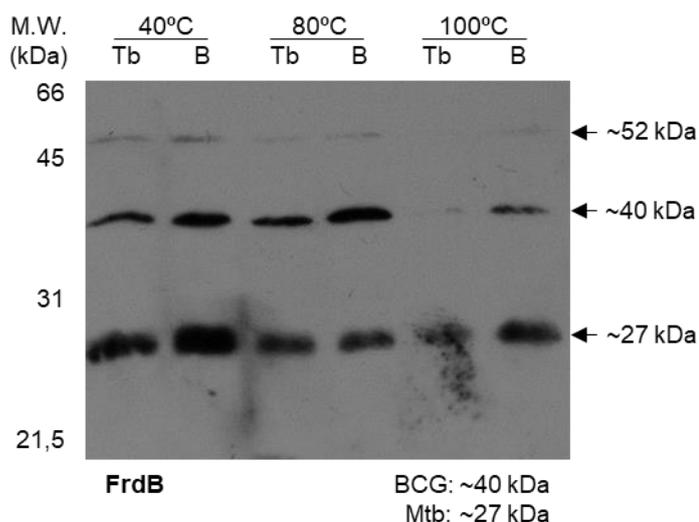


Figura 32 - Análise da termoestabilidade de FrdB nativa. Proteínas que permaneceram solúveis após incubação em diferentes temperaturas (40, 80 e 100 °C) do extrato proteico total de culturas de *M. bovis* BCG Moreau (B) e *M. tuberculosis* cepa H37Rv (Tb) na fase LOG de crescimento foram resolvidas em géis SDS-PAGE 15%. Experimentos de *western blotting* foram realizados usando o soro policlonal contra a proteína recombinante. A imagem é representativa dos resultados de uma triplicata biológica (n=3).

4.3.7. Mutante Δfrd em *M. bovis* BCG Moreau: genotipagem e caracterização

Como mostrado na Figura 33, conseguiu-se produzir o mutante com a deleção no operon da fumarato redutase em BCG Moreau. Somente obteve-se colônias após cultivo em meio seletivo quando se utilizou o método de *recombineering*.

Observa-se que tal cepa mutante não apresenta diferença de morfologia de colônia quando comparada com a cepa selvagem. Outro fato interessante sobre esse clone é que só foi possível observar colônias no meio seletivo após a transformação da cepa selvagem com pJV53H com o substrato de troca alélica depois de incubação das placas por cerca de 5-6 semanas. Isso foi diferente para o *knockout* de *rv1371/2/3*, no qual as colônias foram obtidas após cerca de 3-4 semanas.

A cepa *knockout* foi complementada com o operon *frdABCD*, tanto com o alelo de *M.tb* cepa H37Rv como com o próprio de BCG Moreau. Observou-se que em ambos casos se teve colônias no meio seletivo após cerca de 3-4 semanas, indicando a reversão do fenótipo do mutante com a deleção nesse operon.

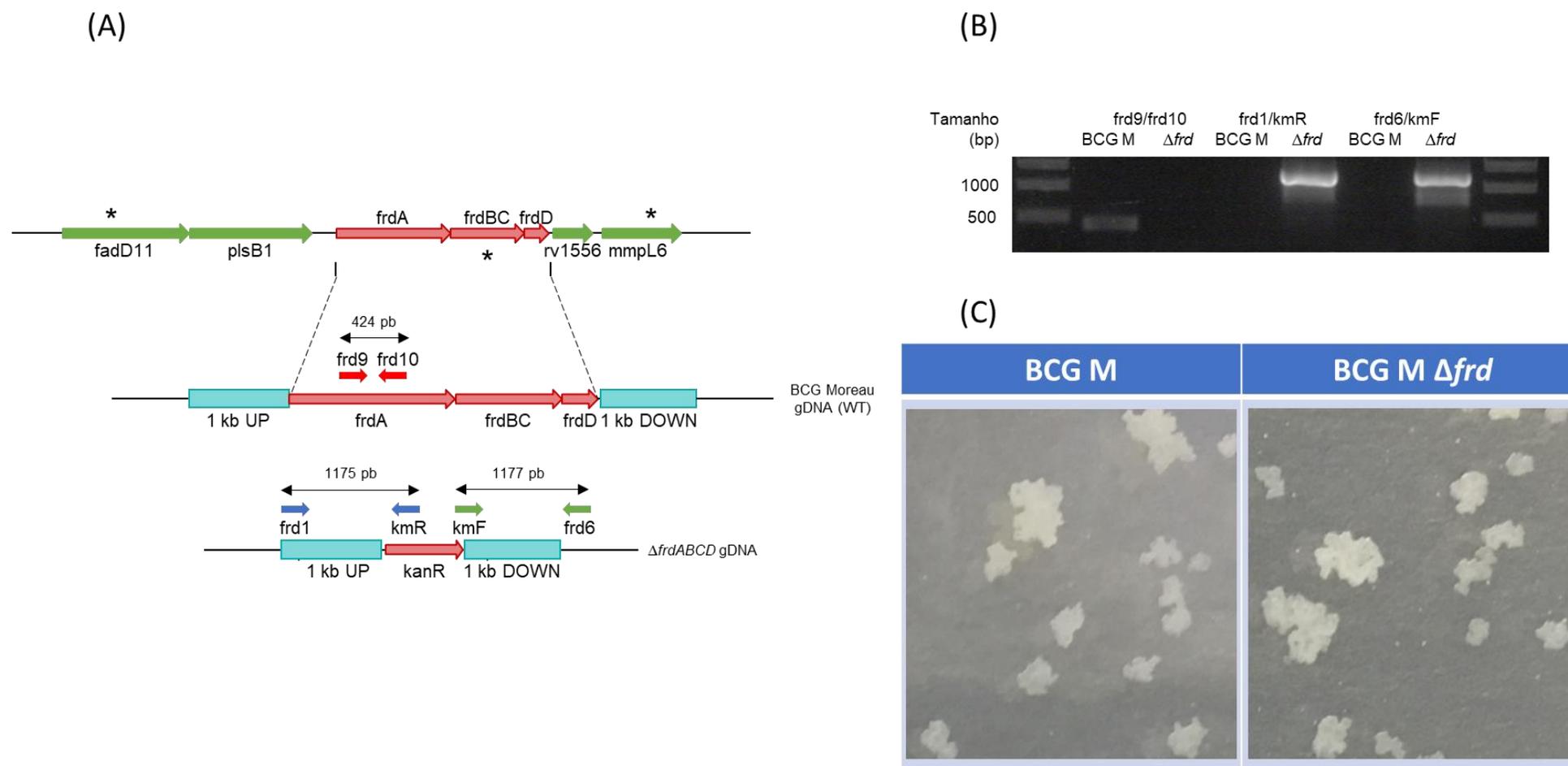


Figura 33 – Caracterização inicial do mutante Δfrd em *M. bovis* BCG Moreau. (A) Esquema da organização gênica do *locus* do operon da fumarato redutase (e genes circundantes) na cepa selvagem e no *knockout*. Para genotipagem dos clones utilizou-se os iniciadores mostrados em (A) e pode-se observar em (B) o padrão de bandas da cepa selvagem e do *knockout*, (C) morfologia de colônia de ambas cepas analisadas. Os asteriscos mostram genes ao redor da sequência analisada que possuem mutações quando comparados os genomas de *M.tb* e BCG Moreau.

4.3.8. Análise do impacto da deleção no crescimento em meio axênico

Após o cultivo em meio axênico e a mensuração da DO_{600nm} de ambas culturas, pode-se observar na Figura 34 que o mutante com a deleção no operon da fumarato redutase apresenta uma deficiência no crescimento na fase inicial e de crescimento logarítmico. Mas, é interessante observar que ambos cultivos atingem o mesmo nível de saturação no mesmo período de tempo.

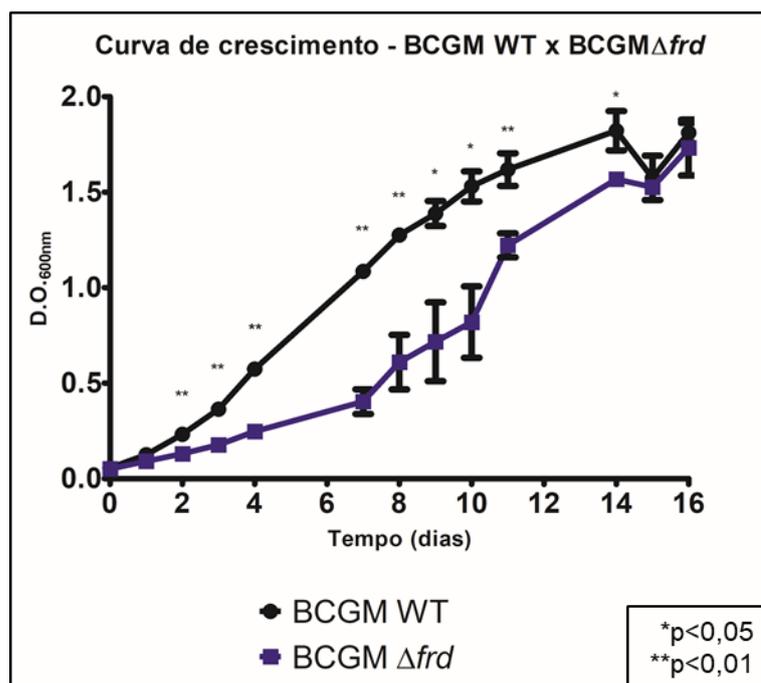


Figura 34 – Curva de crescimento comparativa de *M. bovis* BCG Moreau selvagem e do *knockout* no *locus* do operon da fumarato redutase. Os pontos no gráfico representam a média +/- o desvio padrão de uma triplicata biológica (n=3). A análise estatística foi realizada por teste t não-pareado. *p<0,05, **p<0,01.

4.3.9. Criação de BCG Moreau::*frd* (alelos de *M. tuberculosis* H37Rv e próprio alelo) e análise do impacto no crescimento em meio axênico

Como se observa na Figura 35, complementou-se a cepa selvagem de BCG Moreau com ambos alelos do operon da fumarato redutase (próprio alelo e o de *M.tb*) portando o próprio promotor.

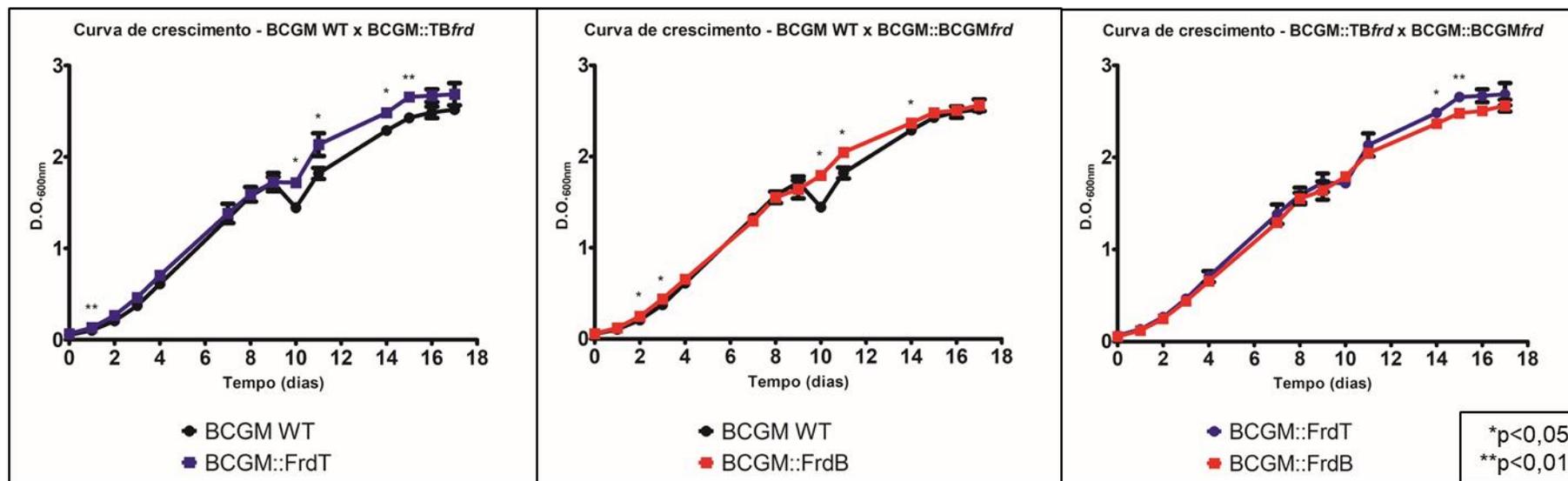
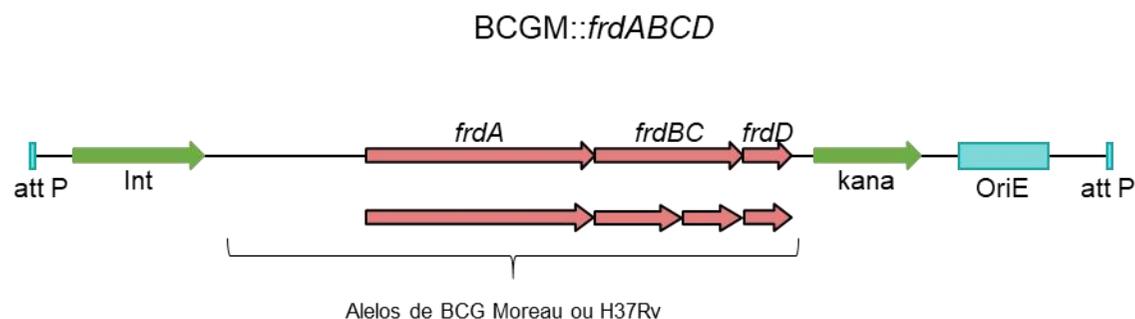


Figura 35 – Caracterização inicial do mutante *M. bovis* BCG Moreau::*frdABCD* (próprio alelo e o de *M. tuberculosis*). No topo mostra-se o esquema do plasmídeo de complementação após a inserção no genoma. Na base mostra-se as curvas de crescimento comparativas das cepas selvagens e complementadas. Os pontos no gráfico representam a média +/- o desvio padrão de uma triplicata biológica (n=3). A análise estatística foi realizada por teste t não-pareado. *p<0,05, **p<0,01.

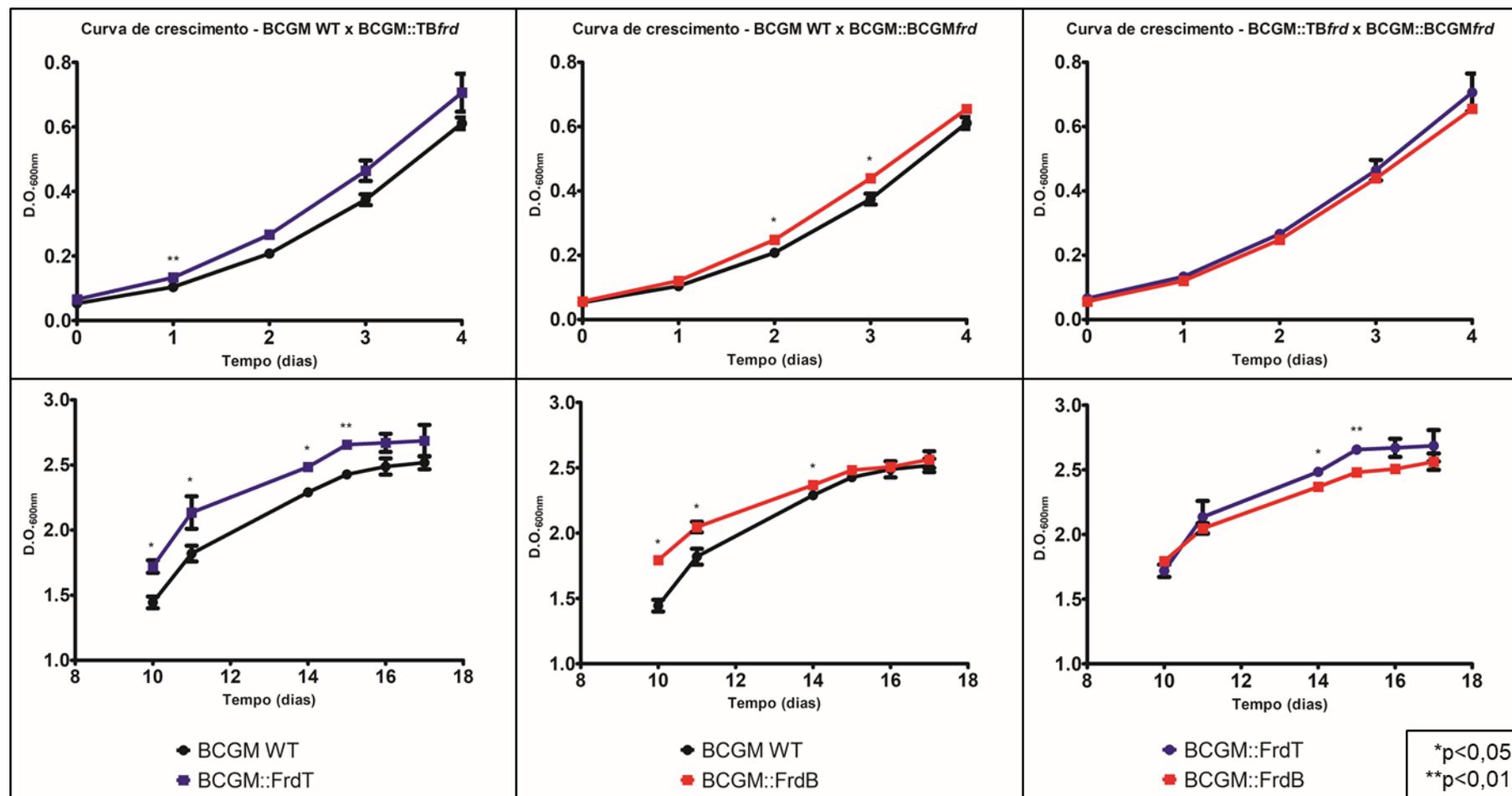


Figura 36 – Curvas de crescimento das cepas selvagem e complementadas com os alelos de *frdABCD*, focando nas fases iniciais (até 4 dias) de cultivo e na fase estacionária (entre 10 e 18 dias). Os pontos no gráfico representam a média +/- o desvio padrão de uma triplicata biológica (n=3). A análise estatística foi realizada por teste t não-pareado. *p<0,05, **p<0,01.

Além disso, cultivos em meio axênico demonstram uma pequena diferença, com significância estatística, no crescimento entre as cepas, principalmente focando nas fases iniciais e finais do cultivo (fases lag e estacionária) (Figura 36). Pode-se observar que na fase lag ambas cepas complementadas apresentam um maior crescimento quando comparadas com a cepa selvagem. Já no final da curva, a cepa portando o alelo de *M.tb* mostra um nível de saturação do cultivo superior à cepa selvagem, e um menor tempo para alcançar tal padrão quando comparada com a cepa portando o outro alelo.

4.3.10. Modelagem por homologia da fumarato redutase de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau, e análises comparativas

Após realizada a modelagem por homologia obteve-se as estruturas dos complexos codificados por *M.tb* cepa H37Rv e BCG Moreau (Figura 37). Análises iniciais de alinhamento estrutural mostra um baixo RMSD (0,46 Å) entre os modelos, indicando pouca diferença ao nível de estrutura tridimensional.

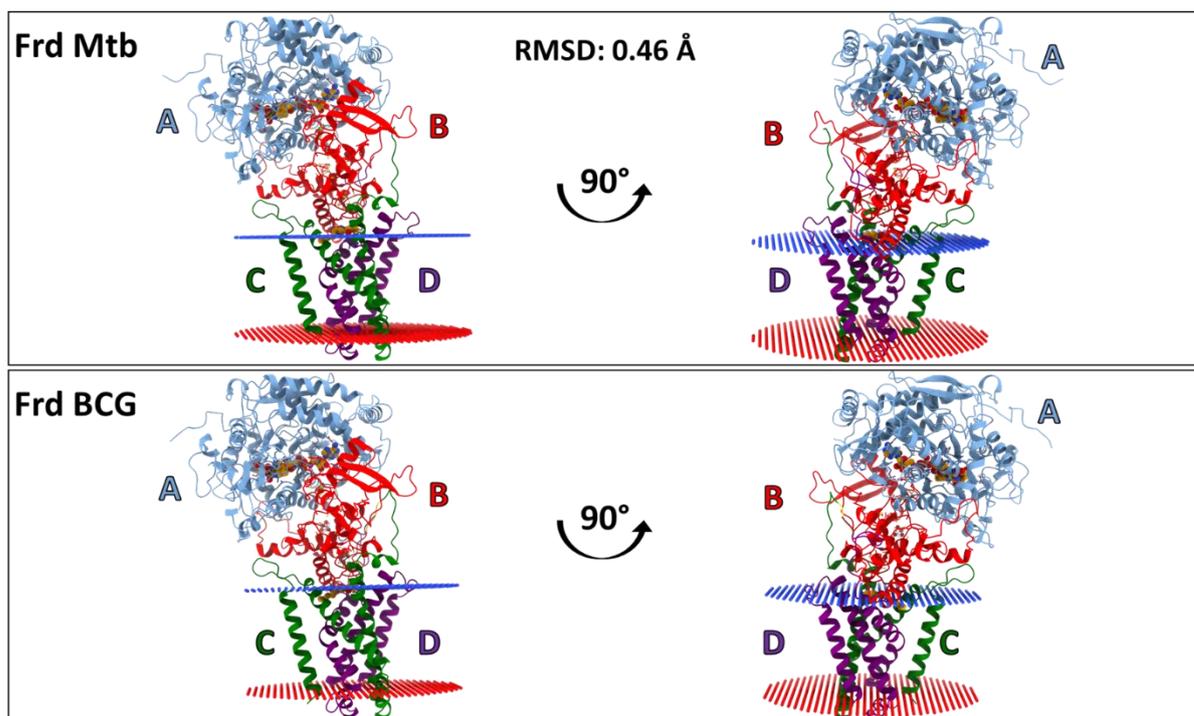


Figura 37 – Estrutura tridimensional dos complexos da fumarato redutase de *M. tuberculosis* cepa H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau inseridos na bicamada lipídica. Mostra-se as estruturas sob dois ângulos distintos, focando nas quatro subunidades diferentes: as duas porções hidrossolúveis, A (azul) e B (vermelha), e as duas porções de ancoragem na membrana, C (verde) e D (roxo). No topo mostra-se o valor de RMSD obtido após o alinhamento estrutural de ambos os complexos, mostrando que estes possuem pouca diferença no contexto de estrutura tridimensional.

Além disso, observa-se que a grande diferença entre esses modelos é a presença de três subunidades na proteína de BCG Moreau (FrdA, BC e D), contrapondo com as quatro subunidades no complexo de *M.tb*. Isso se deve à fusão da subunidade B e C, como já descrito, o que ocorre através do tripeptídeo GGR (Figura 38).

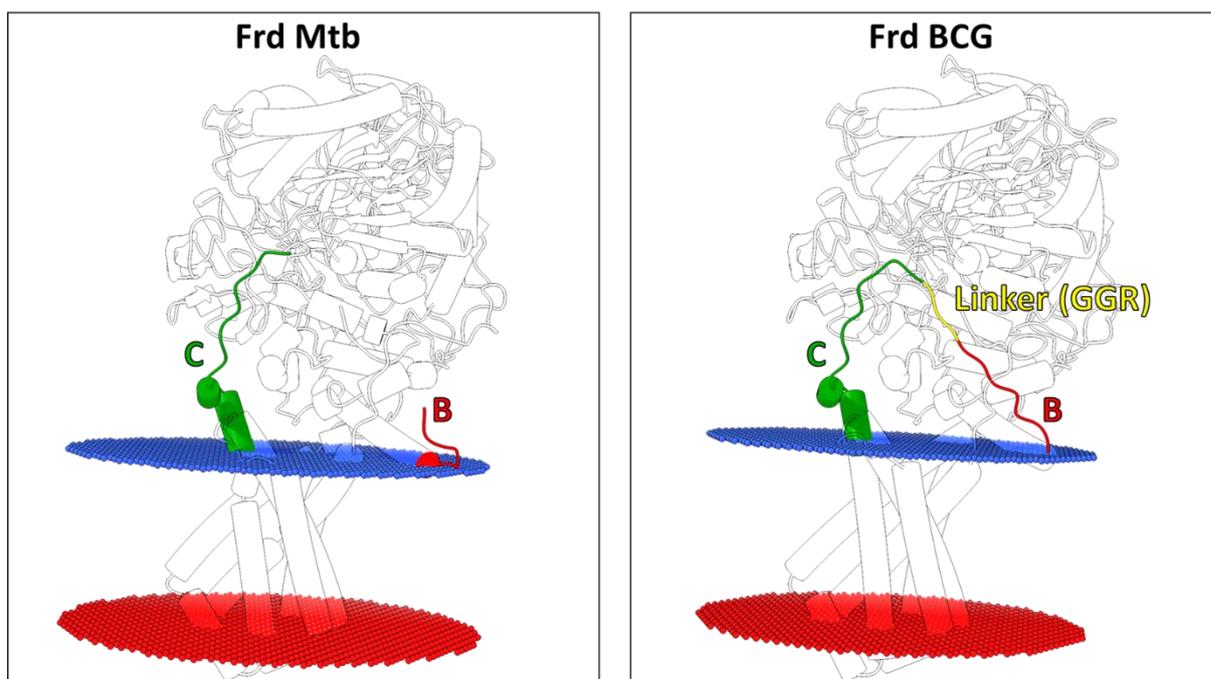


Figura 38 – Detalhe da estrutura tridimensional dos complexos fumarato redutase de *M. tuberculosis* cepa H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau, mostrando o tripeptídeo GGR (amarelo) que liga a subunidade B (vermelho) à C (verde) na forma fusionada (FrdBC), formada devido à mutação presente no gene em *M. bovis* BCG Moreau.

