

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Construção e Estudo de Mutantes Envolvidos na
Biossíntese de Aminoácidos Aromáticos e Purinas
em *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium
smegmatis* por Troca Alélica**

Cristopher Zandoná Schneider

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular da UFRGS
como um dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientadores: Dr. Diógenes Santiago Santos
Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre, janeiro de 2007

Esta Tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, tendo sido aprovada em sua forma final pelos Orientadores e pela Comissão Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadores:

Dr. Diógenes Santiago Santos

Dr. Luiz Augusto Basso

Comissão Examinadora:

Dr. Eduardo Eizirik

Dr. Giancarlo Pasquali

Dra. Maria Martha Campos

Este trabalho foi iniciado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, Porto Alegre, Brasil), continuado no Centre for Infectious Disease (Barts and The London, Queen Mary's School of Medicine and Dentistry, University of London, Londres, Reino Unido) e finalizado no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS, Porto Alegre, Brasil), sendo financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico este trabalho a meus pais, Paulo e Odete, e a meus irmãos, Rafael, Mateus e Thiago, pelo apoio constante, exemplo intelectual e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A meus orientadores, Dr. Diógenes Santiago Santos e Dr. Luiz Augusto Basso, por me apresentarem ao fascinante mundo das micobactérias, pela oportunidade de realizar este trabalho e pela orientação: muito obrigado!

À minha orientadora no exterior, Prof. Tanya Parish, por inúmeros ensinamentos na difícil arte de manipulação genética do bacilo da tuberculose: *thank you very much!*

Aos amigos do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional: Bruna, Clarissa, Isabel, Isabelinha, Rafael, Raquel, Rodrigo e todos os demais colegas, antigos e novos, pela ajuda técnica, companheirismo e incentivo.

Aos amigos do *TB Group* em Londres: Dra. Amanda Brown, Jade James, Khaled Al-Saaidi, Dr. Paul Carroll e Dr. Renan Goude, por ensinamentos, discussões científicas e companheirismo.

Aos amigos Fernanda Ely e Dr. Jaim Simões de Oliveira, pelas dicas para a realização dos experimentos de expressão protéica e ensaios de atividade enzimática, além de importantes discussões científicas.

À Dra. Jocelei Maria Chies, Claudinha, Eraldo, Gaby e demais membros da empresa QuatroG, pela convivência amiga.

Aos funcionários e técnicos do CP-BMF e UFRGS: Ana Paula, Clotilde, Gleci e Renilda, por seu indispensável auxílio para a realização dos experimentos.

Ao Dr. Giancarlo Pasquali e Dr. Rafael Roesler, membros da Comissão de Acompanhamento, pela revisão do trabalho e demais sugestões.

Ao Dr. Arthur Germano Fett Neto, pela paciência.

Ao amigo Luciano Saucedo e em especial à minha amiga Silvia Regina Centeno, pelo inestimável auxílio em questões burocráticas e logísticas.

A todos os amigos que me ajudaram durante a estada em Londres.

Aos demais amigos, sanos e insanos, por festas, papos e viagens: obrigado, de coração!

ÍNDICE

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES, 9

RESUMO, 12

ABSTRACT, 13

1. INTRODUÇÃO, 14

1.1. Tuberculose, 14

1.2. Micobactérias, 24

1.3. Patogênese e virulência de *Mycobacterium tuberculosis*, 28

1.4. Métodos genéticos para o estudo de micobactérias, 39

1.5. Corismato mutase, 56

1.6. Fosforilase de nucleosídeos purínicos, 64

1.7. Objetivos, 70

2. MATERIAIS E MÉTODOS, 72

2.1. Linhagens bacterianas e meios de cultura, 72

2.2. Extração de DNA genômico de micobactérias, 74

2.3. Plasmídeos e extração de DNA plasmidial, 74

2.4. *Primers* e amplificação por PCR, 76

2.5. Clonagem molecular de fragmentos de DNA, 79

2.5.1. Clivagem de DNA com enzimas de restrição, 79

2.5.2. Desfosforilação de DNA, 79

2.5.3. Purificação de vetores e fragmentos de DNA, 79

2.5.4. Ligação de DNA, 80

2.5.5. Transformação bacteriana, 80

2.6. Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*, 81

2.7. Preparação de extratos celulares de *M. smegmatis*, 82

2.8. Ensaio de atividade enzimática de CM, 82

2.9. Preparação de células eletrocompetentes de micobactérias, 83

2.10. Eletroporação de células de micobactérias, 84

2.11. Construção de plasmídeos suicidas, 84

2.12. Isolamento e seleção de mutantes de micobactérias, 86

2.13. Estudo da atividade promotora, 87

2.14. Determinação da concentração de proteína, 88

2.15. Análise de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, 88

NOTA, 90

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO, 91

3.1. Corismato mutases em *M. tuberculosis*, 92

3.1.1. Identificação, amplificação e clonagem em vetor de expressão dos genes MTB *aroQ* (Rv0948c) e MTB **aroQ* (Rv1885c), 92

3.1.2. Expressão em *E. coli* e teste da atividade enzimática das proteínas MTB AroQ (Rv0948c) e MTB **AroQ* (Rv1885c), 105

3.1.3. Construção dos plasmídeos suicidas p2NIL+COCA5 e p2NIL+COPA3, 110

3.1.4. Eletroporação de *M. tuberculosis* H37Rv e isolamento de mutantes, 114

3.1.5. Caracterização e complementação dos prováveis mutantes, 116

3.2. Corismato mutases em *M. smegmatis*, 125

3.2.1. Identificação, amplificação e clonagem em vetor de expressão dos genes MSM *aroQ* (MSMEG5513) e MSM **aroQ* (MSMEG2114), 125

3.2.2. Expressão em *E. coli* e teste da atividade enzimática das proteínas MSM AroQ (MSMEG5513) e MSM **AroQ* (MSMEG2114), 132

3.2.3. Construção dos plasmídeos suicidas p2NIL+CHOC1 e p2NIL+CHOP1, 137

3.2.4. Eletroporação de *M. smegmatis* mc²155 e isolamento de mutantes, 140

3.2.5. Caracterização e complementação dos prováveis mutantes, 141

3.3. Estudo da região promotora dos genes *aroQ* e **aroQ* de *M. tuberculosis*, 148

3.3.1. Amplificação e clonagem da seqüência promotora do gene *aroQ*, do operon *fbpB* e da região intergênica *fbpB*-**aroQ*, 149

3.3.2. Eletroporação de *M. smegmatis* mc²155 e isolamento de mutantes, 151

3.3.3. Análise da atividade promotora, 152

3.4. Fosforilase de nucleosídeos purínicos em *M. tuberculosis*, 162

3.4.1. Construção do plasmídeo suicida p2NIL+deoDLR1.8, 162

3.4.2. Eletroporação de *M. tuberculosis* H37Rv e isolamento de mutantes, 164

3.4.3. Caracterização e complementação dos prováveis mutantes, 165

3.5. Fosforilase de nucleosídeos purínicos em *M. smegmatis*, 175

3.5.1. Construção do plasmídeo suicida p2NIL+DODO, 176

3.5.2. Eletroporação de *M. smegmatis* mc²155 e isolamento de mutantes, 177

3.5.3. Caracterização e complementação dos prováveis mutantes, 179

4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS, 185

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, 188

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

A	adenina
Å	angstrom
aa	aminoácido
Ab	antibiótico
ADP	difosfato de adenosina
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
AMP	monofosfato de adenosina
Amp ^r	resistente a ampicilina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	trifosfato de adenosina
BCG	bacilo de Calmette-Guérin
β-Gal	beta-galactosidase
bp	par de bases
BSA	albumina sérica bovina
C	citocina
°C	grau Celsius
Cb ^r	resistente a carbenicilina
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cfu	unidade formadora de colônia
CM	corismato mutase
CMC	corismato mutase citoplasmática
CMP	corismato mutase periplasmática/secretada
CoA	coenzima A
CS	região codificante
CSM	marcador de contra-seleção
d	inserto (de DNA) em orientação direta
Da	dalton
DCO	<i>crossover</i> duplo
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	trifosfato de desoxirribonucleosídeo
DOTS	<i>directly observed treatment, short-course</i>
dR	desoxirribonucleosídeo
DTT	ditiotretol
EcCM	domínio CM da proteína bifuncional PheA de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
F	farad
g	grama
G	guanina

GDP	difosfato de guanosina
G+C	guanina+citosina
GMP	monofosfato de guanosina
Gm ^r	resistente a gentamicina
GRDC	controle (ribossomal) dependente da taxa de crescimento
h	hora
H	hidrogênio ou (em alinhamentos múltiplos) aa hidrofóbico
Hx	hipoxantina
Hyg ^r	resistente a higromicina
HIV	vírus da imunodeficiência humana
ID	dose infectante
IFN	interferon
IL	interleucina
IMP	monofosfato de inosina
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
J	joule
kb	quilobase
Kan ^r	resistente a canamicina
Kan ^s	sensível a canamicina
l	litro
LB	meio Luria-Bertani
m	metro
M	molar
MAC	complexo de <i>Mycobacterium avium</i>
MCS	sítio de policlonagem
MDR-TB	MTB resistente a drogas de 1 ^a linha (2)
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
min	minuto
MM	marcador de massa molecular
mRNA	RNA mensageiro
MSM	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
MTB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTC	complexo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mut	mutação/mutante
N	(i) normal; (ii) nucleotídeo
NB	nível de biossegurança
NRP	<i>non-replicating persistence</i>
NTG	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidina
Ω	ohm
OADC	ácido oléico-dextrose-catalase
OD	densidade ótica
OMS	Organização Mundial da Saúde
O/N	durante a noite
ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
ORF	fase aberta de leitura
P	promotor
P _i	fosfato inorgânico
PCR	reação em cadeia da polimerase

pH	potencial de íons hidrogênio
PNP	fosforilase de nucleosídeos purínicos
ppGpp	tetrafosfato de guanósina
pppGpp	pentafosfato de guanósina
r	inserto (de DNA) em orientação reversa
R	ribonucleosídeo
RBS	sítio de ligação a ribossomo
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotação por minuto
rRNA	RNA ribossômico
s	segundo
ScCM	CM de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCO	<i>crossover</i> simples
SDS	dodecil sulfato de sódio (dodecilamina)
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
seq	seqüenciamento
SM	marcador de seleção
Sm ^r	resistente a estreptomicina
SOC	meio SOB (<i>super optimal broth</i>) + glicose
sSNP	<i>synonymous single-nucleotide polymorphism</i>
T	timina
TB	tuberculose
TBE	Tris, borato, EDTA
Tet ^r	resistente a tetraciclina
TE	Tris, EDTA
TNF	fator de necrose tumoral
tRNA	RNA transportador
TS	estado de transição
U	unidade (de atividade enzimática)
UV	radiação ultravioleta
V	volt
v/v	volume/volume
W	watt
wt	tipo selvagem
w/v	massa/volume
X	xantina
XDR-TB	MTB resistente a 2 drogas de 1 ^a linha e 3 drogas de 2 ^a linha
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-tiogalactopiranosídeo
XMP	monofosfato de xantósina

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma séria doença infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis*, e constitui um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Novas drogas e vacinas de segunda geração são urgentemente necessárias para o controle da TB, mas a complexa biologia de *M. tuberculosis* tem dificultado o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras. A manipulação genética de *M. tuberculosis* também é complicada, mas, atualmente, técnicas novas e mais eficientes de troca alélica permitem o estudo detalhado de diversos genes micobacterianos. No presente trabalho, os genes da corismato mutase (CM) e fosforilase de nucleosídeos purínicos (PNP) de *M. tuberculosis* e *Mycobacterium smegmatis* foram estudados. A CM catalisa a conversão de corismato em prefenato na rota de biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina em bactérias, fungos e plantas. Dois genes de CMs monofuncionais (*aroQ* e **aroQ*) foram identificados, clonados, expressos e bioquimicamente caracterizados em ambas as espécies de micobactérias. Esses genes também foram investigados usando uma metodologia de recombinação homóloga e ensaios de atividade promotora. Os resultados indicam que os genes *aroQ* são provavelmente essenciais ao crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, enquanto uma linhagem mutante para o gene **aroQ* de *M. smegmatis* pôde ser obtida. A PNP catalisa a interconversão e reciclagem de bases, nucleosídeos e nucleotídeos purínicos na via de salvamento das purinas. A construção de mutantes para o gene *deoD* (que codifica a PNP) de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, usando um método eficiente de troca alélica em duas etapas, não foi possível. Assim, sugere-se que, nas condições testadas, o gene *deoD* seja essencial ao crescimento *in vitro* dessas micobactérias. A identificação de genes essenciais é de fundamental importância, pois indica tanto a relevância biológica dos mesmos como, no caso de *M. tuberculosis*, que seus produtos constituem alvos moleculares interessantes para o desenvolvimento de novas drogas antimicobacterianas.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB), a serious infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, still remains a public health problem in the world. New drugs and second generation vaccines are urgently required to control TB, but the complex biology of *M. tuberculosis* has hindered the development of novel therapeutic tools. Genetic manipulation of *M. tuberculosis* is also difficult, but currently new, more efficient gene replacement techniques have allowed detailed studies of many mycobacterial genes. In the present work, the chorismate mutase (CM) and purine nucleoside phosphorylase (PNP) genes from *M. tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* were studied. CM catalyzes the rearrangement of chorismate to prephenate in the biosynthetic pathway that forms phenylalanine and tyrosine in bacteria, fungi, and plants. Two monofunctional CM genes (*aroQ* and **aroQ*) were identified, cloned, expressed, and biochemically characterized in both mycobacteria. Those genes were also investigated by homologous recombination methods and promoter activity assays. *AroQ* genes seem to be essential for the growth of *M. tuberculosis* and *M. smegmatis*, while an **aroQ* mutant strain could be generated in *M. smegmatis*. PNP promotes the interconversion and recycling of purine bases, nucleosides, and nucleotides in the purine salvage pathway. Construction of *deoD* (which codes for PNP) deletion mutants of *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* using an efficient two-step gene replacement technique was not possible. Thus, it is suggested that *deoD* is also essential for mycobacterial growth under the conditions tested. The identification of essential genes is of great importance, both because it indicates their biological significance, and because, with pathogens like *M. tuberculosis*, these may also indicate attractive molecular targets for the development of new antimycobacterial drugs.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tuberculose

Apesar de uma série de avanços nas áreas farmacológica e médica, a tuberculose (TB) – uma epidemia mortal no passado – representa, ainda hoje, uma das principais causas de óbito em todo o mundo. Aproximadamente dois bilhões de pessoas, um terço da população mundial, encontram-se infectados por *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da TB. Estima-se que a doença se desenvolva em 5 a 10% desse total, e que dois milhões de pessoas morram anualmente (WHO, 2004). A maioria dos infectados permanece assintomática ou com a lesão inicial controlada, mas como *M. tuberculosis* é um patógeno extremamente bem adaptado ao organismo humano, sendo capaz de sobreviver por longos períodos de tempo em estado de latência, o tratamento clínico da TB – o qual é igualmente longo e envolve a utilização de diversos antibióticos – é bastante dificultado (McKinney, 2000).

A TB é uma doença antiga, que acompanha a humanidade há milênios, e foi descrita por egípcios, assírios e gregos – os últimos a chamavam de tísica, denotando o caráter consumptivo e debilitante dos estágios avançados da TB pulmonar. Mas foi durante a Revolução Industrial, especialmente na primeira metade do século XIX, que a TB atingiu seu ápice na Europa, quando as taxas de incidência anual podiam chegar a 800 casos por 100.000 habitantes e, acredita-

se, um quarto dos europeus tenha morrido de TB (Smith, 2003). Na segunda metade do século XIX, a mortalidade diminuiu, devido ao melhoramento das condições sanitárias e sociais dos grandes centros urbanos e ao surgimento dos sanatórios, onde o tratamento da TB consistia em alimentação adequada, ar fresco e repouso (Harries & Dye, 2006). Por volta de 1900, a taxa de incidência anual da TB na Europa e nos Estados Unidos era de 200 casos por 100.000 habitantes e, em 1980, menos de 10 por 100.000 (Rastogi *et alii*, 2001). Nos últimos dois séculos, no entanto, a TB foi responsável pela morte de cerca de um bilhão de pessoas (Zhang, 2005).

Em 1865, Jean-Antoine Villemin forneceu os primeiros indícios científicos de que a TB era uma doença infecciosa, e não congênita, como muitos médicos até então acreditavam. Ao inocular coelhos e cobaias com um preparado de lesões oriundas de um paciente tuberculoso, ele observou que os animais desenvolviam uma infecção com características patológicas similares à TB humana. Em 1873, Gerhard Hansen identificou a bactéria causadora da lepra, a qual se descobriu, posteriormente, ser muito semelhante ao bacilo da TB. Em 1882, Robert Koch, por meio de uma técnica especial de coloração, visualizou células de *M. tuberculosis* no microscópio, e também conseguiu cultivar *in vitro* o bacilo que, por muitos anos, levou seu nome. Outro importante avanço da época foi o método de coloração desenvolvido por Ziehl-Neelsen, até hoje rotineiramente usado em laboratórios de microbiologia para a identificação de *M. tuberculosis* e outras micobactérias. Em 1895, Conrad Roentgen descobriu os raios X, o que permitiu, pela primeira vez, diagnosticar com precisão e acompanhar a progressão da TB nos pacientes (Rastogi *et alii*, 2001).

Em 1908, Calmette e Guérin isolaram *Mycobacterium bovis* – o agente etiológico da TB em bovinos – de um animal com sintomas típicos da TB bovina. Nos anos subseqüentes, até 1921, eles realizaram passagens seqüenciais deste isolado em meio de cultura específico, a fim de diminuir sua virulência. Após 230 passagens, observou-se que o bacilo sofrera atenuação, tendo perdido a capacidade de causar TB em bovinos. Tal linhagem de *M. bovis*, denominada BCG (bacilo de Calmette-Guérin), foi então utilizada como a primeira vacina contra a TB em humanos. Ainda amplamente empregada em todo o mundo, principalmente por conferir proteção a formas graves de TB na infância (como TB meníngea e miliar), a BCG é um caso único na história das vacinas, pois em geral apresenta boa eficiência e tolerância e foi administrada a um número recorde de pessoas (mais de um bilhão desde 1921). No entanto, a real eficácia da BCG em adultos é controversa: atualmente sabe-se que a proteção conferida pela vacina contra a TB pulmonar cai drasticamente à medida que a idade avança e, em certas populações humanas, é praticamente nula (Orme, 2001).

O início da quimioterapia anti-TB se deu em 1944, com a descoberta da estreptomicina por Schatz e Waksman, e em 1952, com a descoberta simultânea da isoniazida por três companhias farmacêuticas (Zhang, 2005). A isoniazida representou um marco histórico no tratamento da TB, devido à sua alta atividade bactericida contra *M. tuberculosis*, baixo custo de produção e efeitos colaterais mínimos. Também em 1952, descobriu-se a pirazinamida, um análogo estrutural da nicotinamida que sofre ativação *in vivo* e cuja propriedade mais notável é a diminuição do tempo de tratamento da quimioterapia anti-TB. A subseqüente descoberta do etambutol e da rifampicina, na década de 1960, possibilitou a

elaboração do moderno regime quimioterápico anti-TB, que combina a administração de 3 a 4 drogas por um período de 6 a 9 meses ao paciente, em duas etapas (Harries & Dye, 2006). Na primeira etapa, são administradas, por 2 meses, 4 drogas ao paciente com TB: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, cujas ações bacteriostáticas e bactericidas, combinadas, são efetivas na eliminação de células de *M. tuberculosis* que estão ativamente se multiplicando (Zhang, 2005). Na segunda etapa, que dura no mínimo 4 meses e consiste na administração de isoniazida e rifampicina ao paciente, o principal objetivo é atacar as subpopulações de bacilos que se encontram em estados metabólicos diferenciados e que, se não devidamente eliminadas, permanecerão em latência e poderão ser posteriormente reativadas e novamente causar TB (Gomez & McKinney, 2004). Esta quimioterapia anti-TB padronizada, com índices de cura de até 95%, é denominada DOTS (*directly observed treatment, short-course*) e recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para o tratamento de todos os pacientes com TB (Harries & Dye, 2006).

A introdução da quimioterapia anti-TB na década de 1950, juntamente com o uso em grande escala da vacina BCG, teve um impacto significativo na redução do número de casos de TB nos países industrializados. No entanto, esta não foi a realidade nos países pobres e em desenvolvimento, onde a TB nunca foi efetivamente erradicada e, nos últimos anos, ressurgiu de forma preocupante. Atualmente, a incidência anual de TB varia de menos de 10 casos por 100.000 habitantes na América do Norte, de 100 a 300 por 100.000 na Ásia e Rússia e acima de 300 por 100.000 na maior parte da África (WHO, 2004). Há uma morte causada por TB a cada 15 s no mundo, e surtos vêm ocorrendo com relativa

freqüência mesmo na Europa e nos Estados Unidos (Corbett & Raviglione, 2005). Grandes centros urbanos, como Londres, por exemplo, têm áreas com taxas de incidência de TB superiores às registradas em cidades como Pequim (Rose *et alii*, 2001). Em São Francisco, na Califórnia, a taxa de incidência de TB também é alta, ocorrendo cerca de 270 casos por 100.000 habitantes entre a população desabrigada (Corbett & Raviglione, 2005).

Já o Brasil ocupa o 15^o lugar entre os 22 países que concentram 80% do total de novos casos de TB no mundo, com uma taxa de incidência anual que varia de 50 a 100 casos por 100.000 habitantes (WHO, 2004). Anualmente, são notificados quase 100.000 novos casos de TB e entre 5.000 e 6.000 mortes em decorrência da doença (Ministério da Saúde, 2006). A situação é consideravelmente grave nos estados do Rio de Janeiro, Amazonas e Roraima, que registram as maiores taxas de incidência de TB no país. Áreas metropolitanas e periféricas das grandes cidades também apresentam altas taxas de incidência de TB, bem como as populações indígenas, carcerárias e desabrigadas, o que demanda estratégias governamentais específicas (Hijjar, 2005).

Os fatores epidemio-sociológicos mais relevantes à atual reemergência e disseminação da TB, em todo o mundo, são: (i) fácil transmissão de *M. tuberculosis* por via aérea; (ii) baixa proteção conferida pela vacina BCG em adultos; (iii) falhas ou atraso no diagnóstico da TB ativa; (iv) longa e complexa quimioterapia (no mínimo 6 meses, envolvendo de 3 a 4 antibióticos); (v) drogas anti-TB de primeira e segunda geração de qualidade duvidosa; (vi) surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a drogas anti-TB de várias classes; (vii) complicações associadas à TB em pacientes HIV positivos; (viii) políticas de

saúde pública inadequadas; (ix) globalização, guerras e migração de pessoas e (x) pobreza extrema em muitas regiões.

O aumento do número de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes às drogas anti-TB comumente usadas durante a quimioterapia, incluindo os casos de TB multirresistente (MDR-TB, resistente a no mínimo duas drogas de primeira geração, como isoniazida e rifampicina), é particularmente alarmante. A MDR-TB já causou vários surtos fatais e é uma ameaça para o tratamento e controle da doença em alguns países, onde a incidência de linhagens multirresistentes pode chegar a 20% (WHO, 2004). A terapia anti-TB convencional é ineficiente no controle da MDR-TB em áreas com alta incidência de linhagens multirresistentes, como na antiga União Soviética (Kimerling *et alii*, 1999). Nessas regiões, é necessária a implantação de um programa de tratamento mais complexo, denominado DOTS-Plus, que consiste no uso de drogas anti-TB de segunda geração (como canamicina, etionamida e fluoroquinolonas, entre outras), mais caras e também mais tóxicas ao paciente (Zhang, 2005). Além disso, o tratamento pode se estender por até 24 meses e não apresenta os mesmos índices de cura que a terapia DOTS convencional (WHO, 2004).

Um estudo realizado pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) dos Estados Unidos e pela OMS, em conjunto com laboratórios de referência em TB de diversos países entre 2000 e 2004 e no qual foram analisados quase 18.000 isolados clínicos de *M. tuberculosis* em todo o mundo, indicou que 20% das amostras constituíam MDR-TB e 2% XDR-TB (*extensively drug-resistant-TB*), esta última definida como casos de TB resistente a duas drogas de primeira linha (isoniazida e rifampicina) e no mínimo três das seis

principais classes de drogas de segunda linha (CDC, 2006). A OMS estima que, a cada ano, aproximadamente 300.000 novos casos de TB sejam ocasionados por MDR-TB, e a maioria dos mesmos não responde ao tratamento com três das quatro drogas de primeira linha usadas na terapia DOTS convencional (WHO, 2004). As principais razões para o surgimento de linhagens MDR-TB e XDR-TB são: (i) abandono do tratamento pelos pacientes (que se sentem melhores e se tornam não-infectantes em apenas duas semanas de quimioterapia); (ii) drogas anti-TB de baixa qualidade e (iii) prescrição errônea dos regimes quimioterápicos por médicos e agentes de saúde (Harries & Davies, 2006).

Outro fator fundamental ao surgimento de resistência em *M. tuberculosis* se refere à relativa ineficiência das principais drogas anti-TB de primeira linha, cujas atividades *in vitro* exibem baixa correlação com as observadas *in vivo*, justificando o longo período de tratamento. Dois fenômenos estão aí implicados. Primeiro, a dificuldade de penetração das drogas anti-TB em células de *M. tuberculosis*, que possui um envelope espesso, composto por diferentes tipos de moléculas complexas, principalmente ácidos micólicos (Nguyen & Thompson, 2006). Segundo, o fato de que as concentrações inibitórias mínimas de algumas drogas anti-TB são muito próximas às concentrações séricas máximas, limitadas pela toxicidade. A concentração sérica dessas drogas pode, portanto, oscilar entre níveis acima e abaixo da concentração inibitória mínima durante o período de administração das mesmas, gerando a resistência (Barry *et alii*, 2000).

Há ainda uma preocupação crescente de que a situação da TB recrudesça nos próximos anos com a disseminação mundial do HIV, o qual compromete o sistema imune do hospedeiro e facilita a reativação do bacilo latente – além de

deixar o indivíduo mais suscetível à reinfecção com *M. tuberculosis*, incluindo linhagens multirresistentes. A combinação letal de HIV e MDR-TB é um problema que desafia seriamente o combate efetivo à TB, principalmente nos países pobres e em desenvolvimento, onde ocorrem cerca de 98% das mortes causadas por TB (Hopewell, 1992). Diante disso, a OMS decretou, em 1993, que a TB é uma emergência global, e desde então incitou os países a adotarem programas de erradicação da doença (WHO, 1993).

Considerando o fato de que nenhuma nova droga anti-TB foi desenvolvida nos últimos 30 anos, a situação atual é ainda mais crítica (Zhang, 2005). Há, contudo, um plano global (*The Global Plan to Stop TB, 2006-2015*), instituído e coordenado pela OMS, que pretende reduzir pela metade as taxas de incidência de TB e mortalidade em todo o mundo até 2015 (em relação a 1990) e eliminar a TB como problema de saúde pública até 2050, quando se atingiria o patamar de apenas um caso por um milhão de habitantes (Stop TB Partnership & WHO, 2006). Este programa, baseado na estratégia DOTS e em outras importantes linhas de ação (como a pesquisa e o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, drogas e vacinas para o controle da TB), envolve custos operacionais de 50 bilhões de dólares para o tratamento de 50 milhões de pessoas nos próximos 10 anos. Entretanto, o grande desafio do programa se refere exatamente à sua política central – a estratégia DOTS –, que exige uma imensa logística de diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos pacientes com TB em países pobres, onde os sistemas de saúde básica são deficientes (Young & Dye, 2006). Nesse sentido, a prospecção e o desenvolvimento de novas drogas e vacinas anti-TB, mais eficientes que as atualmente disponíveis, se

tornaram uma prioridade para diversos grupos de pesquisa. O seqüenciamento completo do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, assim como de *M. bovis* AF2122/97 e de outras micobactérias, constituiu um avanço fundamental ao entendimento da biologia desses organismos, possibilitando estabelecer as bases da resistência observada em isolados clínicos, efetuar estudos de genômica comparativa e detalhar mecanismos-chave que atuam na interação patógeno-hospedeiro (Cole *et alii*, 1998; Cole *et alii*, 2001; Garnier *et alii*, 2003).

Em relação a novas drogas anti-TB, o principal objetivo é obter moléculas que apresentem melhores propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas e que sejam capazes de diminuir o tempo de tratamento, causar menos toxicidade ao paciente e limitar o surgimento de resistência (Cole, 2002). Idealmente, esses novos fármacos também devem ser ativos contra linhagens MDR-TB e XDR-TB e, o mais importante, eliminar com eficiência e rapidez as formas latentes do bacilo – as quais podem, acredita-se, permanecer viáveis por vários meses após o tratamento quimioterápico (Gomez & McKinney, 2004).

Como mencionado, as drogas anti-TB usadas na atual quimioterapia são especialmente eficazes contra os bacilos que se encontram em multiplicação ativa e exibem um metabolismo vigoroso, pois atuam, em sua maioria, sobre processos como a biossíntese da parede celular, de ácidos nucleicos e de proteínas (Zhang, 2005). As subpopulações de bacilos que se encontram na fase estacionária, com os níveis metabólicos baixos e em dormência, ou seja, não se multiplicando, não são eficientemente eliminadas pelas drogas anti-TB convencionais (com exceção da rifampicina e da pirazinamida, de ação limitada), dificultando sua erradicação (McKinney, 2000). A busca por melhores drogas anti-TB requer, portanto, a

identificação e caracterização de alvos moleculares essenciais à sobrevivência *in vivo* do bacilo, principalmente quanto à fase de latência, na qual estão ativos outros genes e rotas metabólicas (Voskuil, 2004).

Em relação a novas vacinas anti-TB, o principal objetivo é desenvolver uma vacina que (i) aumente o espectro de proteção à TB nas populações humanas em que a eficácia da vacina BCG é baixa ou nula; (ii) confira proteção a formas graves de TB, especialmente TB pulmonar em adultos e (iii) seja segura para o uso em pacientes HIV positivos, nos quais a TB é um importante fator de risco. Trata-se de uma tarefa formidável, e inúmeras abordagens experimentais vêm sendo testadas nos últimos anos: seleção de novos antígenos para a construção de vacinas de subunidade, vacinas de DNA, linhagens atenuadas de *M. tuberculosis* (mutantes auxotróficos, alterados quanto à estrutura do envelope ou, ainda, quanto a respostas adaptativas), linhagens atenuadas de outras micobactérias e linhagens recombinantes de BCG (Snewin *et alii*, 2000; Orme, 2001; Young & Stewart, 2002). Em 2005, quatro novas vacinas anti-TB, todas baseadas na resposta celular Th1 de linfócitos T CD4⁺ – a qual se acredita ser essencial à resistência de humanos e animais contra infecções micobacterianas – entraram na fase I de testes clínicos (Young & Dye, 2006). Em modelos animais, algumas linhagens atenuadas de *M. tuberculosis* oferecem níveis de proteção superiores à BCG, e uma das estratégias mais promissoras na área é a geração de mutantes avirulentos com deleções múltiplas (Skeiky & Sadoff, 2006).

Para desenvolver de forma racional novos agentes antimicobacterianos, é essencial, portanto, estudar a bioquímica, fisiologia e genética de *M. tuberculosis* e outras micobactérias relacionadas. É igualmente importante compreender a

complexa interação *M. tuberculosis*-hospedeiro, na qual existe um fino balanço entre virulência e sistema imune (Smith, 2003).

1.2. Micobactérias

Taxonomicamente, as micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, o único dentro da família Mycobacteriaceae, a qual integra a ordem Actinomycetales. O nome genérico *Mycobacterium* foi cunhado para designar, no passado, microrganismos que cresciam sob a forma de película em meio líquido, à semelhança de fungos, e cujas principais características incluíam ausência de mobilidade, células levemente curvadas e em forma de bastonete e resistência a ácido-álcool segundo o método de coloração de Ziehl-Neelsen (Rastogi *et alii*, 2001). Outras características gerais das micobactérias são: metabolismo tipicamente aeróbico (embora ocorram espécies e linhagens microaerofílicas), presença de arabinose, galactose e meso-diaminopimelato na parede celular e alto conteúdo de G+C no genoma (que pode variar de 58 a 70%).

Sua característica mais marcante, no entanto, é o complexo envelope celular, que contém um elevado percentual de lipídeos, principalmente ácidos micólicos de cadeia longa (60 a 90 carbonos), os quais compõem, em associação com peptideoglicano, glicolipídeos e polissacarídeos, uma camada espessa e lipofílica (Brennan & Nikaido, 1995). O envelope torna as micobactérias resistentes à lise enzimática e mecânica e contribui para a baixa permeabilidade das células a diversos compostos, incluindo antibióticos (Parish & Stoker, 1998b). Nas micobactérias patogênicas, o envelope desencadeia reações inflamatórias no

hospedeiro e participa ativamente do processo patológico (Brennan, 2003). Embora outros actinomicetos (como *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*) também sintetizem ácidos micólicos, o gênero e as espécies de *Mycobacterium* podem ser distinguidos pelo número de carbonos presentes nas cadeias laterais, número de ligações insaturadas, oxigenação, etc (Rastogi *et alii*, 2001).

A maioria das mais de 50 espécies de micobactérias atualmente conhecidas compreende microrganismos gram-positivos saprofíticos, não patogênicos, filogeneticamente próximos a bactérias que vivem no solo, como *Streptomyces* e *Actinomyces*. No entanto, algumas espécies de *Mycobacterium* causam importantes infecções em animais e no homem. As micobactérias patogênicas incluem *M. tuberculosis*, que causa a TB humana, e *Mycobacterium leprae*, que causa a lepra, ambas doenças negligenciadas que afetam um grande número de pessoas em todo o mundo (Parish & Stoker, 1998b). Nos animais, as mais importantes espécies de micobactérias patogênicas são *M. bovis*, que causa a TB bovina, e *Mycobacterium avium*, que infecta aves e porcos, mas também pode causar sérias infecções oportunistas em indivíduos imunodeprimidos. Outras micobactérias oportunistas em humanos incluem *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium ulcerans*. Recentemente, *Mycobacterium paratuberculosis* foi relacionada à doença de Crohn no homem (Cosma *et alii*, 2003).

Além da classificação quanto à patogenicidade, as micobactérias podem ser divididas em outras categorias, com base em aspectos microbiológicos e estudos de filogenia molecular. As espécies de crescimento lento, cujo tempo de geração varia entre 12 e 24 h (com exceção de *M. leprae*, que não cresce *in vitro* e, em modelos animais, se divide entre 7 e 14 dias), compreendem a maioria das

micobactérias patogênicas e oportunistas. O tempo de geração de *M. tuberculosis*, por exemplo, é de aproximadamente 20 a 24 h, tanto em meio de cultura como em animais infectados, e colônias podem ser observadas, em uma placa de Petri, somente após 3 a 4 semanas de incubação a 37°C. As espécies de crescimento rápido, cujo tempo de geração varia entre 2 e 6 h, compreendem a maioria das micobactérias saprofíticas, e colônias podem ser observadas, em uma placa de Petri, após 3 a 7 dias de incubação a 37°C. Tal distinção empírica entre micobactérias de crescimento lento (*slow growers*) e rápido (*fast growers*) tem sido corroborada por análises de uma região específica de 16S rRNA, a qual varia em seqüência e tamanho entre os dois grupos e permite a construção de uma árvore filogenética (Rastogi *et alii*, 2001).

Diversas outras classificações são possíveis e utilizadas, e os mesmos estudos de filogenia molecular confirmam a proximidade existente entre as espécies historicamente agrupadas nos chamados 'complexo de *M. tuberculosis*' (MTC) e 'complexo de *M. avium*' (MAC). O primeiro, MTC, consiste em cinco espécies, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* e *M. microti*, as quais possuem 99,9% de similaridade na seqüência nucleotídica de muitos locos e seqüências de 16S rRNA idênticas (Smith *et alii*, 2006). O segundo, MAC, consiste em duas espécies, *M. avium* e *M. intracellulare*, sendo que *M. avium* se divide em três subespécies distintas: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* e *M. avium* subsp. *silvaticum* (Allen, 1998).

Além de *M. tuberculosis*, tanto *M. bovis* como *M. africanum* podem causar TB em humanos, e a patologia e progressão da doença são semelhantes. Antes do advento da pasteurização do leite, estima-se que, na Europa, cerca de 10%

dos casos de TB eram ocasionados por *M. bovis* (Rastogi *et alii*, 2001). Atualmente, em certas regiões da África, *M. africanum* é o principal responsável pelos casos de TB, superando significativamente *M. tuberculosis* (Cosma *et alii*, 2003). A existência de sSNPs raros entre essas espécies permite sua distinção e *insights* evolutivos, e um estudo realizado por Brosch *et alii* (2002), no qual foi avaliada a distribuição de deleções e inserções nos genomas das micobactérias do MTC, sugere a evolução independente de *M. tuberculosis* e *M. bovis* a partir de um ancestral comum, provavelmente relacionado a *M. canettii*. Na verdade, as micobactérias do MTC, com exceção de *M. canettii*, exibem uma estrutura clonal severa: a divergência de seqüências entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* é de menos de 0,05%, enquanto entre duas linhagens de *Escherichia coli* é de 1,6%. Há também poucas evidências de transferência e recombinação de genes cromossômicos no MTC, o que explica a clonalidade do complexo e aponta para efeitos de gargalo, contrariando a hipótese de que *M. tuberculosis* tenha se originado de *M. bovis* e se adaptado ao hospedeiro humano quando da domesticação do gado (Smith *et alii*, 2006). Embora a evolução do MTC seja complexa e ainda não inteiramente compreendida, o aumento dramático do número de casos de TB entre os séculos XVIII e XIX na Europa pode estar relacionado a fenômenos evolutivos semelhantes (Brosch *et alii*, 2002). Estudos baseados na taxa de mutação de *M. tuberculosis* indicam que a maior parte da diversidade genética observada entre as linhagens desta espécie teve origem entre 250 e 1.000 anos atrás (Daniel, 2006). Em resumo, a análise filogenética do MTC revela que esses organismos são evolutivamente muito próximos e em princípio estritamente clonais, mas capazes de infectar vários mamíferos.

M. tuberculosis H37Rv – uma linhagem laboratorial originalmente isolada por Baldwin em 1905 e amplamente usada em pesquisas biomédicas por sua virulência em modelos animais, suscetibilidade a drogas e relativa facilidade de manipulação genética – foi a primeira micobactéria a ter seu genoma totalmente seqüenciado (Cole *et alii*, 1998). Desde então, diversos outros genomas de micobactérias (incluindo os de isolados clínicos de TB, como *M. tuberculosis* CDC1551) foram seqüenciados ou estão em fase de finalização, com destaque para os de *M. leprae*, publicado por Cole *et alii* (2001), de *M. bovis*, publicado por Garnier *et alii* (2003), de *Mycobacterium marinum* (em conclusão no Sanger Centre, <http://www.sanger.ac.uk>) e de *Mycobacterium smegmatis* (em conclusão no Institute for Genomic Research, <http://www.tigr.org>). *M. marinum* é uma micobactéria que causa lesões muito semelhantes à TB humana em peixes e sapos, e vem sendo considerada um modelo interessante para o estudo da patogênese de *M. tuberculosis*, já que é a espécie filogeneticamente mais próxima ao MTC (Cosma *et alii*, 2003). *M. smegmatis* é uma micobactéria saprofítica, de crescimento rápido, e um importante modelo à biologia molecular de micobactérias, pois a manipulação genética de *M. tuberculosis* é dificultada por uma série de fatores (Parish & Stoker, 1998b).

1.3. Patogênese e virulência de *Mycobacterium tuberculosis*

A patogênese de *M. tuberculosis* em humanos envolve três estágios diferenciados de infecção (Smith, 2003). No primeiro estágio, o indivíduo – por meio da inalação de aerossóis contendo *M. tuberculosis* – é infectado, o que

ocorre quando uma pessoa com TB ativa (capaz de efetuar a transmissão do bacilo) tosse, espirra, fala ou cospe. A infecciosidade de *M. tuberculosis* é alta, relacionada à baixa dose infectante no homem ($ID_{50} < 10$ bacilos) e ao fato de que uma pessoa com TB ativa pode infectar, em média, entre 10 e 15 outras por ano. Uma vez dentro dos pulmões, *M. tuberculosis* entra em contato com células fagocitárias do hospedeiro, como macrófagos alveolares, células dendríticas ou, ainda, monócitos recrutados da circulação periférica. Moléculas efetoras, principalmente lipídeos, proteínas e lipoglicanos (como lipoarabinomanano), presentes no envelope do bacilo dão início a eventos de sinalização entre as células de *M. tuberculosis* e os macrófagos alveolares (Brennan, 2003). As bactérias são então fagocitadas pelos macrófagos, em um processo que depende do contato de *M. tuberculosis* com receptores de manose e do sistema complemento do hospedeiro (Schlesinger, 1993). Os receptores de manose dos macrófagos parecem desempenhar um papel central na apresentação de antígenos às células T humanas, sendo o lipoarabinomanano um dos principais efetores (Kang & Schlesinger, 1998). Recentemente, demonstrou-se que a superexpressão do gene *manB* (que codifica uma fosfomanomutase) de *M. tuberculosis* em *M. smegmatis* aumenta tanto a biossíntese de lipoarabinomanano (e outras moléculas que contêm manose em sua estrutura) como a associação das micobactérias a macrófagos humanos (McCarthy *et alii*, 2005).

Após a fagocitose, *M. tuberculosis* (assim como outros patógenos intracelulares) inicialmente reside em um vacúolo endocítico denominado fagossomo. Se o ciclo normal de maturação do fagossomo prosseguisse, com a fusão de fagossomos a lisossomos, os bacilos seriam bombardeados por uma

série de agentes bactericidas produzidos pelos macrófagos, como espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio, enzimas hidrolíticas e peptídeos tóxicos, além de pH ácido (Smith, 2003). No entanto, *M. tuberculosis* é capaz não só de persistir como, também, se multiplicar no interior desse ambiente hostil, empregando várias estratégias que permitem sua sobrevivência intracelular (Russell, 2001). Um certo grau de resistência à atividade microbicida dos macrófagos é conferido pelo envelope do bacilo, que representa uma barreira física relativamente impermeável às enzimas lisossômicas do macrófago, e por enzimas micobacterianas que combatem os radicais livres, como catalase e superóxido dismutase. Mas talvez a característica mais notável de *M. tuberculosis* seja sua capacidade de impedir o processo normal de maturação do fagossomo: o fagossomo micobacteriano não se funde aos endossomos tardios e lisossomos da rede de tráfego de vesículas coordenada pelo complexo de Golgi, possibilitando, desse modo, a sobrevivência intracelular do bacilo (Stewart *et alii*, 2005). Ainda não se sabe exatamente como e que fatores e mecanismos estão envolvidos nesse processo, mas as células fagocitadas de *M. tuberculosis* são capazes de reduzir a acidificação dos endossomos que as contêm, inibir a apoptose de macrófagos infectados e alterar o recrutamento de diversas proteínas à membrana do fagossomo (Russell, 2001).

Em conjunto, essas alterações permitem a *M. tuberculosis* evitar sua eliminação pelos macrófagos e se multiplicar em níveis moderados durante o estágio inicial da infecção. O resultado é que não ocorre o desenvolvimento de uma resposta imune localizada e eficiente, que rapidamente ative as células hospedeiras e mate os bacilos (Zahrt, 2003). Há uma certa modulação do sistema

imune, e os próprios macrófagos se encarregam de processar e apresentar os antígenos aos linfócitos T, transportar as células vivas de *M. tuberculosis* a outros tecidos do organismo e disseminar a infecção. Existem ainda evidências de que o bacilo da TB é capaz de modular diretamente o sistema imune, diminuindo a produção de IL-12, inibindo a apresentação de antígenos pelo MHC II e interferindo na ativação de macrófagos mediada por IFN- γ , a principal citocina usada contra *M. tuberculosis* (Hingley-Wilson *et alii*, 2003).

Por sua vez, os macrófagos infectados nos pulmões produzem citocinas e atraem monócitos, linfócitos e neutrófilos de vasos sanguíneos adjacentes, iniciando uma resposta pré-inflamatória (Smith, 2003). Isso resulta na formação de um granuloma ou tubérculo, que define e caracteriza a TB, ao redor dos macrófagos infectados. O granuloma consiste em um núcleo de macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, cercados por macrófagos imaturos e ativados, células gigantes derivadas de macrófagos e uma camada de linfócitos na periferia (Russell, 2001). Inicialmente, apenas células T CD4⁺ e CD8⁺ ocorrem no granuloma, mas, à medida que a imunidade celular se desenvolve, outros tipos de linfócitos também são recrutados, como células T $\gamma\delta$ e células T $\alpha\beta$ (Skeiky, 2006). A formação de granulomas é o principal mecanismo utilizado pelo hospedeiro para limitar a multiplicação e disseminação dos bacilos a outros órgãos e para controlar o crescimento de *M. tuberculosis* durante o período de latência da TB, que dura anos ou décadas (Zahrt, 2003).

A progressão da infecção durante o segundo estágio é primariamente ditada pelo sistema imune do hospedeiro. Embora o real estado fisiológico em que as células de *M. tuberculosis* se encontram no interior dos granulomas ainda

seja motivo de intensa discussão, em geral acredita-se que os bacilos estejam com o metabolismo bastante baixo ou mesmo não se multiplicando (Voskuil, 2004). Isso resultaria de: (i) baixa disponibilidade de oxigênio dentro dos granulomas; (ii) altos níveis de dióxido de carbono e presença de ácidos orgânicos alifáticos e enzimas hidrolíticas e (iii) ativação de macrófagos e outras células efectoras do sistema imune ao redor dos granulomas (Zahrt, 2003). Assim, nesse ambiente adverso, os bacilos permanecem em estado de latência ou dormência durante longos períodos, e a essa infecção persistente, em que o indivíduo é assintomático e não infectante, dá-se o nome de TB latente (Gomez & McKinney, 2004). O que determina a manifestação da TB ativa é a imunidade celular de cada indivíduo, que mantém os granulomas nessa chamada fase de contenção: as lesões tuberculares se tornam fibrosas e calcificadas, e os bacilos em seu interior se tornam dormentes, mas ainda viáveis (Stewart *et alii*, 2003).

Contudo, se uma pessoa infectada com *M. tuberculosis* não consegue controlar a infecção inicial nos pulmões, ou se o sistema imune de uma pessoa com TB latente se torna vulnerável por drogas imunossupressoras, co-infecção com HIV, desnutrição, envelhecimento e outros fatores, o núcleo do(s) granuloma(s) se liquefaz, tornando-se um meio de cultura para os bacilos que, então, passam a se multiplicar de forma descontrolada. Nesse terceiro e final estágio da doença, chamado de fase de reativação no caso de indivíduos com TB latente, células viáveis de *M. tuberculosis* saem do(s) granuloma(s) e se espalham pelos pulmões (TB pulmonar) e também para outros tecidos e órgãos do corpo via sistema linfático e circulação sanguínea (TB extrapulmonar). O indivíduo se torna infectante e passa a apresentar os sintomas típicos da TB ativa:

fadiga, febre, mal-estar, perda progressiva de peso, anemia, dispnéia e tosse crônica (com eventual hemoptise), exigindo tratamento quimioterápico anti-TB imediato para sobreviver (Hopewell & Jasmer, 2005).

A maioria desses sintomas representa manifestações sistêmicas da doença, provavelmente mediadas por citocinas – como TNF- α , que parece ser o principal responsável (Orme *et alii*, 1999). Os sintomas variam com maior ou menor intensidade, dependendo do tipo de TB que se estabelece no organismo. Antes do advento da epidemia de AIDS, cerca de 85% dos casos registrados de TB envolviam casos de TB pulmonar e 15% envolviam casos de TB extrapulmonar – cujos tipos predominantes eram TB linfática, TB pleural, TB geniturinária, TB miliar e TB óssea. Embora ocorram muitas variações regionais, nos pacientes HIV positivos (que, uma vez infectados com *M. tuberculosis*, têm 50% de chance de desenvolver TB ativa ao longo de sua vida, contra 10% de indivíduos imunocompetentes) essa proporção muda: aproximadamente 40% dos casos são representados por TB pulmonar, 30% por TB extrapulmonar e 30% por TB concomitantemente pulmonar e extrapulmonar. Em comparação à TB pulmonar, os casos de TB extrapulmonar constituem um desafio maior para o diagnóstico e a terapêutica, pois os sítios envolvidos são, em geral, de difícil acesso e um número menor de bacilos pode causar lesões mais graves. Na TB miliar ou disseminada, ocorre a formação de pequenos e incontáveis tubérculos em qualquer órgão do corpo (Hopewell & Jasmer, 2005).

Portanto, muitos dos sintomas da TB, incluindo a destruição de tecidos, são mediados pela resposta imune do hospedeiro contra *M. tuberculosis*, e não o resultado direto de fatores ou mecanismos de virulência da bactéria. Como acima

detalhado, o bacilo da TB parece ter aprimorado várias estratégias de patogenicidade, distintas e seqüenciais: (i) multiplicação no interior de macrófagos; (ii) resistência à resposta imune do hospedeiro ou modificação desta, de forma a permitir que o hospedeiro controle a multiplicação dos bacilos, mas não os elimine totalmente e (iii) persistência no hospedeiro em um estado 'inativo', com potencial de reativação posterior (Glickman & Jacobs, 2001). Em cada estágio de infecção da TB (multiplicação, disseminação, estabelecimento de latência, persistência e reativação), *M. tuberculosis* deve responder a diferentes ambientes e condições, por meio da regulação coordenada de múltiplos genes. Embora os eventos moleculares que atuam em cada etapa ainda não sejam extensivamente conhecidos, inúmeros estudos genéticos e de expressão gênica vêm sendo realizados nos últimos anos, a fim de identificar e caracterizar genes, proteínas e rotas bioquímicas que possibilitam a adaptação metabólica de *M. tuberculosis*. Por sua vez, modelos *in vitro* e animais buscam simular as condições ambientais encontradas pelo bacilo ao longo da infecção (Zahrt, 2003).

No entanto, não existe um modelo animal adequado que se aproxime da complexa infecção ocasionada por *M. tuberculosis* no homem. Camundongos, cobaias e coelhos são geralmente utilizados, mas o sistema imune desses animais, embora capaz de controlar a multiplicação de *M. tuberculosis*, não diminui a viabilidade dos bacilos, de modo que não ocorre o estabelecimento de latência (Cosma *et alii*, 2003). No modelo murino, após se multiplicarem exponencialmente entre 3 e 4 semanas pós-infecção, os bacilos são controlados pelo sistema imune e entram em uma longa fase de persistência: o título se mantém constante, porém alto. Os bacilos, nessa fase da infecção murina, não

mimetizam o estado de latência observado no hospedeiro humano; mas, ainda assim, há evidências bioquímicas de que *M. tuberculosis* altera sua fisiologia durante o processo, passando de um metabolismo tipicamente aeróbico, baseado em carboidratos, para um metabolismo mais anaeróbico, baseado em lipídeos. Na verdade, quando cresce *in vitro*, *M. tuberculosis* em geral usa carboidratos como fonte de carbono, ao passo que, *in vivo*, usa ácidos graxos (Smith, 2003).

Células de *M. tuberculosis* isoladas de tecidos animais também utilizam preferencialmente ácidos graxos como fonte de carbono, em vez de glicose, sugerindo que, *in vivo*, os bacilos possam ser lipolíticos. A isocitrato liase, enzima da via do glioxilato (que emprega acetato e ácidos graxos como fontes exclusivas de carbono), tem sua expressão e atividade aumentadas à medida que *M. tuberculosis* atinge a fase estacionária e em condições anaeróbicas, e os níveis de mRNA do gene *icl* também aumentam à medida que a TB progride nos pulmões de camundongos infectados (Glickman & Jacobs, 2001). Além disso, mais de 200 genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos ocorrem no genoma de *M. tuberculosis*, quase 10% de sua capacidade codificante total (comparativamente, *E. coli* possui apenas 50), o que explica por que as micobactérias são capazes de sintetizar e degradar as mais diferentes moléculas de lipídeos existentes na natureza. Cerca de 100 genes têm funções de lipólise, e há múltiplos homólogos do sistema Fad de β -oxidação de ácidos graxos, que produz acetil-CoA a partir de lipídeos (Cole *et alii*, 1998). A abundância dessas enzimas lipolíticas pode indicar que *M. tuberculosis* emprega uma complexa maquinaria catabólica que, durante a infecção, degrada os vários tipos estruturais de lipídeos encontrados no hospedeiro (Glickman & Jacobs, 2001).

A idéia de que a TB latente requer bacilos metabolicamente dormentes e viáveis provém, sobretudo, da observação clínica em humanos, nos quais a infecção é mantida por um pequeno número de bactérias, as lesões patológicas são mínimas e não há sintomas de doença. Contudo, é igualmente possível que, no estado de latência, nem todas as células de *M. tuberculosis* apresentem o mesmo perfil metabólico, e que ocorram subpopulações fisiologicamente distintas (Stewart *et alii*, 2003). Independentemente do fato de os bacilos estarem ou não se multiplicando no interior dos granulomas – uma questão que ainda permanece sem resposta –, os dados experimentais indicam que a persistência de *M. tuberculosis* no hospedeiro é um processo dinâmico que envolve a expressão coordenada de diversos genes micobacterianos e processos de adaptação que impedem a eliminação do patógeno pelo sistema imune (Zahrt, 2003).