Ainda do ponto de vista estrutural, investigou-se o perfil eletroestático da superfície de ambos complexos. Como observado na Figura 39, existem diferenças pontuais na distribuição de cargas presentes na superfície, o que pode acarretar alterações em parâmetros como a interação com diferentes moléculas, além de influenciar na hidrofobicidade do complexo.

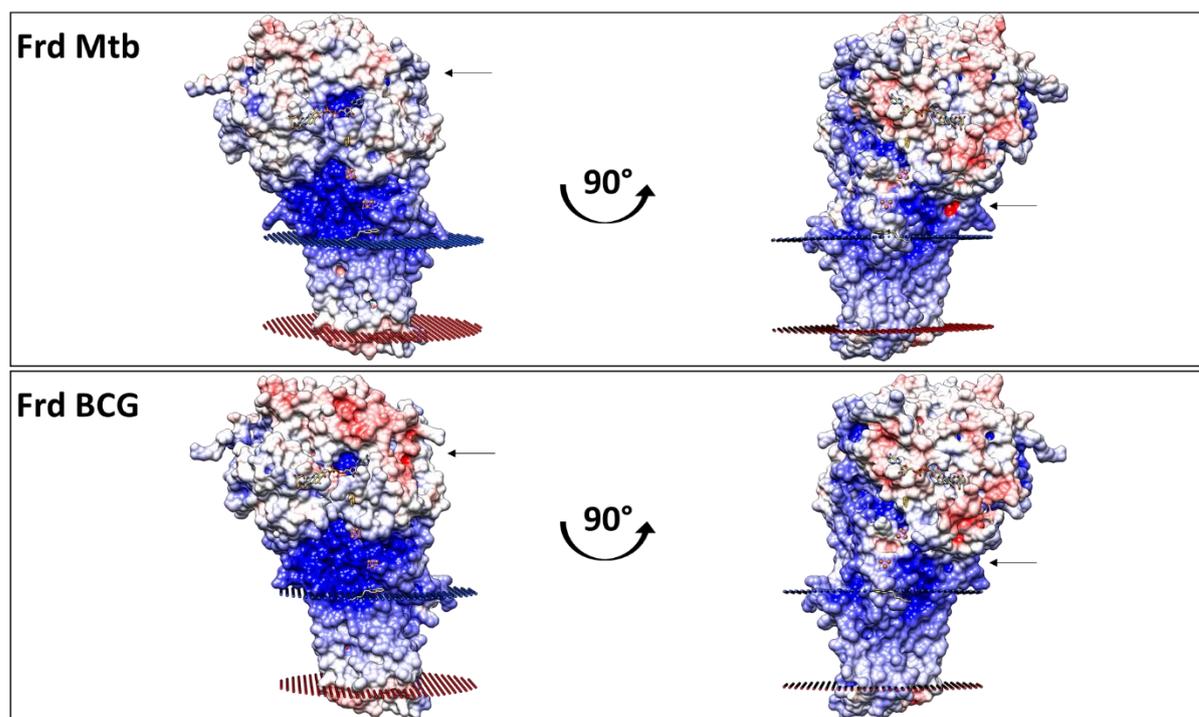


Figura 39 – Superfície eletroestática dos complexos da fumarato redutase de *M. tuberculosis* cepa H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau. Regiões com cargas positivas são coloridas de azul, e com cargas negativas de vermelho. As setas indicam regiões dos complexos que apresentam diferença no perfil eletroestático entre os modelos.

Sabe-se que tal complexo interage com diferentes cofatores, coenzimas e outras moléculas importantes para o correto funcionamento da enzima; por isso, analisou-se a estrutura das cavidades presentes nas subunidades que são responsáveis pela interação direta com essas moléculas não-proteicas. Como observado na Figura 40, ambos complexos possuem tais cavidades muito similares entre si.

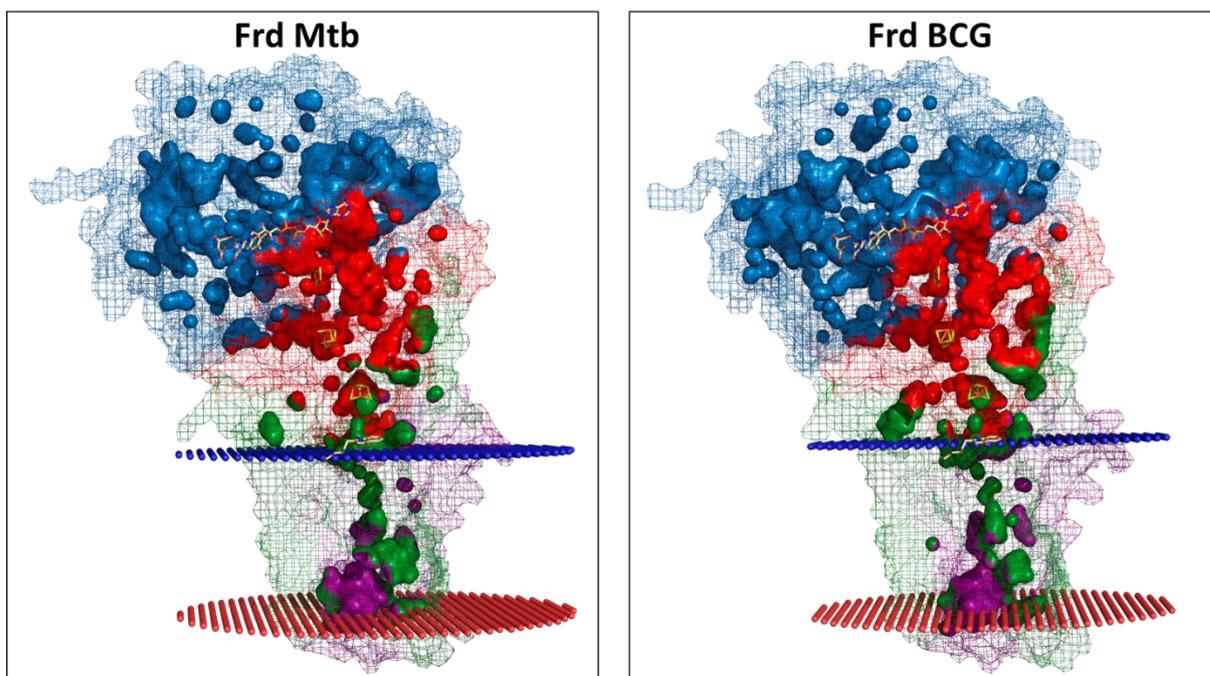


Figura 40 – Detalhe nas cavidades dos complexos da fumarato redutase (*M. tuberculosis* cepa H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau) que interagem diretamente com seus cofatores. Na subunidade A (azul) tem-se FADH₂ e oxaloacetato, na B (vermelho) temos os centros ferro-enxofre, e em C (verde) tem-se a menaquinona. Observa-se nenhuma diferença significativa entre as estruturas apresentadas.

Além disso, analisou-se o mapa de interação entre as coenzimas FAD e menaquinona, além do inibidor oxaloacetato, com os aminoácidos presentes nas respectivas cavidades. Como observado na Figura 41, nota-se que as interações dessas moléculas não-proteicas ocorrem com resíduos diferentes dependendo do complexo analisado.

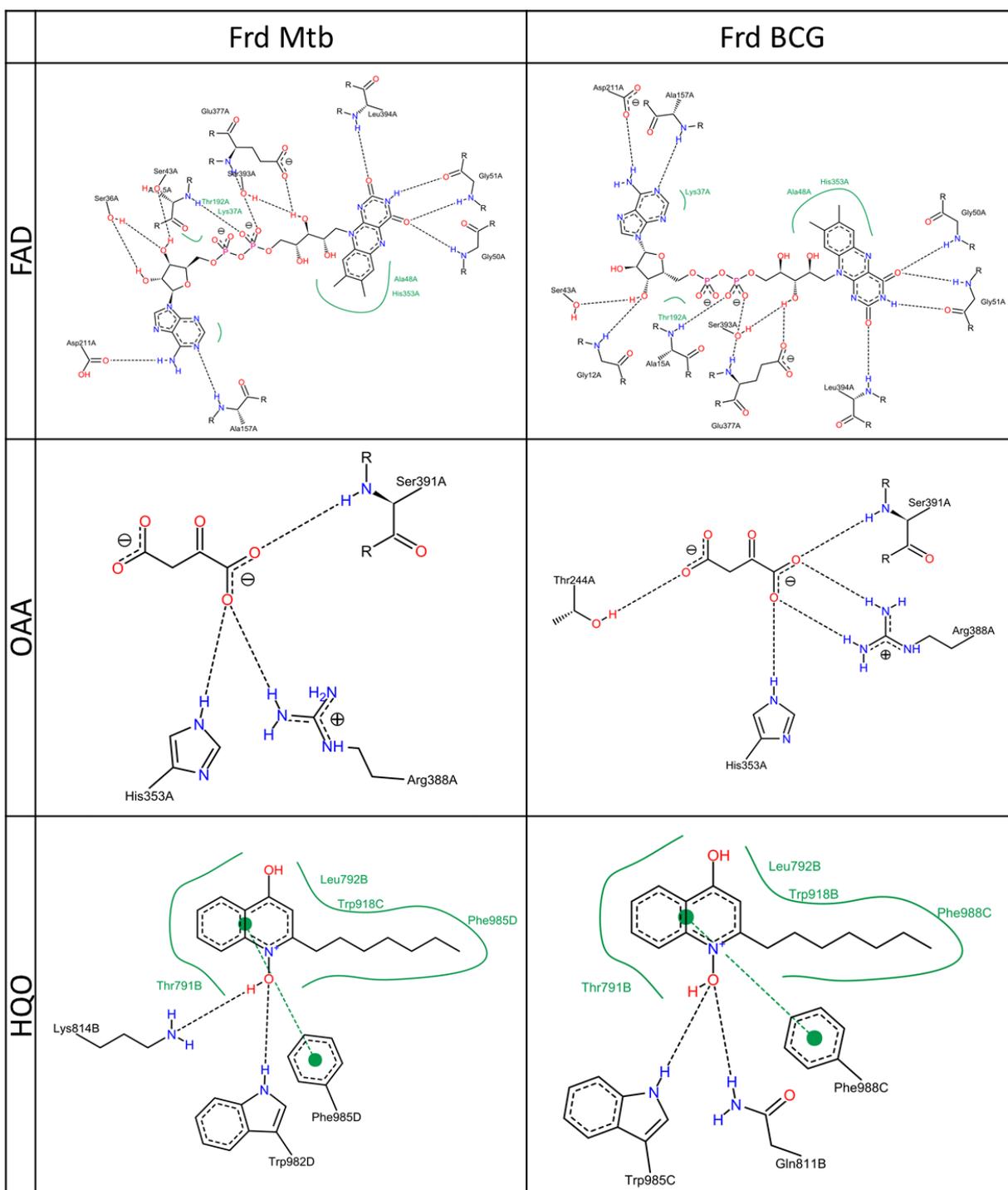


Figura 41 – Mapa de interação das coenzimas FAD e menaquinona, e do inibidor oxaloacetato, com os complexos da fumarato redutase (*M. tuberculosis* cepa H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau).

4.4. Dodecina

4.4.1. Análise *in silico* das sequências de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau e do possível impacto funcional da mutação

Análises *in silico* iniciais mostravam que o produto de *rv1498A* era uma proteína hipotética conservada. Depois de uma revisão bibliográfica sobre o *locus* diagnosticou-se que esse gene codifica uma proteína denominada dodecina, já caracterizada *in vitro* no caso de *M.tb*.

Como pode-se observar na Figura 42, uma transição de um nucleotídeo no homólogo em BCG Moreau muda o códon de início predito para a proteína de *M.tb*, fazendo com que o próximo códon utilizado na tradução teórica da proteína de Moreau seja um GTG. Dessa forma, essa proteína seria menor, não possuindo os sete aminoácidos N-terminais.

Além disso, na Figura 43 mostra-se que a mutação presente em BCG Moreau aparenta ter surgido no clado de *M. africanum* tipo 2 e cepas que infectam animais não-humanos preferencialmente.

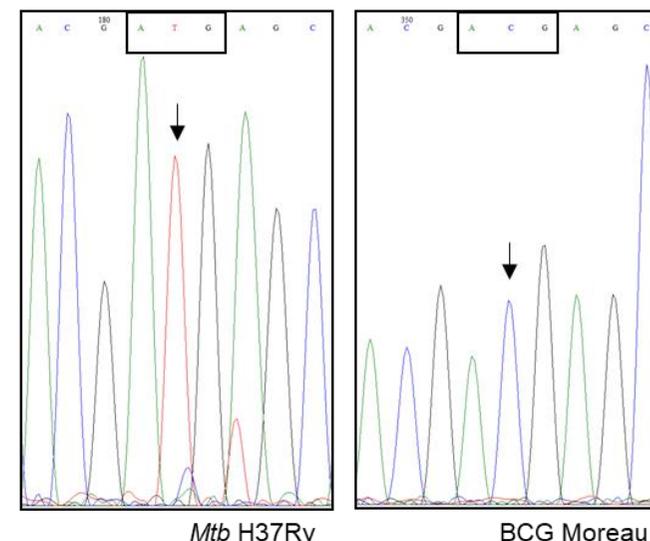
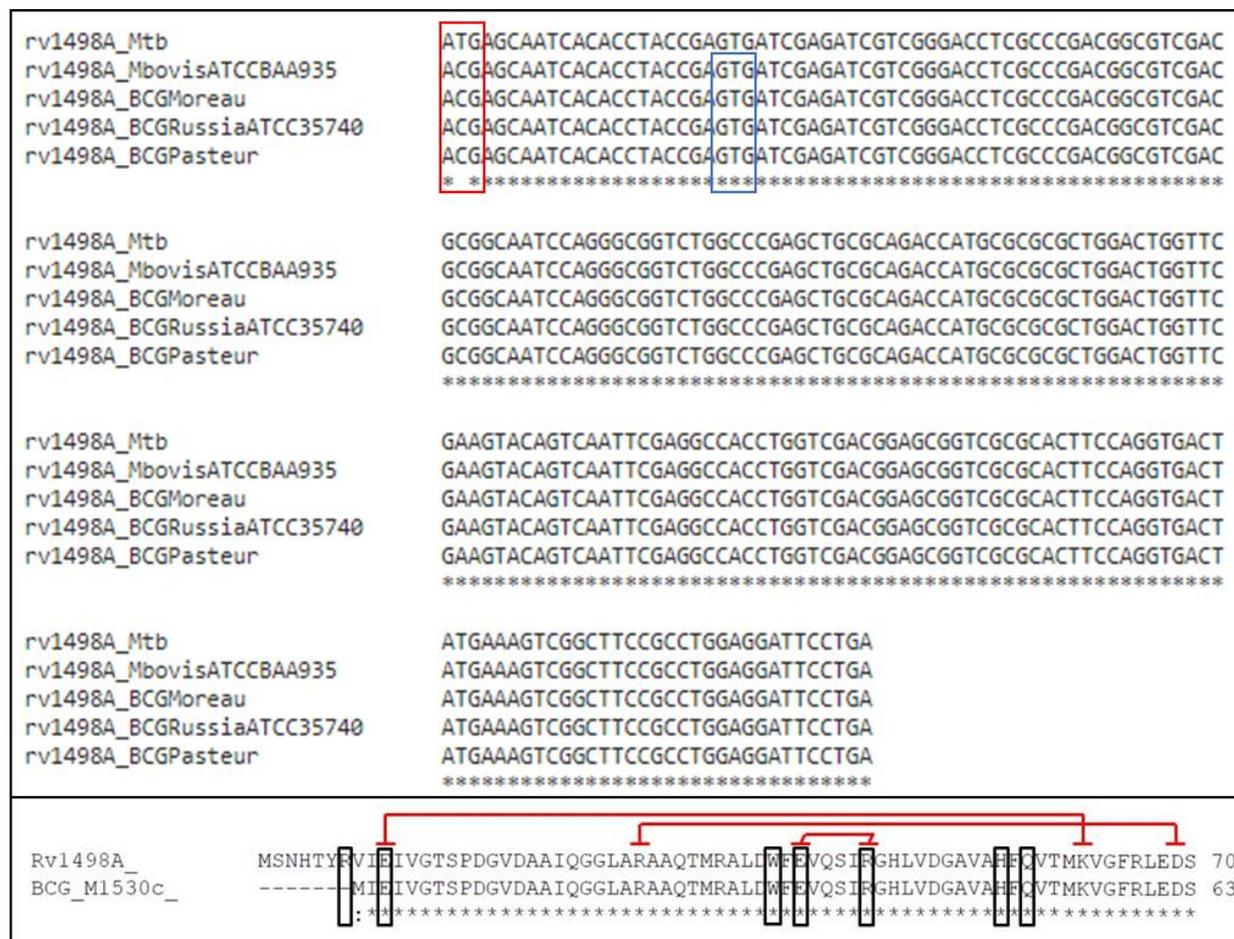


Figura 42 – Análise da mutação presente no gene homólogo a *rv1498A* (dodecina) presente em *M. bovis* BCG Moreau. O destaque em vermelho mostra a sequência correspondente ao códon de início predito para o gene de *M. tuberculosis*, e a mutação (transição) em *M. bovis* BCG Moreau, trocando a timidina de ATG por uma guanósina (ACG). A predição para o códon de início das sequências mutadas é a tríade GTG, em destaque em azul. A mudança do códon de início faz com que a proteína mutada não tenha os sete aminoácidos N-terminais preditos para a proteína de *M. tuberculosis*. No quadro abaixo mostra-se em destaque os aminoácidos (preto) e as ligações entre os mesmos (vermelho) preditos como importantes para a manutenção da estrutura e termoestabilidade da proteína de *M. tuberculosis*. Nos quadros do lado direito mostra-se o resultado do sequenciamento dessa região.

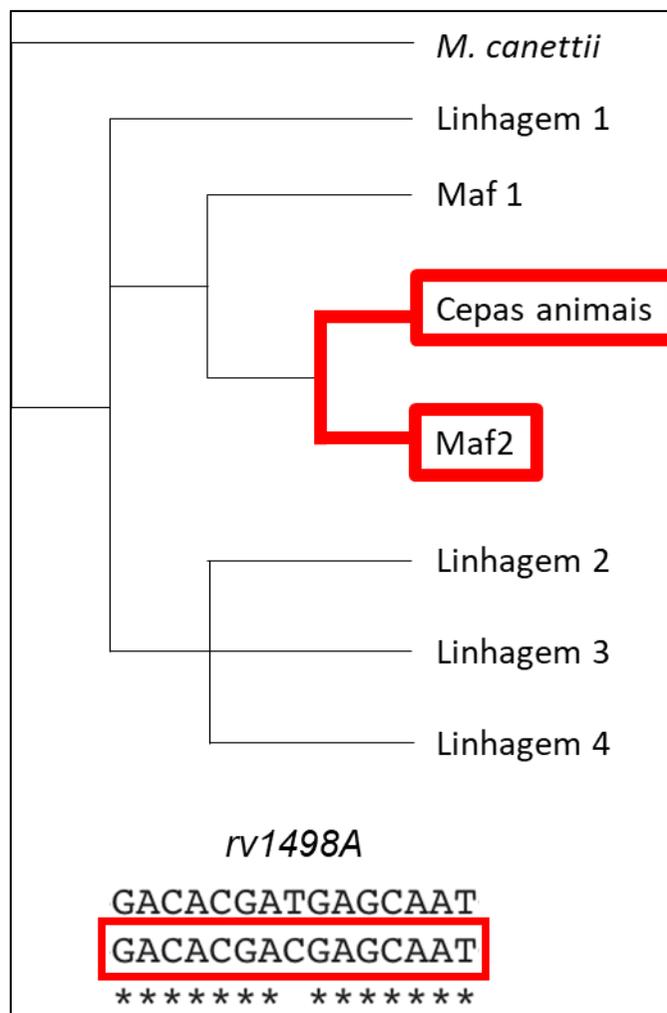


Figura 43 - Filogenia do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, mostrando o surgimento da mutação presente em *rv1498A* de BCG Moreau. Tal resultado foi obtido a partir do alinhamento local das sequências homólogas de diferentes representantes do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, e mostra que a mutação encontrada em *M. bovis* BCG Moreau é específica ao clado de *M. africanum* 2 e cepas que infectam animais não-humanos preferencialmente. Abaixo mostra-se parte do alinhamento, focando na região com a mutação.

4.4.2. Análise da transcrição dos genes estudados por RT-PCR em *M. bovis* BCG Moreau

Na Figura 44 observa-se que há transcritos referentes a *rv1498A* em amostras de RNA oriundas de *M. bovis* BCG Moreau nas diferentes fases de cultivo.

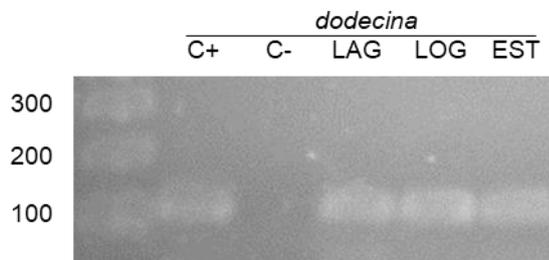


Figura 44 – Análise da transcrição do gene *rv1498A* (dodecina) nas fases lag, log e estacionária (EST) em *M. bovis* BCG Moreau. Para cada reação realizou-se um controle positivo (C+, com DNA genômico) e um negativo (C-, usando RNA sem tratamento com a transcriptase reversa). Cada gel é representativo dos resultados de uma triplicata biológica (n=3).

4.4.3. Produção de dodecina recombinante de *M. bovis* BCG Moreau e de soro policlonal

De todas as proteínas recombinantes produzidas nesse trabalho somente a dodecina foi expressa na fração de proteínas solúveis. Assim, como pode-se observar na Figura 45, essa fração foi usada para purificar a dodecina recombinante de BCG Moreau, já que a mesma também possuía a cauda de histidina, como observado no ensaio de *western blotting* com anticorpo primário anti-his.

Pode-se observar que o soro policlonal consegue identificar a proteína na forma monomérica (cerca de 7 kDa) somente em pequenas diluições, mas consegue identificar também outras bandas de massa molecular maior.

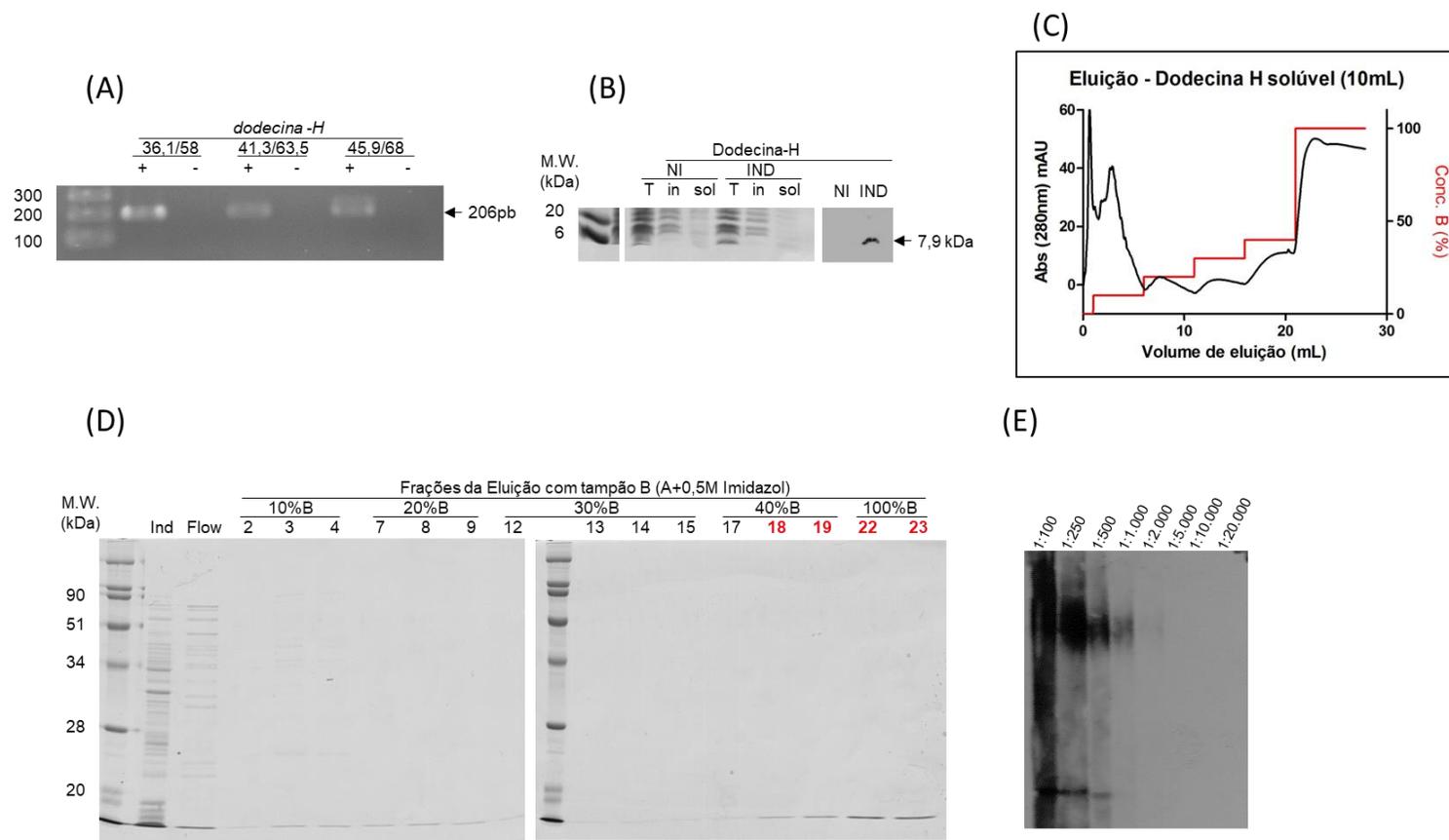


Figura 45 – Resultados gerais da clonagem, expressão e purificação da dodecina de BCG Moreau. (A) Padronização da PCR para o gene *rv1498A*, mostrando resultado positivo para as três combinações de temperatura de anelamento usadas, sendo C– o controle negativo sem DNA; (B) extrato proteico de culturas induzidas (IND) ou não (NI) a expressar a proteína recombinante resolvidas por SDS-PAGE 15%, analisando-se a fração de proteínas totais (T), insolúveis (in) e solúveis (sol) após a lise e clarificação, e *western blotting* com anticorpo primário anti-6His de proteínas fracionadas em gel equivalente; (C) cromatograma obtido durante a purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade por metais imobilizados, mostrando a absorbância a 280 nm (curva preta) e a concentração teórica de imidazol no tampão de eluição (tampão B; curva vermelha); (D) proteínas resolvidas em géis SDS-PAGE 15%, mostrando a amostra aplicada na coluna (Ind), proteínas não-ligadas (Flow) e as frações da eluição com o tampão B nas suas diferentes concentrações; (E) titulação do soro policlonal obtido contra a proteína recombinante purificada (*pool* das frações em destaque em vermelho em D).

4.4.4. Produção de dodecina recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv

No caso da dodecina, decidiu-se produzir também a proteína recombinante codificada pelo alelo de *M.tb*, ou seja, contendo os sete aminoácidos N-terminais. Na Figura 46 mostra-se o resumo das etapas de produção dessa proteína recombinante.

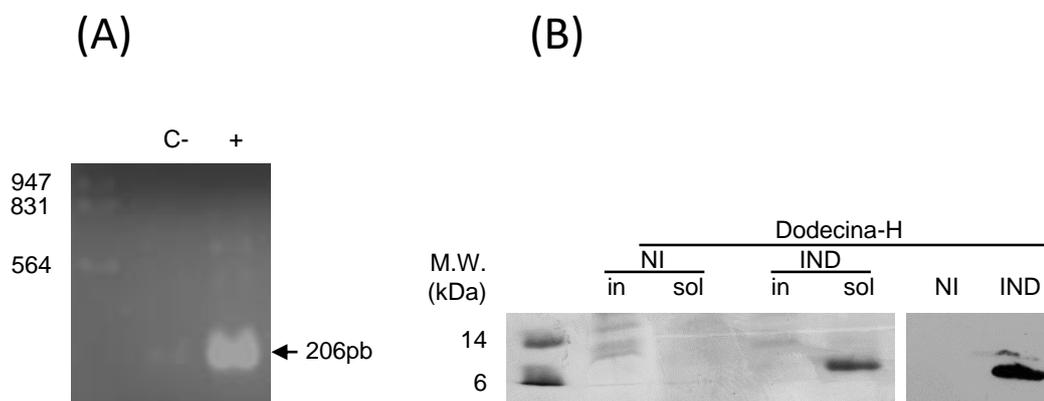


Figura 46 - Resultados gerais da clonagem, expressão e purificação da dodecina de *M. tuberculosis*. (A) Padronização da PCR para clonar o gene *rv1498A*, sendo C- o controle negativo sem DNA; (B) extrato proteico de culturas induzidas (IND) ou não (NI) a expressar a proteína recombinante resolvidas por SDS-PAGE 15%, analisando-se a fração de proteínas insolúveis (in) e solúveis (sol) após a lise e clarificação, e *western blotting* com anticorpo primário anti-6His com extratos proteicos totais de culturas induzidas e não-induzidas.

4.4.5. Análise da expressão de dodecina em *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau nas diferentes fases de cultivo axênico

Usando o soro policlonal produzido contra a proteína de BCG Moreau, identificou-se em extratos proteicos de BCG e *M.tb* uma banda de cerca de 37 kDa, que corresponderia à forma hexamérica da proteína. Além disso, pode-se observar que a proteína foi expressa em todas as fases do cultivo em meio axênico, com menor representatividade na fase inicial.

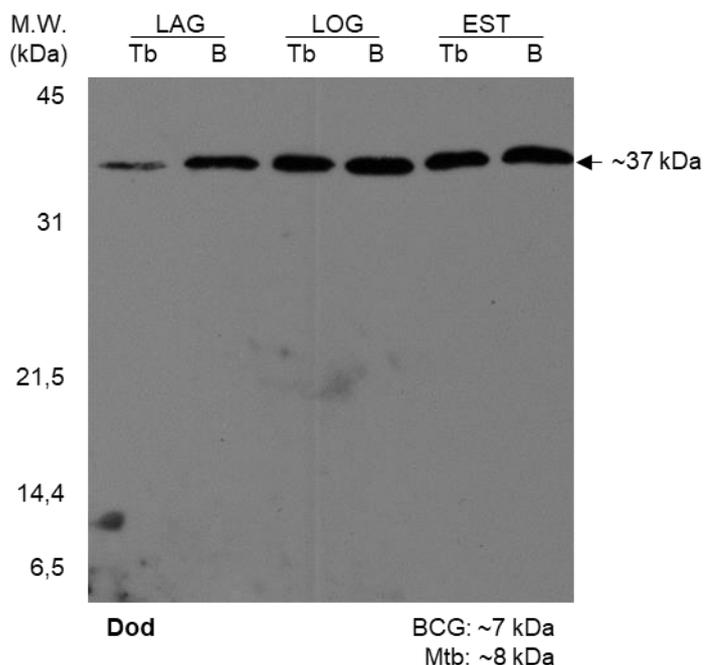


Figura 47 - Análise da expressão de dodecina. Extrato proteico total de culturas de *M. bovis* BCG Moreau (B) e *M. tuberculosis* cepa H37Rv (Tb) nas três fases de crescimento *in vitro* (LAG, LOG e EST) foi resolvido em géis SDS-PAGE 15%. Experimentos de *western blotting* foram realizados usando o soro policlonal contra a proteína recombinante. A imagem é representativa dos resultados de uma triplicata biológica (n=3).

4.4.6. Análise da solubilidade de dodecina nativa de *M. bovis* BCG Moreau por extração diferencial com Triton X-114

Após a extração proteica diferencial e a realização do ensaio de *western blotting* com o soro policlonal contra a dodecina de BCG, pode-se observar na Figura 48 que essa proteína, em BCG Moreau, encontra-se associada à fração de proteínas hidrossolúveis.

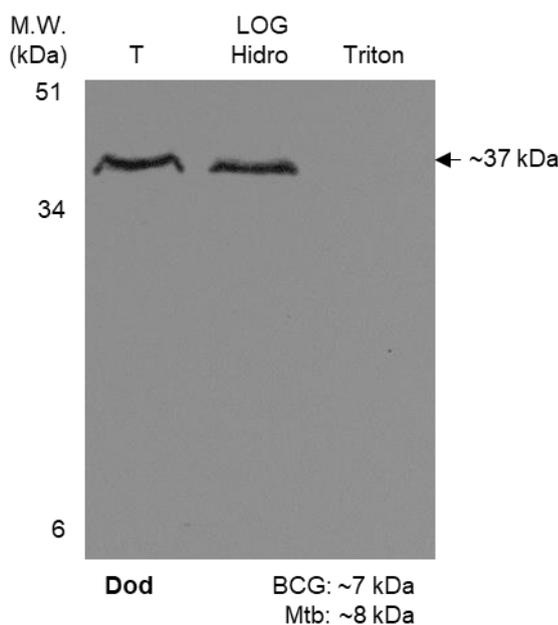


Figura 48 - Análise da hidrofobicidade/associação com membranas de dodecina. Extrato diferencial das proteínas de *M. bovis* BCG Moreau na fase log com o uso de Triton X-114, assim como descrito em Malen *et al.*, 2010. Proteínas do extrato total (T) e da fração aquosa (Hidro) e hidrofóbica (Triton) após o protocolo de extração diferencial foram resolvidas em SDS-PAGE 15%. Experimentos de *western blotting* foram realizados usando o soro policlonal contra a proteína recombinante. A imagem é representativa dos resultados de uma triplicata biológica (n=3)

4.4.7. Análise do impacto da mutação na estrutura, termo e haloestabilidade das dodecinas recombinantes

Para iniciar o estudo do impacto nesse *locus*, investigou-se os efeitos da mutação presente em BCG Moreau em características já descritas para outras dodecinas na literatura, como sua capacidade de oligomerizar (com 12 subunidades idênticas) e desse dodecâmero ser bastante termo e haloestável. Para tal, iniciou-se experimentos com as proteínas recombinantes produzidas (tanto de BCG como de *M.tb*).

Como pode-se observar na Figura 49, a proteína de BCG Moreau, com e sem a cauda de histidina, consegue se oligomerizar, assim como a de *M.tb*, mas apresentam um baixo ou nenhum sinal da forma monomérica após revelação.

No quesito de termoestabilidade, a proteína de BCG permanece em solução na forma de dodecâmero somente até incubações a 40 °C, enquanto a isoforma de *M.tb* permanece até a temperatura de 100 °C. Padrão similar é observado no ensaio de haloestabilidade, no qual a proteína de BCG permanece em solução em condições de força iônica de até 2 M de NaCl, enquanto a de *M.tb* permanece até 5 M.

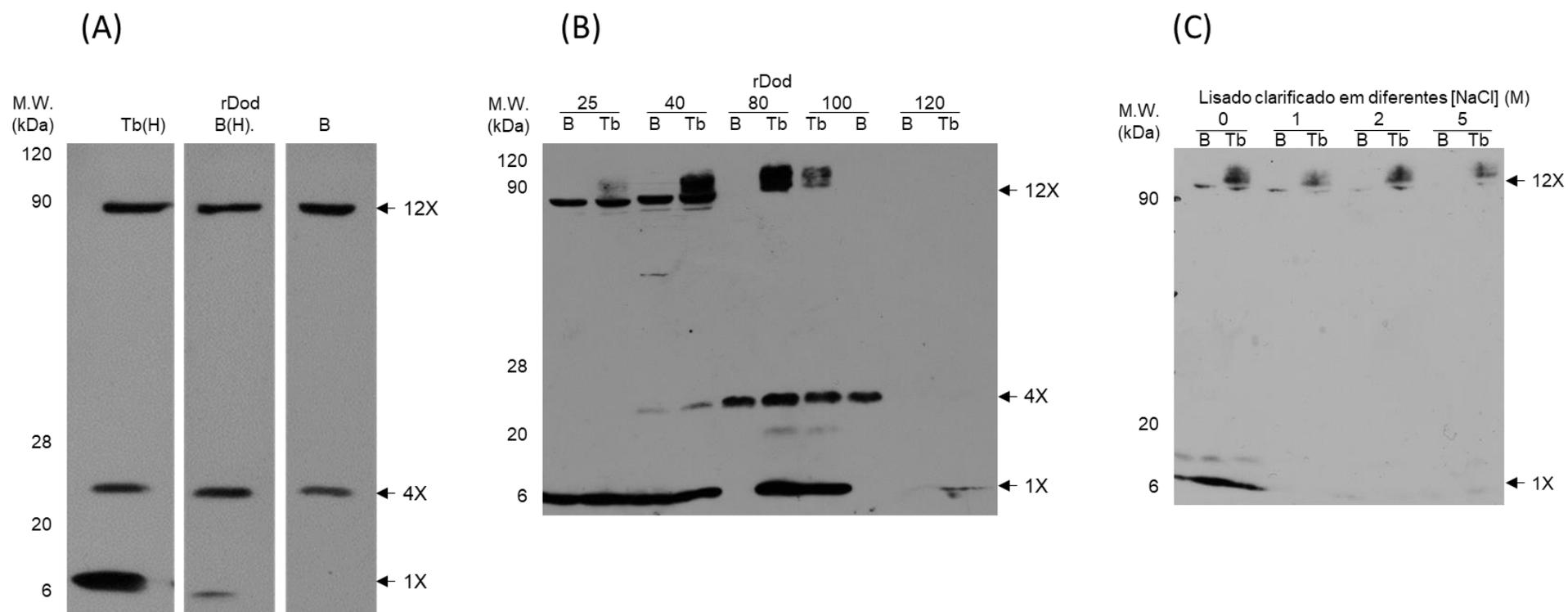


Figura 49 – Ensaio em gel com as dodecinas recombinantes de *M. bovis* BCG Moreau e *M. tuberculosis* cepa H37Rv. Para tais experimentos, utilizou-se extratos proteicos dos clones de *E. coli* induzidos para expressar a proteína recombinante. Os resultados foram visualizados após ensaios de *western blotting* usando o soro policlonal contra a proteína recombinante. Em (A) utiliza-se o extrato total, enquanto em (B) e (C) os extratos foram previamente incubados por 30 min em diferentes temperaturas e concentrações salinas, respectivamente. As proteínas que permaneceram em solução foram analisadas. Cada imagem é representativa dos resultados de uma triplicata biológica (n=3)

4.4.8. Análise do impacto da mutação na capacidade de ligação à riboflavina das dodecinas recombinantes e extratos proteicos micobacterianos

Analisou-se a capacidade de ligação à riboflavina de extratos proteicos contendo as dodecinas recombinantes e nativas. Como pode-se observar no gráfico à esquerda da Figura 50, extratos proteicos contendo a dodecina recombinante de *M.tb* (que contém os sete aminoácidos N-terminais) se ligam mais à riboflavina do que a proteína de BCG Moreau. Porém, tal fato não foi observado quando se utilizou extratos proteicos contendo as dodecinas nativas de *M.tb* e BCG Moreau, já que não houve diferença significativa entre os valores obtidos com esses extratos. Isso pode ser visto no gráfico à direita da Figura 50.

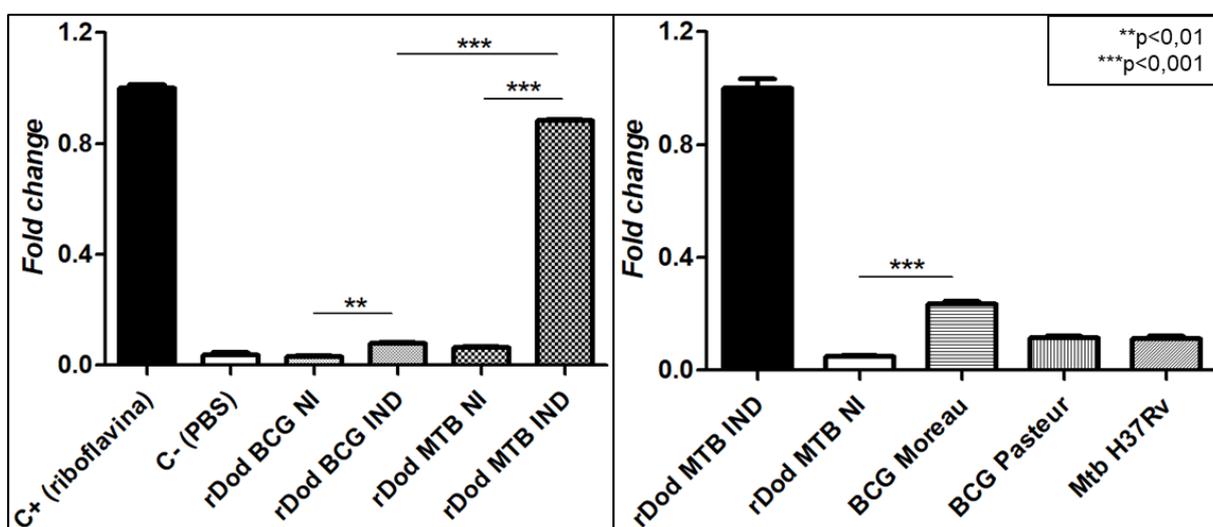


Figura 50 - Análise do impacto da mutação na capacidade de ligação à riboflavina das dodecinas. Para o ensaio com as proteínas recombinantes, utilizou-se extrato proteico total de *E. coli* induzidas (IND) ou não (NI) para expressar dodecina recombinante de BCG (rDod BCG) ou de *M.tb* (rDod MTB). No gráfico da esquerda mostra-se a análise da ligação de riboflavina ($\lambda=450$ nm) das dodecinas recombinantes comparando-se com valores de solução saturada de riboflavina (C+) e usando-se PBS 1X como controle negativo (C-). Para a análise das proteínas nativas, usou-se extrato proteico total de BCG Moreau, Pasteur e *M. tuberculosis*, e os resultados de tal análise são apresentados no gráfico da direita, comparando-se com valores da dodecina recombinante de *M.tb* (rDod MTB IND) e usando-se extrato proteico do clone que expressa dodecina recombinante de *M.tb* sem indução como controle negativo (rDod MTB NI). Os pontos no gráfico representam a média +/- o desvio padrão de uma triplicata biológica (n=3). A análise estatística foi realizada por teste t não-pareado. **p<0,01, ***p<0,001.

4.4.9. Análise do impacto da mutação na termoestabilidade da dodecina nativa

Como pode-se observar na Figura 51, diferentemente das dodecinas recombinantes, as proteínas nativas apresentam estabilidade térmica similares, permanecendo em solução com incubações de até 80 °C.

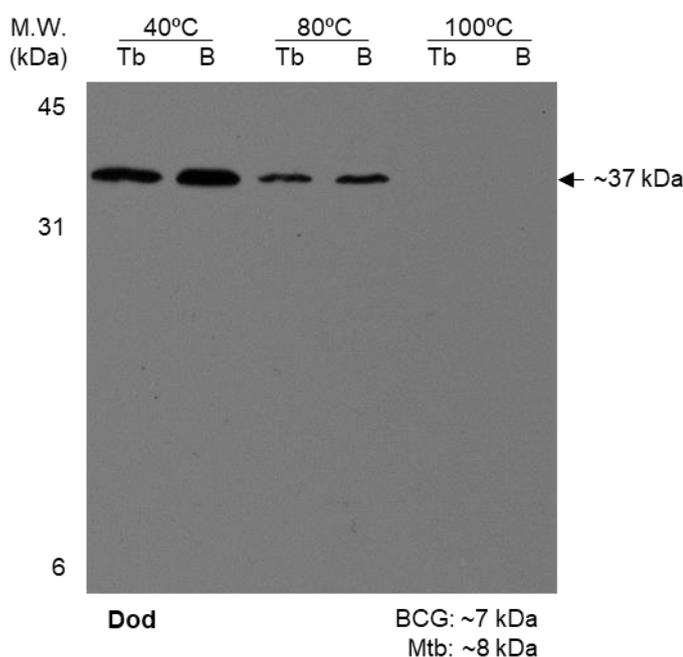


Figura 51 – Análise da termoestabilidade da dodecina nativa. Proteínas que permaneceram solúveis após incubação em diferentes temperaturas (40, 80 e 100 °C) do extrato proteico total de culturas de *M. bovis* BCG Moreau (B) e *M. tuberculosis* cepa H37Rv (Tb) na fase LOG de crescimento foram resolvidas em géis SDS-PAGE 15%. Experimentos de *western blotting* foram realizados usando o soro policlonal contra a proteína recombinante. A imagem é representativa dos resultados de uma triplicata biológica (n=3).

4.4.10. Mutante Δ dod em *M. bovis* BCG Moreau

Inicialmente, tentou-se criar um mutante de BCG Moreau contendo a deleção do gene da dodecina, seguindo o racional já descrito para os outros mutantes produzidos nesse trabalho, e como resumido na Figura 52.

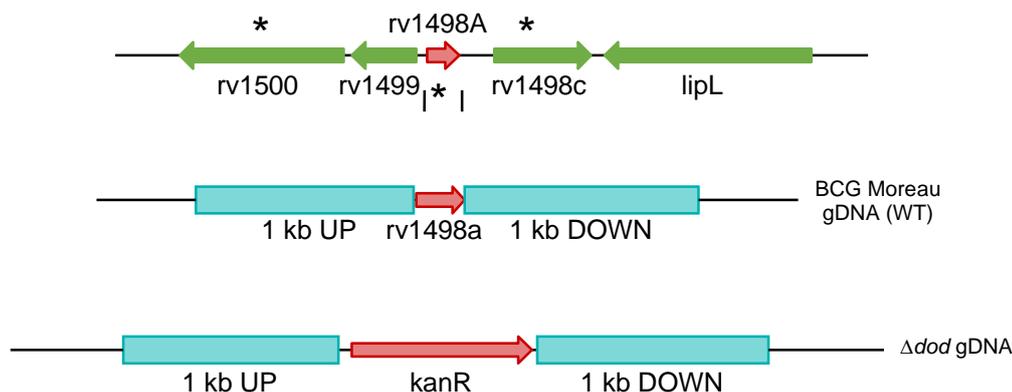


Figura 52 – Esquema da organização gênica do locus de *rv1498A* (e genes circundantes) na cepa selvagem e no *knockout*. Os asteriscos mostram genes ao redor da sequência analisada que possuem mutações quando comparados os genomas de *M.tb* e BCG Moreau.

Após o cultivo em meio seletivo, não se obteve colônias para nenhuma das duas metodologias usadas: *recombineering* e transdução especializada. Dessa forma, realizou-se uma segunda tentativa para produzir o mutante contendo a deleção de *rv1498A*. Para tal, repetiu-se o protocolo de *recombineering* com já descrito, mas para a transdução especializada utilizou-se também BCG Pasteur (organismo que é o controle positivo para a técnica) e o fago para realizar a deleção de *rv1371/2/3* (locus que é o controle de região passível de ser deletada). Para potencializar a recombinação homóloga, usou-se BCG Moreau portando as recombinases oriundas de pJV53H para tentar a transdução especializada com o fago portando o substrato de troca alélica para o gene da dodecina.

Tabela 24 – Resumo das tentativas de obtenção de mutantes com deleção no gene da dodecina em *M. bovis* BCG Moreau utilizando o protocolo de transdução especializada. Os valores correspondem ao número de colônias obtidas depois de cultivo em meio seletivo, que eram triadas por PCR para caracterizar como um *knockout* verdadeiro (+) ou frutos de recombinação ilegítima (-).

Transdução especializada		
	<i>rv1371/2/3</i>	dodecina
BCG Pasteur	16 (+)	6 (-)
BCG Moreau	8 (-)	X
BCG Moreau + pJV53H	N.D.	X

Após todas as tentativas, não se obteve colônias com o padrão correto na PCR, condizente ao *knockout* de *rv1498A*, depois do cultivo em meio seletivo.

4.4.11. Mutante condicional Δ *dod* em *M. bovis* BCG Moreau

De modo a analisar a essencialidade do gene *rv1498A* para BCG Moreau, tentou-se construir o mutante *knockdown*, no qual pretendia-se substituir o promotor do gene por aquele presente no cassete gênico. Na Figura 53 observa-se o racional, em forma de esquema, usado para criar o mutante, inserindo o cassete entre as regiões *UP* e *DOWN*.

Após o cultivo em meio seletivo, obteve-se diversas colônias, mas todas apresentavam o padrão de bandas após a PCR condizentes à organização genética da cepa selvagem (Figura 53).

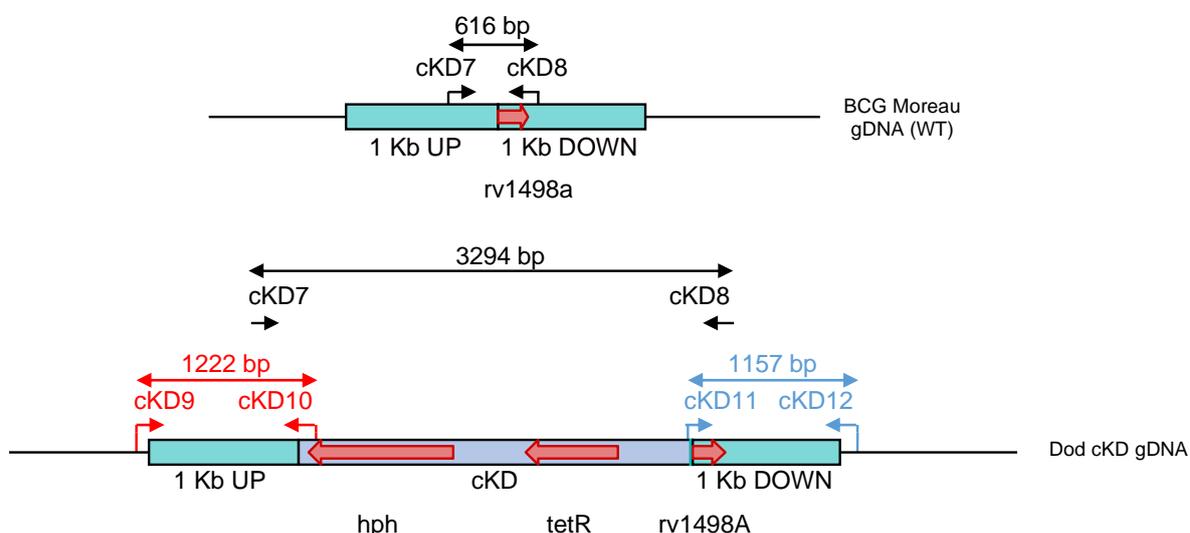


Figura 53 – Esquema da organização gênica do locus de *rv1498A* na cepa selvagem e no mutante *knockdown*. Mostra-se os iniciadores utilizados para testar a estrutura genética dos clones obtidos após cultivo em meio seletivo, e o tamanho dos fragmentos para cada identidade gênica.

4.4.12. Modelagem por homologia da dodecina de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau, e análises comparativas

Após realizada a modelagem por homologia obteve-se as estruturas dos dodecâmeros das dodecinas codificadas por *M.tb* cepa H37Rv e BCG Moreau (Figura 54).