Uma vez que os fatores e mecanismos que regulam a latência, persistência e virulência de *M. tuberculosis* no hospedeiro humano são complexos e podem demorar anos ou décadas para se manifestar, vários sistemas *in vitro* e *in vivo* foram desenvolvidos a fim de compreender aspectos básicos da infecção, destacando-se os modelos *in vitro* que buscam reproduzir o ambiente provavelmente encontrado pelos bacilos no interior dos granulomas durante a latência (Cosma *et alii*, 2003; Gomez & McKinney, 2004; Murry & Rubin, 2005). Embora medidas precisas da concentração de oxigênio e outros nutrientes dentro dos granulomas não tenham sido realizadas, supõe-se que haja pouco oxigênio e limitação de nutrientes, como aminoácidos, ferro e outros cofatores essenciais (Cosma *et alii*, 2003). Além disso, os bacilos são expostos a óxido nítrico produzido pelo hospedeiro (Nathan & Shiloh, 2000).

O chamado 'modelo de Wayne' ou NRP (*non-replicating persistence*) baseia-se na hipótese de que as células de *M. tuberculosis* encontram condições de hipóxia ou anaeróbicas dentro dos granulomas do hospedeiro. Em tal modelo, culturas *in vitro* de micobactérias são submetidas a uma depleção gradual de oxigênio, passando a exibir o fenótipo NRP, que caracterizaria o estado fisiológico *in vivo* de *M. tuberculosis* (Wayne & Sohaskey, 2001). Essa transição para o estado de NRP ocorre em três diferentes etapas. Na primeira etapa, a concentração de oxigênio no meio de cultura é alta e os bacilos se multiplicam logaritmicamente, reproduzindo, portanto, o crescimento *in vivo* inicial de *M. tuberculosis*. Na segunda etapa (NRP-1), a concentração de oxigênio diminui para 1%, ocorrendo uma queda abrupta da síntese de DNA e, em certa extensão, de RNA. A síntese protéica também diminui, *M. tuberculosis* exibe resistência a isoniazida e rifampicina e é induzida a expressão de genes cujos produtos (i) utilizam fontes alternativas de energia; (ii) estabilizam e protegem biomoléculas essenciais e (iii) regulam genes que atuam em respostas adaptativas. Na terceira etapa (NRP-2), a concentração de oxigênio diminui para menos de 0,05%, e os bacilos mudam seu metabolismo de aeróbico para anaeróbico; quando colocados em concentrações usuais de oxigênio, no entanto, são prontamente reativados (Zahrt, 2003). Os estágios de NRP-1 e NRP-2 reproduziriam o ambiente encontrado por *M. tuberculosis* durante a latência (Voskuil, 2004).

Ainda que o modelo de Wayne não contemple a influência do sistema imune do hospedeiro, explica, porém, algumas características observadas durante a persistência de *M. tuberculosis* no organismo humano – como, por exemplo, a indução da proteína Acr (um homólogo da proteína α -cristalina e um dos

principais antígenos reconhecidos pelo soro de pacientes com TB), que ocorre durante o estado de NRP-1 (Zahrt, 2003). O mesmo modelo (ou variações) foi utilizado em estudos de expressão gênica global, e todos detectaram repressão e ativação de genes específicos em resposta a alterações na concentração de oxigênio, com destaque para os genes induzidos pelo regulon de dormência (Voskuil, 2004). Esses genes são controlados pelo regulador DosR e ativados em condições como depleção de oxigênio e presença de óxido nítrico (Park *et alii*, 2003; Voskuil *et alii*, 2003). Há evidências de sobreposição entre a resposta de *M. tuberculosis* à hipóxia e a óxido nítrico (Warner & Mizrahi, 2006).

O chamado 'modelo de privação de nutrientes' baseia-se na hipótese de que a disponibilidade de nutrientes é limitada dentro dos granulomas do hospedeiro. Em tal modelo, células de *M. tuberculosis* são primeiro crescidas em meio de cultura rico, transferidas para PBS e, em seguida, incubadas por um longo período nessas condições. Observa-se que os bacilos não perdem sua viabilidade após mais de seis semanas de incubação, diminuem significativamente a taxa respiratória e apresentam morfologia alterada de colônia. A expressão de genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos, cofatores e lipídeos, na replicação de DNA, no metabolismo energético, em modificações traducionais e pós-traducionais e na virulência é igualmente diminuída (Betts *et alii*, 2002).

Em resumo, genes envolvidos na β -oxidação de ácidos graxos, via do glioxilato, gliconeogênese, catabolismo de aminoácidos, síntese e modificação de RNA (e também reguladores transcricionais de diferentes famílias) são induzidos em resposta ao estresse nutricional, ao passo que genes envolvidos em lipogênese, glicólise, síntese *de novo* de ATP, maquinaria de tradução e

biossíntese de purinas e pirimidinas têm níveis de expressão diminuídos, em maior ou menor grau. Além disso, vários genes de *M. tuberculosis* são induzidos em ambas as condições (privação de oxigênio e nutrientes), como, por exemplo, fatores de transcrição, reguladores de resposta e o gene *acr2*. Esse gene codifica uma chaperona similar à proteína Acr e pode estar envolvido na estabilização de proteínas não dobradas durante os estágios em que *M. tuberculosis* não se multiplica – quando há acúmulo de proteínas danificadas e o custo energético para repará-las seria elevado (Voskuil, 2004).

1.4. Métodos genéticos para o estudo de micobactérias

Por muito tempo, a investigação genética de micobactérias, principalmente de importantes patógenos humanos (como *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. bovis*), esteve em grande desvantagem se comparada a outras bactérias patogênicas, provavelmente devido à queda de interesse na área de pesquisa em TB durante a década de 1950, quando o sucesso da recém-introduzida quimioterapia anti-TB tornou possível o controle da doença em muitos países (Young & Cole, 1993). Assim, o uso de técnicas de biologia molecular para o estudo de micobactérias começou somente em 1985, com a construção das primeiras bibliotecas genômicas de *M. tuberculosis* e *M. leprae* em *E. coli* (Pelicic *et alii*, 1998). Embora essas bibliotecas tenham permitido a identificação de muitos antígenos, logo ficou evidente que a utilidade de *E. coli* (gram-negativa e com um conteúdo de G+C de 50%) na genética molecular de micobactérias era limitada, pois a maioria das proteínas micobacterianas não era expressa a partir de seus promotores nativos

(Machowski *et alii*, 2005). Atualmente sabe-se que muitos promotores de genes micobacterianos funcionam com baixa eficiência ou não funcionam em *E. coli*, devido a diferenças estruturais nas seqüências reconhecidas pela RNA polimerase (Bashyam *et alii*, 1996). Certas modificações pós-traducionais também não ocorrem em *E. coli*. Desse modo, a antigenicidade e outras características importantes de proteínas micobacterianas expressas em *E. coli* podem ser diferentes ou perdidas (Parish & Stoker, 1998b).

Tradicionalmente, em microbiologia molecular, o desenvolvimento de ferramentas e técnicas genéticas laboratoriais procura explorar processos que ocorrem naturalmente nas bactérias (como recombinação, transdução, transformação e conjugação, entre outros), de modo que seus genes possam ser estudados por meio de clonagem, expressão, mutação e análise em hospedeiros 'homólogos' e 'heterólogos'. No entanto, a manipulação genética de micobactérias, especialmente *M. tuberculosis* e outras micobactérias patogênicas, é complicada por uma série de fatores: (i) crescimento lento, devido ao longo tempo de geração; (ii) tendência das células à formação de agregados, o que causa problemas na medição precisa da OD e no *screening* de mutantes isolados; (iii) resistência da parede celular à lise enzimática e mecânica, dificultando a obtenção de ácidos nucléicos; (iv) alto risco de biossegurança (NB-3); (v) taxas elevadas de resistência espontânea a antibióticos; (vi) ineficiência de transformação e, principalmente, (vii) falta de sistemas de transferência genética natural (Glickman & Jacobs, 2001; Morsczek, 2003; Smith, 2003).

Nos últimos anos, contudo, muitas dessas dificuldades puderam ser superadas, e a manipulação genética de micobactérias, incluindo *M. tuberculosis*,

utilizando métodos de mutagênese direcionada e global, aliada ao seqüenciamento completo de genomas micobacterianos e às tecnologias de microarranjos e química combinatória, tornou-se fundamental ao entendimento da complexa biologia desses organismos (Kana & Mizrahi, 2004).

O uso de micobactérias como hospedeiros para moléculas de DNA recombinante foi possível graças ao desenvolvimento de vetores de clonagem baseados em micobacteriófagos (vírus que infectam diferentes espécies de micobactérias) e plasmídeos micobacterianos que ocorrem naturalmente (Hatfull, 2000; Pashley & Stoker, 2000). Na verdade, os micobacteriófagos desempenharam um papel central na genética molecular de micobactérias, constituindo o primeiro sistema de transferência genética entre *E. coli* e micobactérias (Jacobs *et alii*, 1987).

A identificação de marcadores de seleção capazes de conferir resistência a antibióticos e o melhoramento das técnicas de transformação por eletroporação levaram ao uso em grande escala de micobactérias não patogênicas como hospedeiros extremamente úteis, se não ideais, para o estudo da estrutura e função de genes micobacterianos (Parish & Stoker, 1998b). A espécie mais utilizada foi e ainda é *M. smegmatis*, por ser saprofítica, exibir crescimento rápido (tempo de geração de 2 a 3 h) e, ao contrário de *M. tuberculosis*, não possuir altos níveis de resistência espontânea a antibióticos. Como a maioria dos *slow growers* possui apenas um operon de rRNA, isso facilita a geração de resistência espontânea a aminoglicosídeos, como canamicina; já os *fast growers*, em geral, possuem dois operons de rRNA, diminuindo consideravelmente a resistência por mutações espontâneas no gene de 16S rRNA (Smith, 2003).

Ainda assim, a eficiência de transformação de *M. smegmatis* é baixa em comparação a outros hospedeiros, como *E. coli*. No entanto, o isolamento de uma linhagem mutante de *M. smegmatis* que exhibe alta eficiência de transformação revolucionou a genética de micobactérias (Snapper *et alii*, 1990). Tal linhagem, denominada *M. smegmatis* mc²155, além de exibir alta eficiência de transformação, não possui um sistema de restrição ou modificação capaz de degradar DNAs exógenos, tendo se tornado o principal modelo experimental para a biologia molecular de micobactérias (Kana & Mizrahi, 2004).

Embora a relevância de *M. smegmatis* como modelo para o estudo da TB seja discutível – já que não se trata de um patógeno humano e, portanto, não apresenta os mecanismos de virulência característicos de *M. tuberculosis* –, é inegável que constitui um sistema útil e importante para o esclarecimento de diversas questões ligadas à genética, fisiologia e bioquímica de micobactérias (Barry, 2001; Reyrat & Kahn, 2001). Inúmeros estudos e evidências experimentais apontam para a semelhança da maquinaria de transcrição (e da estrutura dos promotores) entre *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, a alta conservação de genes *housekeeping* e até mesmo o fato de que *M. smegmatis* se adapta a um modelo *in vitro* de hipóxia (com indução de dormência) e de depleção de nutrientes, como *M. tuberculosis* (Dick *et alii*, 1998; Smeulders *et alii*, 1999). Muitos reguladores de resposta semelhantes também estão presentes em ambas as espécies (Tyagi & Sharma, 2002). Entretanto, é claro que essas abordagens de biologia comparada têm limitações, e estudos feitos em *M. smegmatis* devem ser interpretados com cautela quando aplicados a *M. tuberculosis*, cujo metabolismo está primariamente direcionado à interação com o do hospedeiro humano.

O desenvolvimento de vetores plasmidiais para micobactérias teve início com a descoberta do plasmídeo críptico pAL5000, isolado de *Mycobacterium fortuitum*, uma micobactéria de crescimento rápido (Pashley & Stoker, 2000). Esse plasmídeo é capaz de se replicar em outros *fast growers*, como *M. smegmatis*, e também em *slow growers*, como *M. tuberculosis*, mostrando-se bastante versátil. Desse modo, teve sua estrutura genética detalhada e foi explorado com sucesso na construção de uma série de vetores micobacterianos, como plasmídeos sensíveis à temperatura (carregando transposons ou alelos mutantes), plasmídeos contendo repórteres e plasmídeos de expressão em hospedeiros micobacterianos (Kana & Mizrahi, 2004). Porém, os vetores derivados de pAL5000 ocorrem em baixo número de cópias (cerca de 2 a 5 por célula) nas micobactérias. Assim, foram criados vetores bifuncionais com origens de replicação para *E. coli* e micobactérias (Parish & Stoker, 1998b).

A elucidação dos mecanismos de integração de micobacteriófagos lisogênicos permitiu que vetores bifuncionais integrativos, derivados sobretudo do micobacteriófago L5, também fossem criados (Machowski *et alii*, 2005). Esses vetores contêm a seqüência *attP* e o gene *int*, que codifica uma integrase capaz de integrar o plasmídeo no cromossomo de micobactérias que possuem o sítio de integração *attB*. Os vetores integrativos são mais estáveis que os epissômicos, transformam as micobactérias com alta eficiência e se integram em cópia única no genoma, de modo que estudos funcionais, de expressão e principalmente de complementação gênica podem ser realizados (Kana & Mizrahi, 2004). Além disso, a versatilidade do sistema foi demonstrada em *M. tuberculosis* pelo uso de uma enzima que efetua a excisão correta do plasmídeo integrado no cromossomo

e, concomitantemente, serve à comprovação da essencialidade de genes específicos (Parish *et alii*, 2001).

A transformação é talvez o mais importante método de manipulação genética bacteriana, e a introdução de moléculas de DNA recombinante nas micobactérias é em geral realizada por meio de eletroporação (Morsczek, 2003). A eficiência de eletroporação varia muito entre as diferentes espécies de micobactérias: com exceção da linhagem *M. smegmatis* mc²155, cuja eficiência é de 10⁵-10⁶ transformantes por µg de DNA, as demais apresentam níveis baixos, entre 10³ e 10⁵ transformantes por µg de DNA (Parish & Stoker, 1998a). Um fator decisivo à eficiência de eletroporação em micobactérias é o marcador de seleção usado no DNA introduzido. Os marcadores mais usados são genes de resistência a antibióticos, e as diferenças observadas para cada um podem refletir a estabilidade de seus produtos nas células micobacterianas. Outro fator relevante é a aplicação de altas voltagens durante o pulso de eletroporação, a fim de romper a resistência da parede celular. Curiosamente, células competentes de *M. tuberculosis* preparadas em temperaturas médias (37°C) aumentam a eficiência de eletroporação, ao contrário de outras bactérias (Wards & Collins, 1996).

Uma vez construídos diversos tipos de vetores, isolada a linhagem *M. smegmatis* mc²155 e melhoradas as técnicas de eletroporação tanto em espécies de crescimento rápido como nas de crescimento lento, o último sério obstáculo à manipulação genética de micobactérias foi a obtenção de mutantes. A construção e caracterização de mutantes são essenciais à análise biológica de qualquer organismo, permitindo que a função e regulação de genes específicos sejam determinadas e compreendidas. Em bactérias patogênicas, a geração de

linhagens isogênicas geneticamente definidas, contendo mutações únicas ou múltiplas em determinados genes, é uma estratégia fundamental à avaliação não só de sua função, mas também de sua relevância à patogênese e virulência do microrganismo. Além disso, linhagens mutantes podem ser utilizadas na elucidação do modo de ação de drogas e na validação de alvos moleculares cujo estudo visa ao desenvolvimento de futuras drogas antibacterianas. E, como certos mutantes de bactérias patogênicas exibem um fenótipo atenuado, os mesmos podem ser usados no desenvolvimento de novas vacinas.

Embora alguns métodos de mutagênese química, utilizando agentes mutagênicos como NTG, tenham sido empregados na geração de linhagens mutantes de micobactérias, esse sistema apresenta várias desvantagens (Brooks, 1998; Connell & Belanger, 2000). A principal é que não há controle sobre as mutações introduzidas no genoma, criando-se mutantes indefinidos. Há ainda a possibilidade de ocorrência de mutações múltiplas, e freqüentemente esforços significativos devem ser feitos para caracterizar os mutantes obtidos e localizar a mutação (Parish & Stoker, 1998b; Hernández Pando *et alii*, 2006).

Já a mutagênese com transposons, baseada na inserção global e idealmente ao acaso de um elemento transponível no genoma de um organismo, constitui uma ferramenta genética valiosa, permitindo a construção de uma biblioteca de transposição e a obtenção de um grande número de mutantes (Morsczeck, 2003; Kana & Mizrahi, 2004; Machowski *et alii*, 2005). Também não há necessidade de conhecimento prévio da função do gene mutado (Pelicic *et alii*, 1998). É necessário, contudo, um método de seleção capaz de identificar com eficiência os mutantes que exibem um fenótipo característico (como, por exemplo,

auxotrofia a nutrientes). Quando o fenótipo de seleção não é simples, o *screening* pode ser laborioso (Hernández Pando *et alii*, 2006).

A técnica de mutagênese com transposons foi inicialmente aplicada a *M. smegmatis*, estendendo-se, posteriormente, a *M. bovis* e *M. tuberculosis* (Smith, 2003; Kana & Mizrahi, 2004). A aplicabilidade de um determinado sistema de transposição a uma espécie de micobactéria depende de um protocolo eficiente de transferência, e dois diferentes métodos de mutagênese com transposons foram desenvolvidos para *M. tuberculosis* e outras micobactérias, usando vetores termossensíveis (micobacteriófagos ou plasmídeos) incapazes de se replicar à temperatura de 39°C (Bardarov *et alii*, 1997; Pelicic *et alii*, 1997). Ambos foram usados na identificação de genes de virulência em *M. tuberculosis* por meio da técnica de *signature tagged mutagenesis*, em que são caracterizados genes essenciais à sobrevivência *in vivo* de um patógeno. Alguns desses genes estão envolvidos no metabolismo de lipídeos (Camacho *et alii*, 1999; Cox *et alii*, 1999). Outra abordagem interessante foi a construção de uma biblioteca de transposição com o transposon Tn5370 em *M. tuberculosis*, gerando mutantes alterados quanto à virulência em um modelo animal (McAdam *et alii*, 2002).

Uma desvantagem desses métodos de análise genética é que os eventos de transposição não são completamente ao acaso em *M. tuberculosis*, havendo *hot spots* para a integração dos transposons, principalmente os derivados da seqüência de inserção IS1096 de *M. smegmatis* (Smith, 2003; Machowski *et alii*, 2005). Desse modo, o elemento transponível *Himar1*, pertencente à família de transposons eucarióticos *mariner*, foi introduzido na genética de micobactérias. Esse elemento se insere especificamente na seqüência dinucleotídica TA,

reconhecendo, portanto, um sítio de integração muito menor que os dos transposons micobacterianos. O resultado é sua inserção praticamente ao acaso no genoma. A construção de uma biblioteca de transposição com o transposon *Himar1*, aliada à técnica de microarranjos, possibilitou a identificação de genes essenciais ao crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis* sob várias condições (Sasseti *et alii*, 2001; Sasseti *et alii*, 2003). A maioria desses genes (quase 80%) está presente em *M. leprae*, cujo genoma parece ter sofrido perdas gênicas em massa, restando somente as funções essenciais (Cole *et alii*, 2001).

Utilizando essa mesma tecnologia pós-genômica, Sasseti & Rubin (2003) demonstraram que aproximadamente 5% dos genes codificados pelo genoma de *M. tuberculosis* são especificamente necessários para o crescimento e a sobrevivência *in vivo* do bacilo, durante a infecção em camundongos. Porém, como o genoma de *M. tuberculosis* possui um alto conteúdo de G+C, com regiões particularmente mais ricas que outras, certos genes podem não estar corretamente representados no RNA usado nas hibridizações desses experimentos, o que levou à proposição de um método alternativo por Lamichhane *et alii* (2003). Nesse último modelo, que combina dados experimentais e uma rigorosa análise estatística *in silico*, cerca de 35% das ORFs de *M. tuberculosis* são consideradas essenciais ao crescimento *in vitro* do bacilo, ao passo que, no estudo realizado por Sasseti *et alii* (2003), pouco mais de 15% são essenciais.

O nocaute gênico (*gene knockout*), substituição gênica (*gene replacement*) ou troca alélica (*allelic exchange*) é uma poderosa técnica de mutagênese direcionada que explora os mecanismos naturais de recombinação homóloga de um organismo. Tal metodologia permite a substituição específica de uma

determinada seqüência genômica por uma cópia contendo mutações definidas, facilitando a avaliação da função ou funções de um gene. Como a mutação introduzida nem sempre resulta em perda total da função correspondente, os termos 'substituição gênica' e 'troca alélica' são preferíveis a 'nocaute gênico', pois o último descreve um fenótipo de ausência total de função, ocasionado pela deleção ou inativação de um ou mais genes.

A construção de mutantes geneticamente definidos, produzidos por meio de recombinação homóloga, não foi uma tarefa fácil em micobactérias. Embora tenha sido inicialmente realizada com sucesso em *M. smegmatis*, mostrou-se, no entanto, uma abordagem bastante complexa e ineficiente em *M. tuberculosis* e outras micobactérias de crescimento lento (Husson *et alii*, 1990; Pelicic *et alii*, 1998). Primeiramente, essa dificuldade foi atribuída a altos níveis de recombinação ilegítima (não homóloga) e/ou baixos níveis de recombinação homóloga em *M. tuberculosis* (McFadden, 1996).

A subsequente descoberta de que a proteína RecA de *M. tuberculosis* contém uma inteína em sua seqüência, devendo ser processada, levou à especulação de que essa característica incomum poderia resultar em níveis celulares reduzidos de RecA e, assim, de recombinação homóloga (Davis *et alii*, 1992). No entanto, estudos posteriores comprovaram que o gene *recA* e a proteína RecA de *M. tuberculosis* são capazes de complementar um mutante de *M. smegmatis* deficiente na produção de RecA, evidenciando que os mecanismos de reparo de DNA e de recombinação homóloga são inteiramente funcionais em *M. tuberculosis* (Frischkorn *et alii*, 1998; Papavinasasundaram *et alii*, 1998). Outro estudo, realizado por Pavelka & Jacobs (1999), demonstrou que a freqüência de

recombinação homóloga em *M. tuberculosis* (e também em *M. bovis*) é similar às observadas nas micobactérias de crescimento rápido, como *M. smegmatis*. Na verdade, o fato de os *slow growers* apresentarem níveis de recombinação ilegítima mais elevados que os *fast growers* não significa que os primeiros não sejam eficientes na realização de recombinação homóloga.

Aparentemente, a dificuldade de identificar eventos de recombinação homóloga, resultantes de *crossover* duplo, foi o principal fator que retardou a construção de mutantes definidos por troca alélica nas micobactérias de crescimento lento (Stoker *et alii*, 2005). O desenvolvimento e a aplicabilidade de marcadores de seleção e contra-seleção, facilitando a triagem de mutantes desse tipo, foram fundamentais ao progresso na área.

As estratégias de substituição gênica em geral envolvem três passos: (i) clonagem de um gene ou região genômica em um vetor apropriado e geração de uma mutação; (ii) transferência do DNA mutante à micobactéria hospedeira e (iii) seleção de mutantes. A recombinação entre as seqüências homólogas presentes no cromossomo da micobactéria e no vetor de transferência leva à inserção do DNA transformante no genoma. Como durante a recombinação homóloga eventos de *crossover* podem ocorrer em qualquer lado da mutação, dois resultados são possíveis. Em um *crossover* duplo (DCO), isto é, dois eventos de recombinação homóloga (um em cada lado da mutação), ocorre a troca do alelo selvagem pela cópia mutante introduzida. Em um *crossover* simples (SCO), isto é, apenas um evento de recombinação homóloga (em qualquer lado do alelo selvagem), ocorre a inserção do vetor de transferência (contendo o alelo mutante) no cromossomo do hospedeiro (Gordhan & Parish, 2001). No último caso, a linhagem bacteriana

produzida é um SCO ou merodiplóide, que pode dar origem a um DCO, se um segundo evento de recombinação homóloga ocorrer (**Figura 1.1**).

Nesse contexto, os métodos de substituição gênica em micobactérias fazem uso de elementos que auxiliam a identificação de mutantes, discriminando os mutantes originados de troca alélica (DCO) das linhagens SCO e das originadas de resistência espontânea a marcadores de seleção (Kana & Mizrahi, 2004). Para tal, marcadores de seleção – conferindo resistência a antibióticos (*aph*, *hyg*) e visualizáveis (*lacZ*) – e de contra-seleção (*sacB*) foram otimizados para o *screening* de mutantes de micobactérias, empregando vetores suicidas, isto é, que não se replicam (Stoker *et alii*, 2005). Os dois primeiros tipos de marcador são usados na seleção de transformantes e para distinguir eventos produtivos de recombinação daqueles gerados por resistência espontânea a antibióticos (com o uso, no caso, de *lacZ*). Em outras palavras, selecionam-se linhagens SCO, nas quais ocorreu a integração, no cromossomo da micobactéria, do vetor de transferência contendo a mutação (Machowski *et alii*, 2005).