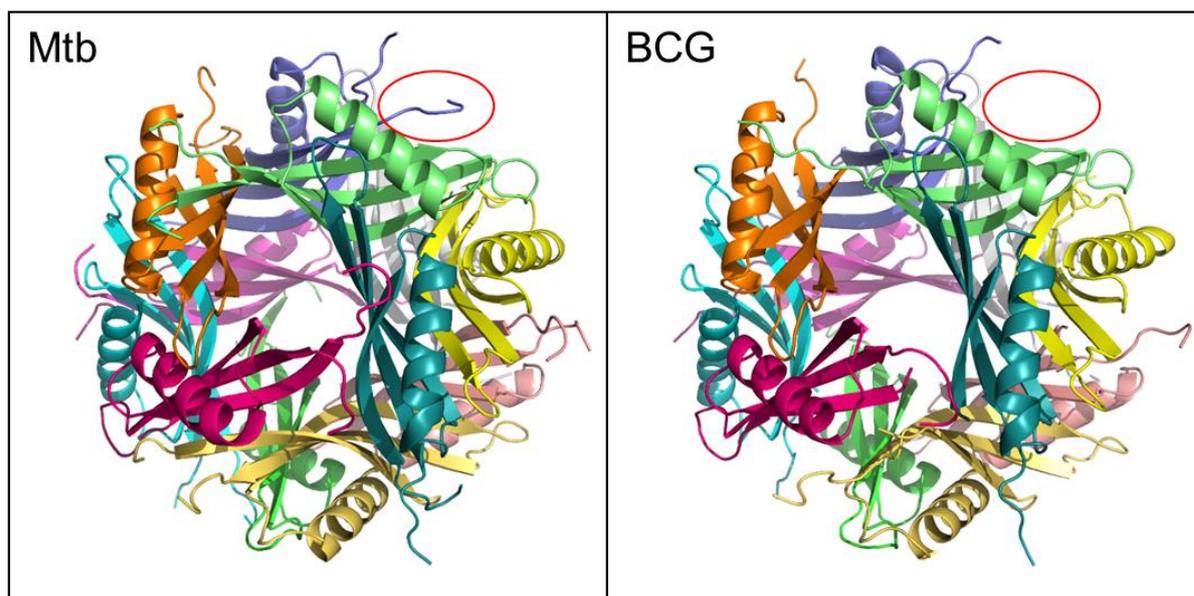


Figura 54 - Estrutura tridimensional das dodecinas na forma dodecamérica de *M. tuberculosis* cepa H37Rv (Mtb) e *M. bovis* BCG Moreau (BCG). Mostra-se em destaque em vermelho a alça na extremidade correspondendo aos sete aminoácidos N-terminais que são retirados da estrutura da proteína de BCG. Tal detalhe é somente em uma das subunidades, mas vale lembrar que tal fato é verdadeiro para todas as doze unidades.

A partir da visualização dos modelos percebe-se que a grande diferença é a falta do *loop* condizente aos sete aminoácidos N-terminais em cada monômero na isoforma de BCG. Além disso, nota-se na Figura 55 que a alça presente na proteína de *M.tb* participa na interação entre duas subunidades vizinhas.

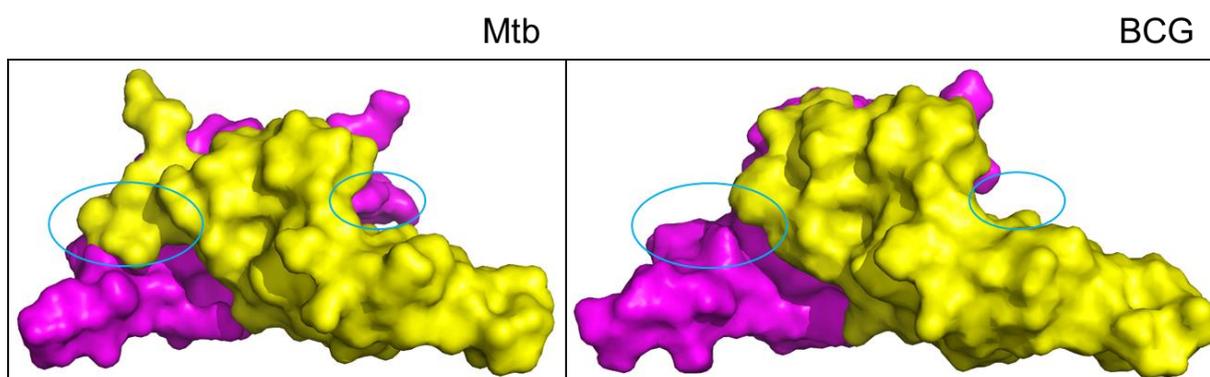


Figura 55 – Detalhe da interação de dois monômeros nos modelos das dodecinas de *M. tuberculosis* (Mtb) e *M. bovis* BCG Moreau (BCG). Nesse caso, mostra-se dois monômeros adjacentes e, em destaque em azul, indica-se a estrutura correspondente aos sete aminoácidos N-terminais inexistentes na proteína de BCG. Tal fato diminui a interação entre as cadeias vizinhas na estrutura quaternária.

Com o modelo disponível fez-se análises de energia de interação entre as doze unidades dentro do próprio complexo. Como se observa na Figura 56, as subunidades de dodecinas de *M.tb* apresentam uma energia de interação maior quando comparado com os monômeros do complexo de BCG Moreau.

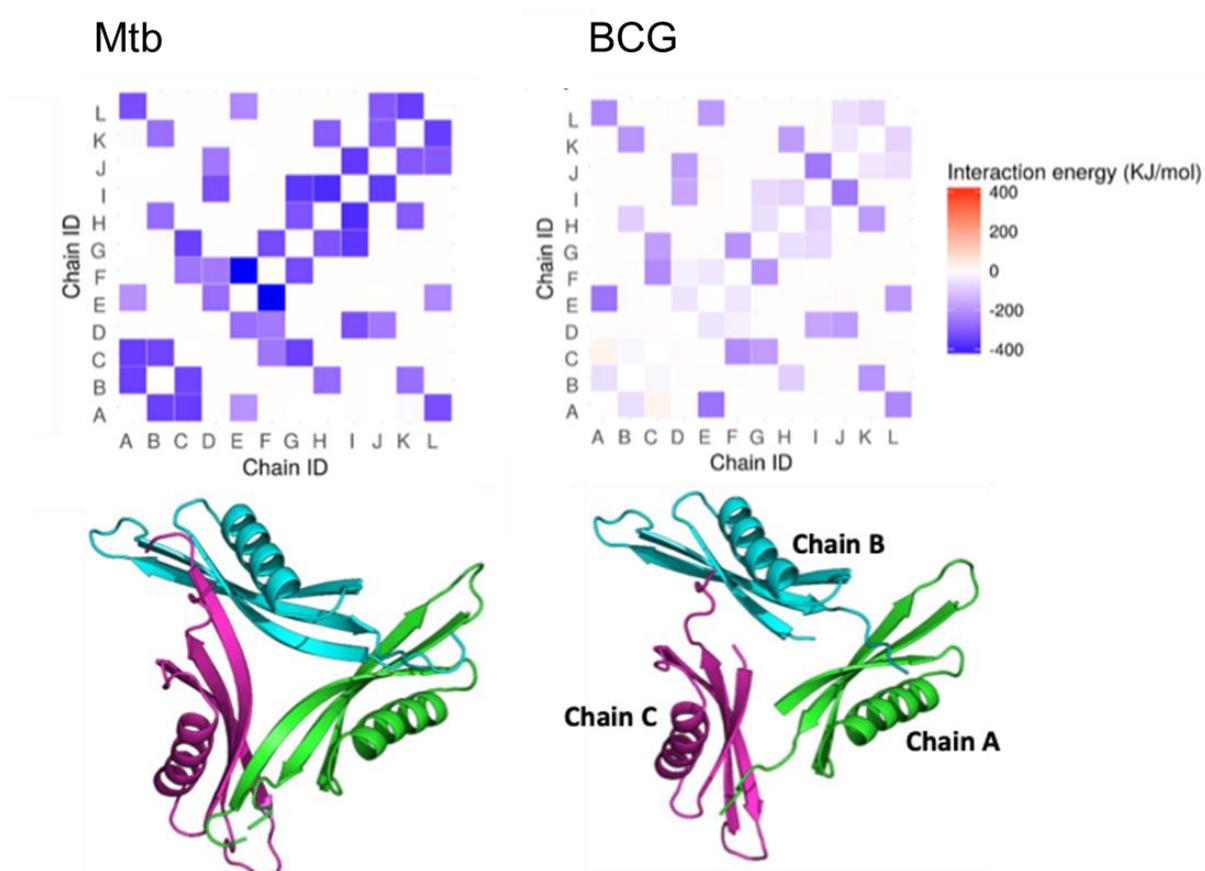


Figura 56 - Energia de interação intercadeia nos modelos de dodecina de *M. tuberculosis* cepa H37Rv (*Mtb*) e *M. bovis* BCG Moreau (*BCG*). Os *heatmaps* mostram as energias de interação intercadeia nos modelos. As estruturas abaixo destacam uma das faces de cada um dos modelos gerados, mostrando as relações estruturais entre as cadeias A, B e C. É possível perceber que a superfície de contato na dodecina de BCG Moreau com as cadeias vizinhas é reduzida por conta do N-terminal reduzido, o que explica a menor energia de interação com as cadeias vizinhas.

Por fim, analisou-se a superfície eletroestática da cavidade que interage com a riboflavina, de maneira a observar se há diferença nessa variável entre as isoformas das bactérias estudadas. Como observado na Figura 57, enquanto os complexos de *Halorhodospira halophila* e *M.tb* H37Rv possuem uma pequena cavidade com cargas positivas cercadas por cargas negativas, o sítio de ligação no modelo da BCG Moreau possui uma espécie de fenda com cargas positivas.

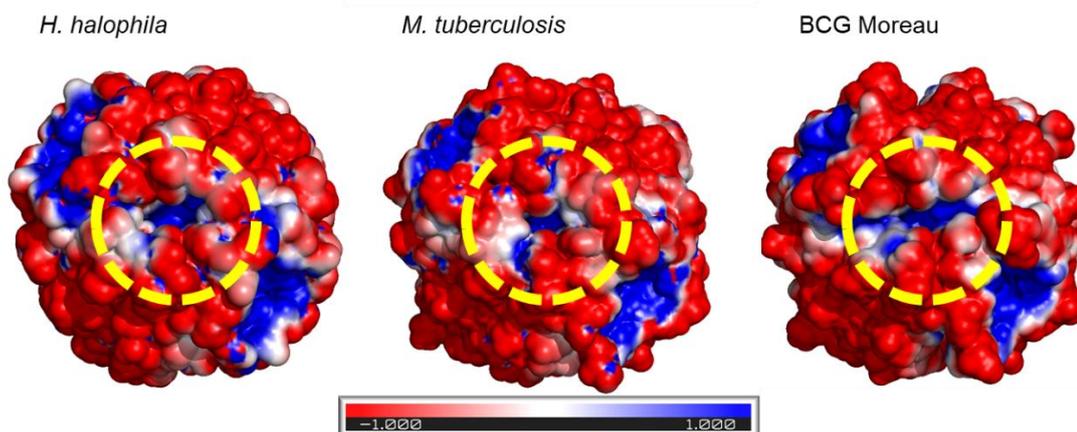


Figura 57 – Superfície eletrostática do sítio de ligação da riboflavina dos modelos de dodecina de *M. tuberculosis* cepa H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau. São mostradas as superfícies eletrostáticas de três moléculas de dodecina: dodecina de *Halorhodospira halophila* cristalizada em complexo com a riboflavina, modelo da dodecina de *M. tuberculosis* H37Rv e modelo da dodecina de BCG Moreau. Os círculos amarelos destacam o sítio de ligação da riboflavina.

4.4.13. Complementação de *M. smegmatis* mc²155 com alelos de dodecina de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau: impacto no crescimento em meio axênico e análise da expressão da dodecina recombinante

Através de ferramentas de busca por sequências homólogas, observou-se que no genoma de *M. smegmatis* mc²155 não há genes homólogos a *rv1498A*. Com isso, pretendeu-se complementar essa bactéria com os alelos codificantes para a dodecina (com seu próprio promotor) de *M.tb* e BCG Moreau, e analisar o impacto dessa complementação nas cepas produzidas.

Como se observa na Figura 58, a cepa contendo o plasmídeo vazio é facilmente caracterizada por PCR, produzindo uma banda menor do que aquelas oriundas das cepas complementadas com os genes das dodecinas. Estas últimas são diferenciadas apenas por sequenciamento.

Além disso, observa-se que as cepas complementadas produzem a proteína recombinante, e que estas possuem a cauda de histidina C-terminal.

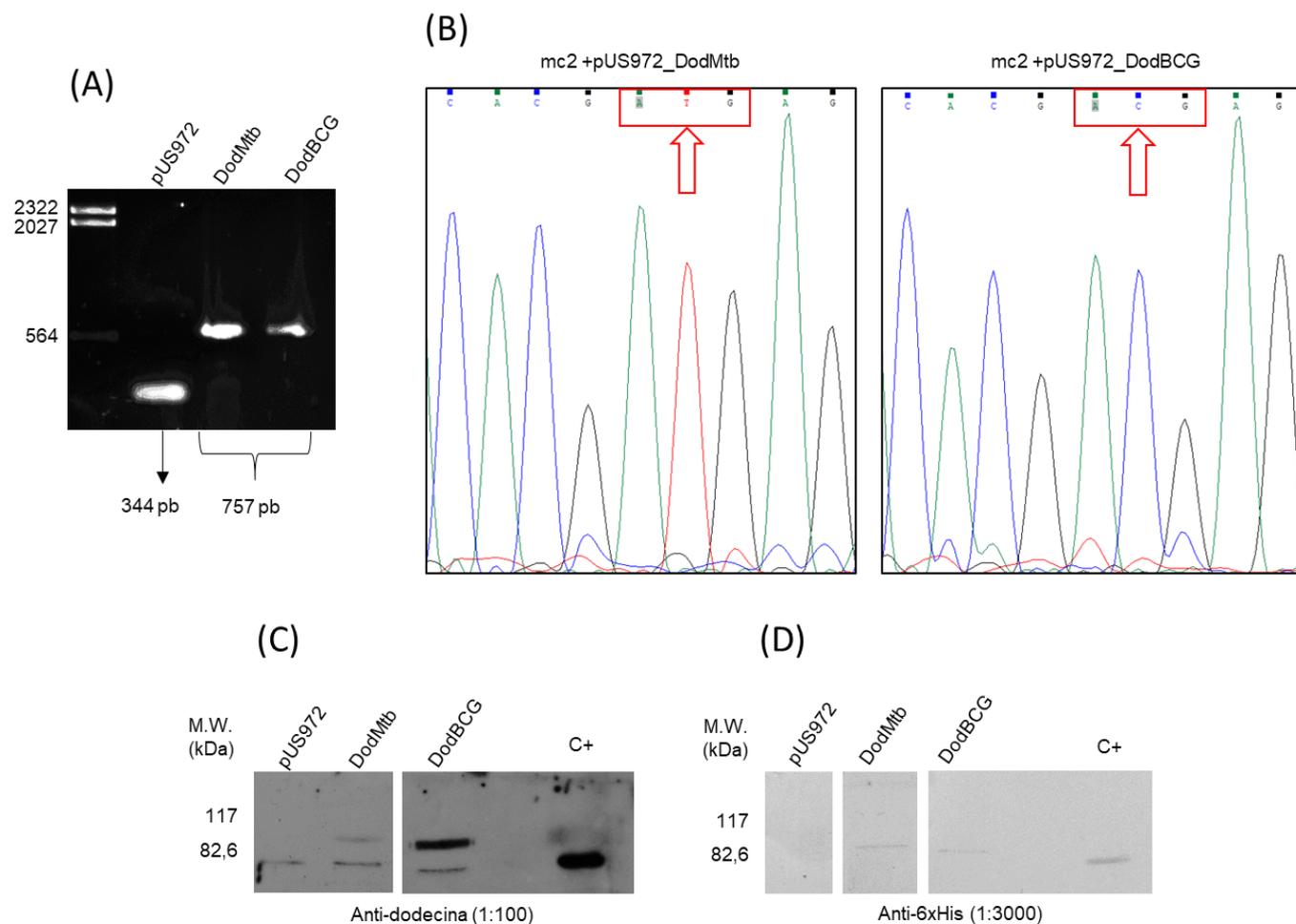


Figura 58 – Resultados gerais da complementação de *M. smegmatis* mc²155 com os alelos de dodecina de *M. tuberculosis* cepa H37Rv e *M. bovis* BCG Moreau. (A) Padrão de bandas após PCR para diferenciar o plasmídeo vazio daqueles que possuem os alelos de *rv1498A*; (B) Eletroesferogramas do sequenciamento com os plasmídeos portando os alelos para complementação, diferenciando ambos; Ensaio *western blotting* para confirmar a presença das dodecinas heterólogas no extrato proteico total de *M. smegmatis* portando os plasmídeos de complementação, usando soro policlonal contra a dodecina (C) ou anticorpo anti-his (D).

Após acompanhar o crescimento em meio axênico das cepas produzidas, obteve-se os resultados mostrados na Figura 59. Nota-se que as cepas complementadas, independente do alelo que foi usado para a complementação, possuem uma taxa de crescimento maior quando entram na fase logarítmica do cultivo *in vitro* quando comparadas com a cepa com o plasmídeo vazio. Entretanto, todas as cepas alcançam o mesmo nível de saturação em tempos de cultivo similares. Além disso, quando comparadas somente as cepas complementadas observa-se que não há diferença significativa no crescimento.

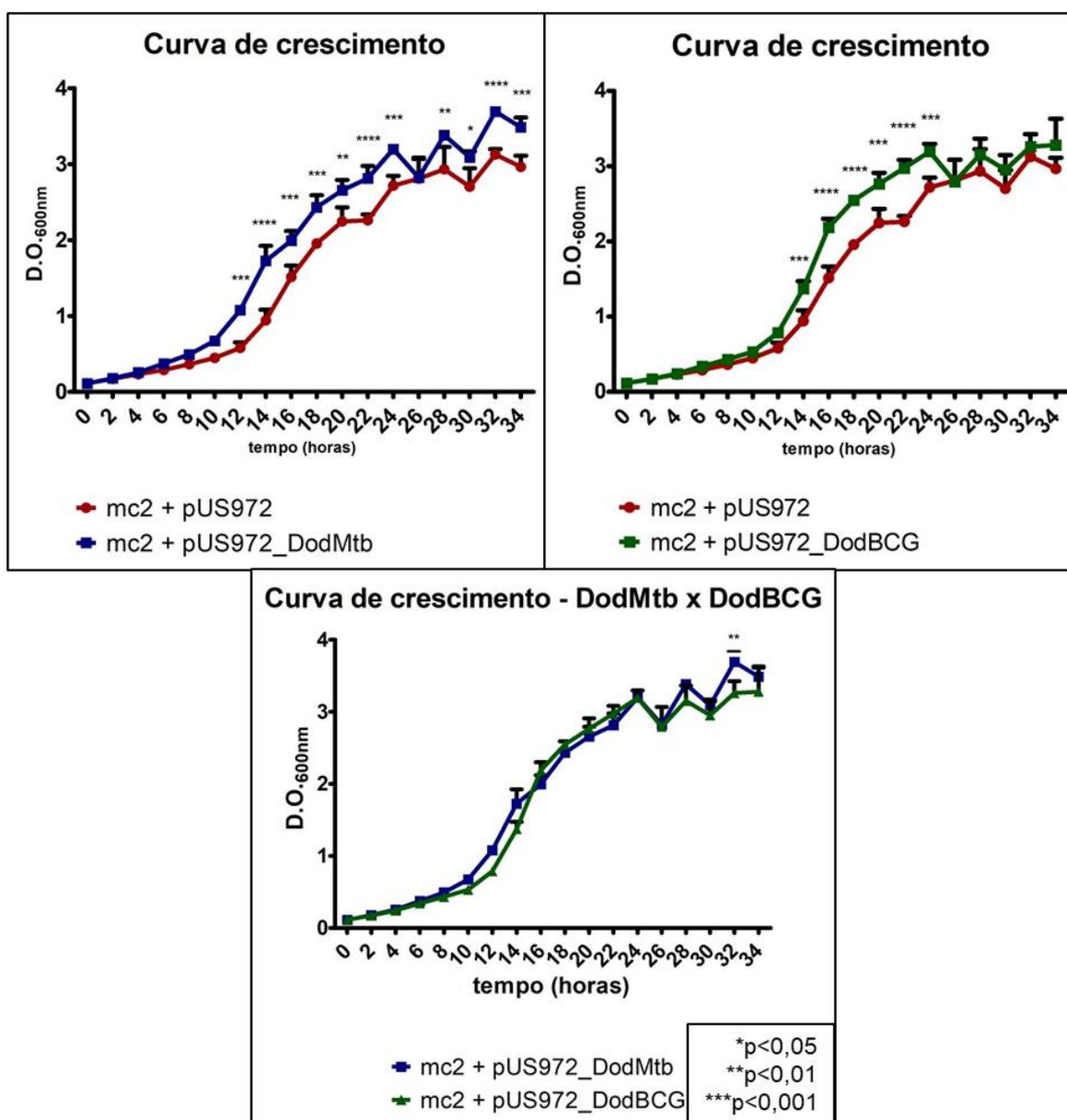


Figura 59 – Curva de crescimento comparativa de *M. smegmatis* mc²155 portando o plasmídeo vazio (pUS972) ou complementada com o gene da dodecina de *M. tuberculosis* (pUS972_DodMtb) ou de *M. bovis* BCG Moreau (pUS972_DodBCG). Os pontos no gráfico representam a média +/- o desvio padrão de uma triplicata biológica (n=3). A análise estatística foi realizada por teste t não-pareado. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Quando se analisa a expressão das dodecinas heterólogas nas diferentes fases de cultivo em meio axênico, observa-se que ocorre o acúmulo dessa proteína quando se avança o tempo de cultura, tendo o seu máximo na fase estacionária.

Através de análises densitométricas observa-se que da fase logarítmica (16 h) para a estacionária (24 h) aumenta-se cerca de 6 vezes o acúmulo de dodecina no caso da cepa complementada com o alelo de *M.tb*, e 5 vezes para o de BCG Moreau.

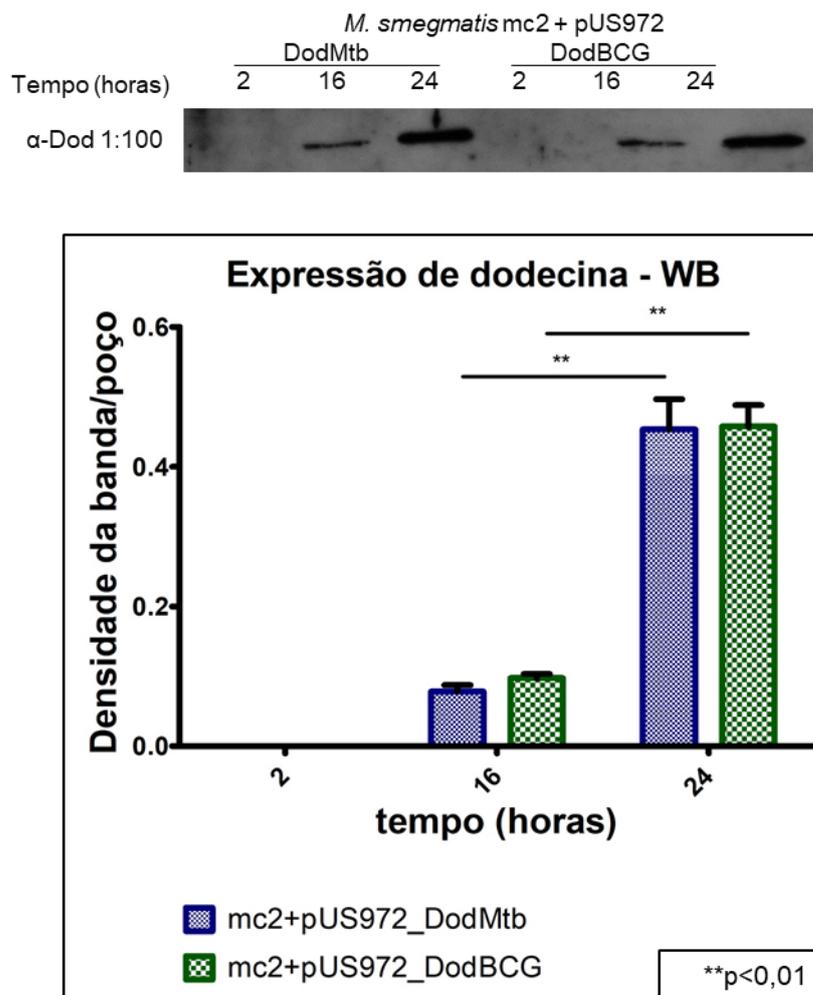


Figura 60 – Análise do acúmulo de dodecina nas cepas complementadas de *M. smegmatis* mc²155 com os alelos de *rv1498A* em diferentes fases do cultivo em meio axênico. No topo observa-se o resultado de um ensaio de *western blotting* usando o extrato total de *M. smegmatis* mc²155 complementada com o alelo de *M. tuberculosis* (DodMtb) ou *M. bovis* BCG Moreau (DodBCG) e o soro policlonal contra dodecina com anticorpo primário. O gráfico foi confeccionado a partir da análise densitométrica das bandas oriundas de uma triplicata biológica (n=3). Os pontos no gráfico representam a média +/- o desvio padrão. A análise estatística foi realizada por teste t não-pareado. **p<0,01.

4.4.14. Impacto da complementação na resposta ao estresse oxidativo em *M. smegmatis* mc²155

Para analisar o impacto da complementação com os diferentes alelos na sobrevivência em meio com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) realizou-se o cultivo na presença desse aditivo na concentração de 15 mM e acompanhou-se o crescimento por espectrofotometria a 600 nm.

Como pode-se observar na Figura 61, a cepa com o plasmídeo vazio apresenta um decréscimo no crescimento quando exposta ao H₂O₂ e um desenvolvimento normal na ausência do mesmo. Já as cepas complementadas apresentam uma parada no crescimento até 4 h após a adição do agente de estresse, sendo que após esse momento o desenvolvimento da cultura segue em níveis similares ao das culturas não expostas ao H₂O₂.