O terceiro tipo de marcador, *sacB*, é usado para selecionar a ausência do marcador de contra-seleção nos mutantes obtidos (Stoker *et alii*, 2005). Marcadores de contra-seleção são genes cuja expressão, em condições específicas de crescimento, é letal à sobrevivência do microrganismo que os contêm (Reyrat *et alii*, 1998). Assim, transformantes que têm um vetor suicida (contendo um marcador de contra-seleção) integrado em seu cromossomo (SCO) são eliminados quando aplicada uma pressão de contra-seleção, sobrevivendo apenas os mutantes em que ocorreu um segundo evento de recombinação homóloga, o qual levou à perda do vetor e dos marcadores (DCO). Nessa etapa,

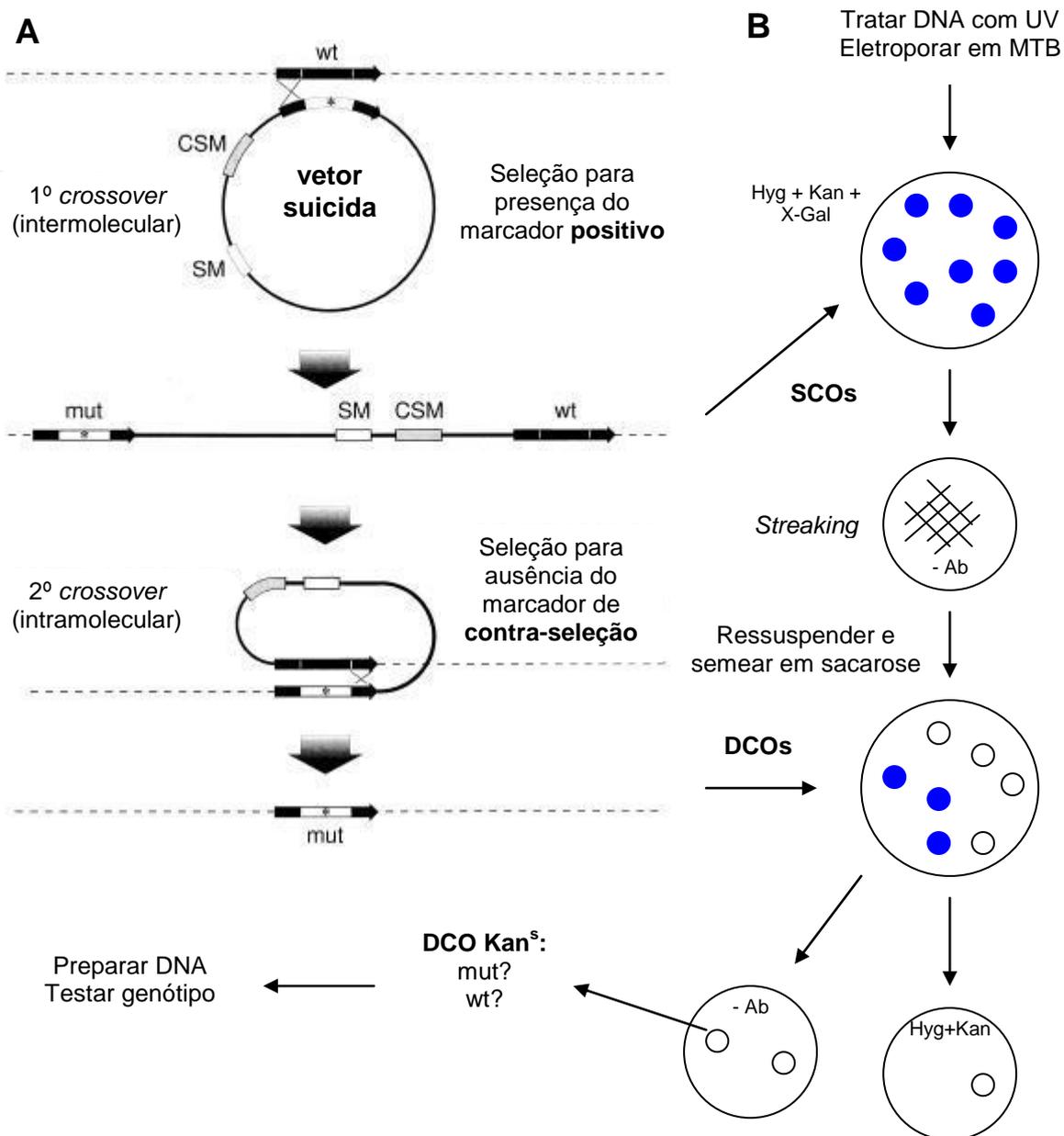


Figura 1.1. (A) Substituição gênica por recombinação homóloga usando uma metodologia de seleção e contra-seleção em duas etapas. Um plasmídeo suicida (não replicativo) contendo uma versão mutante (mut) do gene-alvo (wt) é pré-tratado com radiação UV e eletroporado em células de MTB, como mostrado em (B). O plasmídeo contém marcadores de seleção (SM: *hyg*, *kan* e *lacZ*) e contra-seleção (CSM: *sacB*). No primeiro *crossover*, ocorre a recombinação entre seqüências homólogas presentes no alelo mutante e no cromossomo micobacteriano, dando origem a colônias azuis Hyg^r Kan^r (SCOs). Após o *streaking* dessas colônias em meio sem antibióticos (- Ab), ocorre o segundo *crossover*. Em seguida, as colônias são contra-selecionadas na presença de sacarose: colônias azuis representam mutantes espontâneos; colônias brancas representam DCOs. Na última etapa, os DCOs são testados quanto à sensibilidade a Kan, sendo que as colônias Kan^s representam mutantes ou o tipo selvagem (ocorrência de reversão). Adaptado de Gordhan & Parish (2001).

portanto, selecionam-se linhagens DCO, as quais podem (dependendo do lado da mutação em que ocorreu a segunda recombinação) tanto ser linhagens mutantes, originadas da troca do alelo selvagem pelo mutante, como linhagens selvagens, em que houve reversão (Machowski *et alii*, 2005) (**Figura 1.1**).

O marcador de contra-seleção mais utilizado em micobactérias é o gene *sacB* de *Bacillus subtilis*, que codifica uma enzima responsável pela síntese, a partir da hidrólise de sacarose, de polímeros de frutose de alto peso molecular. A expressão do gene *sacB* em bactérias gram-negativas, como *E. coli*, é letal, uma vez que o acúmulo dos polímeros de frutose no periplasma é tóxico. Nas micobactérias, embora gram-positivas, observa-se o mesmo fenômeno, sendo a toxicidade do gene *sacB* explicada pelo provável acúmulo dos polímeros de frutose no “pseudo” espaço periplasmático formado entre a membrana celular e a camada externa de ácidos micólicos (Pelicic *et alii*, 1996a). Desse modo, quando se adiciona sacarose ao meio de cultura durante a etapa de contra-seleção de mutantes, ocorre a expressão do gene *sacB* e os mutantes SCO que o contêm morrem, restando apenas os mutantes DCO (Pelicic *et alii*, 1996b).

Essa abordagem de mutagênese por troca alélica usando vetores suicidas incapazes de se replicar em micobactérias é, como acima explicado, geralmente efetuada em duas etapas (seleção e contra-seleção) e oferece controle total sobre o tipo de mutação introduzida. Não só deleções de extensão variável podem ser realizadas no gene-alvo, mas também alterações mais sutis, como mutações pontuais. Outra possibilidade é inativar regiões específicas de uma seqüência codificante, como, por exemplo, o domínio catalítico de uma proteína (Reyrat *et alii*, 1998). A função de um gene pode ser dissecada e caracterizada, e, no caso

de genes relacionados (que fazem parte do mesmo operon, codificam enzimas de uma rota metabólica em comum ou desempenham funções semelhantes ou mesmo idênticas), mutações múltiplas podem ser introduzidas, de forma a esclarecer a participação individual de cada um no sistema (Parish & Stoker, 2000). Se o gene executar uma função regulatória, como no caso de reguladores de resposta, que controlam a expressão de outros genes, a mutação introduzida pode revelar os prováveis genes que compõem o regulon e como seus níveis de transcrição são afetados (Parish *et alii*, 2003).

Qualquer gene em estudo pode ter sua respectiva seqüência genômica interrompida por meio da inserção de um cassete contendo um ou mais genes de resistência a antibióticos, mas essa estratégia apresenta problemas. O primeiro é que a simples inserção do cassete no cromossomo pode causar um fenótipo mutante. Como muitos genes bacterianos se encontram agrupados em operons e possuem regulação acoplada, a inserção do cassete pode gerar efeitos polares *upstream* e *downstream* ao gene-alvo e criar um fenótipo mutante misto, resultante não somente da inativação originalmente planejada (Reyrat *et alii*, 1998). Em segundo lugar, a mutação introduzida é marcada, isto é, produz-se uma linhagem bacteriana que contém um gene de resistência a antibiótico em seu cromossomo, o que nem sempre é desejável. Por fim, se o objetivo da mutação é apenas inativar o gene, de modo que haja perda de função sem concomitante perda de antigenicidade da proteína correspondente, isso não é possível.

Todos esses problemas são contornados pela técnica de mutagênese por troca alélica com vetores suicidas (contendo marcadores de contra-seleção) em duas etapas. E, embora seja um processo inerentemente lento em *M. tuberculosis*

(cerca de 12 a 15 semanas, do momento da eletroporação à identificação das colônias mutantes), a principal vantagem – além da geração de deleções precisas e mutações pontuais no gene-alvo – é a produção de linhagens mutantes não marcadas (Reyrat *et alii*, 1998; Gordhan & Parish, 2001; Kana & Mizrahi, 2004). Essa última característica é recomendável no caso de construção de uma linhagem com mutações múltiplas e fundamental no caso de obtenção de um mutante atenuado a ser futuramente testado em experimentos de proteção em animais e no homem (Hingley-Wilson *et alii*, 2003).

Como anteriormente descrito, a vacina BCG nada mais é que uma linhagem mutante de *M. bovis*, atenuada por sucessivas passagens em cultura e cuja eficácia é bastante discutível (Orme, 2001; Young & Stewart, 2002; Skeiky & Sadoff, 2006). Hoje, novas vacinas anti-TB podem ser produzidas de forma racional, tendo como base os dados do seqüenciamento do genoma de *M. tuberculosis* e a metodologia de troca alélica, que permite a construção de mutantes atenuados e não marcados (Hernández Pando *et alii*, 2006). Muitas dessas linhagens são auxotróficas para um ou mais compostos, sendo que alguns mutantes de *M. tuberculosis* mostram um grau de proteção igual ou superior ao da BCG em camundongos e cobaias: $\Delta leuD$ (auxotrofia para leucina), $\Delta panCD$ (auxotrofia para pantotenato), $\Delta proC$ (auxotrofia para prolina), $\Delta purC$ (auxotrofia para purinas) e $\Delta trpD$ (auxotrofia para triptofano) (Jackson *et alii*, 1999; Hondalus *et alii*, 2000; Smith *et alii*, 2001; Sambandamurthy & Jacobs, 2005).

Linhagens mutantes atenuadas contendo deleções múltiplas, em mais de um gene, são candidatas ideais ao desenvolvimento de novas vacinas anti-TB por dois motivos. Primeiro, a vacinação pode induzir uma resposta imune maior e

mais duradoura que a conferida pela BCG ou por mutantes auxotróficos de *M. tuberculosis* a um único composto (Hernández Pando *et alii*, 2006). Segundo, a segurança dessas linhagens é maior: como no mínimo dois locos envolvidos na virulência de *M. tuberculosis* possuem deleções, a chance de reversão diminui consideravelmente (Sambandamurthy & Jacobs, 2005). Recentemente, dois duplos-mutantes promissores foram racionalmente criados em *M. tuberculosis*, e ambos oferecem bons níveis de proteção em modelos animais: $\Delta leuD \Delta panCD$ (auxotrofia para leucina e pantotenato) e $\Delta lysA \Delta panCD$ (auxotrofia para lisina e pantotenato) (Sampson *et alii*, 2004; Sambandamurthy *et alii*, 2005).

No entanto, deve-se mencionar que a construção de mutantes em micobactérias patogênicas por meio de troca alélica resulta em diversos tipos de linhagens atenuadas, tendo sido proposto um sistema de classificação, de acordo com as características observadas durante seu crescimento *in vivo* (em comparação à linhagem selvagem *M. tuberculosis* H37Rv) (Hingley-Wilson *et alii*, 2003). Da mesma forma, é possível que certos mutantes de *M. tuberculosis* gerados de forma racional sejam hipervirulentos, o que foi detectado em mais de um estudo (Parish *et alii*, 2003; Shimono *et alii*, 2003; Rao *et alii*, 2006).

Diversas outras melhorias e técnicas mais eficientes para a introdução de DNA exógeno em micobactérias foram sendo progressivamente desenvolvidas e estão atualmente disponíveis, como, por exemplo, o pré-tratamento de moléculas recombinantes com radiação ultravioleta (UV), o uso de micobacteriófagos em experimentos de transdução especializada e novos sistemas de integração sítio-específica (Hinds *et alii*, 1999; Bardarov *et alii*, 2002; Murry *et alii*, 2005). Um dos mais importantes avanços na área foi a recente utilização, por três grupos de

pesquisa independentes, do repressor Tet em sistemas de expressão condicional com tetraciclina (Blokpoel *et alii*, 2005; Carroll *et alii*, 2005; Ehrt *et alii*, 2005). Variando a concentração de tetraciclina durante condições experimentais definidas, a regulação de certos genes pôde ser controlada em diferentes níveis, o que é um passo fundamental para o estudo de genes essenciais.

Análises de expressão gênica global realizadas com *M. tuberculosis* em modelos *in vitro* e *in vivo*, nos quais várias condições foram testadas (choque térmico, hipóxia, limitação de ferro, privação de nutrientes, tratamento com drogas anti-TB, etc), possibilitaram a obtenção de transcriptomas complexos e a identificação de novos genes (Kendall *et alii*, 2004). Contudo, muitos desses genes não têm função atribuída, e seu papel na interação patógeno-hospedeiro também é desconhecido. A elucidação de suas funções representa o próximo grande desafio na área de pesquisa em TB, e, para tal, o contínuo melhoramento de técnicas moleculares para a manipulação genética de *M. tuberculosis* e de outras micobactérias é indispensável (Murry & Rubin, 2005).

1.5. Corismato mutase

A via do chiquimato, presente em bactérias, fungos, plantas e parasitas do filo Apicomplexa, constitui uma rota central no metabolismo de uma ampla série de compostos, incluindo a biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Elucidada por B. Davis, F. Gibson e D. Sprinson há mais de 50 anos, é considerada um alvo molecular interessante para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas e herbicidas, pois não ocorre em animais

(Gibson, 1999; Roberts *et alii*, 2002). As sete enzimas que a compõem realizam a conversão de eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato em corismato, seu produto final e um precursor comum à síntese de aminoácidos aromáticos, folato, benzoquinonas, naftoquinonas, sideróforos e outros metabólitos secundários que contêm o anel aromático (Bentley, 1990; Herrmann & Weaver, 1999). No caso de *M. tuberculosis*, em que a aquisição e o metabolismo de ferro são estritamente regulados, os sideróforos são moléculas derivadas de salicilato, as micobactinas, essenciais à multiplicação *in vivo* do bacilo (Rodriguez, 2006).

As enzimas da via do chiquimato (3-desoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato sintase, 3-desidroquinato sintase, 3-desidroquinato desidratase, chiquimato desidrogenase, chiquimato quinase, 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase e corismato sintase) foram originalmente descobertas e estudadas em bactérias, principalmente *E. coli* e *Salmonella typhimurium* (Herrmann & Weaver, 1999). Embora os substratos e produtos dessas enzimas – e, portanto, os intermediários da via – sejam idênticos em organismos procarióticos e eucarióticos, é comum ocorrerem grandes variações na estrutura primária e nas propriedades bioquímicas das próprias enzimas, bem como na regulação global da via e de seus componentes (**Figura 1.2**).

A anotação do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv revelou a existência de sete genes *aro* com similaridade às enzimas da via do chiquimato de outras bactérias, quatro dos quais agrupados em um mesmo operon (Cole *et alii*, 1998). Posteriormente, todas as sete enzimas da via do chiquimato de *M. tuberculosis* foram isoladas e caracterizadas (Oliveira *et alii*, 2001; Magalhães *et alii*, 2002; Rizzi *et alii*, 2005). Uma das particularidades, em *M. tuberculosis*, é a presença de

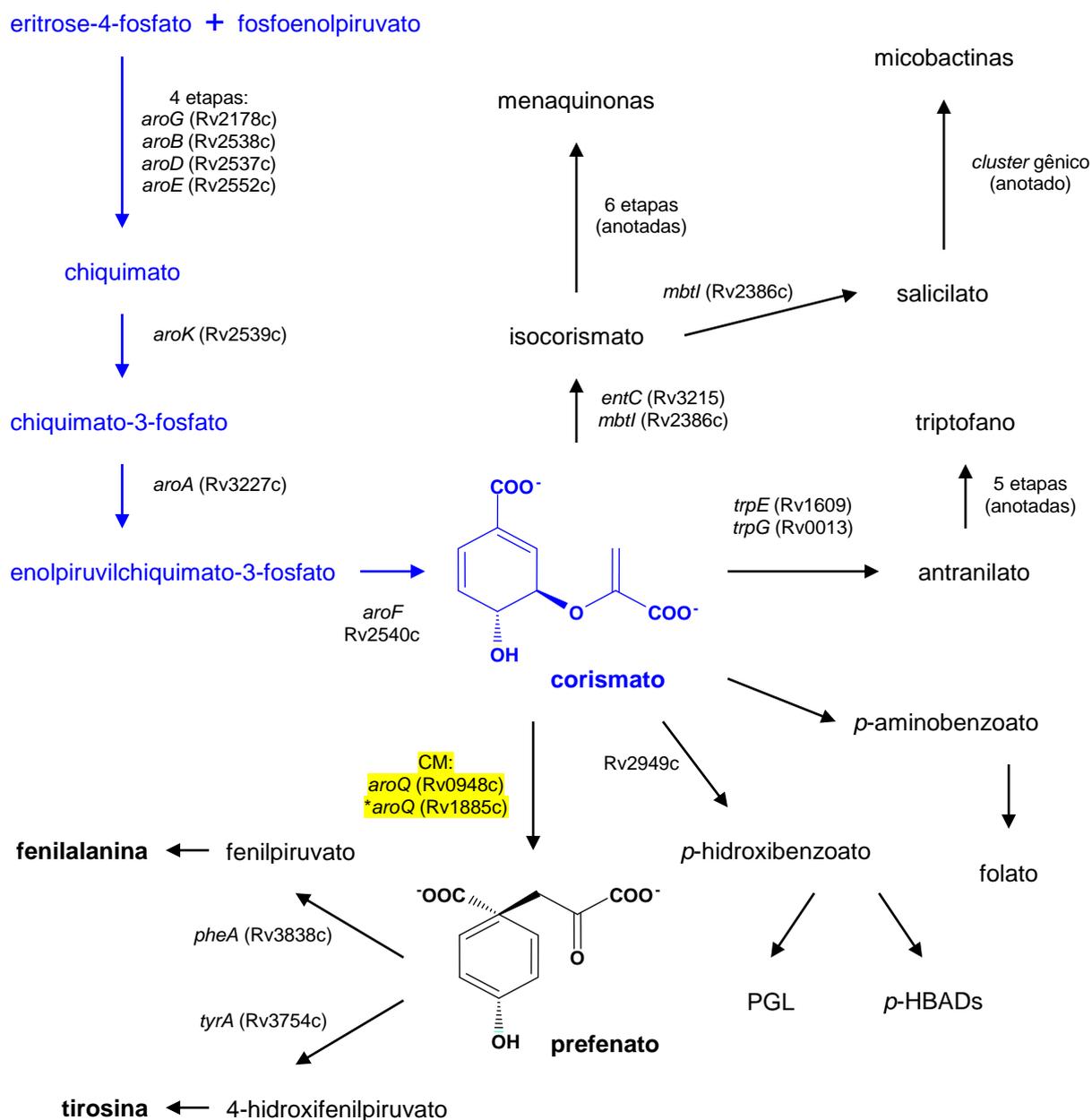


Figura 1.2. Via do chiquimato (em azul) e biossíntese de compostos aromáticos a partir do corismato em *M. tuberculosis*. A corismato mutase (CM) converte corismato em prefenato, o qual serve de substrato à síntese de fenilalanina e tirosina. Genes já caracterizados ou atribuídos para cada etapa enzimática foram compilados do banco de dados TubercuList, e estão indicados ao lado das setas. PGL, glicolípídeos fenólicos; *p*-HBADs, ésteres metilados de *p*-hidroxibenzoato.

somente uma 3-desoxi-D-arabino-heptulose 7-fosfato sintase (a primeira enzima da via), ao passo que, em outras bactérias, como *E. coli*, ocorrem três, uma para cada aminoácido aromático (Pittard, 1996). Além disso, demonstrou-se que o gene *aroK*, que codifica a chiquimato quinase (a quinta enzima da via), é essencial ao crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis*: a inativação do alelo cromossômico só pôde ser efetuada quando, além de suplementação com corismato e cinco compostos aromáticos no meio de seleção, uma segunda cópia funcional do gene estava presente (Parish & Stoker, 2002). Esse dado comprova que a via do chiquimato é essencial em *M. tuberculosis*, ao contrário de outras bactérias, em que genes *aro* podem ser inativados (O'Callaghan *et alii*, 1988).

Apesar de haver muitas ramificações a partir de cada intermediário metabólico da via do chiquimato, o corismato representa o principal ponto de ramificação, dando origem a, como mencionado, fenilalanina e tirosina (via p-fenilalanato), triptofano (via antranilato), cofatores de folato (via amino-desoxicorismato), ubiquinonas (via *p*-hidroxibenzoato) e menaquinonas e micobactinas (via isocorismato) (Roberts *et alii*, 2002) (**Figura 1.2**). Embora aparentemente as linhagens de *M. tuberculosis* não sintetizem ubiquinonas, recentemente demonstrou-se que a ORF Rv2949c codifica uma corismato piruvato liase responsável pela produção de *p*-hidroxibenzoato, o qual é usado na biossíntese de ésteres metilados de *p*-hidroxibenzoato e glicolípídeos fenólicos – constituintes do envelope associados à patogenicidade (Stadthagen *et alii*, 2005). A síntese dos derivados primários de corismato é freqüentemente sujeita a complexos mecanismos de regulação, em nível transcricional, traducional e de atividade enzimática. E, muitas vezes, seus produtos finais (como os aminoácidos

aromáticos, por exemplo) controlam a atividade das etapas iniciais da via do chiquimato, pois a disponibilidade de corismato é limitada e seus níveis devem ser mantidos em concentrações adequadas durante várias condições ambientais (Dosselaere & Vanderleyden, 2001).

Entre as enzimas que utilizam o corismato, destaca-se a corismato mutase (CM), que catalisa a primeira etapa metabólica na biossíntese de fenilalanina e tirosina. A CM realiza a conversão intramolecular de corismato em preferato, sendo um raro exemplo de uma enzima que executa um tipo de reação pericíclica denominado rearranjo de Claisen (Guilford *et alii*, 1987) (**Figura 1.3**). Trata-se de uma reação altamente exergônica e essencialmente irreversível, em que uma ligação carbono-oxigênio é quebrada e uma ligação carbono-carbono é formada (Kast *et alii*, 1997). A reação procede espontaneamente na ausência de catálise enzimática, de forma coordenada (mas assincrônica), passando de corismato a preferato via um estado de transição polar; além disso, a CM é capaz de acelerar esse processo entre 10^6 e 10^7 vezes (Copley & Knowles, 1985). Contudo, o mecanismo pelo qual a enzima facilita o rearranjo de corismato a preferato ainda não é totalmente compreendido (Zhang *et alii*, 2005).

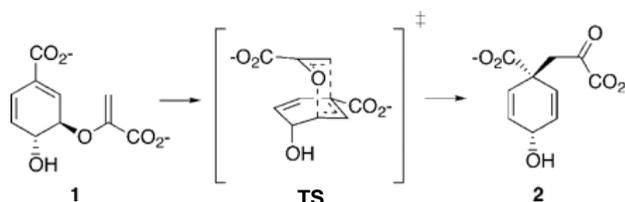


Figura 1.3. Rearranjo de Claisen catalisado pela CM, resultando na formação de preferato (2), a partir de corismato (1), via um estado de transição (TS).

Após a conversão de corismato em prefenato pela CM, o prefenato serve de substrato a duas outras enzimas: prefenato desidratase, que o converte a fenilpiruvato, e prefenato desidrogenase, que o converte a 4-hidroxifenilpiruvato. Na seqüência, fenilpiruvato e 4-hidroxifenilpiruvato são transaminados por aminotransferases específicas, resultando na formação de fenilalanina e tirosina, respectivamente (Pittard, 1996).

Em geral, com base na estrutura protéica, as CMs são divididas em duas classes principais: classe AroH, que compreende CMs com estrutura trimérica do tipo pseudo α/β barril, e classe AroQ, que compreende CMs com estrutura predominantemente dimérica e formada apenas por α -hélices (Dosselaere & Vanderleyden, 2001). Os protótipos da classe AroH, relativamente mais rara na natureza, são as proteínas AroH de *B. subtilis* e AroH de *Thermus thermophilus* (Chook *et alii*, 1993; Chook *et alii*, 1994; Helmstaedt *et alii*, 2004). Os principais representantes da classe AroQ, consideravelmente mais abundante, são o domínio CM da proteína bifuncional PheA (CM-prefenato desidratase, P-proteína ou AroQ_p) de *E. coli*, EcCM, e a proteína AroR de *Saccharomyces cerevisiae*, ScCM (Lee *et alii*, 1995a; Sträter *et alii*, 1997). Embora as proteínas AroH e AroQ catalisem a mesma reação enzimática, possuem similaridade de seqüência muito baixa entre si e estruturas tridimensionais totalmente diferentes. Os sítios ativos de ambas as classes de CMs são, no entanto, funcionalmente similares, o que indica origens independentes e um processo de evolução convergente (Calhoun *et alii*, 2001; Dosselaere & Vanderleyden, 2001).

A EcCM, o protótipo da classe AroQ, é um dímero entrelaçado composto por duas subunidades de três α -hélices cada (Lee *et alii*, 1995a). Já a ScCM é

uma versão mais elaborada da dobra polipeptídica característica da classe AroQ, pois cada subunidade do dímero (que, acredita-se, tenha se originado da duplicação de um gene *aroQ* primordial) possui 12 α -hélices. Cada polipeptídeo da ScCM forma um domínio catalítico único, que se sobrepõe de forma aproximada à estrutura correspondente da EcCM, mas há, adicionalmente, um domínio regulatório, ao qual se ligam, na interface do dímero, os efetores alostéricos tirosina ou triptofano (Xue *et alii*, 1994). A EcCM não é regulada alostericamente, uma vez que faz parte, na verdade, da proteína bifuncional PheA, que tem atividade de CM e prefenato desidratase e um domínio regulatório na porção C-terminal, estando envolvida na biossíntese de fenilalanina (Zhang *et alii*, 1998). Em *E. coli* ocorre, também, a proteína bifuncional TyrA, que tem atividade de CM e prefenato desidrogenase e está envolvida na biossíntese de tirosina (Dosselaere & Vanderleyden, 2001).

A descoberta de CMs monofuncionais da classe AroQ, não fusionadas a outras proteínas (como no caso das proteínas PheA e TyrA de *E. coli*), teve início com a identificação da CM periplasmática de *Erwinia herbicola* (que também possui proteínas PheA e TyrA homólogas às de *E. coli*) (Xia *et alii*, 1993). Posteriormente, à medida que o seqüenciamento de genomas bacterianos foi avançando, verificou-se que muitas outras espécies apresentavam genes *aroQ* codificadores de CMs monofuncionais (Gu *et alii*, 1997; MacBeath *et alii*, 1998; Calhoun *et alii*, 2001). Na verdade, o gene *aroQ* exemplifica um caso interessante de fusão a outros genes que codificam enzimas da via de biossíntese dos aminoácidos aromáticos e da via do chiquimato. Assim, em *E. coli* e na maioria das Proteobacteria, o gene *aroQ* se encontra fusionado aos genes *pheA* e *tyrA*,

formando, como acima mencionado, as proteínas bifuncionais PheA (ou AroQ_p) e TyrA (ou AroQ_t). Em *Clostridium acetobutylicum*, o gene *aroQ* está fusionado ao da chiquimato desidrogenase. Em *B. subtilis*, o gene *aroQ* está fusionado ao da 3-desoxi-D-arabino-heptulose 7-fosfato sintase, o que também ocorre em *Staphylococcus aureus* e outras bactérias (Calhoun *et alii*, 2001). E, como é o caso de *E. herbicola* e outras espécies, múltiplos parálogos do gene *aroQ* ocorrem em um mesmo organismo (Xia *et alii*, 1993).

Desta maneira, as espécies de bactérias organizam as rotas biossintéticas de corismato a fenilalanina e tirosina de forma diferenciada, utilizando proteínas monofuncionais e/ou bifuncionais. O significado dessa organização genômico-funcional ainda não está claro, mas pode estar relacionado à regulação do *pool* intracelular de corismato, já que a via do chiquimato (e a biossíntese dos aminoácidos aromáticos) é extremamente custosa em termos energéticos – implicando mecanismos de controle e otimização enzimática (Dosselaere & Vanderleyden, 2001). Mas, como observa Calhoun *et alii* (2001), a distribuição filogenética errática das proteínas AroQ pode ter origem em diversos eventos, como perda gênica em massa, transferência horizontal e evolução independente de certos domínios protéicos. E, apesar de os genes *aroQ* exibirem baixa similaridade de seqüência entre si, apontam para uma origem comum.

De qualquer forma, o fato mais notável em relação às CMs monofuncionais da classe AroQ foi a identificação de versões periplasmáticas dessas enzimas em espécies como *E. herbicola*, *S. typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* (Xia *et alii*, 1993; Calhoun *et alii*, 2001). Trata-se de uma situação incomum, pois, ao contrário de *Methanococcus jannaschii*, em que ocorre apenas uma CM mono-

funcional citoplasmática, as três espécies anteriores possuem CMs bifuncionais citoplasmáticas (MacBeath *et alii*, 1998). A localização espacial dessas CMs monofuncionais (denominadas *AroQ para indicar que são exportadas) é intrigante, uma vez que o periplasma é um ambiente celular mais oxidante que o citoplasma e as rotas conhecidas de biossíntese de fenilalanina e tirosina ocorrem neste último. Contudo, é possível que haja rotas biossintéticas alternativas desses aminoácidos, ou que as proteínas *AroQ interajam com vias diferentes. Também interessante é a presença de proteínas *AroQ em bactérias patogênicas (como *S. typhimurium*) e nematódeos (que não possuem a via do chiquimato) (Lambert *et alii*, 1999; Calhoun *et alii*, 2001; Bekal *et alii*, 2003).

Como relatado no presente trabalho e de forma independente por Prakash *et alii* (2005) e Sasso *et alii* (2005), *M. tuberculosis* também apresenta uma CM monofuncional, da classe AroQ e provavelmente exportada, como originalmente previsto por Calhoun *et alii* (2001). Além disso, *M. tuberculosis* apresenta uma outra CM, também monofuncional, mas de localização citoplasmática.

1.6. Fosforilase de nucleosídeos purínicos

Os nucleotídeos de purinas podem ser sintetizados *de novo*, a partir de precursores simples, ou derivados de purinas exógenas, por meio da via de salvamento das purinas. Na biossíntese *de novo* dos nucleotídeos de purinas, a formação de AMP e GMP a partir de IMP, seu precursor comum, ocorre por vias separadas e é irreversível. No entanto, na via de salvamento das purinas, os nucleotídeos de adenina e guanina (e seus derivados) podem ser interconvertidos

por meio de IMP. Os compostos de adenina podem ser convertidos em nucleotídeos de guanina via duas rotas metabólicas, enquanto uma única enzima catalisa a conversão de GMP em IMP (**Figura 1.4**). Em *E. coli*, essas conversões são importantes para a manutenção do equilíbrio entre os *pools* dos nucleotídeos de adenina e guanina, principalmente quando compostos de adenina e guanina estão presentes no meio de cultura (Zalkin & Nygaard, 1996).

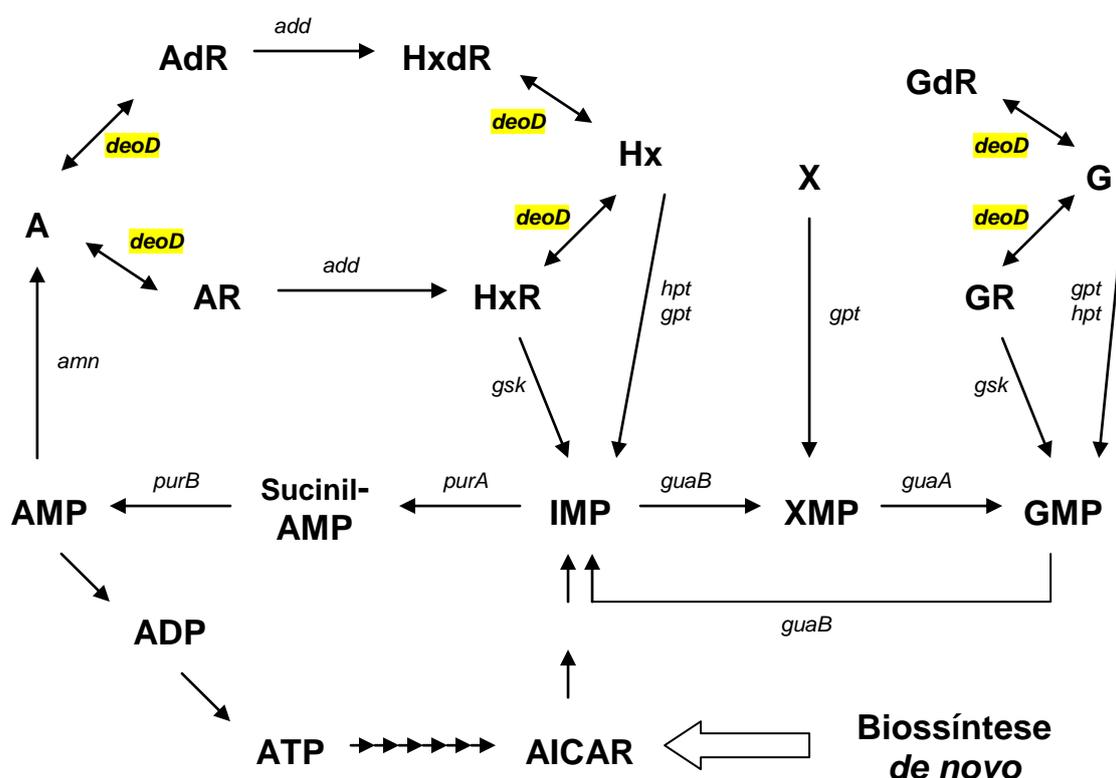


Figura 1.4. Via de salvamento das purinas em *E. coli*, em que os nucleotídeos de adenina (A) e guanina (G) são interconvertidos via IMP. As enzimas estão identificadas por seus respectivos genes, com destaque para *add* (adenosina desaminase), *deoD* (fosforilase de nucleosídeos purínicos) e *hpt* (hipoxantina fosforribosiltransferase). Hx, hipoxantina; X, xantina. Os ribonucleosídeos e desoxirribonucleosídeos estão identificados por R e dR, respectivamente.

A fosforilase de nucleosídeos purínicos (PNP) é uma das enzimas centrais na via de salvamento das purinas, catalisando a clivagem da ligação glicosídica de ribonucleosídeos e desoxirribonucleosídeos na presença de fosfato inorgânico (P_i) e formando, como produtos, a respectiva base purínica e (desoxir)ribose-1-fosfato, conforme a seguinte reação reversível:



Termodinamicamente, a constante de equilíbrio favorece a síntese de nucleosídeos. Adenosina, guanosina, inosina e os desoxirribonucleosídeos correspondentes são os substratos da PNP, e a enzima opera por um mecanismo seqüencial, em que o nucleosídeo, P_i e ribose-1-fosfato se ligam em ordem randômica e a base purínica se liga após a ribose-1-fosfato (Zalkin & Nygaard, 1996). Entretanto, *in vivo*, a reação de fosforólise catalisada pela PNP (codificada pelo gene *deoD*) é favorecida em detrimento à reação de síntese, devido ao acoplamento com mais duas reações enzimáticas, catalisadas pela adenosina desaminase (codificada pelo gene *add*) e pela hipoxantina fosforribosiltransferase (codificada pelo gene *hpt*) (**Figura 1.4**).

Em *E. coli* e *S. typhimurium*, a via de salvamento das purinas desempenha várias funções, entre as quais a captação de bases e nucleosídeos exógenos para a biossíntese de nucleotídeos e a reutilização de bases e nucleosídeos gerados pela reciclagem intracelular de nucleotídeos. Uma terceira função é catabólica: as porções pentose dos nucleosídeos exógenos e os grupos amino dos compostos de adenina podem servir como fonte de carbono e nitrogênio,

respectivamente, sendo que, quando há disponibilidade de bases e nucleosídeos exógenos no meio de cultura, todas as enzimas relacionadas ao catabolismo de nucleosídeos são induzidas. Além disso, mutantes auxotróficos para a via, bloqueados na síntese de IMP, podem ser suplementados – com eficiência variável, dependendo da espécie – com diversos compostos de purinas, evidenciando a complexidade desta rota (Zalkin & Nygaard, 1996).

Em *M. tuberculosis*, homólogos às enzimas da via de salvamento das purinas foram identificados no genoma, mas, até o momento, poucos genes e proteínas foram experimentalmente estudados (Cole *et alii*, 1998). A PNP de *M. tuberculosis* é uma proteína de 268 aminoácidos e massa molecular de 80 kDa, sendo um trímero em solução, à semelhança da PNP humana, mas diferentemente das enzimas de *E. coli* e *S. typhimurium*, de estrutura hexamérica (Basso *et alii*, 2001). A estrutura cristalina da PNP de *M. tuberculosis*, complexada com o inibidor imucilina-H e P_i , foi determinada por Shi *et alii* (2001), representando um passo fundamental ao desenvolvimento de novas drogas anti-TB, uma vez que a enzima tem um papel central na via de salvamento das purinas.

Acredita-se que a inibição da atividade da PNP de *M. tuberculosis* leve ao acúmulo de nucleotídeos de guanina, uma vez que os genes da guanilato quinase (*gmk*, Rv1389) e da nucleosídeo difosfato quinase (*ndkA*, Rv2445c) estão presentes no genoma do bacilo (Basso *et alii*, 2001). Nesse caso, o acúmulo de guanina prejudicaria o metabolismo celular, pois outra enzima, a ppGpp sintetase ou RelA, é capaz de usar GTP como substrato para a formação de ppGpp (tetrafosfato de guanosina), o principal efetor da chamada ‘resposta severa’. A resposta severa ou *stringent response* é um conjunto de adaptações fisiológicas,

mediado por ppGpp, que se caracteriza pela súbita repressão da síntese de ácidos nucléicos e proteínas e pela simultânea ativação da degradação de proteínas e síntese de aminoácidos (Cashel *et alii*, 1996; Chatterji & Ojha, 2001). Trata-se de um fenômeno metabólico complexo, observado em diversas espécies de bactérias em resposta à deficiência de aminoácidos e outros nutrientes, bem como a situações ambientais que temporariamente interrompem o crescimento bacteriano (Magnusson *et alii*, 2005; Braeken *et alii*, 2006).

O acúmulo de guanosina hiperfosforilada é a característica mais marcante da resposta severa, e, como mencionado, esse nucleotídeo é sintetizado pela fosforilação enzimática de GDP e GTP a ppGpp e pppGpp (pentafofato de guanosina), respectivamente, utilizando ATP como doador de fosfato. Em condições 'normais', de crescimento favorável, o nível basal de pppGpp e ppGpp é mantido em estado estacionário nas células bacterianas pela atividade das enzimas RelA e SpoT – ou, em certas espécies, somente por RelA (Chatterji & Ojha, 2001). Em condições de estresse nutricional, pppGpp é convertido em ppGpp, iniciando efeitos regulatórios globais que levam a uma resposta adaptativa e permitem às células bacterianas resistir ao estresse. Além disso, a resposta severa também parece estar implicada em eventos de sinalização entre as populações bacterianas que se encontram em condições de alta densidade celular e baixa disponibilidade de nutrientes (Braeken *et alii*, 2006).

Os mecanismos pelos quais o ppGpp exerce seus efeitos regulatórios ainda não são totalmente conhecidos, mas sabe-se que, em *E. coli*, as moléculas de ppGpp se ligam às subunidades β e β' da RNA polimerase, afetando, portanto, a transcrição gênica. Ocorre tanto a regulação negativa como a regulação positiva

de certos genes; desse modo, genes relacionados ao crescimento (RNAs estáveis, proteínas ribossômicas, biossíntese de lipídeos, etc) são reprimidos, e genes relacionados à sobrevivência ao estresse (*rpoS*, proteínas de estresse, biossíntese de aminoácidos, etc) são ativados (Magnusson *et alii*, 2005).

O acúmulo de ppGpp foi demonstrado em *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, em que ocorre a proteína bifuncional RelA (Avarbock *et alii*, 1999; Ojha *et alii*, 2000). Ojha *et alii* (2000) também observaram que o acúmulo de ppGpp em células de *M. smegmatis* submetidas a estresse nutricional (deficiência de glicose) era acompanhado de mudanças morfológicas: as colônias se apresentavam arredondadas, e não curvadas. Isso os levou a sugerir que a resposta severa poderia ser importante à fase de latência de *M. tuberculosis* no hospedeiro humano, quando os bacilos notoriamente assumem morfologia alterada. Concomitantemente, Primm *et alii* (2000) demonstraram que um mutante de *M. tuberculosis* deficiente na produção de RelA não acumulava ppGpp e era muito menos apto que a linhagem selvagem a sobreviver a estresse nutricional *in vitro* por longos períodos, indicando que a resposta severa era, de fato, importante à latência do patógeno. Dahl *et alii* (2003) analisaram a histopatologia e o perfil de expressão gênica deste mesmo mutante em camundongos, comprovando que a resposta severa é crítica à sobrevivência de *M. tuberculosis* durante a latência. Além disso, esses últimos autores observaram que alguns dos mais potentes antígenos micobacterianos (como FbpA, FbpB e FbpD) podem estar sob controle direto dos níveis intracelulares de ppGpp.

Como no interior dos granulomas, durante a fase de latência, a disponibilidade de nutrientes (e conseqüentemente energia) é menor, muitas vias

anabólicas se encontram total ou parcialmente reprimidas, obrigando *M. tuberculosis* a fazer uso de reservas e rotas de reciclagem que não exijam etapas enzimáticas complexas. Desta maneira, a inibição da PNP, com conseqüentes efeitos sobre a via de salvamento das purinas, poderia interferir no estado de latência de *M. tuberculosis*, em maior ou menor grau.

Cabe ainda mencionar que o gene *deoD* de *M. tuberculosis* provavelmente faz parte de um operon de dois genes com o gene *pmmB*, que codifica uma fosfomanomutase (Cole *et alii*, 1998). As fosfomanomutases são enzimas responsáveis pela conversão de manose-6-fosfato em manose-1-fosfato, a qual é subseqüentemente utilizada na síntese de GDP-manose, uma molécula fundamental à produção de lipoarabinomanano, lipomanano e manosídeos de fosfatidilinositol – glicoconjugados abundantes no envelope das micobactérias e que estão envolvidos na interação de *M. tuberculosis* com os macrófagos humanos (McCarthy *et alii*, 2005). Assim, a transcrição acoplada de *deoD* e *pmmB* representaria um mecanismo de otimização metabólica.

1.7. Objetivos

O objetivo geral na realização deste trabalho foi construir e caracterizar mutantes definidos de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* por troca alélica, a fim de compreender o papel biológico de genes relevantes ao metabolismo dessas micobactérias e validar seus respectivos produtos como alvos em potencial para o desenvolvimento de futuras drogas e/ou vacinas anti-TB. Também pretendeu-se estabelecer e consolidar a tecnologia de manipulação genética de micobactérias

patogênicas e não patogênicas no Brasil, atualmente inexistente e de importância ao avanço da micobacteriologia molecular.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. construir e caracterizar mutantes para os genes *aroQ* (CM citoplasmática) e **aroQ* (CM periplasmática), envolvidos na biossíntese de aminoácidos aromáticos em *M. tuberculosis*;
2. construir e caracterizar mutantes para os mesmos genes em *M. smegmatis*, e realizar estudos genômicos comparativos entre as regiões que contêm os genes de CM em micobactérias;
3. identificar, clonar e expressar, em *E. coli*, os genes *aroQ* e **aroQ* de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, a fim de realizar estudos bioquímicos e comprovar sua atividade de CM;
4. clonar, em vetor de integração específico, a região promotora de cada gene de CM e do operon *fbpB* de *M. tuberculosis*, a fim de testar sua possível atividade promotora;
5. construir e caracterizar um mutante para o gene *deoD*, envolvido na via de salvamento das purinas em *M. tuberculosis*;
6. construir e caracterizar um mutante para o potencial gene *deoD* de *M. smegmatis*, envolvido na via de salvamento das purinas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Linhagens bacterianas e meios de cultura

A linhagem *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 25618), a linhagem *Mycobacterium smegmatis* mc²155 (ATCC 700084) e linhagens laboratoriais derivadas de *Escherichia coli* K-12 e *Escherichia coli* B estão descritas na **Tabela 2.1**. As linhagens mutantes derivadas de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. smegmatis* mc²155, construídas neste trabalho, estão devidamente descritas nos itens **3.1.4**, **3.2.4**, **3.3.2** (**Tabela 3.6**), **3.4.2** e **3.5.2**.

Tabela 2.1. Linhagens bacterianas usadas no presente estudo.

Linhagem bacteriana	Descrição ^a	Referência
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Cepa para expressão de proteínas	Novagen
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Star	Cepa para expressão de proteínas	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa para clonagem de DNA, <i>recA</i> 1	Estoque laboratorial
<i>E. coli</i> DH10B	Cepa para clonagem de DNA, <i>recA</i> 1	Estoque laboratorial
<i>E. coli</i> TOP10	Cepa para clonagem de DNA, <i>recA</i> 1, Kan ^r	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Cepa para clonagem de DNA, <i>recA</i> 1, Tet ^r	Stratagene
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	Cepa laboratorial de alta transformação, wt	Snapper <i>et alii</i> (1990)
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Cepa laboratorial virulenta, wt	ATCC 25618

^awt, tipo selvagem

Todas as manipulações gerais de biologia molecular foram realizadas em derivados de *E. coli* K-12. A linhagem *M. tuberculosis* H37Rv (manipulada em laboratório de contenção NB-3, segundo protocolos operacionais padronizados) foi usada como fonte de DNA genômico e nos experimentos de recombinação homóloga. A linhagem *M. smegmatis* mc²155 foi usada como fonte de DNA

genômico, nos experimentos de recombinação homóloga e na análise da atividade promotora de genes de *M. tuberculosis*.

M. tuberculosis e *M. smegmatis* foram crescidas em meio líquido Middlebrook 7H9 (Difco) e em meio sólido Middlebrook 7H10 (Difco) suplementados com 10% (v/v) de OADC (Becton Dickinson). Tween-80 foi acrescentado às culturas líquidas na concentração de 0,05% (w/v), para evitar a formação de agregados celulares. Nos experimentos de recombinação homóloga, canamicina (Kan) foi usada a 20 µg/ml, higromicina (Hyg) a 100 µg/ml (*M. tuberculosis*) ou 50 µg/ml (*M. smegmatis*), X-Gal a 50 µg/ml e sacarose a 2% (w/v) (*M. tuberculosis*) ou 5-10% (w/v) (*M. smegmatis*). Aminoácidos ultrapuros (e não casaminoácidos) e outros suplementos (Sigma) foram adicionados em concentrações específicas, dependendo do experimento.

M. smegmatis também foi rotineiramente crescida em meio Lemco líquido e sólido, contendo 5 g/l de pó de Lemco (Oxoid), 5 g/l de NaCl e 10 g/l de bactopectona, ao qual se adicionou 0,05% (w/v) de Tween-80 (meio líquido) ou 15 g/l de ágar (meio sólido). Outros meios de cultura utilizados para *M. smegmatis* foram M9 (Sigma-Aldrich) suplementado com 20 mM de glicose e meio mínimo para micobactérias suplementado com 0,02% (w/v) de glicose, adaptado de Mahenthiralingam *et alii* (1993) e Parish *et alii* (1997).

As linhagens de *E. coli* foram crescidas em meio LB líquido e sólido, em concentrações de 100 µg/ml de ampicilina (Amp), 50 µg/ml de canamicina, 50 µg/ml de carbenicilina (Cb), 20 µg/ml de estreptomicina (Sm), 10 µg/ml de gentamicina (Gm), 50 µg/ml de higromicina e/ou 20 µg/ml de tetraciclina (Tet).

Todas as culturas foram incubadas a 37°C, exceto se indicado ao contrário.

2.2. Extração de DNA genômico de micobactérias

Células de *M. tuberculosis* H37Rv foram semeadas e crescidas em meio sólido Löwenstein-Jensen por aproximadamente 3 a 4 semanas a 37°C (Allen, 1998). Após, foram cuidadosamente coletadas em capela de biossegurança, transferidas a tubos de ensaio lacrados e inativadas a 80°C por 1 h. O método empregado para a obtenção de DNA genômico utilizou pérolas de vidro, lisozima, proteinase K, extração com fenol/clorofórmio e precipitação com etanol absoluto a -20°C (van Helden *et alii*, 2001). O resultado foi a obtenção de DNA genômico de alta qualidade (concentração aproximada de 460 ng/μl), o qual foi estocado a 4°C e utilizado nas amplificações por PCR.

Células de *M. smegmatis* mc²155 foram semeadas e crescidas em meio sólido Lemco por aproximadamente 3 a 4 dias a 37°C. Após, foram coletadas, ressuspensas em 1 ml de tampão GTE (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 e EDTA 10 mM) e processadas segundo o protocolo de preparação de DNA genômico de micobactérias de Larsen (2000), adaptado de Connell (1994).

2.3. Plasmídeos e extração de DNA plasmidial

Os plasmídeos usados no presente trabalho estão listados na **Tabela 2.2**. Somente os plasmídeos citados na Seção 3 (**RESULTADOS E DISCUSSÃO**) estão listados. Foram omitidos os plasmídeos recombinantes referentes a clonagens realizadas nos vetores pCR-Blunt (Invitrogen) e pGEM-T Easy (Promega), os quais foram utilizados para a ligação de produtos de PCR contendo

extremidades *blunt* (amplificados com *Pfu* ou *Pfx* DNA polimerase e clonados em pCR-Blunt) ou com 3'-A (amplificados com *Taq/Tgo* DNA polimerase e clonados em pGEM-T Easy).

Para a extração de DNA plasmidial de alta qualidade e em alta concentração, necessário à eletroporação eficiente de micobactérias, utilizou-se o *kit* comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Para a extração rotineira de DNA plasmidial, utilizou-se o *kit* Wizard *Plus* SV DNA Purification System (Promega) e também o método de preparação de DNA plasmidial por lise alcalina descrito em Sambrook & Russell (2001).

Tabela 2.2. Plasmídeos usados no presente estudo.

Plasmídeo ^a	Descrição ^b	Referência
p1NIL	Vetor bifuncional <i>E. coli</i> -micobactérias, Kan ^r	Parish & Stoker (2000)
p2NIL	Vetor bifuncional <i>E. coli</i> -micobactérias, Kan ^r	Parish & Stoker (2000)
p2NIL+aroQC3	DNA flanqueador (3 kb) MTB <i>aroQ</i> em p2NIL	Este trabalho
p2NIL+aroQP1	DNA flanqueador (3 kb) MTB * <i>aroQ</i> em p2NIL	Este trabalho
p2NIL+COCA5	p2NIL+aroQC3 + cassete de <i>PacI</i> (pGOAL19)	Este trabalho
p2NIL+COCO1	DNA flanqueador (2 kb) MSM <i>aroQ</i> em p2NIL	Este trabalho
p2NIL+COPA3	p2NIL+aroQP1 + cassete de <i>PacI</i> (pGOAL19)	Este trabalho
p2NIL+CHOC1	p2NIL+COCO1 + cassete de <i>PacI</i> (pGOAL19)	Este trabalho
p2NIL+CHOP1	p2NIL+POP1 + cassete de <i>PacI</i> (pGOAL19)	Este trabalho
p2NIL+deoD1697	DNA flanqueador (2 kb) MSM <i>deoD</i> em p2NIL	Este trabalho
p2NIL+deoDB5	DNA flanqueador (1,8 kb) MTB <i>deoD</i> em p2NIL	Este trabalho
p2NIL+deoDLR1.8 D1	p2NIL+deoDB5 + cassete de <i>PacI</i> (pGOAL19) d	Este trabalho
p2NIL+deoDLR1.8 D6	p2NIL+deoDB5 + cassete de <i>PacI</i> (pGOAL19) r	Este trabalho
p2NIL+DODO	p2NIL+deoD1697 + cassete de <i>PacI</i> (pGOAL19)	Este trabalho
p2NIL+POP1	DNA flanqueador (2 kb) MSM * <i>aroQ</i> em p2NIL	Este trabalho
pAPA3	Vetor de complementação (<i>P_{hsp60}</i>), Gm ^r	T. Parish
pAPA3+aroQPC5	CS (612 bp) de MTB * <i>aroQ</i> em pAPA3	Este trabalho
pCR-Blunt	Vetor de clonagem, Kan ^r	Invitrogen
pET-23a(+)	Vetor de expressão procariótico, Amp ^r (Cb ^r)	Novagen
pET-23a(+)-aroQC1	CS de MTB <i>aroQ</i> (315 bp) em pET-23a(+)	Este trabalho
pET-23a(+)-aroQP25	CS de MTB * <i>aroQ</i> (501 bp) em pET-23a(+)	Este trabalho
pET-23a(+)-msmCMC1	CS de MSM <i>aroQ</i> (315 bp) em pET-23a(+)	Este trabalho
pET-23a(+)-msmCMP1	CS de MSM <i>aroQ</i> (486 bp) em pET-23a(+)	Este trabalho
pGEM-T Easy	Vetor de clonagem TA, Amp ^r	Promega
pGOAL17	Vetor micobacteriano, <i>lacZ</i> , <i>sacB</i> , Amp ^r	Parish & Stoker (2000)
pGOAL19	Vetor micobacteriano, <i>lacZ</i> , <i>sacB</i> , Amp ^r Hyg ^r	Parish & Stoker (2000)
pINT3	Vetor de complementação integrativo, Gm ^r	Parish <i>et alii</i> (2001)
pINT3+aroQCC3	P + CS (568 bp) de MTB <i>aroQ</i> em pINT3	Este trabalho
pINT3+deoDC1	P + CS (1,3 kb) de MTB <i>deoD</i> em pINT3	Este trabalho
pSM128	Vetor repórter integrativo, <i>lacZ</i> , Sm ^r	Dussurget <i>et alii</i> (1999)
pSM128-aroQr	250 bp <i>upstream</i> a MTB <i>aroQ</i> em pSM128	Este trabalho

pSM128- <i>aroQd</i>	250 bp <i>upstream</i> a MTB <i>aroQ</i> em pSM128	Este trabalho
pSM128- <i>*aroQd</i>	267 bp <i>upstream</i> a MTB <i>*aroQ</i> em pSM128 (P2)	Este trabalho
pSM128- <i>*aroQr</i>	267 bp <i>upstream</i> a MTB <i>*aroQ</i> em pSM128 (P2)	Este trabalho
pSM128- <i>fbpBd</i>	215 bp <i>upstream</i> a MTB <i>fbpB</i> em pSM128 (P1)	Este trabalho
pSM128- <i>fbpBr</i>	215 bp <i>upstream</i> a MTB <i>fbpB</i> em pSM128 (P1)	Este trabalho

^aSomente os plasmídeos citados na Seção 3 (**RESULTADOS E DISCUSSÃO**) estão listados, sendo omitidos os plasmídeos recombinantes referentes à clonagem inicial de produtos de PCR nos vetores pCR-Blunt e pGEM-T Easy. d, orientação direta; r, orientação reversa.