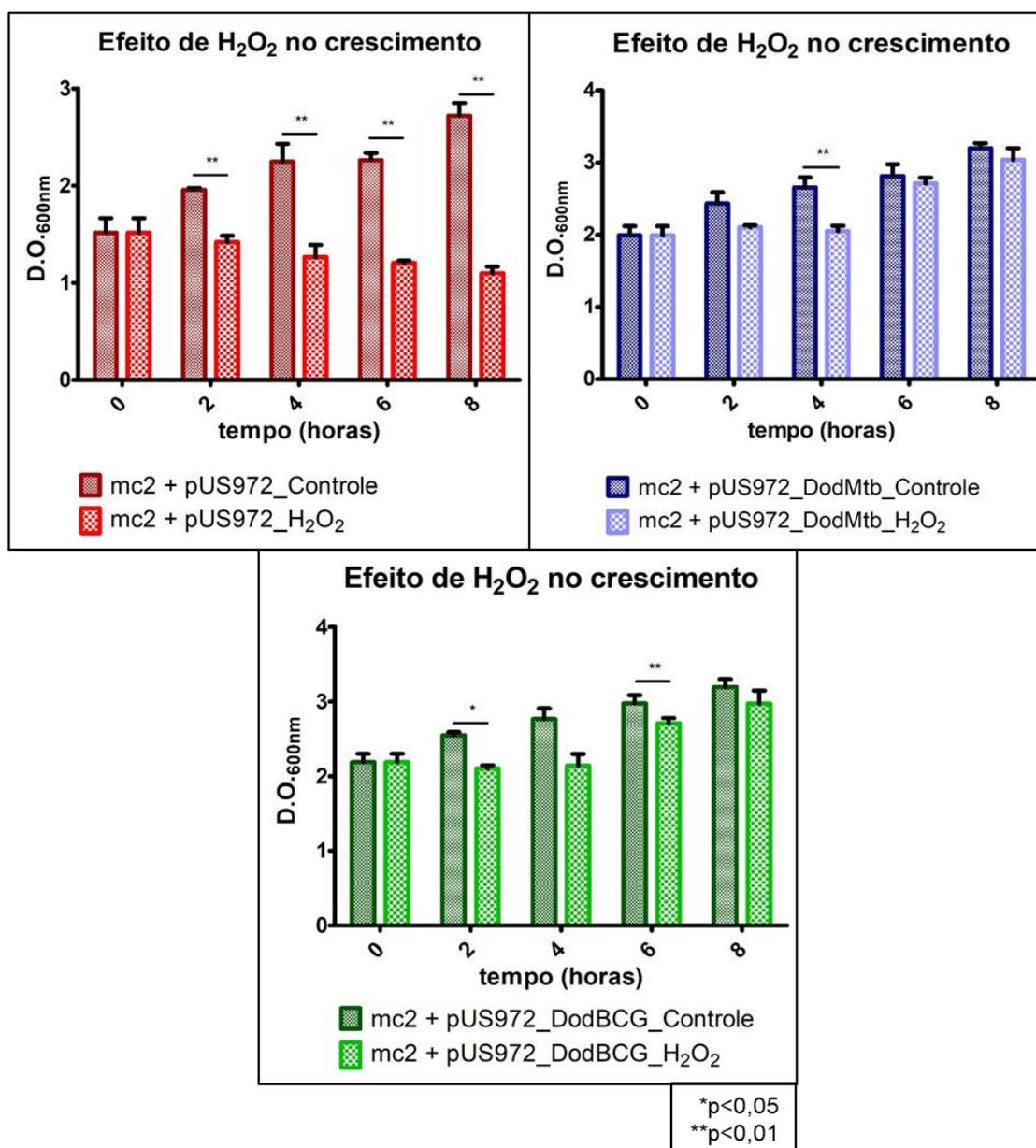


Figura 61 – Curva de crescimento comparativa de *M. smegmatis* mc²155 portando o plasmídeo vazio (pUS972) ou complementada com o gene da dodecina de *M. tuberculosis* (pUS972_DodMtb) ou de *M. bovis* BCG Moreau (pUS972_DodBCG) após a adição (H₂O₂) ou não (Controle) de 15 mM de peróxido de hidrogênio. Os pontos no gráfico representam a média +/- o desvio padrão de uma triplicata biológica (n=3). A análise estatística foi realizada por teste t não-pareado. *p<0,05, **p<0,01.

Analisou-se também o acúmulo da dodecina heteróloga nas cepas complementadas 2 e 8 h após a adição ou não do agente de estresse. Como pode-se observar na Figura 62, uma diferença significativa no acúmulo da proteína foi observada quando as condições foram comparadas, havendo a tendência de um maior acúmulo de proteína no cultivo exposto ao estresse.

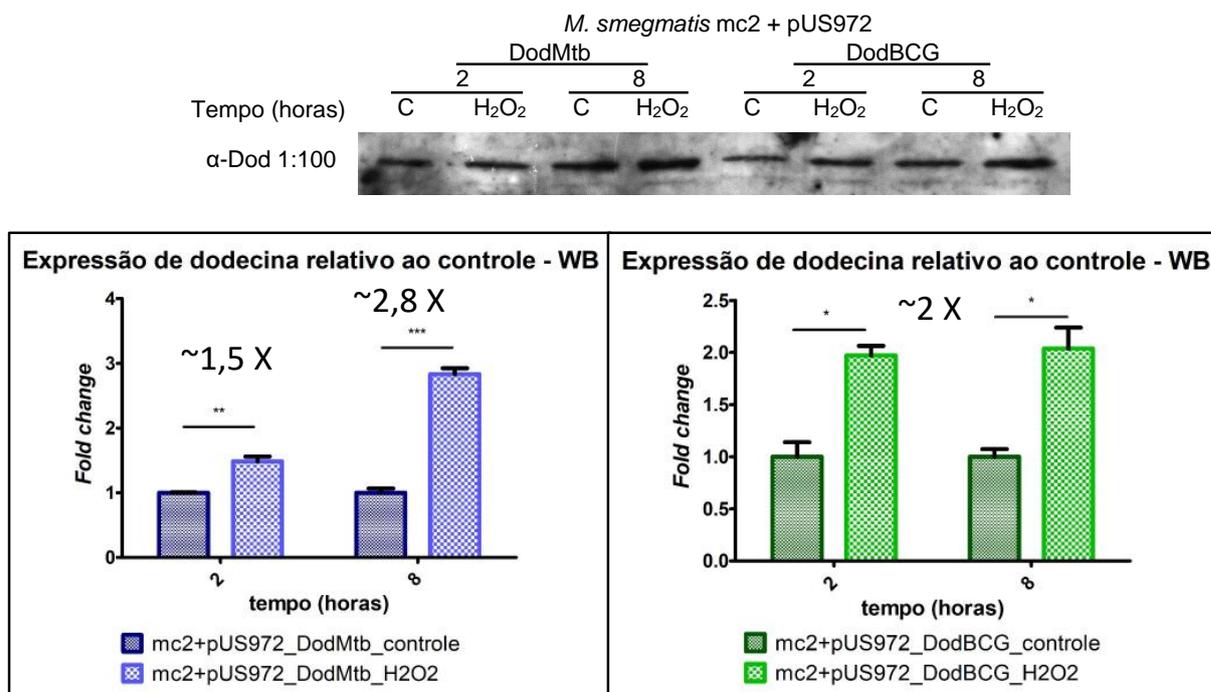


Figura 62 - Análise do acúmulo de dodecina nas cepas complementadas de *M. smegmatis* mc²155 com os alelos de *rv1498A* após 2 e 8 h da adição (H₂O₂) ou não (C) de 15 mM de peróxido de hidrogênio. No topo observa-se o resultado de um ensaio de *western blotting* usando o extrato total de *M. smegmatis* mc²155 complementada com o alelo de *M. tuberculosis* (DodMtb) ou *M. bovis* BCG Moreau (DodBCG) e o soro policlonal contra dodecina com anticorpo primário. O gráfico foi confeccionado a partir da análise densitométrica das bandas oriundas de uma triplicata biológica (n=3). Os pontos no gráfico representam a média ± o desvio padrão. A análise estatística foi realizada por teste t não-pareado. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Analisando a presença de sítios de ligação para proteínas regulatórias na sequência de 200 pb a montante do códon de início de *rv1498A* identificou-se regiões homólogas aos sítios de OxyR e FurA, reguladores ligados à resposta à hipóxia e estresse oxidativo.

4.5. Análise proteômica

Após um passo de padronização do protocolo de extração de proteínas totais, analisou-se amostras da fase de crescimento logarítmica e estacionária de *M.tb* e BCG Moreau. Cada condição teve uma triplicata biológica, e injetou-se três vezes cada amostra no espectrômetro (replicata técnica). Os dados das replicatas técnicas foram reunidas em um arquivo que foi utilizado para a identificação das proteínas usando o programa PEAKS 8.1. Um resumo dos resultados com relação ao número de proteínas identificadas é mostrado na Figura 63.

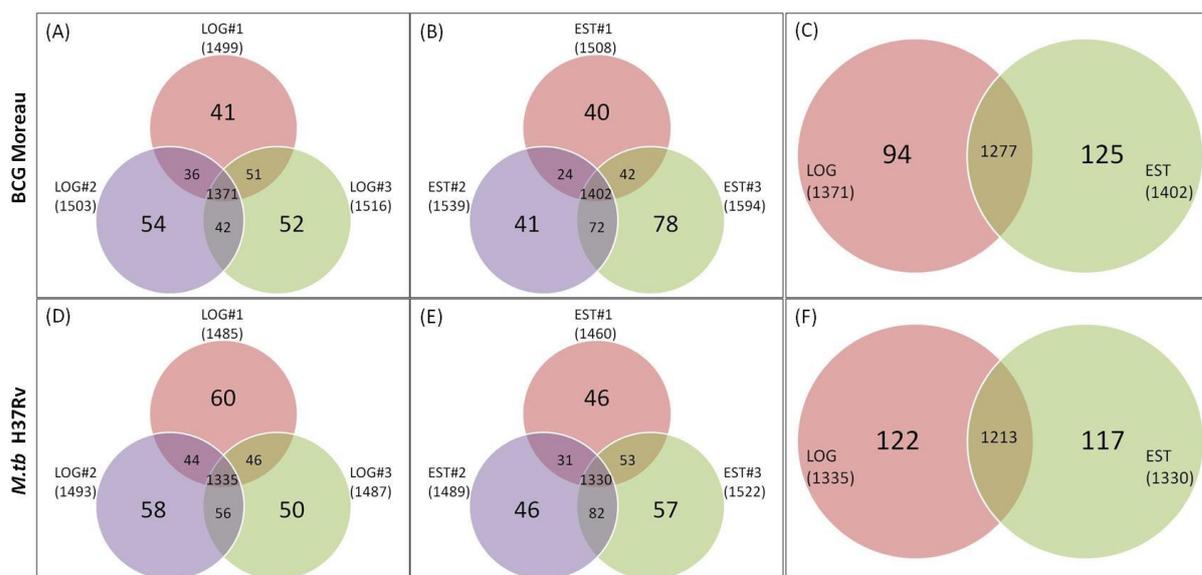


Figura 63 - Análise do número de proteínas identificadas na abordagem de proteômica de alta vazão. Inicialmente compara-se as proteínas identificadas entre as replicatas biológicas para *M. bovis* BCG Moreau (A e B) e *M. tuberculosis* (D e E), para as fases log (A e D) e estacionária (B e E). Depois, analisando-se somente as proteínas compartilhadas entre as triplicatas biológicas, compara-se o obtido entre as fases de crescimento para BCG Moreau (C) e *M. tuberculosis* (F).

Como se observa, algumas proteínas foram específicas para uma determinada fase de crescimento. As análises que se seguiram com essas identificações foram somente com aquelas compartilhadas na triplicata técnica.

Focando-se nos alvos identificados pela análise de genômica comparativa, a abordagem proteômica utilizada permitiu a identificação de representantes de 53 casos, alguns presentes só em uma das bactérias e outros só em uma fase de crescimento. Daqueles selecionados para o estudo (*rv1498A*, *rv1371/2/3* e *rv1552/3/4/5*), não se identificou nenhum deles em nenhuma das triplicatas técnicas. Dos 53 que foram identificados, alguns apresentaram diferenças quantitativas (igual ou maior que 2 vezes) entre as fases e/ou entre as bactérias analisadas, conforme demonstrado na Figura 64.

Nas Tabelas 25 e 26 estão descritas as anotações e a classe funcional das proteínas codificadas por esses alvos com expressão diferencial na análise proteômica. Observa-se que dentro desse grupo de proteínas cujos genes possuem mutação em BCG Moreau e com expressão diferencial tem-se um predomínio daqueles que participam de metabolismo lipídico.

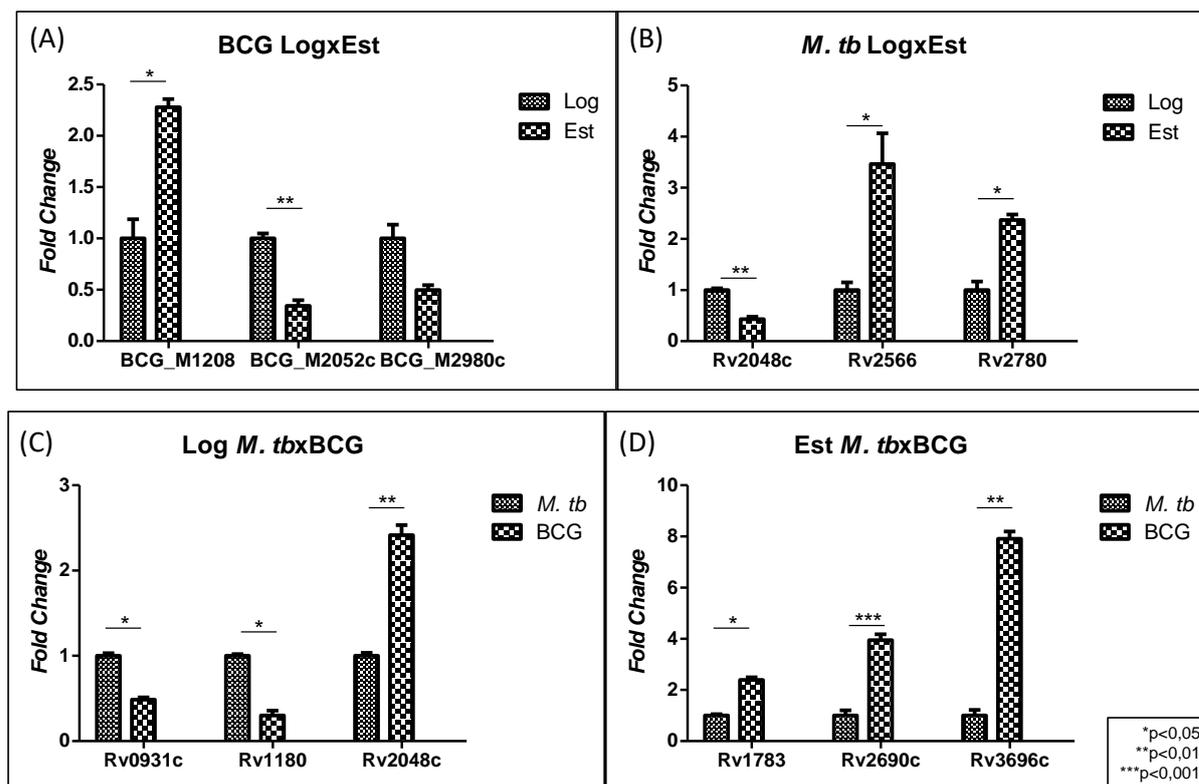


Figura 64 - Análise quantitativa dos alvos diferencialmente expressos entre as fases de crescimento (log e estacionária) (A e B) e bactérias (*M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG Moreau) (C e D) analisadas. Nos gráficos mostra-se a comparação entre quantas vezes os alvos foram diferencialmente expressos entre as condições especificadas. Cada análise é representativa dos resultados de uma triplicata biológica (n=3). Os pontos no gráfico representam a média \pm o desvio padrão. A análise estatística foi realizada por teste t não-pareado. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Tabela 25 – Lista dos alvos obtidos a partir da análise de genômica comparativa que apresentaram expressão diferencial entre as fases de cultivo na análise proteômica. Observa-se o identificador do gene em *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG Moreau, além da anotação do produto codificado pelo gene e sua classe funcional.

		Gene	Anotação	Classe funcional
log x est	MTB	<i>M. tuberculosis</i> <i>rv2048c</i>	<i>M. bovis</i> BCG Moreau BCG_M2052c	Policetídeo sintase – pks12 Metabolismo lipídico
		<i>rv2566</i>	BCG_M2571 + BCG_M2572	Hipotética conservada
		<i>rv2780</i>	BCG_M2780 + BCG_M2781	L-alanina desidrogenase secretada Metabolismo intermediário e respiração
	BCG	<i>rv1180 + rv1181</i>	BCG_M1208	Policetídeo sintase – pks3 Metabolismo lipídico
		<i>rv2048c</i>	BCG_M2052c	Policetídeo sintase – pks12
		<i>rv2974c</i>	BCG_M2980c	Hipotética conservada

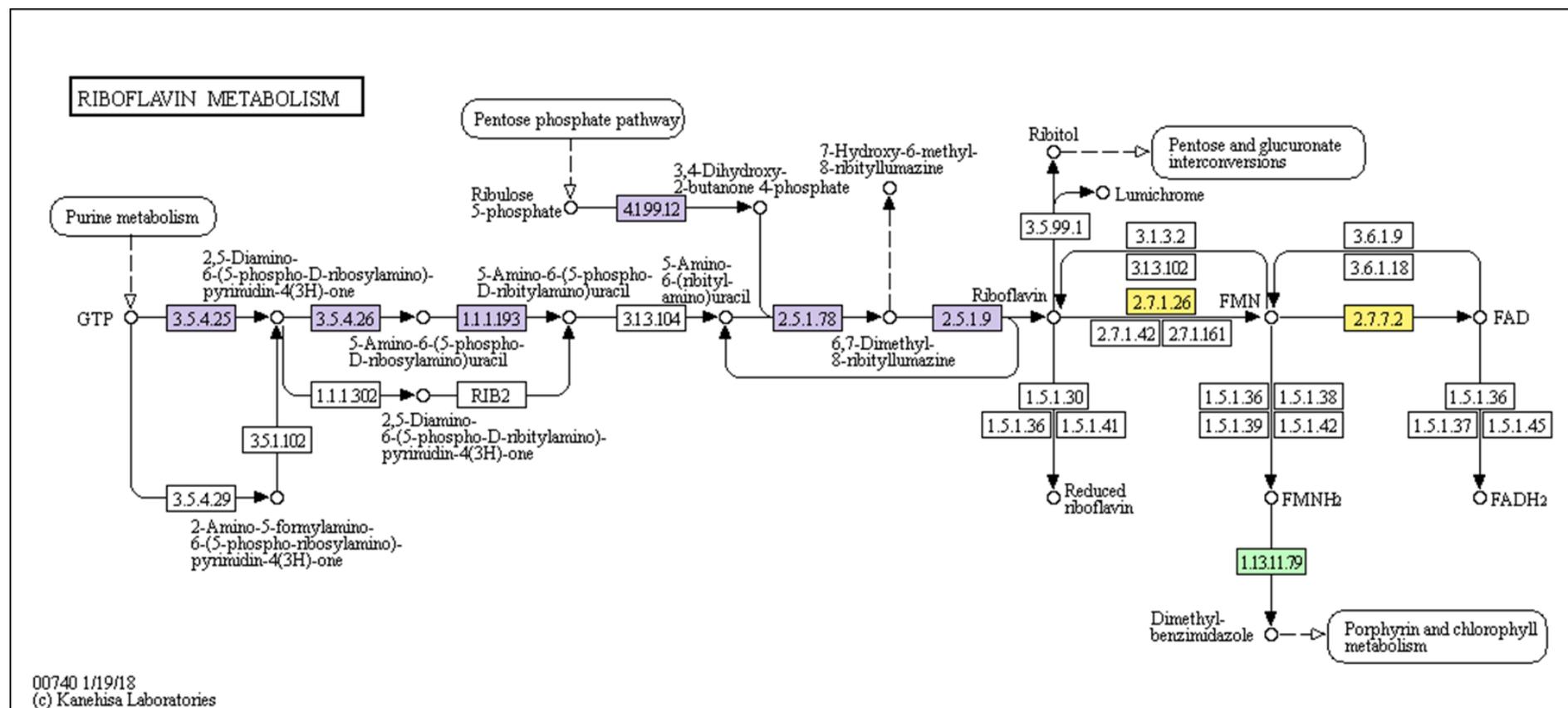
Tabela 26 – Lista dos alvos obtidos a partir da análise de genômica comparativa que apresentaram expressão diferencial entre as bactérias estudadas na análise proteômica. Observa-se o identificador do gene em *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG Moreau, além da anotação do produto codificado pelo gene e sua classe funcional.

		Gene		Anotação	Classe funcional
		<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i> BCG Moreau		
MTB x BCG	log	<i>rv0931c</i>	BCG_M0948c + BCG_M0949c	Serina/treonina-proteína quinase	Proteínas regulatórias
		<i>rv1180</i>	BCG_M1208	Policetídeo sintase – pks3	Metabolismo lipídico
		<i>rv2048c</i>	BCG_M2052c	Policetídeo sintase – pks12	
	est	<i>rv1783</i>	BCG_M1792	Proteína do sistema de secreção ESX-5	Processos celulares e de parede celular
		<i>rv2690c</i>	BCG_M2686c	Proteína integral de membrana	
		<i>rv3696c</i>	BCG_M3719c	Glicerol quinase	Metabolismo intermediário e respiração

4.6. Análise do metabolismo através das identificações oriundas da análise proteômica

A partir das identificações compartilhadas entre as triplicatas técnicas pôde-se realizar a reconstrução metabólica para observar possíveis diferenças globais entre os proteomas sob as variáveis estudadas (bactéria e fase de cultivo).

Dentre todos os mapas metabólicos gerados encontrou-se um que mostra diferenças no metabolismo de riboflavina dependendo da fase de cultivo em *M.tb*. Como pode-se observar na Figura 65, as atividades enzimáticas 2.7.1.26 e 2.7.7.2, que estão envolvidas na síntese das flavinas ativas (FMN e FADH₂), estão presentes somente nas amostras oriundas de bactérias na fase estacionária (e em nenhuma das triplicatas técnicas da fase logarítmica), enquanto o restante da via metabólica encontra-se em ambas as fases de crescimento.

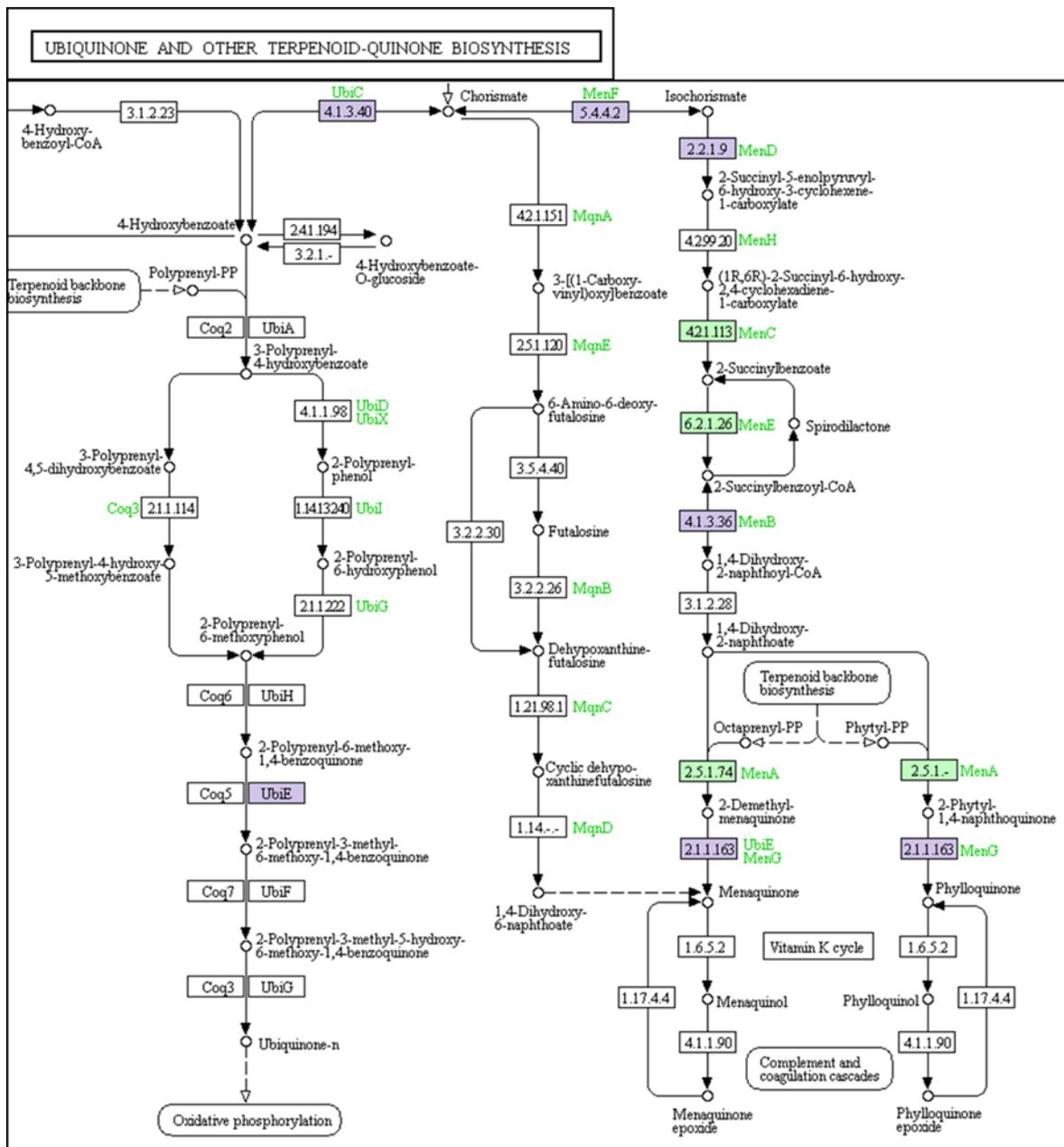


Identificação de proteínas de *M.tb.* – análise proteômica

- EST e LOG
- EST
- Anotação genômica

Figura 65 – Reconstrução do metabolismo de riboflavina em *M. tuberculosis* cepa H37Rv nas fases logarítmica e estacionária de crescimento em meio axênico. Atividades enzimáticas identificadas em ambas amostras estão em roxo, aquelas encontradas somente na fase estacionária estão em amarelo, enquanto aquelas não identificadas no proteoma, mas que estão anotadas no genoma da bactéria, estão em verde.

Além do metabolismo já descrito, observou-se que, diferentemente de outras bactérias, *M.tb* possui as atividades enzimáticas (em ambas fases de crescimento analisadas) para produzir menaquinona, mas não ubiquinona. Tal fato é comum entre as micobactérias.



Identificação de proteínas de *M.tb*. – análise proteômica

■ EST e LOG
■ Anotação genômica

Figura 66 – Parte da reconstrução do metabolismo de biossíntese de ubiquinona e outras quinonas-terpenóides em *M. tuberculosis* cepa H37Rv nas fases logarítmica e estacionária de crescimento em meio axênico. Atividades enzimáticas identificadas em ambas amostras estão em roxo enquanto aquelas não identificadas no proteoma, mas que estão anotadas no genoma da bactéria, estão em verde.

5. Discussão

Como já apresentado, o trabalho se divide em dois grandes blocos: análise genômica e proteômica comparativa. O primeiro se baseia em análises tanto *in silico* quanto em bancada para identificar possíveis genes afetados por pequenas mutações (SNPs e/ou INDELS de até 10 nucleotídeos). Depois, com a listagem disponível, escolheram-se alguns alvos para aprofundar o estudo do impacto funcional, utilizando ferramentas diversas de Biologia Molecular e Bioquímica.

Na parte de identificação dos alvos através da abordagem de genômica comparativa procurou-se escolher aqueles em que a função da proteína codificada já estivesse descrita. Dentre todos, iniciar com os ortólogos de *M.tb* em BCG Moreau descritos (*rv1371/2/3*, *rv1553/4* e *rv1498A*) se mostrou favorável, já que cada alvo possui uma mutação diferente, provavelmente causando distintos impactos na estrutura, e conseqüentemente função, das proteínas.

Há exemplos de genes que em BCG Moreau há a alteração no códon de início de tradução (*rv1498A*), conseqüentemente perdendo a porção N-terminal da proteína codificada, e outros no qual se altera o códon de término de tradução (*rv1371*, *rv1373* e *rv1553*), causando tanto a perda e alteração da porção C-terminal, nos dois primeiros casos, como a fusão do produto proteico com o codificado pelo gene a jusante (*rv1554*), no caso do complexo da fumarato redutase.

Além da questão de diversidade de eventuais efeitos, procurou-se genes que codificam proteínas possivelmente importantes para o bacilo. Dos três exemplos retirados da abordagem genômica sabe-se que a perda da função do polipeptídeo pode, em teoria, alterar a fisiologia bacteriana. Mas analisando os dados disponíveis no banco de dados do Tuberculist observa-se que todos os genes selecionados estão descritos como não-essenciais para o crescimento de *M.tb* cepa H37Rv. Vale a pena lembrar que tais afirmações são oriundas de experimentos com inserção de transposons, e não com a criação de *knockouts* como realizado nesse trabalho. Ou seja, os resultados já existentes podem ser devido a efeitos da deleção de mais de um gene, com a possibilidade de termos também efeitos compensatórios atuando.

A dodecina (produto de *rv1498A*), conhecida pela sua capacidade de se ligar a flavinas, vem sendo bastante estudada em outros organismos, e acredita-se que sua principal função seja de armazenar não só as flavinas reativas como outras

coenzimas, como a coenzima A (MEISSNER, *et al.*, 2007). Dessa forma, essa proteína estaria envolvida em um sistema tamponante dessas flavinas, moléculas estas que quando “livres” no citoplasma podem se envolver em reações redox com alvos indesejados, aumentando o estresse oxidativo na célula. Nesse sentido, essas proteínas teriam funções similares às das proteínas ligadoras de flavinas (fbp) de eucariotos (KELLEY, *et al.*, 2017). Além disso, acredita-se que possam funcionar como reservas de outras coenzimas, agilizando a resposta do micro-organismo às mudanças ambientais que o obriguem a alterar suas vias metabólicas e consequentemente usar outro conjunto de coenzimas.

Já o complexo fumarato redutase (oriundo de *rv1552/3/4/5*) está envolvido no processo de respiração anaeróbica, no qual em condições de baixa concentração de oxigênio (encontradas, por exemplo, na fase de latência dentro do granuloma para *M.tb*) essa enzima catalisa a reação reversa da succinato desidrogenase (SDH), enzima que conecta o ciclo de Krebs com a cadeia de transporte de elétrons, sendo a entrada de elétrons a partir de succinato. Em ambientes microaerófilos o excesso de poder redutor gerado nas vias catabólicas de carboidratos e lipídeos, principalmente, precisa ser re-oxidado para manter tais vias em funcionamento, já que são essenciais para a produção de ATP por fosforilação a nível de substrato. Dessa forma, a fumarato redutase catalisa a redução de fumarato a succinato usando o poder redutor em excesso, reestabelecendo um controle redox da célula e permitindo também a contínua produção de ATP por fosforilação oxidativa. Isso porque esse complexo permite o normal funcionamento da cadeia de transporte de elétrons, sendo responsável pela metabolização do aceptor final de elétrons sob essas condições. Tal succinato pode ser secretado pela célula e essa e outras vias permitem a manutenção dos níveis de energia em hipóxia (JARDIM-MESSEDER, *et al.*, 2017).

No caso do operon *rv1371/2/3* pouco se sabe sobre a proteína codificada pelo primeiro gene, sendo caracterizada por análises de homologia *in silico* como uma desaturase de ácido graxo. Já Rv1373 foi caracterizada como uma glicolípido sulfotransferase (RIVERA-MARRERO, *et al.*, 2002), enzima possivelmente envolvida na via biossintética de lipídeos sulfatados, importantes moléculas presentes na parede celular de diferentes micobactérias e já caracterizada como fator de virulência em *M.tb*. Esses compostos auxiliam também na evasão do fagolisossomo pela bactéria e alterando o perfil de citocinas secretadas pelo macrófago infectado (MOUGOUS, *et al.*, 2002).

Corroborando a ideia de que esse operon esteja envolvido com síntese de lipídeos, sabe-se que Rv1372 foi caracterizada *in vitro* como uma policetídeo sintase (Pks18) (SANKARANARAYANAN, *et al.*, 2004). Essa enzima foi caracterizada como uma produtora de alfa-pironas, que a partir de ácidos graxos iniciais de 11 a 19 átomos de carbono pode sintetizar pironas tri- ou tetracetídeos, através da condensação e ciclização de malonil-CoA. Ou seja, o operon aparenta apresentar uma enzima capaz de sintetizar o substrato lipídico a partir de ácidos graxos (Rv1372) e duas outras enzimas capazes de realizar diferentes modificações no mesmo, como sulfatá-lo (Rv1373) e adicionar insaturações (Rv1371).

Visto tais informações da literatura acredita-se que os alvos selecionados pela abordagem de genômica comparativa compreendem genes importantes para a fisiologia bacteriana, só que sob determinadas condições, visto que dados já citados os caracterizam como não-essenciais para *M.tb*. Com isso, as mutações presentes em BCG Moreau podem significar um efeito adaptativo, no qual a perda da função das proteínas codificadas não teria efeito no *fitness* da bactéria vacinal sob as condições de armazenamento e cultivo. Tal fato é esperado para organismos mantidos em cultura em laboratórios por longos períodos, onde a perda de fatores de virulência e a mudança do perfil metabólico condizente com um ambiente rico em nutrientes não-complexos já são esperadas. Dessa forma, investigar se tais mutações geram ou não um impacto funcional se mostra tarefa mister para melhor compreender os eventos de atenuação sofridos por *M. bovis* até as cepas de BCG atuais.

Mas, antes de poder inferir uma ligação entre a presença da mutação e história evolutiva de BCG, deve-se procurar onde na filogenia do grupo tais mudanças foram adquiridas e, a partir desse ponto, mantidas. A partir de alinhamentos observa-se que as mutações presentes no homólogo de *rv1373* e no complexo fumarato redutase surgem na linhagem de *M. bovis*, enquanto a do homólogo de *rv1371* está compartilhada por todas as cepas que infectam animais não-humanos preferencialmente. Do ponto de vista evolutivo, isso mostra que essas mutações ocorreram a um tempo menor, e isso pode ajudar a justificar o fato de se identificar no extrato proteico total de BCG Moreau as proteínas correspondentes à forma mutada e à selvagem em alguns casos, como em Rv1371 e fumarato redutase. Já no caso de *rv1498A*, a mutação surge no nó que junta as cepas de *M. africanum* II e as cepas animais, tendo ocorrido a mais tempo.

Além disso, quando se analisa o operon *rv1371/2/3* em *M.tb* observa-se que há sequências móveis nas suas extremidades, podendo indicar que tal sistema policistrônico tenha sido adquirido por transferência lateral. Mas tal hipótese é enfraquecida pela ausência de tais sequências em todos os outros representantes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* analisados, o que levaria a crer que caso tal fato evolutivo tenha realmente ocorrido só teria sido mantido em H37Rv e perdido em todo restante do clado, idéia essa pouco parcimoniosa. Junto com isso temos o fato de que o conteúdo GC no operon e nas sequências adjacentes não é discrepante da média para o genoma de BCG Moreau, o que diminui a credibilidade da ideia de transferência lateral.

Usando a abordagem de proteômica comparativa podem-se identificar também genes afetados por INDELS que valham a pena investigar mais a fundo, como por exemplo o caso de diferentes Pks e genes codificantes para proteínas de metabolismo lipídico. Tais análises ainda são iniciais e devem ser aprofundadas, mas já se compreende a dificuldade de seguir o mesmo racional experimental para o caso das Pks, principalmente devido à alta massa molecular das proteínas codificadas e sua forte associação com membranas biológicas, dificultando assim a expressão heteróloga das mesmas no sistema bacteriano usado. Dessa forma, outro conjunto de experimentos deverá ser realizado para se abordar o impacto funcional causado pelas mutações presentes nas Pks identificadas em BCG Moreau.

De maneira global, ao analisar os resultados das abordagens de genômica e proteômica comparativas observa-se vários casos no qual o gene identificado está envolvido em metabolismo de lipídeos. Como já discutido, micobactérias são conhecidas por sempre estarem relacionadas com tais biomoléculas, principalmente nos quesitos energético e estrutural. De um ponto de vista evolutivo pode parecer contraditório que o metabolismo mais afetado na teoria por pequenas mutações seja esse. Mas pensando em relação à probabilidade, é de se esperar que, escolhidos aleatoriamente o local para uma mutação no genoma de uma micobactéria, encontre-se um *locus* envolvido especificamente nesse contexto dos lipídeos.

Além disso, como foi demonstrado nesse trabalho, algumas vezes a mutação predita por análises *in silico* e seu conseqüente impacto não ocorrem da maneira esperada, sendo a cepa selvagem e mutante muito similares fenotipicamente. Pode-se considerar também que devido à característica clonal desses microrganismos e à importância desse metabolismo, mutações nesses *loci* sejam comuns e benéficas no

contexto da história evolutiva global do grupo, sendo que serão gerados diversos variantes e aqueles com maior *fitness* são selecionados positivamente enquanto outros serão descartadas com as gerações, ou por seleção ou por deriva gênica.

Além disso, se realmente houver uma relação da predominância de genes envolvidos em metabolismo lipídico que são afetados por essas mutações com a atenuação de BCG, isso pode ser pensado como uma resposta às adaptações da bactéria ao meio de cultivo rico em carboidratos e outras fontes de carbono não-lipídicas. Com isso, esses *loci* não estariam sob forças seletivas e mutações seriam acumuladas ao decorrer da história do clado. Tal adaptação ao meio axênico pode ser exemplificada por dados na literatura que mostram a duplicação do gene envolvido no metabolismo de glicerol, *glpD2*, em todas as cepas de BCG (ABDALLAH, *et al.*, 2015). Isso provavelmente foi selecionado pela abundância dessa fonte de carbono nos meios comumente usados para manutenção de culturas de BCG (por exemplo, o meio Sauton utilizado na produção da vacina, com 60 mL de glicerol por litro).

Um dos interesses do trabalho é investigar o impacto de pequenas mutações, principalmente aquelas de INDELS não-múltiplas de 3 nucleotídeos, em CDSs. Isso porque tal evento pode acarretar, como já explicado, na mudança do quadro de leitura, alterando toda a sequência da proteína a partir do ponto da mutação e normalmente alterando a posição do códon de parada, gerando um produto proteico com tamanho diferente. Além disso, no caso de sistemas policistrônicos, pode-se abolir a expressão dos genes a jusante da mutação desde que estes estejam acoplados traducionalmente ao primeiro. Nos casos dos operons analisados (*rv1371/2/3* e fumarato redutase) se observa nas análises *in silico* a proximidade dos códons de parada de tradução com os de início em genes vizinhos. Dessa maneira, o impacto funcional da mutação não deverá ser visto ao nível de transcriptoma, mas sim do proteoma, ou seja, o RNA continuará sendo produzido, mas devido à mutação a proteína poderá ter sua expressão e/ou estrutura alteradas.

Dessa forma, deve-se esperar encontrar o impacto funcional ao nível de proteína, mas deve-se investigar também ao nível de RNA, já que o fenótipo da proteína estar alterado pode ser capaz de selecionar bactérias que deixam de transcrever o gene respectivo através do acúmulo de mutações em, por exemplo, sequências no promotor envolvidos no processo de transcrição. Por isso, analisou-se a transcrição dos genes identificados pela abordagem de genômica comparativa através de ensaios de RT-PCR, que demonstram a presença de RNA codificantes

para esses genes em todas as fases de crescimento *in vitro*. Vale a pena ressaltar que a análise sempre é feita em diferentes fases de cultivo porque já está descrito na literatura (GRININGER, *et al.*, 2009) que a dodecina de *H. salinarum* é uma proteína com controle de expressão dependente de crescimento, e tal fato foi investigado também no modelo aqui utilizado.

Além disso, devido à inexistência de comprovação na literatura científica de que os genes aqui preditos como pertencentes a sistemas policistrônicos realmente o sejam, realizou-se experimentos de RT-PCR com oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiem as regiões intergênicas entre os ortólogos de *M.tb* em BCG Moreau (*rv1371/rv1372*, *rv1372/rv1373*, *rv1552/rv1553* e *rv1554/rv1555*). Os resultados demonstram a co-transcrição desses genes, indicando que estes estão presentes no mesmo mRNA, pertencendo a um sistema policistrônico. Os dados mostram que as mutações identificadas ao nível de genoma não causam impacto qualitativo na transcrição dos genes afetados estudados.

O próximo passo foi investigar o impacto no próximo nível clássico do dogma central da biologia molecular, ou seja, observar se a mutação altera o nível de expressão e/ou a estrutura das proteínas. Vale a pena ressaltar que nas análises iniciais por *western blotting* só é possível identificar alterações na estrutura quando estas geram mudanças significativas na massa molecular da proteína em questão.

Para realizar tais experimentos faz-se necessário a geração de anticorpos contra essas proteínas. Logo, procedeu-se à clonagem, expressão e purificação de Rv1371, Rv1373, FrdB e dodecina de BCG Moreau. Inicialmente tentou-se clonar a CDS completa predita de BCG Moreau para o gene do complexo da fumarato redutase, que seria *frdBC*. Mas, após tentativas sem sucesso, se optou por clonar a porção correspondente à *frdB*.

Acredita-se que a dificuldade encontrada para clonar a sequência completa se deva à região *hotspot* no qual ocorre a mutação de inserção. Essa é uma região repetitiva rica em guanina, típico local para ocorrer o evento de “escorregamento” da polimerase, no qual se tem alta probabilidade de se adicionar ou retirar nucleotídeos repetidos, tanto no nível de transcrição quanto no de replicação (causando uma mutação, nesse caso). Tal hipótese é corroborada pelo resultado da análise de fragmentos por eletroforese capilar, na qual, ao mesmo tempo em que se comprova a mutação pela adição de 10 nucleotídeos na região homóloga em BCG Moreau observa-se também a presença de múltiplos picos na amostra de BCG. Isso pode

indicar falhas na polimerização pela DNA polimerase usada no experimento, e acredita-se que tal evento possa acarretar na formação de múltiplas moléculas após a PCR realizada para gerar o fragmento a ser clonado no vetor de expressão, mesmo utilizando uma enzima de alta fidelidade. Isso dificultaria os processos para produção da proteína recombinante, já que a adição/perda de nucleotídeos pode fazer com que a sequência a ser traduzida saia de fase e não codifique a cauda de histidina (usada para identificação da proteína recombinante durante as fases de *screening* dos clones e para purificação da mesma), que no vetor e nas condições utilizadas fica na posição C-terminal da proteína.

De maneira geral obteve-se sucesso na produção das proteínas recombinantes para a produção de soro policlonal. Em todos os casos, exceto o da dodecina, a proteína apresentava-se em corpos de inclusão, sendo necessária a desnaturação da mesma com solução de 4 M de ureia e a retirada desse agente após a purificação e antes da inoculação nos camundongos. É importante ressaltar tal dado porque já é conhecido que a inoculação desses antígenos nos camundongos permite a produção de anticorpos contra vários epítomos, tanto lineares quanto conformacionais, podendo estes últimos, nas proteínas recombinantes usadas, serem pouco representativos da proteína nativa. Além disso, muitas vezes o processo de desnaturação/renaturação não fornece a proteína na conformação nativa, sendo preferível a produção direta da mesma na forma solúvel nos casos onde se deseja estudar a função do polipeptídeo. Tal fato ocorreu no caso da dodecina, provavelmente devido à baixa massa molecular da mesma.

Para se analisar o impacto funcional das mutações ao nível de proteoma usaram-se duas abordagens: o uso de soros policlonais para identificar os alvos em extratos proteicos de BCG Moreau e *M.tb* cepa H37Rv e identificação global das proteínas por proteômica de alta vazão (LC-MS/MS) dos mesmos extratos. Com a segunda abordagem não foi possível identificar peptídeos que permitissem a identificação dos quatro alvos estudados. Tal dado pode ser explicado por essas proteínas serem pouco abundantes (o que é corroborado pelos baixos títulos necessários para a identificação das formas nativas nos experimentos de *western blotting*). Dessa forma, como o experimento de identificação por espectrometria de massas foi do tipo DDA (*data-dependent acquisition*) no qual somente os 10 peptídeos mais abundantes na análise de MS1 são encaminhados para a dissociação por CID (*collision-induced dissociation*) e futura análise por MS2 (o que melhora a identificação

da proteína devido à presença de informação de sequência), talvez os peptídeos referentes aos alvos inicialmente selecionados estivessem pouco abundantes e não prosseguiram para análises de MS2.

Além disso, no caso da fumarato redutase, a ausência de identificação pode ter sido devido à similaridade que as subunidades A e B apresentam com as contrapartes do complexo da SDH. Interessantemente, os dados proteômicos obtidos nesse trabalho permitiram a identificação das subunidades A e B de SDH, mas, como já explicado, devido à similaridade de sequência não se pode descartar a hipótese de que haja também peptídeos correspondente a FrdA e FrdB no proteoma total.

Utilizando-se a abordagem de *western blotting* foi possível identificar a expressão dos 4 alvos oriundos da análise de genômica comparativa nos extratos proteicos de *M.tb* e BCG Moreau. Em todos os casos observa-se certo nível de controle de expressão dependente da fase de crescimento, já que tem-se um aumento na intensidade da banda quando se passa da fase lag para a log. Além disso, não se obteve dados que corroborem a mutação presente em Rv1373, sendo necessários outros experimentos para explicar tal fato. Analisando-se o caso de Rv1371, observam-se indícios do efeito da mutação em BCG Moreau, evidenciado pela presença de banda com massa molecular condizente com a forma mutada (~33 kDa). Mas, vale a pena ressaltar que há uma fraca banda correspondente à massa da proteína selvagem (~55 kDa) no extrato de BCG Moreau da fase log. Tal fato propõe a existência das duas formas em BCG Moreau.

A identificação de Rv1371 mutada e Rv1373 nos extratos proteicos de BCG Moreau não corrobora a hipótese de acoplamento traducional, já que o encurtamento da região codificante de *rv1371* faria com o que o códon de término desse gene não se sobrepusesse ao códon de início de *rv1372*, abolindo a expressão do polipeptídeo codificado por este. Com isso, se a expressão de Rv1373 estivesse acoplada à de Rv1372, era esperado que nessa condição a produção da primeira proteína cessasse. Uma possível explicação para tal fato é de que *rv1373* não esteja acoplado ao restante do operon, podendo haver um RBS a montante desse gene. Análises *in silico* iniciais ainda não foram capazes de identificar tal sequência, mas, dentre os casos estudados nesse trabalho, este é o que apresenta a maior distância entre o códon de início de um gene e o de término do gene a montante, sendo o único que não apresenta uma perfeita sobreposição dos mesmos.

No caso de FrdB observa-se a presença da forma fusionada (FrdBC com cerca de 40 kDa), da não-fusionada (FrdB com cerca de 27 kDa) e de uma banda de cerca de 52 kDa, tanto nos extratos de BCG Moreau quanto de *M.tb*. Tal resultado corrobora a hipótese de que nessa região homopolimérica ocorre o evento de “escorregamento” da RNA polimerase. Ou seja, tanto em *M.tb* quanto em BCG Moreau produz-se um conjunto de mRNAs a partir dessa sequência do genoma, cada um com um número diferente de Gs nessa região propensa à variação. Com isso, pode-se gerar três tipos de polipeptídeos, cada um correspondendo a uma fase de leitura da região a jusante da inserção. Tal evento de escorregamento da polimerase já foi descrito para outros *loci* em *E. coli* a nível transcricional (WONS, *et al.*, 2018) e para *M.tb* a nível de replicação (MACHOWSKI, *et al.*, 2007), indicando, nesse caso, que alguns genes são propensos a sofrerem mutações via esse mecanismo.

Como já descrito, a forma do operon Frd em *M.tb* cepa H37Rv é a de cada subunidade independente, enquanto que em BCG Moreau tem-se a fusão de FrdB com FrdC, mantendo-se homologia de sequência protéica na forma fusionada. Já no caso da fase de leitura +3 (descrita por análises *in silico* em algumas cepas de *M.tb*, como Beijing) tem-se a fusão da região codificante de *frdB* com *frdC* e *frdD*, sendo que o polipeptídeo formado apresenta o N-terminal homólogo a FrdB e o C-terminal a FrdD, ambos de *M.tb* cepa H37Rv.

No caso da dodecina já se sabe da literatura científica que a proteína de *M.tb*, mesmo sendo caracterizada como um dodecâmero estabilizado por pontes salinas e ligações de hidrogênio, apresenta-se com uma banda correspondente a um hexâmero após eletroforese em condições desnaturantes e redutoras (SDS-PAGE) e corado com Coomassie Blue R-250 (LIU, *et al.*, 2011). Nosso trabalho identifica a proteína na forma monomérica durante a produção e purificação da proteína recombinante, tanto após coloração com Coomassie quanto após *western blotting* com anticorpo anti-His. Mas, quando analisamos a proteína nativa com o anticorpo anti-dodecina produzido, observamos uma banda condizente com a forma hexamérica, em concordância com os dados já publicados para a proteína recombinante de *M.tb* (LIU, *et al.*, 2011). Nossos *westerns blottings* com anticorpo anti-dodecina com a forma recombinante identificam bandas condizentes às formas mono-, tetra- e dodecaméricas. Do ponto de vista estrutural pode-se acreditar que a porção C-terminal do monômero, região na qual se encontra a cauda de histidina na forma recombinante, deve ficar pouco acessível ao solvente (conseqüentemente ao anticorpo), de modo que somente a

forma monomérica da proteína seja observada nos *westerns blottings* utilizando anti-His. Mas, quando se utiliza o soro policlonal contra a dodecina reconhecem-se as outras formas presentes em solução (tetra e dodecamérica). Além disso, algo além da presença do epítipo de histidinas deve estar influenciando a observação de formas mono-, tetra- e dodecaméricas com a proteína recombinante e somente o hexâmero com a nativa, podendo ser explicado por questões de enovelamentos diferenciais devido a características dos ambientes do citoplasma de *E. coli* e BCG Moreau e também pela taxa de produção do polipeptídeo.

Além disso, outro dado que corrobora as diferenças estruturais entre as dodecinas (recombinante e nativa) é a análise de termoestabilidade. No caso da proteína produzida em *E. coli* observa-se que com o aumento da temperatura observa-se uma menor quantidade da forma dodecamérica em solução, porém sem mudança nos níveis do tetrâmero, que com o subsequente aumento da temperatura acaba não permanecendo em solução. Já no caso da proteína nativa, tem-se a presença do hexâmetro até que se atinja a temperatura crítica e nenhuma forma da dodecina seja observada a partir desse ponto. Isso mostra um comportamento diferencial das formas quanto ao “decaimento” devido à temperatura.

Outro fato interessante quanto às dodecinas recombinantes é o maior sinal na forma monomérica quando se analisa a homóloga de *M.tb* em relação à de BCG. Isso indica que a presença dos sete aminoácidos N-terminais pode alterar a multimerização do complexo.

No caso dos alvos homólogos de *M.tb* já se têm relatos na literatura da presença de algumas dessas proteínas nos extratos proteicos. Na maioria dos trabalhos a identificação foi utilizando abordagem proteômica, sendo que no caso do operon *rv1371/2/3*, Rv1371 foi encontrada em filtrado de cultura (MÅLEN, *et al.*, 2007) e na fração de membrana celular (MAWUENYEGA, *et al.*, 2005), Rv1372 estava presente em amostras de pulmão de cobaias após 30 dias de infecção (KRUH, *et al.*, 2010) e não se identificou ainda a presença de Rv1373. Para o operon da fumarato redutase tem-se que FrdA e FrdB estavam na fração de membrana celular (DE SOUZA, *et al.*, 2011) e em extratos de Triton X-114 (MÅLEN, *et al.*, 2010), e até o momento não houve a identificação de FrdC e FrdD. Já a dodecina foi encontrada em filtrado de cultura (MÅLEN, *et al.*, 2007) e extratos de Triton X-114 (MÅLEN, *et al.*, 2010).