^bCS, região codificante; P, promotor.

2.4. Primers e amplificação por PCR

Os oligonucleotídeos sintéticos ou *primers* (Invitrogen) utilizados na amplificação por PCR, na clonagem molecular e no seqüenciamento automático de fragmentos de DNA de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* estão listados na

Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Primers usados no presente estudo.

Primer	Seqüência (5' – 3')^a	Uso^b
AROQC1	AC catatg AGACCAGAACCCCCACATCACG	Clonagem MTB <i>aroQ</i>
AROQC2	GT ggatcc TCAGTGACCGAGGCGGCCCC	Clonagem MTB <i>aroQ</i>
aroQc1	CC aagctt GGAATACCGGCGCGGATCAGC	p2NIL+COCA5
aroQc2	atgagaccagaacccccacatggcaggggccgctcgtcactaa	p2NIL+COCA5
aroQc3	ttagtgaccgagggcgcccctgccatgtgggggttctgtctcat	p2NIL+COCA5
aroQc4	GG aagctt CCGCGTCGGCATAGTGGCGC	p2NIL+COCA5
AROQC5	GATCAACTCGTTCTTCAG	Seq p2NIL+COCA5
AROQC6	CCCTCATGCACGACCGCC	Seq p2NIL+COCA5
AROQC7	CAGCTCTTGGGCCATATC	Seq p2NIL+COCA5
AROQC8	AGTTATCGTGCTCGGCGG	Seq p2NIL+COCA5
AROQCAN1	TCC cccggg CCAATTTTGGGTGCACTTTT	Análise P MTB <i>aroQ</i>
AROQCAN2	TCC cccggg GGTTCATGGCTGCTAACTCC	Análise P MTB <i>aroQ</i>
AROQcC1	GC gaattc ACCCAATTTTGGGTGCACT	pINT3+aroQCC3
AROQcC2	GC gaattc TCAGCGCAGCGATGCAGAA	pINT3+aroQCC3
AROQCS1	GTCGCGTGACACTCATGT	Screening mut MTB <i>aroQ</i>
AROQCS2	CGAATACCGGCAGGTGTATATC	Screening mut MTB <i>aroQ</i>
aroQp1	CG ggatcc CGCGGTGAACGCAAGTTCGGC	p2NIL+COPA3
aroQp2	ttgcttaccggtccacgtgagtgccagggccctaccgcccgtga	p2NIL+COPA3
AROQP2a	CG catatg GACGGACACGAGCCAGTTAGCC	Clonagem MTB <i>*aroQ</i>
AROQP2b	CG ggatcc TCAGGCCGGCGGTAGGGCC	Clonagem MTB <i>*aroQ</i>
aroQp3	tcaggccggcggttagggcctggcactcacgtggacgggtaagcaa	p2NIL+COPA3
aroQp4	CC ggatcc GTAACGTGACGGCGCGGGCC	p2NIL+COPA3
AROQP5	GCCGCGACATCAAGTTC	Seq p2NIL+COPA3
AROQP6	CCTGATCGGCCTCGCGAT	Seq p2NIL+COPA3
AROQP7	AGGCCAGAGGCGGCGCCG	Seq p2NIL+COPA3
AROQP8	GCGTCAAACGATAATGCC	Seq p2NIL+COPA3
AROQPAN1	CCG cccggg GATTCTGAGAAATCCGCGATA	Análise P MTB <i>fbpB</i>

AROQPAN2	CCG cccggg GAATCTTTCGGCTCACGTCT	Análise P MTB <i>fbpB</i>
AROQPAN3	GTT cccggg GAACTTCGTTTCGTAGCAGCA	Análise P MTB * <i>aroQ</i>
AROQPAN4	CAG cccggg GCCTAGTGGTGCAATCAGC	Análise P MTB * <i>aroQ</i>
aroQp2Hnt	CGG agctt ACGTGGACGGGTAAGCAA	p2NIL+COPA3
aroQp3Hct	CGG agctt GCCCTACCGCCGGCCTGA	p2NIL+COPA3
AROQpC1	GG taattaa GAAGGGTTGCTTACCCGT	pAPA3+aroQPC5
AROQpC2	TG taattaa GATTGATCAGGCCGGCGG	pAPA3+aroQPC5
AROQPS1		<i>Screening</i> mut MTB * <i>aroQ</i>
AROQPS2		<i>Screening</i> mut MTB * <i>aroQ</i>
DEODC1	TC gaattc CTCAGCCAGTGCCAGCGC	pINT3+deoDC1
DEODC2	CA gaattc GGCTGAACCGCGCTTTCA	pINT3+deoDC1
DEODJ2	ctgcccagtggtgctgacccgatcgcccggttctaagccgtga	p2NIL+deoDLR1.8
DEODJ3	tcacggcttagaaccgggcatcggtcagccacactggcgag	p2NIL+deoDLR1.8
DEODL1	CA ggatcc CCTCCAAGGCTGGCAGCAACG	p2NIL+deoDLR1.8
DEODL200	TCCGATTCGACCGCACGC	Seq p2NIL+deoDLR1.8
DEODL400	TTCCTTACCCCGATAGCG	Seq p2NIL+deoDLR1.8
DEODL600	CCTCAGCCAGTGCCAGCG	Seq p2NIL+deoDLR1.8
DEODR4	CC ctgcag CTGGTTTCCGGCGGCGACGC	p2NIL+deoDLR1.8
DEODR200	CGGGTGGCACGGGTGCTC	Seq p2NIL+deoDLR1.8
DEODR400	TGGGATACAGATCACGGC	Seq p2NIL+deoDLR1.8
DEODR600	TCCAGCGTGCGGCCGGGG	Seq p2NIL+deoDLR1.8
DEODS1	GTA	<i>Screening</i> mut MTB <i>deoD</i>
DEODS2	GCAGAAGCAGCACGAAAAACCT	<i>Screening</i> mut MTB <i>deoD</i>
M13 uni (-21)	TGTAAAACGACGGCCAGT	Seq derivados pCR-Blunt
M13 rev (-29)	CAGGAAACAGCTATGACC	Seq derivados pCR-Blunt
MS DEODS1	CGGCAGCGCGTCTACTCGGCACAG	<i>Screening</i> mut MSM <i>deoD</i>
MS DEODS2	GCCGGGCATTTCTGGAGCGGTGG	<i>Screening</i> mut MSM <i>deoD</i>
MSM CMC3	TCT catatg AGGCCGATCACCGGATG	Clonagem MSM <i>aroQ</i>
MSM CMC4	GC ggatcc TCAGTACCCGAGGCGG	Clonagem MSM <i>aroQ</i>
MSM CMP1	CC catatg GACGACGCGAGCCCGCTG	Clonagem MSM * <i>aroQ</i>
MSM CMP4	TGT ggatcc TCATCGGCAGTACGAATGCGT	Clonagem MSM * <i>aroQ</i>
MSM COCO1	CT agctt CCAGCACGTA	p2NIL+CHOC1
MSM COCO2	CG gaattc GATGGTCTCAGGCATGTGAG	p2NIL+CHOC1
MSM COCO3	CG gaattc GGCCGCCTCGGGTACTAGCGCTCG	p2NIL+CHOC1
MSM COCO4	AA gcgggcgc GCGCTGGCGGCCACAG	p2NIL+CHOC1
MSM COSY1	AGCACGGCAGTCTTCCCGAAC	<i>Screening</i> mut MSM <i>aroQ</i>
MSM COSY2	AACGCCAAGCTCAACCCCAAC	<i>Screening</i> mut MSM <i>aroQ</i>
MSM DODO1	CA agctt CCGGCAGTGGTTCCCGTCC	p2NIL+DODO1
MSM DODO2	CC atcgat CGCCTGGCTCGAGGTATGC	p2NIL+DODO1
MSM DODO3	CC atcgat GCGCTGCTCGCTTCAGTCATC	p2NIL+DODO1
MSM DODO4	GT ggatcc GCGAGATCATCAGGGTGTAGGG	p2NIL+DODO1
MSM POPO1	AC ggatcc CACCCCGCCGACAGGGC	p2NIL+CHOP1
MSM POPO2	GG agctt CGCAACCGAAGCGAGCACCGTT	p2NIL+CHOP1
MSM POPO3	GG agctt ACGCATTCGTA	p2NIL+CHOP1
MSM POPO4	GC ggtacc CACCGCGCCCGCAGGC	p2NIL+CHOP1
MSM POSE1	CGGGTTGACCACCAAGCTCAACGAG	<i>Screening</i> mut MSM * <i>aroQ</i>
MSM POSE2	ACCGTGCGGTGCTATTCGGGTCCG	<i>Screening</i> mut MSM * <i>aroQ</i>
pNILmcs1	GACGGTGCCGAGGATGACG	Seq plasmídeos suicidas
pNILmcs2	CTGCGCGCTGCGCAGGGCT	Seq plasmídeos suicidas
pNILmcs3	AACGCGTATTCAGGCTGACC	Seq plasmídeos suicidas
POP1		Seq plasmídeos pSM128
SP6	CATTTAGGTGACACTATAG	Seq clones pGEM-T Easy
SPLAT3		Seq plasmídeos pSM128
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Seq clones pGEM-T Easy
T7 term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Seq derivados pET-23a(+)

^aAs seqüências em minúsculo e negrito indicam sítios de restrição.

^bmut, mutação/mutante; seq, seqüenciamento.

Para a amplificação eficiente de fragmentos de DNA de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, utilizaram-se enzimas termoestáveis que propiciam alta fidelidade de síntese *in vitro* de DNA: *Pfu* DNA polimerase (Stratagene), *Pfx* DNA polimerase (Invitrogen) e *Taq/Tgo* DNA polimerase do Expand High Fidelity PCR System (Roche). Todas as PCRs foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml, segundo as instruções específicas dos fabricantes, e continham, em geral: cerca de 100 ng de DNA genômico de *M. tuberculosis* ou *M. smegmatis*, 50 pmol de cada *primer*, 200 μ M de dNTPs, 2-5 U de DNA polimerase termoestável, tampão de DNA polimerase termoestável 1x e água MilliQ para um volume final de 50 μ l. Dependendo da necessidade, concentrações de 2,5, 5 e até 10% de DMSO foram utilizadas (Winship, 1989). Após a amplificação, 5 μ l de cada reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1 ou 1,5%.

As PCRs foram realizadas em termocicladores automáticos (Eppendorf e PerkinElmer) usando programas específicos, cujos parâmetros variaram de acordo com o par de *primers* utilizado, temperatura ótima de anelamento e tamanho estimado do produto de amplificação. Portanto, diversas condições de amplificação foram avaliadas nas PCRs, e um exemplo típico, usando DNA genômico de *M. tuberculosis* como molde, seria: 5 min de desnaturação a 95-98°C (passo 1); 30-45 s de desnaturação a 95-98°C (passo 2); 30 s de anelamento a 60°C (passo 3); 1-5 min de síntese a 68°C (*Pfx* DNA polimerase) ou 72°C (*Pfu* DNA polimerase e *Taq/Tgo* DNA polimerase) (passo 4); 30 a 35 ciclos de amplificação entre os passos 2 a 4 (passo 5); 10 min de extensão final a 68°C ou 72°C (passo 6); 5 min a 4°C (passo 7). Uma vez obtidos os fragmentos de DNA desejados, os mesmos foram purificados em gel de agarose 1,5%.

2.5. Clonagem molecular de fragmentos de DNA

2.5.1. Clivagem de DNA com enzimas de restrição

As reações de clivagem de DNA foram procedidas de acordo com as instruções fornecidas pelos fabricantes das enzimas de restrição e dependendo das necessidades específicas dos experimentos. Em geral, utilizaram-se 2-5 U de enzima de restrição para a clivagem de 1 µg de DNA em um volume final de 50 µl, sendo a reação incubada por 4 h ou O/N a 37°C. As enzimas de restrição foram obtidas da Boehringer, Invitrogen, New England Biolabs, Promega e 4G.

2.5.2. Desfosforilação de DNA

Quando necessária, a desfosforilação das extremidades 5' de DNA de vetores de clonagem foi realizada segundo o protocolo descrito em Sambrook & Russell (2001).

2.5.3. Purificação de vetores e fragmentos de DNA

Uma vez fracionado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, o DNA foi visualizado em transiluminador de radiação UV de comprimento de onda curto. Após, as bandas de DNA desejadas foram cuidadosamente excisadas, purificadas conforme as instruções do *kit* Concert Matrix Gel Extraction (Gibco) e ressuspendidas em água MilliQ ou TE, pH 8,0.

2.5.4. Ligação de DNA

As reações de ligação de DNA foram realizadas obedecendo a uma proporção molar de 1:3 ou 1:5 entre vetor e fragmento. Tampão de ligação, ATP e T4 DNA ligase foram utilizados de acordo com as especificações do fabricante (Invitrogen). As reações foram incubadas O/N a 16°C.

2.5.5. Transformação bacteriana

As transformações bacterianas foram realizadas utilizando células competentes de *E. coli* (linhagens DH5 α , DH10B ou XL1-Blue), preparadas pelo método de transformação química com CaCl₂ descrito em Sambrook & Russell (2001) ou com RbCl₂ desenvolvido no laboratório de T. Parish. Cerca de 50-100 ng de reação de ligação de DNA foram usados em cada transformação, e, após o choque térmico por 90 s a 42°C, as células foram imediatamente transferidas para um tubo de ensaio contendo 1 ml de LB ou SOC líquido e incubadas com agitação (180 rpm) a 37°C por 1 h. Alíquotas de 25, 50 e 100 μ l dessa preparação foram plaqueadas em LB sólido contendo concentrações adequadas de antibióticos, IPTG e X-Gal. A eficiência de transformação variou de 10⁶ a 10⁸ transformantes por μ g de DNA ligado, e a seleção das colônias recombinantes foi feita visualmente, pelo sistema enzimático da β -galactosidase de *E. coli*. De 8 a 16 colônias brancas foram selecionadas e individualmente crescidas em 3 ml de LB líquido com agitação (180 rpm) a 37°C por 16 h. Após, o DNA plasmidial foi extraído, clivado com enzimas de restrição e analisado em gel de agarose 1%. A

clonagem de fragmentos de DNA foi confirmada por seqüenciamento automatizado (Laboratório de Biologia Molecular Vegetal, Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, Brasil e MWG Biotech, Londres, Reino Unido).

Na clonagem de fragmentos de PCR com extremidades *blunt*, utilizou-se o *kit* Zero Blunt PCR Cloning (Invitrogen), que emprega o vetor pCR-Blunt e a linhagem *E. coli* TOP10. Células eletrocompetentes desta linhagem foram preparadas segundo o protocolo descrito em Sambrook & Russell (2001), o qual também foi usado para a preparação de células eletrocompetentes em geral.

2.6. Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

O sistema pET (Novagen) e as linhagens *E. coli* BL21(DE3) e *E. coli* BL21(DE3) Star (Invitrogen) foram usados na expressão de proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* ou *M. smegmatis* em *E. coli*. Os experimentos de expressão da proteína-alvo recombinante foram feitos em duplicata, para que pudessem ser testadas diferentes condições de expressão, com e sem indução do sistema por IPTG. Em paralelo, foi feito um controle negativo do experimento, consistindo na utilização do vetor pET-23a(+). Foi transferido 0,25 µl de cada plasmídeo recombinante pET-23a(+)-gene clonado para um tubo contendo 200 µl de células de *E. coli* BL21(DE3) ou *E. coli* BL21(DE3) Star eletrocompetentes. Essas células foram transformadas por eletroporação (voltagem de 2,5 kV, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω), semeadas em placas de LB contendo 50 µg/ml de carbenicilina e incubadas O/N a 37°C. Colônias isoladas foram selecionadas e crescidas, a 37°C e 180 rpm, em frascos de 250 ml contendo 50

ml de LB e 50 µg/ml de carbenicilina. Em uma das culturas do controle e da amostra, as células foram induzidas com concentrações específicas de IPTG, quando as mesmas atingiram uma $OD_{600} = 0,4$. A partir da indução, alíquotas de cada frasco contendo as respectivas culturas foram retiradas, para posterior análise, em tempos determinados (por exemplo: 3, 6, 9, 12 e 24 h) após a indução com IPTG. A outra amostra e o controle não foram induzidos, e alíquotas também foram coletadas nos mesmos pontos. Para a análise da expressão, as células bacterianas foram separadas por centrifugação, ressuspensas em 500 µl de Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, sonicadas (2 vezes, por 10 s, em amplitude de 21%), centrifugadas e as frações solúvel e insolúvel analisadas por SDS-PAGE.

2.7. Preparação de extratos celulares de *M. smegmatis*

Os extratos celulares de *M. smegmatis* foram preparados segundo o protocolo de Parish & Wheeler (1998), utilizando pérolas de vidro em um Mini-BeadBeater (BioSpec Products). Alternativamente, os extratos foram preparados com lisozima (concentração final de 2,5 mg/ml e incubação por 2 h a 37°C) e sonicação (4 vezes, por 20 s, em amplitude de 21%).

2.8. Ensaio de atividade enzimática de CM

A atividade enzimática de CM em extratos brutos foi ensaiada pelo método de Cotton & Gibson (1965), adaptado por Ahmad & Jensen (1988), que mede a taxa de conversão de corismato em pterinato por meio da detecção espectro-

fotométrica de fenilpiruvato formado em pH ácido. A mistura de reação, em um volume final de 200 µl, continha tampão A (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, e 1 mM de DTT), 1 mM de corismato (dissolvido em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,8) e quantidades variáveis (5-20 µl) de extrato bruto (controle ou clonado). Após 20 min de incubação a 37°C, 100 µl de HCl 1 N foram adicionados à mistura de reação, a qual foi incubada a 37°C por mais 15 min, para que o prefenato formado fosse convertido em fenilpiruvato. Em seguida, 700 µl de NaOH 2,5 M foram adicionados, e determinou-se a concentração de fenilpiruvato pela medida da absorbância a 320 nm em espectrofotômetro.

Como extrato controle, foi considerada a fração solúvel do extrato bruto de células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET-23a(+). Como extrato clonado, foi considerada a fração solúvel do extrato bruto de células de *E. coli* BL21(DE3) expressando, em condições específicas e separadamente, cada um dos plasmídeos recombinantes pET-23a(+) contendo os respectivos genes *aroQ* e **aroQ* de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. smegmatis* mc²155.

2.9. Preparação de células eletrocompetentes de micobactérias

Células eletrocompetentes de *M. tuberculosis* foram cuidadosamente preparadas em capela de biossegurança, em laboratório de contenção NB-3, utilizando glicerol ultrapuro, segundo o protocolo de Parish & Stoker (1998a). Para cada eletroporação, células frescas de *M. tuberculosis* foram preparadas (a partir de culturas em que OD₆₀₀ ≈ 0,6-0,8) a temperatura ambiente, sendo imediatamente utilizadas (Wards & Collins, 1996).

Células de *M. smegmatis* foram coletadas na fase exponencial tardia ($OD_{600} \approx 0,8-1,0$), incubadas em gelo por 90 min e sucessivamente lavadas com glicerol ultrapuro, segundo os protocolos de Snapper *et alii* (1990) e Larsen (2000). As células eletrocompetentes foram preparadas em larga escala e congeladas em alíquotas de 200 μ l a -80°C , para posterior utilização.

2.10. Eletroporação de células de micobactérias

Alíquotas de 200 μ l de células eletrocompetentes de *M. tuberculosis* ou *M. smegmatis* foram usadas em cada eletroporação, às quais se adicionou, dependendo do experimento, de 1 a 5 μ g de DNA livre de sais, em um volume máximo de 5 μ l. Após 10 min de incubação a temperatura ambiente (*M. tuberculosis*) ou em gelo (*M. smegmatis*), as células foram transferidas para cubetas de eletroporação de 0,2 cm (Bio-Rad) e submetidas a um único pulso, conforme os seguintes parâmetros definidos: voltagem de 2,5 kV, capacitância de 25 μ F e resistência de 1.000 Ω . A suspensão celular no interior da cubeta foi então cuidadosamente lavada com 7H9 ou Lemco, e as células recuperadas em meio líquido por um período variável de no mínimo 2 h (*M. smegmatis*) ou 16 h (*M. tuberculosis*). Em seguida ao período de recuperação, diferentes volumes de cada transformação foram inoculados em placas de 7H10 e/ou Lemco (contendo antibióticos e demais suplementos necessários), as quais foram incubadas a 37°C até o aparecimento de colônias visíveis.

2.11. Construção de plasmídeos suicidas

Para a construção de plasmídeos suicidas não replicativos, foi utilizada a série de vetores plasmidiais pNIL e pGOAL, desenvolvida por Parish & Stoker (2000b) e detalhada em Gordhan & Parish (2001). A estratégia geral usada para a obtenção de substratos de DNA para a recombinação homóloga em micobactérias foi a amplificação por PCR de regiões flangeadoras (de aproximadamente 1 ou 1,5 kb cada) *upstream* e *downstream* ao gene a ser mutado. Essas duas regiões foram unidas por meio de uma *overlap PCR* ou sítios de restrição específicos (presentes nas seqüências dos *primers*), como descrito no item **3.1.3**, criando uma deleção de extensão variável na seqüência-alvo. O fragmento assim gerado foi clonado em um ou mais sítios de restrição de um vetor da série pNIL. Em seguida, o cassete de *PacI* do vetor pGOAL19 (contendo os marcadores de seleção *hyg* e *lacZ* e de contra-seleção *sacB*) foi ligado ao sítio único de *PacI* do vetor p1NIL ou p2NIL previamente construído (contendo o alelo mutante). Dessa forma, cada plasmídeo suicida continha, além do substrato de DNA para a recombinação homóloga, os marcadores *hyg*, *kan*, *lacZ*, *sacB* e a origem de replicação *oriE* (de *E. coli*).

A construção final de cada plasmídeo suicida foi confirmada por clivagem com enzimas de restrição e seqüenciamento de DNA, uma vez que a introdução do gene *sacB* de *B. subtilis* freqüentemente causa deleções e rearranjos indesejáveis durante as etapas de clonagem em *E. coli* (Gordhan & Parish, 2001). As linhagens *E. coli* DH5 α e *E. coli* DH10B foram usadas como hospedeiras para a construção dos plasmídeos suicidas de micobactérias. Se necessário, o DNA dos plasmídeos suicidas foi concentrado (em volume de 5 μ l ou menos) com o *kit* Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research).

2.12. Isolamento e seleção de mutantes de micobactérias

O isolamento e a seleção de mutantes de micobactérias foram realizados segundo a metodologia de troca alélica em duas etapas, originalmente desenvolvida por Parish & Stoker (2000b). Após o DNA (1-5 µg em um volume final não superior a 5 µl) de cada plasmídeo suicida ter sido tratado com radiação UV (100 mJ cm⁻²) ou desnaturado com EDTA 0,2 mM e NaOH 0,2 M por 30 min a 37°C, o mesmo foi adicionado a uma suspensão homogênea de 200 µl de células eletrocompetentes de *M. tuberculosis* ou *M. smegmatis* (Hinds *et alii*, 1999; Parish *et alii*, 1999). Procedeu-se a eletroporação, como descrito no item 2.10. Na primeira etapa de seleção, linhagens SCO Hyg^r Kan^r (nas quais houve, mediante o primeiro evento de recombinação homóloga, a inserção do plasmídeo suicida no cromossomo micobacteriano) foram crescidas e isoladas em Middlebrook 7H10 e/ou Lemco suplementados com antibióticos, X-Gal e, se necessário, compostos específicos. Em seguida, foi realizado o *streaking* de colônias azuis Hyg^r Kan^r em meio sem antibióticos (uma vez que todas as mutações introduzidas eram não marcadas), para a ocorrência do segundo evento de recombinação homóloga. Após, na segunda etapa, realizou-se a contra-seleção das células mutantes em meio suplementado com 2% (*M. tuberculosis*) ou 5-10% (*M. smegmatis*) de sacarose, a qual é tóxica para células micobacterianas que contêm o gene *sacB* de *B. subtilis* (presente no plasmídeo suicida eletroporado e que deve, necessariamente, ser perdido para a sobrevivência das células nessas condições). Colônias brancas resistentes a sacarose (linhagens DCO mutantes em potencial) foram então testadas quanto à sensibilidade a canamicina, para

distinguir prováveis mutantes DCO Kan^s de mutantes espontâneos resistentes ao antibiótico (SCO Kan^r). Para cada experimento, 40 ou mais colônias brancas resistentes a sacarose foram testadas quanto à sensibilidade a canamicina. O DNA genômico de cada mutante DCO Kan^s de *M. tuberculosis* ou *M. smegmatis* foi preparado para posterior análise por PCR (usando *primers* que permitem distinguir entre o tipo selvagem e os prováveis mutantes) e seqüenciamento.