Devido aos dados da literatura mostrando a identificação de várias das proteínas estudadas em extratos de Triton X-114, simbolizando possível associação com membranas biológicas e/ou indicando alto grau de hidrofobicidade dos polipeptídeos, repetiu-se o protocolo de extração diferencial com Triton X-114 (MÅLEN, *et al.*, 2010) com amostras de BCG Moreau na fase log. Nossos dados mostram que Rv1371 e Rv1373 estão presentes na fase de Triton, indicando uma associação com membranas, o que vai de encontro aos dados *in silico* que predizem essas proteínas como associadas a essa organela. Além disso, Rv1373 não foi encontrada na fração aquosa, mostrando uma maior hidrofobicidade dessa proteína quando comparada com Rv1371. A dodecina apresentou-se mais uma vez na forma hexamérica e somente na fração aquosa, enquanto FrdB está presente na fração de proteínas hidrofílicas e observa-se a banda com massa molecular mais elevada (~52 kDa) na fração de Triton X-114. Além disso, observa-se que a forma fusionada (FrdBC) é extraída quase em sua totalidade na fração aquosa, enquanto observamos resquícios de FrdB na fração Triton. Esses dados mostram que os três polipeptídeos diferentes produzidos pelo mesmo *locus* (devido a hipótese do escorregamento da polimerase a nível transcricional) possuem características físico-químicas distintas.

Análise da termoestabilidade das proteínas nativas estudadas mostra que estas possuem a capacidade de permanecer em solução, e provavelmente com estrutura tridimensional pouco afetada, até temperaturas consideradas elevadas (80-100 °C) para outras bactérias. Tal fato já é conhecido na literatura para outras proteínas micobacterianas, principalmente ao se estudar *M.tb* (GANAI, *et al.*, 2011). A hipótese atual para essa tendência é que o aumento da temperatura durante o processo infeccioso selecionou ao longo da evolução bactérias que possuam proteínas estáveis nessas condições e que possam estar ativas após esse período de estresse, de modo que o microrganismo não precise re-sintetizar os polipeptídeos correspondentes. E, como a linhagem de BCG deriva de *M. bovis*, uma micobactéria capaz de infectar organismos homeotérmicos, tal característica aparenta ter sido mantida nas bactérias derivadas.

Além disso, mais uma vez é mostrado que as três proteínas produzidas pelo *locus frdBCD* possuem características físico-químicas diferentes, já que com o aumento da massa molecular do polipeptídeo aparenta ter-se um decréscimo na termoestabilidade da molécula.

De modo a se obter subsídios para se avaliar o impacto das mutações no caso da fumarato redutase e dodecina criou-se modelos da estrutura de ambas por modelagem por homologia. No primeiro caso só foi possível a construção dos modelos por homologia para as formas presentes em *M.tb* cepa H37Rv e BCG Moreau, já que a proteína de 52 kDa (FrdBCD) apresenta uma grande região central (codificada pela região homóloga a *frdC* fora de fase de *M.tb* H37Rv) sem homologia com as sequências disponíveis no PDB. O grande tamanho dessa região também dificulta a construção do modelo por abordagens de modelagem *ab initio*. Com os modelos da fumarato redutase construídos observou-se que aquele descrito para *M.tb* (com FrdB) e BCG (com FrdBC) são similares entre si, visto o baixo valor de RMSD quando se realizou o alinhamento estrutural. Observa-se que no complexo de BCG Moreau, FrdBC se apresenta estruturalmente como um polipeptídeo único, mas com dois domínios que se mantêm espacialmente estruturados como no complexo com as formas separadas (FrdB e FrdC).

Do ponto de vista da superfície eletroestática observa-se pequenas diferenças entre os modelos construídos, o que pode levar a alterações na interação das proteínas com substratos, coenzimas e outras moléculas essenciais para sua correta função, além de poder alterar a hidrofobicidade da molécula, o que, nesse caso, também foi corroborado pelo ensaio de extração diferencial com Triton X-114.

As cavidades de interação com os cofatores conhecidos desse complexo permanecem similares entre os modelos, mostrando que por essas análises não há indícios *in silico* que corroborem a ideia de que a presença dessa forma fusionada impacte funcionalmente a fisiologia da bactéria. Tal ideia de que FrdBC apresenta características similares à cópia de *M.tb* já foi discutida na literatura e se baseia nos dados que indicam que *M. bovis* é capaz de usar essa enzima como acceptor final de elétrons (MARRI, BANNANTINE e GOLDING, 2006).

Por outro lado, analisando-se os mapas de interação entre as moléculas não-protéicas e os complexos observa-se que existem diferenças entre os modelos, havendo diferentes aminoácidos que interagem com tais compostos. Dessa forma, pode-se esperar que mesmo sendo estruturalmente similares no contexto geral da estrutura, os dois complexos analisados possam apresentar eficiências catalíticas diferentes.

Do ponto de vista teórico, a forma codificada pelo quadro de leitura +3 não teria atividade; como perde completamente a homologia de sequência com FrdC, o

complexo poderia não ser formado, devido a questões espaciais de interação entre as subunidades e o correto enovelamento das mesmas, ou não se inserir na membrana, já que perderia uma das alças de membrana. Outros experimentos e análises devem ser realizadas para comprovar tal hipótese.

No estudo da dodecina, os modelos nos permitem corroborar várias análises realizadas na bancada. A diminuição na termo- e haloestabilidade observada nos ensaios em gel para a proteína recombinante de BCG pode ser explicada pela ausência do *loop* composto pelos sete aminoácidos N-terminais, que aumentariam a energia de interação entre as cadeias do complexo, como visto para a proteína de *M.tb*, possivelmente auxiliando na montagem da interface entre dois monômeros adjacentes. Além disso, a queda na capacidade de ligação à riboflavina da isoforma de BCG tem apoio nos dados estruturais, que mostram que no sítio de interação com essa coenzima a proteína de BCG possui um formato de fenda na abertura do polipeptídeo com o solvente. Por outro lado, o modelo da proteína de *M.tb* mostra um formato de cavidade, assim como para outros microrganismos (GRININGER, *et al.*, 2006), isolando mais o sítio de interação do meio externo. Talvez isso afete a capacidade de ligação por permitir que a coenzima não se dissocie tão facilmente das dodecinas que possuam o formato mais “protegido”.

Para analisar mais a fundo os impactos gerados pelas mutações e melhor caracterizar a função dos *loci* tentou-se construir mutantes com a deleção nos alvos e depois complementá-los com os alelos de ambas bactérias estudadas. Para o primeiro passo, utilizou-se duas metodologias: *recombineering* e transdução especializada. Para a última técnica aproveita-se da alta capacidade dos micobacteriófagos em inserir seu DNA na bactéria como uma alternativa para introduzir o substrato de troca alélica dentro da célula. Na contrapartida, o *recombineering* utiliza-se da eletroporação para permitir a entrada do ácido nucléico na célula, mas sua vantagem é de expressar recombinases de fagos (nesse caso, via pJV53) para potencializar o passo de recombinação, enquanto na transdução utiliza-se as recombinases próprias da bactéria.

Nossos resultados mostram que todos os mutantes *knockouts* que conseguimos produzir foram obtidos pela técnica de *recombineering*, indicando que a maquinaria de recombinação própria de BCG Moreau é pouco ou não-funcional. Para excluir a hipótese de o problema estar nos fagos produzidos nesse trabalho pode-se observar que quando usamos o fago portando o substrato para o operon *rv1371/2/3*

em BCG Pasteur obtivemos clones *knockouts* corretos, indicando que sob condições apropriadas esse vetor funciona como devido. Além disso, testamos a infecção de BCG Moreau pelos fagos sob condições líticas e pudemos observar a formação de placas de lise, indicando que essa bactéria é susceptível à infecção por esses vírus.

A hipótese de que BCG Moreau possui um sistema de recombinação não-funcional é corroborado por outro estudo (KELLER, BÖTTGER e SANDER, 2008) que mostra que BCG Rússia, filogeneticamente próxima à cepa brasileira, é um mutante natural em *recA*, e por isso não consegue realizar recombinação homóloga. Mesmo tal fato sendo um empecilho a nível prático quando se almeja construir mutantes, ele também mostra que tais cepas apresentam uma maior estabilidade genômica, podendo essa ser considerada uma vantagem para um biofármaco como as vacinas vivas nas quais não se deseja a modificação da mesma e de suas características ao longo do tempo.

Em relação aos mutantes obtidos, teve-se sucesso na produção dos *knockouts* para *rv1371/2/3* e fumarato redutase, sendo que nesse último, durante a fase de produção, já podia se observar um fenótipo diferencial no tempo de crescimento em meio sólido. Análises da curva de crescimento desse mutante comparando com a cepa selvagem comprovam que o primeiro realmente apresenta uma menor taxa de crescimento nas fases iniciais, mas que alcança os mesmos níveis de saturação nas fases finais.

Estudos anteriores com esse *locus* mostram que *knockouts* de *M.tb* em *frdA* (WATANABE, *et al.*, 2011) não apresentam fenótipos diferenciais quando se analisa taxa de crescimento em meio axênico e em infecção em camundongos. Os autores justificam tal fato pela presença no genoma desse microrganismo de outros alelos de fumarato redutase e/ou SDH, e que devido à sua semelhança estrutural podem possuir um determinado grau de promiscuidade funcional. Tal bifuncionalidade das enzimas já é conhecida da literatura científica há muito tempo, sendo muitas vezes difícil caracterizar essas enzimas *in vitro* e deduzir qual seja sua real função na biologia do organismo (HAGERHALL, 1997).

Mas, indo de encontro a esses dados, outro estudo com mutantes em *M.tb* mostra que o *knockout* de todo o operon *frdABCD* (NICHOLLS, 2008) possui uma diminuição no crescimento *in vitro*, mas somente quando exposto a condições de hipóxia. A falta de variação no fenótipo no crescimento aeróbico é diagnosticada pela presença da mesma quantidade de bactérias do mutante e da cepa selvagem após

cultivo por 21 dias. Esse dado não vai contra o nosso, já que nesse período de incubação nossas análises demonstram a saturação da curva de crescimento, no qual ambas cepas possuem cultivos com densidades óticas iguais.

Mesmo sendo uma enzima dita como participante do metabolismo anaeróbico, a observação de um fenótipo diferencial em crescimento aeróbico pode indicar realmente uma bifuncionalidade dessa enzima. Isso pode significar que em condições normais esse operon anotado como o da fumarato redutase pode atuar também como SDH. Dessa forma, a retirada desses genes compromete o crescimento, principalmente na fase lag e log, devido ao comprometimento energético, já que essa atividade enzimática é essencial para o funcionamento do ciclo de Krebs e da cadeia de transporte de elétrons, principal produtora de ATP em condições normais de oxigênio.

Analisando a literatura sobre essas enzimas em micobactérias percebe-se que em *M. smegmatis* mc²155 não há nenhum gene anotado como fumarato redutase, mas este organismo apresenta dois codificantes para SDH homólogos aos presentes em *M.tb* (PECSI, *et al.*, 2014). Enquanto para a primeira bactéria um dos alelos é considerado essencial, ambos alelos de *M.tb* são não-essenciais (DEJESUS, *et al.*, 2017). Uma hipótese para tal fato é a de que a fumarato redutase de *M.tb* pode compensar em determinadas situações a atividade de SDH, tornando esse último um gene não-essencial para essa bactéria, enquanto para *M. smegmatis* tal compensação não pode ser feita e pelo menos um dos alelos deve sempre estar presente para a homeostase energética da célula.

Outro dado que corrobora a bifuncionalidade da fumarato redutase de micobactérias é a presença de somente menaquinonas no *pool* de quinonas desses microrganismos. Devido a características das reações catalisadas, SDH necessitaria de uma quinona com maior potencial de redução (elétron fluindo do par fumarato/succinato para a quinona), enquanto que a fumarato redutase utilizaria uma com menor valor de tal parâmetro (sentido contrário do fluxo de elétrons) (HARDS, *et al.*, 2019).

Bactérias que usam essas duas enzimas separadamente sem sobreposição de função, como *E. coli*, tendem a ter no seu *pool* de quinonas a ubiquinona (usada pela SDH) e a menaquinona (usada pela fumarato redutase) (UNDEN e BONGAERTS, 1997). No caso de micobactérias, como já dito e observado pela reconstrução do metabolismo de tais moléculas com nossos dados proteômicos, somente há as

enzimas para a síntese da quinona de menor potencial de redução, que será usada por ambos complexos sob condições específicas que permitam que a reação ocorra. Ao longo da evolução, tal fato propicia que as porções de interação com essa coenzima, que ficam nas subunidades C e D (âncoras de membrana), sejam similares entre fumarato redutase e SDH, propiciando a bifuncionalidade das mesmas, já que as porções A e B também são similares entre os complexos devido a serem as subunidades que interagem diretamente com os substratos, que são os mesmos independente da direção da reação. Já no caso de *E. coli*, por exemplo, a semelhança estrutural entre as subunidades de membrana dos diferentes complexos é menor (CECCHINI, *et al.*, 2002).

As cepas *knockouts* complementadas para esse *locus* já foram produzidas e futuras análises serão feitas visando comprovar o retorno do fenótipo selvagem com a adição do alelo, além de revelar se ambos alelos utilizados vão produzir o mesmo efeito. Mas, durante a produção das cepas complementadas já se pôde observar que o tempo de cultivo em meio sólido retornou para valores condizentes à cepa selvagem (dados não mostrados), e não ao *knockout*, indicando que a complementação permitiu o retorno às características de crescimento de BCG Moreau.

Para corroborar a análise da diferença dos alelos usados na alteração do fenótipo construiu-se cepas de BCG Moreau complementadas com ambas cópias do operon da fumarato redutase. Comparando com a cepa selvagem, observou-se que as bactérias complementadas apresentavam um maior crescimento nas fases iniciais de crescimento, facilitando a saída da fase lag para log, e também na fase estacionária. Isso corrobora a hipótese de que essa enzima seja bifuncional, atuando como SDH nas fases iniciais em aerobiose e permitindo um maior e mais rápido crescimento devido a uma maior atuação no metabolismo energético, e como fumarato redutase nas fases finais, no qual a cultura já está saturada e com menor quantidade de oxigênio dissolvido por bactéria, sendo vantajoso possuir uma enzima de respiração anaeróbica.

Comparando-se os alelos utilizados, observa-se uma pequena diferença entre o crescimento na fase estacionária, indicando que a cepa portando o alelo de *M.tb* alcança maiores níveis de saturação e mais rápido. Isso pode indicar que mesmo ambos complexos (fusionado ou não) possuindo teoricamente características similares e ambos alelos serem capazes de produzir as três formas já descritas, pode haver uma taxa de produção diferente das três proteínas para cada sequência, o que

poderia acarretar a vantagem observada pelo alelo de *M.tb*. Tal dado ainda será corroborado pela análise das cepas *knockout* complementadas.

Para o *knockout* de *rv1371/2/3* não se observou nenhum fenótipo em relação ao crescimento em meio axênico, mas tal fato já era esperado devido à função das enzimas envolvidas. Para observar se tal operon é realmente ligado à síntese lipídica construiu-se as cepas complementadas usando BCG Moreau. Como Rv1373 foi caracterizada *in vitro* como uma glicolípido sulfotransferase, acreditava-se que o produto oriundo das enzimas codificadas por esse operon seria um lipídeo com carga negativa. Logo, após o enriquecimento da amostra nesse subconjunto de moléculas, analisou-se as amostras de ambas cepas por TLC e observou-se a presença de bandas diferenciais entre as amostras.

Devido à mutação em *rv1371* e *rv1373* em BCG Moreau, iniciou-se as análises com a hipótese de que esse operon é não-funcional nessa bactéria, o que é corroborado pela facilidade na construção do *knockout* para esse *locus*. Dessa forma, complementar esse microrganismo com seu próprio alelo não acarretaria em mudanças no fenótipo, mas com o alelo de *M.tb* poderíamos observar diferenças, o que de fato ocorreu. Análises preliminares de lipidômica usando espectrometria de massas no modo negativo com o extrato bruto (dados não mostrados) também mostram a presença de picos específicos na amostra da bactéria com o alelo de *M.tb*. Tais dados indicam que o alelo de BCG realmente é não-funcional, enquanto o de *M.tb* é, sendo usado na produção de lipídeos carregados negativamente, provavelmente sulfatados.

A presença de mais de uma banda e pico diferenciais entre as amostras pode indicar a diversidade de produtos desse operon. Como já dito, Rv1372 é uma Pks caracterizada por usar como substrato ácidos graxos de diferentes tamanhos (C11-C19); logo, os diferentes sinais observados nas análises podem ser o mesmo produto com cadeias acilas distintas.

Além disso, já está descrito na literatura (TANG, *et al.*, 2013) que em *Streptomyces coelicolor* há um operon contendo uma Pks do tipo III (similar a Rv1372) e uma sulfotransferase (como Rv1373) que participa no processo de sulfatação de um antibiótico. Esse mecanismo difere da via clássica de transferência de grupos sulfatos, na qual sulfotransferases utilizam o doador universal de enxofre denominado 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS). Nesse microrganismo a enzima que processa o antibiótico utiliza uma molécula sulfatada produzida pelo operon. Isso porque a Pks

sintetiza o *core* lipídico enquanto a sulfotransferase adiciona nele um sulfato oriundo de PAPS. Essa nova molécula será a doadora do grupamento para o antibiótico em questão.

Tal fato descrito permite pensarmos que no caso do operon *rv1371/2/3* pode acontecer algo similar, no qual se produza uma molécula doadora de sulfato (às custas de PAPS) que será utilizada para modificar outros compostos. Com isso, a inativação desse sistema policistrônico em BCG Moreau faria com que essa bactéria não tivesse o sinal de mais de um lipídeo na TLC e no espectrômetro de massas.

A ausência de diferença na morfologia das colônias das construções realizadas em torno desse operon nos permite caracterizar que tal lipídeo produzido não afeta drasticamente a estrutura da parede celular e/ou superfície micobacteriana, podendo ser uma molécula envolvida em outros processos celulares a serem investigados.

Tais lipídeos devem ser purificados e caracterizados para a melhor compreensão da função dos mesmos na biologia do bacilo e para tentar explicar o motivo pelo qual as mutações que levaram à não-funcionalidade do alelo de BCG serem mantidas ao longo da evolução do grupo. Experimentos de infecção em macrófagos com as cepas *knockout* e complementadas serão realizados para observar se há alguma relação da produção desses lipídeos com características como infectividade e virulência.

As curvas de crescimento comparativas entre a cepa selvagem e aquelas complementadas com os alelos de *rv1371/2/3* mostram que aquela que porta a cópia de *M.tb* apresenta um maior crescimento na passagem da fase lag para a logarítmica quando comparada com as outras bactérias. Tal fato pode indicar que o produto desse operon fornece alguma vantagem para o microrganismo durante essa fase inicial do crescimento. Além disso, ambas cepas complementadas apresentam crescimento inferior ao selvagem na fase estacionária, podendo indicar que a expressão dessas enzimas pelo promotor pBlaF usado na construção possa gerar uma desvantagem para as bactérias, provavelmente devido a um maior gasto energético para a produção das proteínas codificadas por esses genes.

Para criar o *knockout* em *rv1498A* tentou-se as duas metodologias já citadas, e duas tentativas diferentes para cada uma. Interessantemente, não se obteve clones mutantes, mesmo quando se potencializava ambos eventos envolvidos no processo, ou seja, a entrega do substrato de troca alélica (utilizando o fago) e a recombinação (usando as recombinases de fago expressas a partir de pJV53). Tal fato pode ser

explicado de duas maneiras: ou o gene a ser deletado é essencial, ou a região genômica é de difícil recombinação devido a problemas estruturais ou à essencialidade daquela sequência para que outros genes adjacentes (essenciais) sejam expressos. Vale a pena ressaltar que até o momento só há um relato na literatura, em *Streptomyces davawensis*, de um mutante com deleção no gene de dodecina (LUDWIG, *et al.*, 2018).

Para obtermos dados sobre a essencialidade de *rv1498A* para BCG Moreau testou-se adicionar antes do códon de início do gene um cassete que contém o promotor e regiões necessárias para expressão do gene adjacente. No caso, esse sistema é regulado por TetR, ou seja, na presença de um inibidor desse regulador tem-se a transcrição constitutiva do gene sob seu controle. Dessa maneira, procedendo-se todos os cultivos durante a construção dos mutantes com ATC, o inibidor de TetR, obteria-se esses clones *knockdown* e testaria-se seu crescimento na presença e ausência do inibidor. Se houvesse proliferação celular somente com ATC, corroboraria-se a ideia de que o gene a jusante do cassete é essencial.

Entretanto, novamente não foi possível obter clones com a estrutura genética desejada, indicando possivelmente que essa região do genoma é de difícil manipulação via recombinação. Como neste processo não foi retirada nenhuma sequência do genoma, havendo apenas a adição do cassete a montante do códon de início de *rv1498A*, exclui-se também a hipótese de que alguma sequência contida nesse gene seja importante para controlar genes essenciais a jusante do códon de início. Para os casos a montante não podemos descartar haver algum efeito deletério porque adicionamos uma sequência de cerca de 3 kb, o que poderia distanciar consideravelmente sequências promotoras ou operadoras dos genes que são controlados por suas ações.

Mas, com essas tentativas fica-se com a ideia de que o gene da dodecina pode ser essencial, fato desconcertante se considerarmos os dados obtidos com a análise das dodecinas recombinantes que mostram que o homólogo teórico de BCG Moreau tem um declínio considerável em diferentes parâmetros de atividade (ligação à riboflavina) e características (termo- e haloestabilidade) quando comparado com a proteína de *M.tb*. Ou seja, se o produto gênico teórico tem grandes diferenças funcionais, mas o gene aparenta ser muito importante para a bactéria, ficamos com duas hipóteses: a proteína tem outra função celular que não medimos nesse trabalho com as formas recombinantes, e nessa função ambas formas atuam similarmente, ou

mesmo a mutação estando presente no genoma o fenótipo não alcança o nível proteico, devido a um uso diferencial de códons que permite que o ACG presente em BCG Moreau seja lido como um códon de início de tradução. Essa última hipótese é corroborada pelos nossos resultados comparativos com as dodecinas nativas, na qual ambas testadas apresentam características de termoestabilidade e ligação à riboflavina similares.

A hipótese do uso alternativo de códons tem subsídios na literatura (TANG, *et al.*, 2004), que mostra o uso de ACG como códon de início para o gene mitocondrial do fungo *Saccharomyces cerevisiae* *ALA1*, que codifica uma alanil-tRNA sintetase,

Para corroborar a semelhança funcional das sequências de *M.tb* e BCG Moreau, realizou-se os experimentos de complementação de *M. smegmatis* mc²155, bactéria já descrita como tendo proteínas sequestradoras de FAD relacionadas com estresse oxidativo e hipóxico (HAROLD, *et al.*, 2018), mas que não possui homólogos de *rv1498A*. As sequências usadas eram idênticas, a não ser pela mutação na posição correspondente ao códon de início do gene de *M.tb*. Os resultados da curva de crescimento em meio axênico mostram que ambas cepas complementadas apresentam uma vantagem em relação à cepa selvagem a partir do início da fase logarítmica. Essa vantagem é acompanhada de um aumento da expressão da dodecina recombinante, indicando uma ligação entre ambos eventos. Além disso, observa-se que há o aumento gradativo da expressão da proteína, tendo seu ápice na fase estacionária, mesmo momento do cultivo que em BCG Moreau apresentava as atividades enzimáticas para a síntese das flavinas ativas, como visto pelos dados proteômicos e de reconstrução metabólica. Além disso, tal expressão diferencial indica um possível controle, o que em procariotos normalmente ocorre a nível transcricional.

Tal fenótipo de melhora de crescimento na passagem da fase lag para a log pode indicar uma melhor homeostase redox, além da melhor homeostase energética já discutida quando analisados os resultados com as cepas complementadas com o operon da fumarato redutase. Sabe-se que flavinas livres no citoplasma de células da retina humana, por exemplo, são capazes de serem reduzidas pela luz e subsequentemente causarem diversos danos celulares, como peroxidação lipídica de ácidos graxos insaturados (KELLEY, *et al.*, 2017). Dada essa desvantagem em ter-se essas coenzimas na forma livre, uma célula que possua uma proteína capaz de se ligar a essas moléculas, protegendo-as da redução por luz ou por outros agentes

químicos, teria uma vantagem no crescimento, já que poderia manter melhor a homeostase redox durante a série de reações de oxirredução do metabolismo energético em atividade máxima.

Sabe-se por outros estudos que a maioria das micobactérias (uma das exceções conhecidas é *M. genitalium* (PANDEY, *et al.*, 2014)) não possuem transportadores de riboflavina, ou seja, não podem obter essa coenzima do meio extracelular. Com isso, baseiam todo seu metabolismo de flavinas a partir das vias *de novo* de biossíntese de riboflavina (LONG, *et al.*, 2010). Além disso, essas mesmas micobactérias são conhecidas por serem super produtoras naturais de riboflavinas, ou seja, acumulam mais de 10 mg dessa coenzima por litro de cultivo sob condições específicas (ABBAS e SIBIRNY, 2011). Todas essas informações e dados corroboram a hipótese de que ter a expressão de uma dodecina no citoplasma de *M. smegmatis* permite uma melhor homeostase redox para a bactéria, já que a mesma produz em excesso essa coenzima por depender somente das vias de síntese *de novo*.

Para corroborar a ligação entre dodecinas e a proteção contra o estresse oxidativo realizou-se o ensaio de cultivo na presença e ausência de peróxido de hidrogênio, molécula conhecida por causar um estresse global. Nossos dados mostram que as cepas complementadas apresentam um momento inicial de estagnação do crescimento (provavelmente uma fase de adaptação da célula na qual está produzindo as proteínas de resposta, dentre elas a dodecina), seguido de um momento de crescimento nos mesmos níveis da célula que não foi exposta ao estresse. Por outro lado, a cepa selvagem, quando na presença do peróxido, apresentou um declínio constante do crescimento.

Analisando a sequência de 200 pb clonada a montante do códon de início de *rv1498A* observa-se sítios de ligação para dois reguladores ligados à resposta ao estresse oxidativo e hipóxia em procariotos: OxyR e FurA (ZAHRT, *et al.*, 2001). Já é conhecido que algumas espécies de micobactérias, entre elas *M. bovis*, *M.tb* e *M. smegmatis*, apresentam um OxyR não-funcional. Mas, muitos genes tipicamente controlados por esse regulador em outras bactérias são regulados por FurA em micobactérias (ECKELT, *et al.*, 2015). Com isso, chega-se a uma hipótese de que *rv1498A* é controlado por reguladores de resposta a estresse oxidativo, podendo ligar tal evento com uma possível função do produto do gene estudado.

Os dados coletados até o momento com os alvos oriundos da abordagem de genômica comparativa indicam a presença da mutação, mas sem um impacto

funcional, como no caso da dodecina e do complexo da fumarato redutase. Isso pode estar mostrando a importância das vias nas quais essas proteínas atuam para a fisiologia da bactéria, sendo selecionados aqueles organismos que consigam desempenhar suas funções com a maior adaptabilidade em determinado ambiente. Já no caso do operon *rv1371/2/3*, obteve-se indícios que corroboram a hipótese de que as mutações presentes em BCG Moreau fazem com que esse alelo seja não funcional. Já a cópia de *M.tb* aparenta ser responsável pela síntese de lipídeos carregados negativamente. Experimentos posteriores serão realizados para caracterizá-lo e observar seu efeito na biologia do bacilo, assim como ensaios de infecção com as cepas complementadas para analisar se esses lipídeos oferecem alguma vantagem durante o processo de interação da bactéria com células eucarióticas. Além disso, pretende-se realizar mais ensaios para compreender o motivo pelo qual BCG Moreau consegue se desenvolver sem a função desse operon.

No caso da fumarato redutase a bactéria (tanto *M.tb* quanto BCG) permanece produzindo as três formas da proteína, mesmo com a desvantagem teórica do gasto energético para a produção delas ao mesmo tempo. Geneticamente, a região na qual a mutação ocorre propicia que tal mutação ocorra, facilitando a aparição de diversas outras, como observado pela variação de alelos encontrados dentro da família das cepas BCG (dado não mostrado). Ainda não temos uma explicação do porquê das diferentes formas da proteína permanecerem sendo produzidas, e outros experimentos necessitam ser realizados para corroborar possíveis hipóteses.

Com os dados oriundos da abordagem de proteômica comparativa pretende-se selecionar outros alvos para o estudo detalhado do impacto das mutações, já escolhendo aqueles que apresentem expressão diferencial entre as bactérias. Visto a predominância de genes codificantes de proteínas de metabolismo lipídico acredita-se que a caracterização do lipidoma desses micro-organismos será de grande valia e permitirá análise de alguns casos de impacto funcional, assim como levantar novos prováveis alvos para estudos posteriores.

6. Conclusões

- Através da abordagem de genômica comparativa, identificamos 273 casos de pequenas mutações (SNPs e INDELS de até dez nucleotídeos) em regiões codificantes do genoma de *M. bovis* BCG Moreau ao compará-lo com o de *M. tuberculosis* cepa H37Rv;
- Dessas mutações, 4 % estão em genes anotados como envolvidos no metabolismo lipídico;
- Escolheu-se os casos dos homólogos em *rv1371/2/3*, *rv1552/3/4/5* e *rv1498A* para estudos do impacto funcional em bancada devido, principalmente, aos produtos gênicos serem descritos como participantes de importantes vias para micobactérias: metabolismo lipídico, respiração anaeróbica e homeostase redox, respectivamente;
- Ensaio de RT-PCR mostram que as mutações em BCG Moreau não afetam a transcrição dos genes estudados nas diferentes fases de crescimento axênico. Além disso, ensaios com iniciadores específicos corroboram que *rv1371/2/3* e o operon da fumarato redutase são realmente sistemas policistrônicos;
- Ensaio de *western blotting* com amostras de BCG Moreau e *M.tb* mostram que a produção das proteínas estudadas na cepa vacinal não foi afetada pelas mutações, além de fornecer indícios para um possível controle de expressão dependendo da fase de cultivo, com maiores níveis nas fases logarítmica e estacionária;
- Análise da massa molecular das bandas reconhecidas nos experimentos de *western blotting* fornece indícios que corroboram os impactos estruturais das mutações em *rv1371* e *rv1553/4*, mas mantendo a expressão da forma não-mutada;
- Alinhamentos de sequência com outros integrantes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* mostram que a mutação presente no homólogo de *rv1373* e no complexo fumarato redutase surgiu na linhagem de *M. bovis*, enquanto a do homólogo de *rv1371* está compartilhada por todas as cepas que infectam animais não-humanos preferencialmente. No caso de *rv1498A*, a mutação surge no nó que junta as cepas de *M. africanum* II e as cepas animais;
- Ensaio de extração diferencial com Triton X-114 mostram que Rv1371, Rv1373 e FrdB apresentam associação total ou parcial à fração orgânica, enquanto a dodecina só é extraída na fração aquosa;

- Experimentos analisando a termoestabilidade das proteínas nativas indicam que todas permanecem em solução após incubações em altas temperaturas (80-100 °C);
- Análises com as dodecinas recombinantes mostram que a proteína teórica de BCG Moreau tem uma capacidade de ligação à riboflavina e termo- e haloestabilidade inferiores à proteína homóloga de *M.tb*;
- O modelo estrutural para os complexos da dodecina indicam que a ausência do *loop* composto pelos sete aminoácidos N-terminais predita para a proteína de BCG Moreau diminui a interação intercadeias e altera a estrutura da abertura da cavidade de ligação à riboflavina, corroborando os dados obtidos com as proteínas recombinantes;
- Os modelos estruturais da fumarato redutase mostram que ambos são similares entre si ao nível global, mas possuem pequenas diferenças quanto à superfície eletroestática e interação com as moléculas não-protéicas;
- Obteve-se sucesso na construção dos *knockouts* em *rv1371/2/3* e fumarato redutase, sendo que este último apresenta um fenótipo diferencial no crescimento que aparenta ser revertido pela complementação com os alelos de *M.tb* e BCG Moreau;
- A cepa selvagem complementada com os alelos de *rv1371/2/3* mostra que há lipídeos diferenciais na amostra com o alelo de *M.tb*, corroborando a hipótese de não-funcionalidade do de BCG Moreau;
- O fato de não se ter obtido mutantes *knockout* e *knockdown* para *rv1498A* indica ou a essencialidade desse gene ou a dificuldade de se realizar recombinação homóloga nessa região do genoma;
- Só se conseguiu produzir os mutantes por recombinação homóloga quando se utilizou o protocolo de *recombineering*, indicando que BCG Moreau tem uma maquinaria pouco ou não-funcional para esse processo;
- Complementação de *M. smegmatis* com os alelos de *rv1498A* indica que ambos possuem uma vantagem em relação à cepa não complementada no que concerne o crescimento em meio axênico. Tal vantagem está vinculada a um aumento na expressão da dodecina recombinante;
- Ensaio com peróxido de hidrogênio com essas cepas indicam que quando complementadas as bactérias permanecem crescendo após um período inicial de expressão das proteínas recombinantes;

- Análises proteômicas indicam a expressão diferencial, quando se analisa fases de crescimento diferentes, de diferentes genes envolvidos em metabolismo lipídico que possuem o tipo de mutação estudado nesse trabalho;
- A reconstrução do metabolismo de riboflavina com as identificações da análise proteômica mostra que as atividades enzimáticas envolvidas na síntese das flavinas ativas estão presentes somente na fase estacionária, indicando controle de expressão similar àquele observado para *rv1498A* nos ensaios com as cepas de *M. smegmatis* complementadas.

7. BIBLIOGRAFIA

ABBAS, C.; SIBIRNY, A. Genetic Control of Biosynthesis and Transport of Riboflavin and Flavin Nucleotides and Construction of Robust Biotechnological Producers. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 2011.

ABDALLAH, A. et al. Genomic expression catalogue of a global collection of BCG vaccine strains show evidence for highly diverged metabolic and cell-wall adaptations. **Nature Scientific Reports**, 2015.

ABDALLAH, A.; BEHR, M. Evolution and Strain Variation in BCG. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2017.

ALTSCHUL, S. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 1997.

ARBUES, A. et al. Playing hide-and-seek with host macrophages through the use of mycobacterial cell envelope phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2014.

AYYAPPAN, J. et al. Adipose Tissue Regulates Pulmonary Pathology during TB Infection. **mBio**, 2019.

BAKER, N. et al. Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. **PNAS**, 2001.

BARBIER, M.; WIRTH, T. The Evolutionary History, Demography, and Spread of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **Microbiology Spectrum**, 2016.

BARDAROV, S. et al. Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. **Microbiology**, 2002.

BENÉVOLO-DE-ANDRADE, T. et al. BCG Moreau Rio de Janeiro - An oral vaccine against tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2005.

BHAT, Z. et al. Cell wall: A versatile fountain of drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2017.

BRITES, D.; GAGNEUX, S. The Nature and Evolution of Genomic Diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2017.

BROSCH, R. et al. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. **PNAS**, 2007.

CECCHINI, G. et al. Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, 2002.

CHEATHAM, T.; CIEPLAK, P.; KOLLMAN, P. A Modified Version of the Cornell et al. Force Field with Improved Sugar Pucker Phases and Helical Repeat. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 1999.

CHUNG, C.; NIEMELA, S.; MILLER, R. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **PNAS**, 1989.

COLOVOS, C.; YEATES, T. ERRAT: an empirical atom-based method for validating protein structures. **Protein Science**, 1993.

COMAS, I.; GAGNEUX, S. The Past and Future of Tuberculosis Research. **PLoS Pathogens**, 2009.

COOK, G. et al. Energetics of Respiration and Oxidative Phosphorylation in Mycobacteria. **Microbiology Spectrum**, 2014.

CUMMING, B. et al. The Physiology and Genetics of Oxidative Stress in Mycobacteria. **Microbiology Spectrum**, 2014.

DE SOUZA, G. et al. Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway. **Journal of Proteomics**, 2011.

DEJESUS, M. et al. Comprehensive Essentiality Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Genome via Saturating Transposon Mutagenesis. **mbio**, 2017.

DOLIN, P.; RAVIGLIONE, M.; KOCHI, A. A review of current epidemiological data and estimation of future tuberculosis incidence and mortality, 1993.

DOLINSKY, T. et al. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, 2004.

ECKELT, E. et al. FurA contributes to the oxidative stress response regulation of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis. **Frontiers in Microbiology**, 2015.

EISENBERG, D.; LUTHY, R.; BOWIE, J. VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in Enzymology**, 1997.

EOH, H. et al. Metabolic anticipation in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Microbiology**, 2017.

FISER, A.; SALI, A. Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. **Methods in Enzymology**, 2003.

FOGEL, N. Tuberculosis: A disease without boundaries. **Tuberculosis**, 2015.

GALGONEK, J. et al. Amino Acid Interaction (INTAA) web server. **Nucleic Acids Research**, 2017.

GALVÃO, T. et al. The BCG Moreau RD16 deletion inactivates a repressor reshaping transcription of an adjacent gene. **Tuberculosis**, 2014.

GANAI, A. et al. Thermostable Hexameric Form of Eis (Rv2416c) Protein of *M. tuberculosis* Plays an Important Role for Enhanced Intracellular Survival within Macrophages. **PLoS ONE**, 2011.

GODDARD, T. et al. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. **Protein Science**, 2018.

GOKHALE, R. et al. Versatile polyketide enzymatic machinery for the biosynthesis of complex mycobacterial lipids. **Natural Product Reports**, 2006.

GOMES, L. et al. Genome Sequence of *Mycobacterium bovis* BCG Moreau, the Brazilian Vaccine Strain against Tuberculosis. **Journal of Bacteriology**, 2011.

GRININGER, M. et al. Dodecin Sequesters FAD in Closed Conformation from the Aqueous Solution. **Journal of Molecular Biology**, 2006.

GRININGER, M. et al. Dodecin Is the Key Player in Flavin Homeostasis of Archaea. **The Journal of Biological Chemistry**, 2009.

HAGERHALL, C. Succinate: quinone oxidoreductases Variations on a conserved theme. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1997.

HARDS, K. et al. Alternate quinone coupling in a new class of succinate dehydrogenase may potentiate mycobacterial respiratory control. **FEBS Letters**, 2019.

HAROLD, L. et al. FAD-sequestering proteins protect mycobacteria against hypoxic and oxidative stress. **The Journal of Biological Chemistry**, 2018.

HERBST, D.; TOWNSEND, C.; MAIER, T. The architectures of iterative type I PKS and FAS. **Natural Product Reports**, 2018.

HERSHKOVITZ, I. et al. Tuberculosis origin: The Neolithic scenario. **Tuberculosis**, 2015.

HMAMA, Z. et al. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunological Reviews**, 2015.

IVERSON, T. et al. Crystallographic Studies of the *Escherichia coli* Quinol-Fumarate Reductase with Inhibitors Bound to the Quinol-binding Site. **The Journal of Biological Chemistry**, 2002.

JARDIM-MESSEDER, D. et al. Fumarate reductase superfamily: A diverse group of enzymes whose evolution is correlated to the establishment of different metabolic pathways. **Mitochondrion**, 2017.

JOUNG, S.; RYOO, S. BCG vaccine in Korea. **Clinical and Experimental Vaccine Research**, 2013.

KELLER, P.; BÖTTGER, E.; SANDER, P. Tuberculosis vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Russia is a natural *recA* mutant. **BMC Microbiology**, 2008.

KELLEY, R. et al. Ablation of the riboflavin-binding protein retbindin reduces flavin levels and leads to progressive and dose-dependent degeneration of rods and cones. **The Journal of Biological Chemistry**, 2017.

KESSEL, J.; HATFULL, G. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Methods**, 2007.

KOCH, R. Die Aetiologie der Tuberkulose. **Berliner Klinische Wochenschrift**, 1882.

KRUH, N. et al. Portrait of a Pathogen: The *Mycobacterium tuberculosis* Proteome In Vivo. **PLoS ONE**, 2010.

LAEMMLI, U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, 1970.

LAI, R.; MEINTJES, G.; WILKINSON, R. HIV-1 tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. **Seminars in Immunopathology**, 2015.

LESLEY, R.; RAMAKRISHNAN, L. Insights into early mycobacterial pathogenesis from the zebrafish. **Current Opinion in Microbiology**, 2008.

LIU, F. et al. Structural and biophysical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* dodecin Rv1498A. **Journal of Structural Biology**, 2011.

LONG, Q. et al. Riboflavin Biosynthetic and Regulatory Factors as Potential Novel Anti-Infective Drug Targets. **Chemical Biology & Drug Design**, 2010.

LUDWIG, P. et al. Characterization of the small flavin-binding dodecin in the roseoflavin producer *Streptomyces davawensis*. **Microbiology**, 2018.

MACHOWSKI, E. et al. In Vitro Analysis of Rates and Spectra of Mutations in a Polymorphic Region of the Rv0746 PE_PGRS Gene of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, 2007.

MÅLEN, H. et al. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Proteomics**, 2007.

MÅLEN, H. et al. Research article Definition of novel cell envelope associated proteins in Triton X-114 extracts of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **BMC Microbiology**, 2010.

MALI, P.; MEENA, L. Triacylglycerol: nourishing molecule in endurance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Biosciences**, 2018.

MARRI, P.; BANNANTINE, J.; GOLDING, G. Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. **FEMS Microbiology Reviews**, 2006.

MAWUENYEGA, K. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Functional Network Analysis by Global Subcellular Protein Profiling. **Molecular Biology of the Cell**, 2005.

MEDEIROS, M. et al. Comparative evaluation of *Mycobacterium vaccae* as a surrogate cloning host for use in the study of mycobacterial genetics. **Microbiology**, 2002.

MEISSNER, B. et al. The Dodecin from *Thermus thermophilus*, a Bifunctional Cofactor Storage Protein. **The Journal of Biological Chemistry**, 2007.

MENDES, A.; FENSTERSEIFER, L. Tuberculose: porque os pacientes abandonam o tratamento? **Boletim de Pneumologia Sanitária**, 2004.

MOGASHOA, T. et al. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains circulating in Botswana. **PLoS ONE**, 2019.

MONTEIRO-MAIA, R. et al. Gain of function in *Mycobacterium bovis* BCG Moreau due to loss of a transcriptional repressor. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2018.

MOUGOUS, J. et al. Sulfotransferases and Sulfatases in *Mycobacteria*. **Chemistry & Biology**, 2002.

NICHOLLS, A. Identification of fumarate reductase as a potential *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor and as an important factor in antimicrobial susceptibility, 2008.

OLSSON, M. et al. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. **Journal of Chemical Theory and Computation**, 2010.

PANDEY, S. et al. Cofactor Biosynthetic Pathways in *Mycobacterium tuberculosis* as Potential Drug Targets. **Current Respiratory Medicine Reviews**, 2014.

PEAN, C. et al. Regulation of phagocyte triglyceride by a STAT-ATG2 pathway controls mycobacterial infection. **Nature Communications**, 2017.

PECSI, I. et al. Essentiality of Succinate Dehydrogenase in *Mycobacterium smegmatis* and Its Role in the Generation of the Membrane Potential Under Hypoxia. **mbio**, 2014.

RABILLOUD, T. **Proteome Research**: two-dimensional gel electrophoresis and identification methods. [S.l.]: Springer, 2000.

RAMESHWARAM, N. et al. Lipid metabolism and intracellular bacterial virulence: key to next-generation therapeutics. **Future Microbiology**, 2018.

RITZ, N.; CURTIS, N. Mapping the global use of different BCG vaccine strains. **Tuberculosis**, 2009.

RIVERA-MARRERO, C. et al. Molecular cloning and expression of a novel glycolipid sulfotransferase in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, 2002.

SALGAME, P. et al. Latent tuberculosis infection e Revisiting and revising concepts. **Tuberculosis**, 2015.

SANKARANARAYANAN, R. et al. A novel tunnel in mycobacterial type III polyketide synthase reveals the structural basis for generating diverse metabolites. **Nature Structural & Molecular Biology**, 2004.

SERSHEN, C.; PLIMPTON, S.; MAY, E. Oxygen Modulates the Effectiveness of Granuloma Mediated Host Response to *Mycobacterium tuberculosis*: a Multiscale Computational Biology Approach. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2016.

SHARAN, S. et al. Recombineering: A Homologous Recombination-Based Method of Genetic Engineering. **Nature Protocols**, 2009.

SIMEONE, R. et al. Delineation of the roles of FadD22, FadD26 and FadD29 in the biosynthesis of phthiocerol dimycocerosates and related compounds in *Mycobacterium tuberculosis*. **The FEBS Journal**, 2010.

STIERAND, K.; RAREY, M. PoseView – molecular interaction patterns. **Journal of Cheminformatics**, 2009.

STOVER, C. et al. New use of BCG for recombinant vaccines. **Nature**, 1991.

STUDER, R.; DESSAILLY, B.; ORENGO, C. Residue mutations and their impact on protein structure and function: detecting beneficial and pathogenic changes. **Biochemical Journal**, 2013.

TANG, H.-L. et al. Translation of a Yeast Mitochondrial tRNA Synthetase Initiated at Redundant non-AUG Codons. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004.

TANG, X. et al. A two-step sulfation in antibiotic biosynthesis requires a type iii polyketide synthase. **Nature Chemical Biology**, 2013.

TEXIER, P. et al. A useful gene cassette for conditional knock-down of essential genes by targeted promoter replacement in Mycobacteria. **BioTechniques**, 2018.

TIAN, T.; SALIS, H. A predictive biophysical model of translational coupling to coordinate and control protein expression in bacterial operons. **Nucleic Acids Research**, 2015.

TOMMASO, P. et al. T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. **Nucleic Acids Research**, 2011.

TRAN, V.; LIU, J.; BEHR, M. BCG Vaccines. **Microbiology Spectrum**, 2014.

TRIVEDI, A. et al. Redox Biology of Tuberculosis Pathogenesis. **Advances in Microbial Physiology**, 2012.

UNDEN, G.; BONGAERTS, J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, 1997.

WALPOLE, G.; GRINSTEIN, S.; WESTMAN, J. The Role of Lipids in Host-Pathogen Interactions. **IUBMB Life**, 2018.

WATANABE, S. et al. Fumarate Reductase Activity Maintains an Energized Membrane in Anaerobic *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathogens**, 2011.

WHO. **Global tuberculosis report 2018**. World Health Organization. Geneva. 2018.

WONS, E. et al. Evaluation of GFP reporter utility for analysis of transcriptional slippage during gene expression. **Microbial Cell Factories**, 2018.

ZAHRT, T. et al. Mycobacterial FurA is a negative regulator of catalase- peroxidase gene katG. **Molecular Microbiology**, 2001.

8. ANEXOS

Tabela 27 – Resumo das características das proteínas recombinantes produzidas nesse trabalho. Indica-se o organismo hospedeiro e o plasmídeo usado, além da massa molar (kDa) das formas recombinante e nativa dos alvos estudados.

Organismo	Plasmídeo	Proteína	Massa molecular (kDa)			
			Recombinante		Nativa	
			BCG	<i>M.tb</i>	BCG	<i>M.tb</i>
<i>Escherichia coli</i> cepa BL21(DE3)	pET28a(+) NcoI/XhoI Cauda 6-His C-terminal	Rv1371	36,7	X	33,6	55,1
		Rv1373	30,1	X	29,0	37,0
		FrdB	27,7	X	40,9	27,2
		Dodecina	7,9	8,8	6,7	7,6

Tabela 28 – Plasmídeos comerciais ou cedidos por outros grupos de pesquisa usados nesse trabalho.

Plasmídeo	Resistência	Utilizado para	Referência
pJV53	Canamicina	Fornecer recombinases para o sistema <i>recombineering</i>	(KESSEL e HATFULL, 2007)
	Higromicina		
pMV361	Canamicina	Plasmídeo integrativo para complementação	(STOVER, <i>et al.</i> , 1991)
	Higromicina		
pJET1.2	Ampicilina	Subclonagem de <i>dod</i> cKD AES	Disponível em: www.thermofisher.com/
pWM370 (pUC18Δ <i>lacZ</i>)		Subclonagem de AES para <i>knockout</i>	---
pUS972	Canamicina	Complementação de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	(MEDEIROS, <i>et al.</i> , 2002)

Tabela 29 – Cepas micobacterianas produzidas nesse trabalho. Indica-se o organismo original, o plasmídeo usado para produção do clone, o genótipo final e a resistência a antibiótico adquirida.

Organismo	Plasmídeo usado	Genótipo	Resistência
BCG Moreau	pMS02*	Δfrd	Canamicina
	pMS03*	$\Delta rv1371/2/3$	
	pMS04	:: <i>rv1371/2/3_M.tb</i>	
	pMS05	:: <i>rv1371/2/3_BCG</i>	
	pMS06	:: <i>frd_M.tb</i>	
	pMS07	:: <i>frd_BCG</i>	
	pMS08	$\Delta rv1371/2/3::$ <i>rv1371/2/3_M.tb</i>	Canamicina + Higromicina
	pMS09	$\Delta rv1371/2/3::$ <i>rv1371/2/3_BCG</i>	
	pMS10	$\Delta frd::frd_M.tb$	
	pMS11	$\Delta frd::frd_BCG$	
	<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	pMS13	:: <i>dod_M.tb</i>
pMS14		:: <i>dod_BCG</i>	

Tabela 30 – Plasmídeos produzidos durante esse trabalho. Mostra-se o arcabouço e os insertos usados, além de um resumo de como foi produzida a molécula final e para qual fim esta foi usada.

Plasmídeo	Resistência	Arcabouço	Inserto	Sítio de inserção	Utilizado para
pMS01		pWM370 (pUC18 Δ lacZ)	<i>dod</i> AES	Sistema INFUSION no sítio PvuI de pWM370, dividindo <i>ampR</i>	Amplificar o AES e usá-lo para criar o mutante <i>knockout</i>
pMS02			<i>frd</i> AES		
pMS03			<i>rv1371/2/3</i> AES		
pMS04	Canamicina	pMV361K	pBlaF+ <i>rv1371/2/3</i> <i>M.tb</i>	NdeI/HindIII	Complementar BCG Moreau
pMS05			pBlaF+ <i>rv1371/2/3</i> BCG		
pMS06			1kb+ <i>frd M.tb</i>	pMV361K – XbaI/NheI	
pMS07			1kb+ <i>frd</i> BCG	inserto - SpeI	
pMS08		pMV361H	pBlaF+ <i>rv1371/2/3</i> <i>M.tb</i>	NdeI/HindIII	Complementar BCG Moreau Δ <i>rv1371/2/3</i>
pMS09			pBlaF+ <i>rv1371/2/3</i> BCG		
pMS10		pMV361K_ <i>frdM.tb</i>	---	Troca do gene de resistência	Complementar BCG Moreau Δ <i>frd</i>
pMS11	pMV361K_ <i>frd</i> BCG	---	(<i>kanR</i> - <i>hygR</i>)		
pMS12		pJET1.2	<i>dod</i> cKD AES	---	Amplificar o AES e usá-lo para criar o mutante <i>dod</i> <i>knockdown</i>
pMS13	Canamicina	pUS972	200bp+ <i>dod M.tb</i>	XbaI/HindIII	Complementar <i>M. smegmatis</i> mc ² 155
pMS14			200bp+ <i>dod</i> BCG		