2.13. Estudo da atividade promotora

As seqüências de DNA *upstream* aos genes MTB *aroQ* e MTB **aroQ* e ao operon *fbpB* de *M. tuberculosis* foram amplificadas por PCR e inicialmente clonadas no vetor pGEM-T Easy (**Figura 3.33**). Após, cada região promotora foi clivada de pGEM-T Easy como um fragmento de DNA com extremidades *blunt*, sendo subclonada, nas orientações direta e reversa, no sítio de restrição *Scal* do vetor repórter integrativo pSM128, que contém o gene *lacZ* (Dussurget *et alii*, 1999). Os plasmídeos baseados em pSM128 se integram em cópia única no genoma de micobactérias, e cada construção a ser testada foi individualmente eletroporada em células de *M. smegmatis*, como descrito no item **2.10**. A seleção dos transformantes ocorreu em Lemco contendo 20 µg/ml de estreptomicina. Subseqüentemente, linhagens selecionadas de *M. smegmatis* foram crescidas, até a fase exponencial (OD₆₀₀ ≈ 0,6-1,0), em 5 ou 10 ml de Lemco ou meio mínimo suplementado com 20 mM de glicose e concentrações variáveis de aminoácidos aromáticos. Os extratos celulares de *M. smegmatis* foram preparados como descrito no item **2.7**, sendo ressuspensos em tampão Z

(Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM, β-mercaptoetanol 50 mM, pH 7,0 e ONPG 3 mM). A medida da atividade enzimática de β-galactosidase foi realizada segundo o ensaio de Miller (1972) e como descrito em Jain *et alii* (2005). Três transformantes independentes foram, cada um, ensaiados em duplicata para a atividade de β-galactosidase.

2.14. Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração de proteína para os ensaios de atividade enzimática de CM em extratos celulares de *E. coli* e *M. smegmatis* foi realizada segundo o método de Bradford *et alii* (1976), usando o *kit* Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) e BSA como padrão.

A detecção e a quantificação de proteína total em extratos celulares de *M. smegmatis* foram realizadas usando o *kit* BCA Protein Assay (Pierce).

2.15. Análise de seqüências de nucleotídeos e aminoácidos

Todas as seqüências de nucleotídeos e aminoácidos, de genes e proteínas de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. smegmatis* mc²155, foram obtidas dos bancos de dados TubercuList do *Institut Pasteur* (<http://www.pasteur.fr>) e do *Institute for Genomic Research* (<http://www.tigr.org>). Se necessário, as mesmas foram submetidas a buscas de similaridade em outros bancos de dados públicos, como GenBank, através dos servidores ExpASY (<http://www.expasy.ch>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e PBIL (<http://pbil.ibcp.fr>). Parâmetros básicos pré-

definidos do algoritmo BLASTX (Altschul *et alii*, 1997) foram utilizados em cada busca de similaridade, e os resultados mais significativos foram posteriormente usados em alinhamentos múltiplos com o programa CLUSTALW (Thompson *et alii*, 1994). As seqüências de proteínas usadas nos alinhamentos múltiplos foram obtidas do banco de dados Swiss-Prot.

NOTA

Os resultados experimentais a seguir apresentados devem resultar na publicação de manuscritos originais (em preparação), os quais serão submetidos à apreciação, no primeiro semestre de 2007, do Corpo Editorial dos periódicos de circulação internacional *BMC Microbiology*, *FEMS Microbiology Letters*, *Journal of Bacteriology*, *Microbiology* e/ou *Tuberculosis*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, pretendeu-se, por meio de estudos genéticos, bioquímicos e de biologia molecular, compreender em maior detalhe a importância das enzimas corismato mutase e fosforilase de nucleosídeos purínicos ao metabolismo de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*.

O primeiro dado interessante, relativo à corismato mutase, é que ocorrem duas enzimas, codificadas por genes distintos, no genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. A mesma situação é observada em *M. smegmatis* mc²155, e análises comparativas revelaram uma organização genômica semelhante em outras micobactérias e gêneros relacionados. A razão pela qual existem duas CMs monofuncionais em *M. tuberculosis* (espécie patogênica) e *M. smegmatis* (espécie não patogênica) permanece desconhecida. Buscou-se, no entanto, avaliar a importância relativa de ambos os genes e suas respectivas enzimas à fisiologia de *M. tuberculosis*, e, para tal, ensaios de expressão gênica foram realizados, sugerindo uma possível regulação diferencial.

Também buscou-se construir mutantes definidos para os dois genes de CM, *aroQ* (CM citoplasmática) e **aroQ* (CM periplasmática), em *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*. Os resultados apontam para a provável essencialidade do gene *aroQ* ao crescimento *in vitro* dessas micobactérias, e a obtenção de um mutante para o gene **aroQ* de *M. smegmatis* revelou que, nessa espécie, a CM citoplasmática constitui a versão fisiologicamente dominante.

Em relação à fosforilase de nucleosídeos purínicos, os dados obtidos indicam a provável essencialidade do gene *deoD* à sobrevivência e ao crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis* e, também provavelmente, de *M. smegmatis*. Desta maneira, evidencia-se a importância da via de salvamento das purinas em micobactérias – cujo metabolismo deve ser complexo e, juntamente com a biossíntese *de novo*, regulada em diferentes níveis.

3.1. Corismato mutases em *M. tuberculosis*

3.1.1. Identificação, amplificação e clonagem em vetor de expressão dos genes MTB *aroQ* (Rv0948c) e MTB **aroQ* (Rv1885c)

Segundo a anotação original do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, a re-anotação feita por Camus *et alii* (2002) e o banco de dados TubercuList do *Institut Pasteur* (<http://www.pasteur.fr>), as seqüências codificadas pelas ORFs Rv0948c e Rv1885c são classificadas como proteínas hipotéticas conservadas, não havendo a descrição de CMs. Como os genes *aroQ* são, em sua maioria, pequenos e não exibem alta conservação de seqüência entre si, isso pode facilmente causar sua perda durante a etapa de anotação dos genomas (Calhoun *et alii*, 2001). No entanto, uma análise cuidadosa de seqüências – inicialmente realizada por Calhoun *et alii* (2001) com a ORF Rv1885c e, posteriormente, por Schneider *et alii* (2003) com ambas as ORFs – revelou que *M. tuberculosis* H37Rv provavelmente possui duas CMs monofuncionais, não fusionadas a outras proteínas ou domínios protéicos e codificadas por genes distintos.

Na **Figura 3.1**, é apresentado um perfil do domínio de CM da classe estrutural AroQ, cujo protótipo é o domínio CM da proteína bifuncional PheA de *E. coli* (EcCM), composto pelos aminoácidos 1-92. O domínio EcCM, também chamado de ‘minimutase’, foi cristalizado por Lee *et alii* (1995), sendo identificados os resíduos do sítio ativo: Arg11, Arg28, Lys39, Asp48, Arg51, Glu52, Ser84 e Gln88 (que posicionam o corismato e efetuam a catálise) e Val35, Leu55, Ile81 e Val85 (que participam de interações hidrofóbicas). A importância dos oito primeiros resíduos à atividade de CM foi comprovada por estudos de mutagênese sítio dirigida (Liu *et alii*, 1996; Zhang *et alii*, 1996).



Figura 3.1. Perfil do domínio de CM da classe estrutural AroQ, tendo como base a estrutura tridimensional do domínio EcCM, cujos resíduos do sítio catalítico estão indicados por * (aa que se ligam ao substrato e efetuam a catálise) e H (aa hidrofóbicos). O domínio EcCM de *E. coli* e as proteínas AroQ de *M. tuberculosis* e *M. bovis* estão destacadas. Preto: resíduos do sítio catalítico do domínio EcCM. Cinza escuro: resíduos com alta similaridade. Cinza claro: resíduos com baixa similaridade.

Pode-se observar, no alinhamento múltiplo da **Figura 3.1**, que a ORF Rv0948c de *M. tuberculosis* possui a maioria dos aminoácidos conservados em

relação ao domínio EcCM, o que permite classificá-la como uma CM do grupo AroQ. Assim, seguindo a nomenclatura proposta por Calhoun *et alii* (2001), o gene correspondente foi denominado *aroQ* (*Rv0948c*), o qual codifica uma CM de 105 aa e massa molecular estimada de 11,77 kDa. A proteína AroQ de *M. tuberculosis* (MTB AroQ) tem 100% de identidade com seqüências homólogas presentes no isolado clínico *M. tuberculosis* CDC1551 e em *M. bovis* AF2122/97, e os maiores níveis de identidade são com proteínas hipotéticas conservadas de *M. leprae* TN, *M. smegmatis* mc²155, *M. avium paratuberculosis* e outras espécies de actinomicetos, conforme mostrado na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1. Níveis de identidade e similaridade entre a seqüência de aa da proteína AroQ de *M. tuberculosis* e outras ORFs de actinomicetos.

Organismo	Acesso	Identidade (%)	Similaridade (%)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Rv0948c	100,0	100,0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	MT_0975	100,0	100,0
<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	Mb0973c	100,0	100,0
<i>Mycobacterium leprae</i> TN	ML0151	81,7	90,3
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	MSMEG5513	78,3	87,0
<i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i>	MAP_0892c	72,3	83,0
<i>Nocardia farcinica</i> IFM10152	nfa49960	68,6	82,9
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> NCTC13129	DIP0834	63,6	77,3
<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032	NCgl0819	57,6	75,8
<i>Corynebacterium jeikeium</i> K411	jk1565	51,5	77,3

Embora a identidade entre a proteína MTB AroQ e o domínio EcCM seja de apenas 22,81%, deve-se considerar que, em geral, as CMs da classe AroQ exibem baixa similaridade de seqüência entre si, o que pode ser resultado de uma falta de pressão funcional – uma vez que a reação catalisada pela CM seria, em termos mecanísticos, muito simples (Dosselaere & Vanderleyden, 2001). Contudo, os resíduos que compõem o sítio ativo das diferentes CMs (incluindo os da classe AroH) são funcionalmente equivalentes, exemplificando um caso

notável de convergência evolutiva: apesar de as dobras polipeptídicas das proteínas AroH e AroQ serem totalmente diversas, os mecanismos enzimáticos de controle conformacional da molécula de corismato e catálise eletrostática são muito semelhantes (Lee *et alii*, 1995a; Lee *et alii*, 1995b). A fim de caracterizar em maior detalhe os resíduos do sítio catalítico da proteína MTB AroQ, foi realizado um segundo alinhamento múltiplo entre esta, o domínio EcCM, o domínio CM da proteína bifuncional TyrA de *E. coli* e seqüências homólogas de actinomicetos (Figura 3.2).



Figura 3.2. Alinhamento múltiplo da proteína AroQ de *M. tuberculosis* com o domínio EcCM (PHEA_ECOLI), o domínio CM da proteína bifuncional TyrA de *E. coli* (TYRA_ECOLI) e seqüências homólogas de actinomicetos. Os resíduos do sítio catalítico do domínio EcCM, como demonstrado por cristalografia de raios X, estão indicados por * e H, e realçados em verde os conservados em *M. tuberculosis*. As setas e os aa realçados em amarelo indicam resíduos presentes na maioria das proteínas AroQ de actinomicetos e cuja variação quanto aos da EcCM mantém a atividade de CM (Lassila *et alii*, 2005). Em turquesa estão realçados os aa do sítio ativo conservados em todas as seqüências, com exceção do domínio EcCM. Vermelho: aa idênticos. Verde: aa com alta similaridade.

No alinhamento múltiplo da **Figura 3.2**, o domínio CM da proteína MTB AroQ, conforme anteriormente determinado no perfil do domínio de CM da classe estrutural AroQ (**Figura 3.1**), está sublinhado (aminoácidos 23-105). Dos resíduos do sítio ativo do domínio EcCM (Arg11, Arg28, Lys39, Asp48, Arg51, Glu52, Ser84 e Gln88), como demonstrado por cristalografia de raios X e mutagênese sítio dirigida, quatro são conservados na seqüência de *M. tuberculosis*, de outras micobactérias e de espécies próximas: Arg11, Arg28, Arg51 e Glu52 (indicados por * e realçados em verde na **Figura 3.2**). Os demais resíduos (Lys 39, Asp48, Ser84 e Gln88) e os aminoácidos hidrofóbicos (Val35, Leu55, Ile81 e Val85) do sítio ativo do domínio EcCM não estão presentes na proteína MTB AroQ (e nas seqüências das outras espécies analisadas). No entanto, em seu lugar, a proteína MTB AroQ parece fazer uso de outros aminoácidos.

Em um estudo recentemente publicado, Lassila *et alii* (2005) combinaram técnicas de *design* computacional de proteínas e de mutagênese sítio dirigida para a caracterização de versões mutantes do domínio EcCM, objetivando a identificação de mutações no sítio ativo compatíveis com a atividade catalítica. Seis mutações foram selecionadas na estrutura otimizada: Leu7Ile, Ala32Ser, Val35Ile, Asp48Ile, Ile81Leu e Val85Ile. Em seguida, os autores construíram cinco proteínas mutantes do domínio EcCM (Leu7Ile, Ala32Ser, Val35Ile, Asp48Ile e Ile81Leu/Val85Ile) e compararam sua atividade enzimática com a do tipo selvagem. Três das cinco proteínas mutantes mostraram eficiência catalítica similar (Leu7Ile e Val35Ile) ou superior (Ala32Ser) ao domínio EcCM selvagem, enquanto o duplo-mutante Ile81Leu/Val85Ile mostrou eficiência reduzida para 40% e o mutante Asp48Ile teve a atividade de CM abolida.

Surpreendentemente, as três primeiras mutações identificadas *in silico* por Lassila *et alii* (2005) para o domínio CM da proteína bifuncional PheA de *E. coli* (Leu7Ile, Ala32Ser e Val35Ile) ocorrem exatamente nas mesmas posições do domínio CM da proteína MTB AroQ (e também de outros actinomicetos), como evidenciado no alinhamento múltiplo da **Figura 3.2**. Como as substituições são idênticas (Leu7Ile, Ala32Ser e Val35Ile), e, levando-se em conta os dados de eficiência catalítica obtidos para cada mutação individual no domínio EcCM, pode-se dizer que o experimento desses autores (embora seu foco tenha sido a CM de *E. coli* e não de *M. tuberculosis*) antecipou uma CM que utiliza resíduos alternativos no sítio catalítico e que, coincidentemente, já existe na natureza – ou seja, a proteína MTB AroQ (e seus homólogos).

As substituições Leu7Ile e Val35Ile (que não alteram a eficiência catalítica da CM de *E. coli*) provavelmente criam um ambiente hidrofóbico ligeiramente diferente na estrutura da proteína MTB AroQ, pois as isoleucinas correspondentes também são aminoácidos hidrofóbicos e devem interagir com a Arg11, um resíduo essencial à catálise. A substituição Ala32Ser (que aumenta a eficiência catalítica da CM de *E. coli*, diminuindo o K_m e aumentando o K_{cat}) provavelmente indica que fatores que estabilizam o estado de transição também contribuem para a estabilização conformacional do corismato no rearranjo catalisado pela CM (Štrajbl *et alii*, 2003). É ainda possível que a hidroxila da Ser32 da proteína MTB AroQ estabeleça uma ponte de H com o grupo amino da Gln88. Na estrutura do domínio EcCM, a hidroxila da Ser84 e os grupos amino da Arg28 formam pontes de H que estabilizam o inibidor análogo ao estado de transição (Liu *et alii*, 1996). Os outros três aminoácidos hidrofóbicos presentes no domínio EcCM (Leu55, Ile81 e Val85)

são compensados por aminoácidos hidrofóbicos diferentes (Leu55→Ile e Ile81→Leu) e arginina (Val85→Arg) na proteína MTB AroQ. Não se observa, portanto, a dupla substituição Ile81Leu/Val85Ile, que poderia diminuir em mais da metade a eficiência catalítica da proteína MTB AroQ, à semelhança do verificado em *E. coli* (Lassila *et alii* 2005). A presença de uma arginina (aa hidrofílico) em lugar de uma valina (aa hidrofóbico) na posição 85 da proteína MTB AroQ é difícil de ser explicada; contudo, essa variação se mantém nos actinomicetos.

Na posição 48 da proteína MTB AroQ há uma valina, o que também ocorre no domínio CM da proteína bifuncional TyrA de *E. coli* (realce em turquesa na **Figura 3.2**). Dessa forma, a ausência do Asp48 do domínio EcCM parece ser compensada, nas demais proteínas, pela presença de uma valina. A Lys39 do domínio EcCM tem uma arginina equivalente, na mesma posição, na proteína MTB AroQ – e, como ambos são aminoácidos com cadeias laterais básicas, essa alteração não deve ser marcante. Finalmente, a proteína MTB AroQ, assim como as dos outros actinomicetos, contém uma glicina na posição 84, correspondente à Ser84 do domínio EcCM. Todas essas variações existentes na seqüência da proteína MTB AroQ indicam que as enzimas de *M. tuberculosis* e de outros actinomicetos (como *M. smegmatis*) empregam um conjunto diferenciado de resíduos no sítio catalítico, alguns dos quais, como descrito, foram identificados na predição *in silico* de Lassila *et alii* (2005) para o domínio EcCM.

Adicionalmente, *M. tuberculosis* possui outra CM monofuncional, representada pela ORF Rv1885c. Gu *et alii* (1997) fazem referência a ela, destacando que sua seqüência de aminoácidos se assemelha muito à da CM monofuncional periplasmática (CMP) de *E. herbicola*, originalmente descoberta

pelo mesmo grupo de pesquisa (Xia *et alii*, 1993). E, embora a ORF Rv1885c seja classificada como proteína hipotética conservada na anotação original do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, análises de seqüências realizadas por Calhoun *et alii* (2001) e Schneider *et alii* (2003) indicam que a mesma corresponde, de fato, a uma CMP do grupo AroQ – como relatado neste trabalho e independentemente por Prakash *et alii* (2005a) e Sasso *et alii* (2005). Desta maneira, seguindo a nomenclatura proposta por Calhoun *et alii* (2001), o respectivo gene de *M. tuberculosis* foi denominado **aroQ* (*Rv1885c*), o qual codifica uma CM (MTB **AroQ*) de 199 aa e massa molecular estimada de 21,94 kDa. Como mostrado na **Figura 3.3**, o provável sítio de clivagem da proteína MTB **AroQ* se situa na extremidade N-terminal, entre Ala33 e Asp34, gerando um peptídeo-sinal de 33 aa e uma proteína madura de 166 aa, conforme a opção de redes neurais do programa SignalP (Nielsen *et alii*, 1997). A massa molecular da proteína madura, sem o peptídeo-sinal, é estimada em 18,47 kDa.

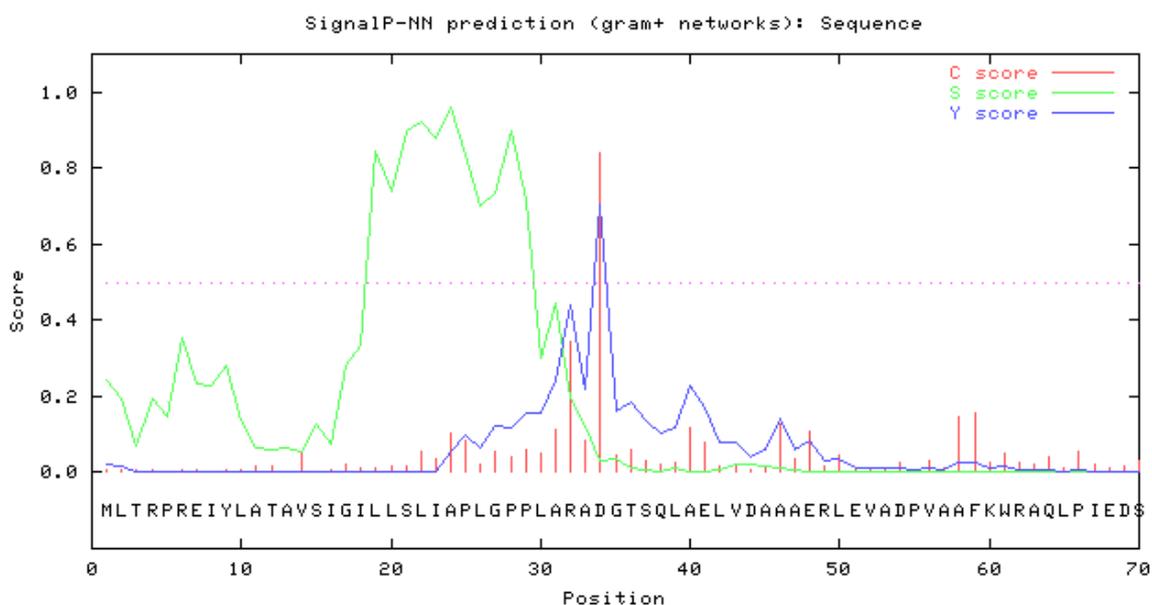


Figura 3.3. Predição do sítio de clivagem (entre Ala33 e Asp34) da proteína MTB **AroQ* usando o programa SignalP. Os 70 primeiros aa são mostrados.

No alinhamento múltiplo da **Figura 3.4**, a proteína MTB *AroQ é comparada com o domínio EcCM, o domínio CM da proteína bifuncional TyrA de *E. coli* e CMPs de outras bactérias, incluindo a de *E. herbicola*.

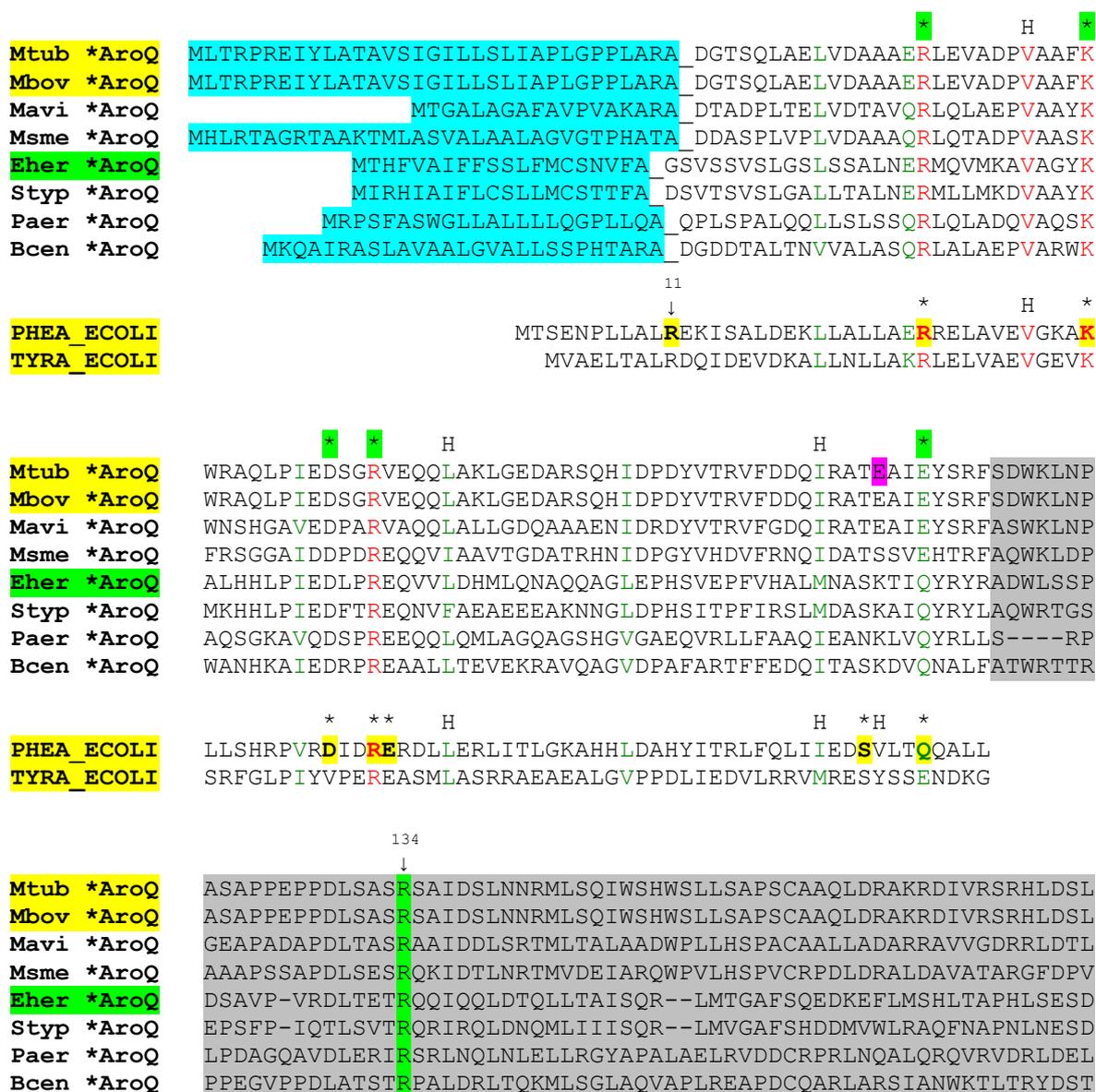


Figura 3.4. Alinhamento múltiplo da proteína *AroQ de *M. tuberculosis* com o domínio EcCM (PHEA_ECOLI), o domínio CM da proteína bifuncional TyrA de *E. coli* (TYRA_ECOLI) e CMs monofuncionais periplasmáticas de outras bactérias, incluindo a de *E. herbicola* (Eher *AroQ, realçada em verde). Os peptídeos-sinais das CMPs estão realçados em turquesa, e, em cinza, a maior parte da extremidade C-terminal das proteínas *AroQ, sem equivalente em *E. coli*. Os resíduos do sítio catalítico do domínio EcCM, como demonstrado por cristalografia de raios X, estão indicados por * e H, e realçados em verde os conservados em

M. tuberculosis. A Arg11 do domínio EcCM (numerada), ausente nas proteínas *AroQ, tem uma equivalente em outra posição (Arg134 na proteína MTB *AroQ), realçada em verde na seqüência das proteínas *AroQ. A Glu106 da proteína MTB *AroQ (realçada em rosa) corresponde funcionalmente à Glu52 do domínio EcCM (Ökvist *et alii*, 2006). Vermelho: aa idênticos. Verde: aa com alta similaridade.

O domínio EcCM faz parte da proteína bifuncional PheA de *E. coli*, a qual não é exportada, localizando-se no citoplasma. Contudo, com a descoberta da proteína *AroQ de *E. herbicola* e a posterior caracterização de enzimas homólogas em *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*, ficou claro que a existência de CMs periplasmáticas, não fusionadas a outras proteínas, é mais comum do que anteriormente imaginado – como também revelam os dados oriundos do seqüenciamento de diversos genomas bacterianos (Xia *et alii*, 1993; Calhoun *et alii*, 2001; <http://www.sanger.ac.uk>; <http://www.tigr.org>). A identidade entre a proteína MTB *AroQ e o domínio EcCM é de apenas 13%, mas, como mostrado na **Figura 3.4**, as proteínas *AroQ (cujo protótipo é a enzima de *E. herbicola*) exibem muitos resíduos conservados no sítio catalítico: Arg28, Lys39, Asp48, Arg51 e, na posição 88 (em relação ao domínio EcCM), glutamato ou glutamina. Ocorrem algumas variações, como, por exemplo, a presença de uma arginina conservada na extremidade C-terminal das proteínas *AroQ – a qual, como recentemente evidenciado na estrutura tridimensional da proteína MTB *AroQ, corresponde à Arg11 do domínio EcCM (Ökvist *et alii*, 2006; Qamra *et alii*, 2006). Especificamente em relação à proteína MTB *AroQ, a Glu52 do domínio EcCM é substituída por uma valina, que obviamente não desempenha a mesma função (formação de uma ponte de H com o inibidor 1 da CM); em seu lugar, a Glu106 da enzima de *M. tuberculosis* realiza essa função (Ökvist *et alii*, 2006). Os últimos autores, que determinaram a estrutura cristalina da proteína MTB *AroQ a 1.6 Å,

ligada e não ligada ao inibidor 1 da CM, observaram que a Thr105 da enzima de *M. tuberculosis* (correspondente à Ser84 do domínio EcCM) participa da formação de interações de van der Waals fortes entre a CM e o ligante. Além disso, como demonstrado por esse estudo e o de Qamra *et alii* (2006), que determinaram a estrutura cristalina da proteína MTB *AroQ a 2.15 Å, a enzima de *M. tuberculosis* apresenta uma estrutura significativamente mais compacta que a do domínio EcCM. Em *E. coli* e *S. cerevisiae*, os sítios ativos da CM se localizam na interface de dois protômeros (Lee *et alii*, 1995a). A proteína MTB *AroQ também é um dímero, mas, diferentemente das anteriores, cada monômero é auto-suficiente, pois um único protômero contribui com todos os resíduos do sítio ativo; dessa forma, representa uma nova topologia protéica (Ökvist *et alii*, 2006).

A proteína MTB *AroQ tem 100% de identidade com seqüências homólogas presentes no isolado clínico *M. tuberculosis* CDC1551 e em *M. bovis* AF2122/97, e os maiores níveis de identidade são com proteínas hipotéticas conservadas de *M. avium paratuberculosis* e *M. smegmatis* mc²155 (**Tabela 3.2**). Em *M. leprae*, o gene homólogo *aroQ (ML2029) é um pseudogene, indicando que as proteínas *AroQ podem ser dispensáveis a certas micobactérias.

Tabela 3.2. Níveis de identidade e similaridade entre a seqüência de aa da proteína *AroQ de *M. tuberculosis* e outras ORFs bacterianas.

Organismo	Acesso	Identidade (%)	Similaridade (%)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	Rv1885c	100,0	100,0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> CDC1551	MT_1933	100,0	100,0
<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	Mb1917c	100,0	100,0
<i>Mycobacterium avium paratuberculosis</i>	MAP_1608c	61,0	76,2
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	MSMEG2114	46,9	64,4
<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H	GOX2001	37,0	49,3
<i>Burkholderia</i> sp. 383	Bcep18194_A4115	35,5	53,5
<i>Hahella chejuensis</i> KCTC 2396	HCH_03913	34,9	49,1
<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054	Bcen_0529	34,7	51,6
<i>Pseudomonas fluorescens</i> PFO-1	Pfl_3544	33,1	48,5

Considerando as evidências acima apresentadas – e independentemente dos recentes trabalhos de purificação e caracterização bioquímica da proteína MTB *AroQ realizados por Prakash *et alii* (2005a) e Sasso *et alii* (2005) e de determinação de sua estrutura cristalina (na presença de inibidor ou de regulador alostérico) realizados por Ökvist *et alii* (2006) e Qamra *et alii* (2006) –, as regiões codificantes de ambos os genes, MTB *aroQ* (*Rv0948c*) e MTB **aroQ* (*Rv1885c*), de *M. tuberculosis* foram amplificadas por PCR e clonadas no vetor de expressão pET-23a(+). Após, a atividade de CM das respectivas proteínas recombinantes foi testada em extratos brutos de células de *E. coli*, confirmando experimentalmente que as enzimas MTB AroQ e MTB *AroQ são CMs (item 3.1.2).

Na **Figura 3.5**, é mostrada a amplificação por PCR da região codificante do gene *aroQ* (*Rv0948c*) de *M. tuberculosis*, usando DNA genômico como molde e concentrações variáveis de DMSO. O DMSO é um co-solvente que auxilia a desnaturação de seqüências de DNA ricas em G+C (como é o caso das micobactérias) e impede a formação de estruturas secundárias (Winship, 1989).

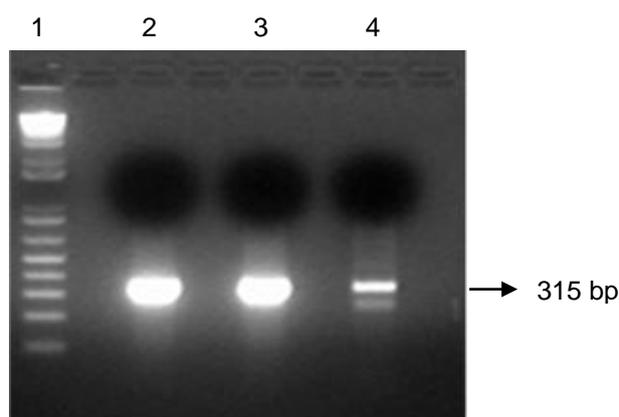


Figura 3.5. Amplificação por PCR do gene estrutural MTB *aroQ* (*Rv0948c*) de *M. tuberculosis* H37Rv, usando DNA genômico como molde. 1: MM; 2: amplificação sem DMSO; 3: amplificação com 5% de DMSO; 4: amplificação com 10% de DMSO. O fragmento obtido (315 bp) foi purificado e ligado no vetor pET-23a(+).

Na **Figura 3.6**, é mostrada a amplificação por PCR da região codificante do gene **aroQ* (*Rv1885c*) de *M. tuberculosis*, usando DNA genômico como molde e concentrações variáveis de DMSO. O gene estrutural **aroQ* foi amplificado sem a seqüência correspondente ao peptídeo-sinal, a fim de que, na etapa posterior de expressão, a proteína madura fosse produzida (**Figura 3.4**). A ausência de DMSO se mostrou essencial à amplificação do gene MTB **aroQ*.

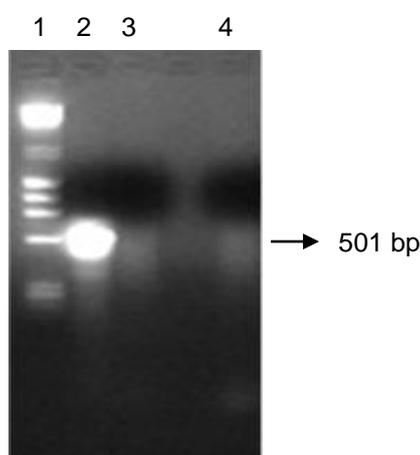


Figura 3.6. Amplificação por PCR do gene estrutural MTB **aroQ* (*Rv1885c*) de *M. tuberculosis* H37Rv, usando DNA genômico como molde. 1: MM; 2: amplificação sem DMSO; 3: PCR com 5% de DMSO; 4: PCR com 10% de DMSO. O fragmento obtido (501 bp) foi purificado e ligado no vetor pET-23a(+).

Após as regiões codificantes dos genes correspondentes às proteínas MTB AroQ (CM citoplasmática) e MTB **AroQ* (CM periplasmática) terem sido amplificadas por PCR, as mesmas foram individualmente clonadas no vetor de expressão pET-23a(+) entre os sítios de restrição *NdeI* e *BamHI*. Os insertos dos plasmídeos recombinantes pET-23a(+)-aroQC1 (contendo o gene MTB *aroQ*) e pET-23a(+)-aroQP25 (contendo o gene MTB **aroQ*) foram inteiramente seqüenciados, não se observando a presença de mutações nas seqüências nucleotídicas (dados não mostrados).

3.1.2. Expressão em *E. coli* e teste da atividade enzimática das proteínas MTB AroQ (Rv0948c) e MTB *AroQ (Rv1885c)

Os plasmídeos pET-23a(+)-aroQC1 (contendo o gene MTB *aroQ*) e pET-23a(+)-aroQP25 (contendo o gene MTB **aroQ*) foram individualmente eletroporados em células de *E. coli* BL21(DE3). Procedeu-se, então, a expressão de cada proteína recombinante, segundo protocolos padronizados e condições variáveis de expressão protéica (temperatura de incubação, presença/ausência de indutor, aeração, etc). Os resultados estão apresentados na **Figura 3.7** e na **Figura 3.8**, em que se observa a expressão das respectivas CMs de *M. tuberculosis* na fração solúvel de extratos de células de *E. coli* BL21(DE3).

Na expressão da proteína MTB AroQ, não houve alterações significativas quanto à presença ou ausência de IPTG no meio de cultura, e uma proteína de tamanho compatível ao esperado (11,77 kDa) foi observada (**Figura 3.7**).

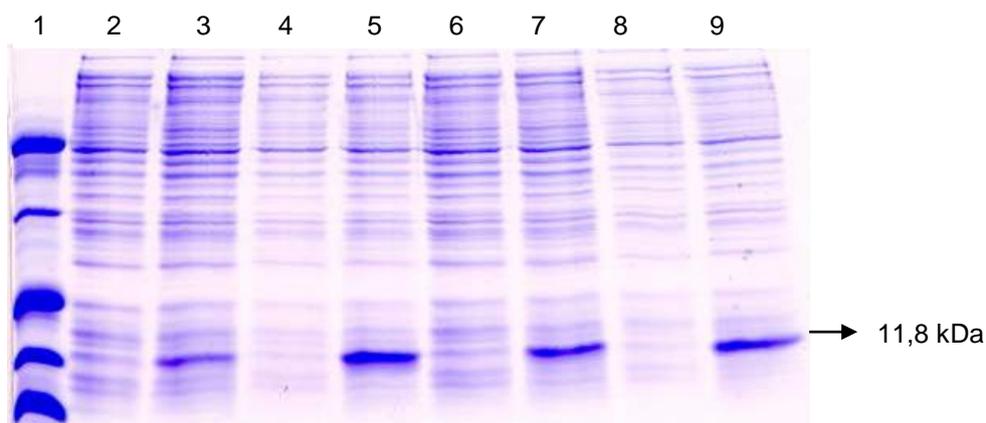


Figura 3.7. Expressão da proteína MTB AroQ (Rv0948c) na fração solúvel de extratos brutos de células de *E. coli* BL21(DE3). 1: MM; 2, 4, 6 e 8: controle, *E. coli* BL21(DE3) + pET-23a(+); 3, 5, 7 e 9: *E. coli* BL21(DE3) + pET-23a(+)-aroQC1. 2, 3, 6 e 7: expressão sem IPTG; 4, 5, 8 e 9: expressão com 1 mM de IPTG. A expressão da proteína MTB AroQ (11,8 kDa) foi monitorada por 24 h após as culturas de *E. coli* BL21(DE3) terem atingido $OD_{600} = 0,4$, sendo mostrado o perfil protéico em 2 h (2-5) e 4 h (6-9) de crescimento celular.

Na expressão da proteína MTB *AroQ, uma proteína de tamanho compatível ao esperado (cerca de 20 kDa) foi observada, e a expressão máxima ocorreu na ausência de IPTG durante as primeiras 12 h após as culturas de *E. coli* BL21(DE3) terem atingido $OD_{600} = 0,4$ (**Figura 3.8**). Na presença de 1 mM de IPTG, a expressão da proteína MTB *AroQ é diminuída, desaparecendo após 6 h de indução (dados não mostrados).

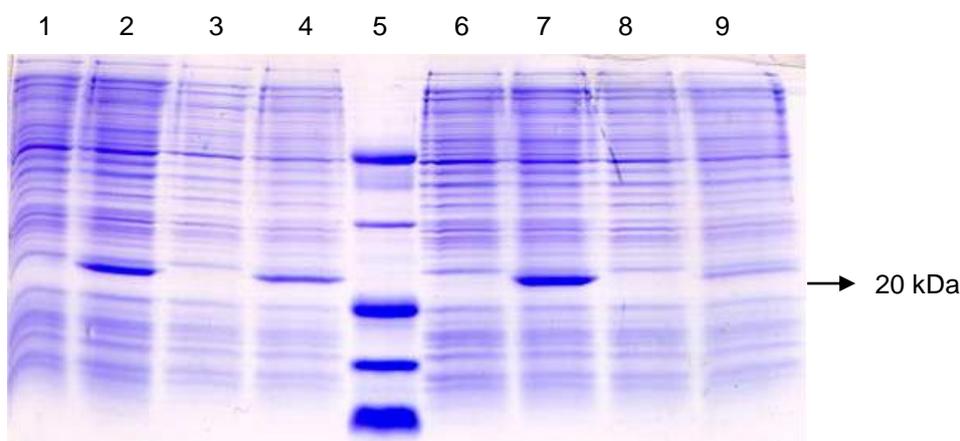


Figura 3.8. Expressão da proteína MTB *AroQ (Rv1885c) na fração solúvel de extratos brutos de células de *E. coli* BL21(DE3). 1, 3, 6 e 8: controle, *E. coli* BL21(DE3) + pET-23a(+); 5: MM; 2, 4, 7 e 9: *E. coli* BL21(DE3) + pET-23a(+)-aroQP25. 1, 2, 6 e 7: expressão sem IPTG; 3, 4, 8 e 9: expressão com 1 mM de IPTG. A expressão da proteína MTB *AroQ (cerca de 20 kDa) foi monitorada por 24 h após as culturas de *E. coli* BL21(DE3) terem atingido $OD_{600} = 0,4$, sendo mostrado o perfil protéico em 3 h (1-4) e 6 h (6-9) de crescimento celular.

Em seguida, as frações solúveis de extratos brutos de células de *E. coli* BL21(DE3), contendo a proteína recombinante MTB AroQ ou MTB *AroQ, foram testadas quanto à atividade de CM. Como controle, foi considerada a fração solúvel do extrato bruto de células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET-23a(+). A atividade específica de CM em células de *E. coli* expressando o produto do gene *aroQ* de *M. tuberculosis* foi aproximadamente 143 vezes superior à observada em células de *E. coli* contendo o plasmídeo controle, como mostrado

na **Tabela 3.3**. Já a atividade específica de CM, em células de *E. coli* expressando o produto do gene **aroQ* de *M. tuberculosis*, foi aproximadamente 98 vezes superior à observada em células de *E. coli* contendo o plasmídeo controle. Esses dados confirmam que as proteínas MTB AroQ e MTB **AroQ*, (correspondentes às ORFs Rv0948c e Rv1885c, respectivamente) têm atividade enzimática específica de CM, indicando ainda que as mesmas são produzidas na sua forma ativa em células de *E. coli*.

Tabela 3.3. Medida da atividade enzimática de CM em extratos de células de *E. coli* BL21(DE3) expressando as proteínas MTB AroQ e MTB **AroQ*.

Extrato celular	Atividade específica (U/mg) ^b	Razão extrato clonado/controle
Controle ^a	0,889	1
MTB AroQ (Rv0948c)	127,38	143,28
Controle	0,964	1
MTB <i>*AroQ</i> (Rv1885c)	94,23	97,75

^aExtrato controle: células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET-23a(+); extrato clonado: células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o respectivo plasmídeo recombinante.

^bA medida da atividade específica de cada extrato foi realizada em duplicata.

Assim, conclui-se que *M. tuberculosis*, além de uma CMP representada pela proteína MTB **AroQ*, também possui uma CMC (CM monofuncional citoplasmática) representada pela proteína MTB AroQ. Esse é um dado inovador, pois CMCs não fusionadas a outras proteínas ainda não foram descritas em nenhuma bactéria – uma vez que, em espécies como *E. coli*, a proteína AroQ (citoplasmática) faz parte das enzimas bifuncionais PheA e TyrA (Pittard, 1996). E, em espécies que apresentam CMs periplasmáticas, como *E. herbicola*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*, a versão citoplasmática de suas CMs também faz parte de enzimas bifuncionais (Xia *et alii*, 1993; Calhoun *et alii*, 2001). Corroborando os dados obtidos no presente trabalho, há, no genoma de *M.*

tuberculosis H37Rv, a descrição de uma prefenato desidratase (PheA, Rv3838c) e uma prefenato desidrogenase (TyrA, Rv3754), ambas monofuncionais, sem nenhum domínio CM associado, codificadas por genes distintos e em localizações genômicas não relacionadas (Cole *et alii*, 1998). Recentemente, as enzimas PheA e TyrA de *M. tuberculosis* foram purificadas e caracterizadas, não se observando nenhuma atividade de CM nas proteínas recombinantes (Prakash *et alii*, 2005b; Xu *et alii*, 2006). Desta maneira, comprova-se que as proteínas AroQ e *AroQ são exclusivamente monofuncionais em *M. tuberculosis*.

A razão pela qual existem duas CMs monofuncionais em *M. tuberculosis*, sendo uma periplasmática, permanece desconhecida. No caso de *E. herbicola*, Xia *et alii* (1993) sugerem uma hipótese interessante: em condições 'normais', a respectiva proteína *AroQ não participaria da biossíntese citoplasmática de fenilalanina e tirosina. Entretanto, em condições de grande acúmulo de corismato (como, por exemplo, deficiência de tirosina no meio de cultura), o excesso deste composto no periplasma seria convertido em prefenato. Por sua vez, o prefenato serviria de substrato a uma ciclohexadienil desidratase e/ou uma ciclohexadienil desidrogenase, resultando na produção de fenilalanina e/ou tirosina – que podem ser direcionadas para o citoplasma ou, alternativamente, participar de uma rota metabólica periplasmática cuja função ainda não é conhecida. Em *P. aeruginosa*, existe uma rota periplasmática completa de três etapas de biossíntese de fenilalanina a partir de corismato (Zhao *et alii*, 1993; Calhoun *et alii*, 2001).

M. tuberculosis, à semelhança de *S. typhimurium*, possui o gene *aroQ, mas não apresenta genes que potencialmente codifiquem uma ciclohexadienil desidratase ou uma ciclohexadienil desidrogenase periplasmática, conforme

buscas de similaridade realizadas no banco de dados TubercuList (dados não mostrados). Genes potencialmente codificando aminotransferases aromáticas exportadas em *M. tuberculosis* também não foram identificados nas mesmas buscas. O papel fisiológico de uma rota periplasmática parcial de biossíntese de aminoácidos aromáticos é intrigante, mas talvez a proteína MTB *AroQ interaja com rotas diferentes. Na verdade, deve-se considerar que mesmo a função da rota periplasmática completa de biossíntese de fenilalanina em *P. aeruginosa* não é conhecida. Dada a baixa conservação de seqüência apresentada pelas CMs, outra possibilidade é que a proteína MTB *AroQ desempenhe uma função adicional. Como mostrado no alinhamento múltiplo da **Figura 3.4**, as proteínas *AroQ possuem uma longa seqüência de aminoácidos na extremidade C-terminal, sem equivalente no domínio EcCM e em outras CMs. Embora essa seqüência de aminoácidos possa ter um papel de estabilização da estrutura protéica da enzima *AroQ de *M. tuberculosis*, resultando em um empacotamento mais eficiente, como sugerido por Sasso *et alii* (2005), é igualmente possível que ela execute uma nova função – que, devido à localização periplasmática ou secretada, estaria relacionada à interação com o hospedeiro.

A hipótese de que a proteína MTB *AroQ está relacionada a algum aspecto desconhecido da patogenicidade de *M. tuberculosis* é tentadora, mas deve ser vista com cautela, pois, como anteriormente mencionado, em *M. leprae* o gene *aroQ é um pseudogene (Cole *et alii*, 2001). E, como relatado no item 3.2, em *M. smegmatis* (espécie não patogênica) ocorre um gene *aroQ funcional. Pode-se ainda assim contra-argumentar que, devido à relativamente baixa identidade de seqüência entre as proteínas *AroQ de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* (46,9%,

como mostrado na **Tabela 3.2**), a CMP de *M. tuberculosis* possui características únicas, especialmente na extremidade C-terminal. Em uma breve inspeção da seqüência de aminoácidos dessa região usando o programa Motif Scan (http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan), dois potenciais sítios de fosforilação de tirosina quinase foram encontrados entre as posições 103-110 e 175-181 da proteína MTB *AroQ. Apenas o segundo sítio ocorre no homólogo de *M. smegmatis*. As funções biológicas das tirosina quinases procarióticas ainda são pouco conhecidas, mas várias linhas de evidência sugerem que essas proteínas, em conjunto com serina/treonina quinases e fosfatases, fazem parte de sistemas de regulação e sinalização celular semelhantes aos de organismos eucarióticos. Em *M. tuberculosis*, essas enzimas são prováveis mediadores de processos que regulam a adaptação global do bacilo a respostas externas e a importantes interações patógeno-hospedeiro (Greenstein *et alii*, 2005).

3.1.3. Construção dos plasmídeos suicidas p2NIL+COCA5 e p2NIL+COPA3

A fim de esclarecer o possível papel diferencial exercido pelas enzimas MTB AroQ e MTB *AroQ no metabolismo de *M. tuberculosis*, plasmídeos suicidas contendo as regiões flangeadoras *upstream* e *downstream* a cada gene *aroQ* foram construídos. O método escolhido, no caso dos genes *aroQ* e **aroQ*, foi a amplificação por PCR de fragmentos de DNA de aproximadamente 1,5 kb *upstream* e *downstream* ao gene de interesse, os quais continham, além das regiões flangeadoras, uma pequena porção das seqüências correspondentes às extremidades N-terminal e C-terminal de cada região codificante (equivalente a

mais ou menos 15 aa). Como brevemente esquematizado na **Figura 3.9**, após a amplificação por PCR de cada região flanqueadora, os dois fragmentos foram unidos através de uma *overlap PCR*, criando uma deleção *in-frame* no gene-alvo (Ho *et alii*, 1989; Horton *et alii*, 1990). O fragmento de PCR produzido dessa forma foi subsequenteclonado no vetor pNIL, ao qual foi ligado um cassete oriundo do vetor pGOAL. O plasmídeo suicida final, contendo o alelo mutante, os marcadores de seleção e o marcador de contra-seleção *sacB*, foi eletroporado em células de *M. tuberculosis* (Parish & Stoker, 2000b).

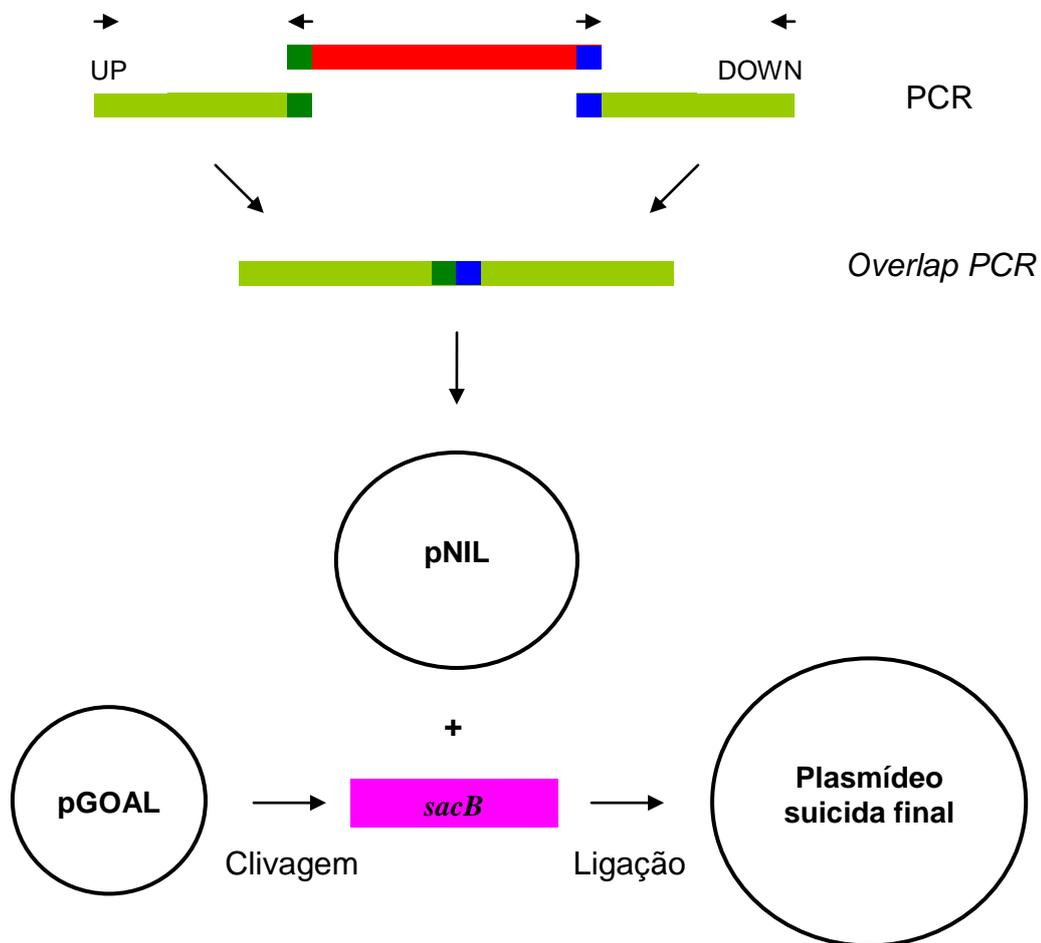


Figura 3.9. Esquema geral do método usado na construção de plasmídeos suicidas para a eletroporação de células de micobactérias e geração de linhagens mutantes. Uma pequena porção da extremidade N-terminal (verde) e C-terminal (azul) da região codificante do gene-alvo (vermelho) é amplificada junto com o

DNA flanqueador *upstream* (UP) e *downstream* (DOWN), em verde claro (as setas pequenas indicam *primers*). Após, os dois fragmentos amplificados são unidos em uma *overlap PCR*, criando uma deleção *in-frame* no gene-alvo. Este alelo mutante é clonado em um vetor da série pNIL, ao qual é ligado um cassete contendo marcadores de seleção e contra-seleção (*sacB*) oriundo de um vetor da série pGOAL (Parish & Stoker, 2000b). O plasmídeo suicida final não se replica em micobactérias e carrega o substrato de DNA para que ocorra a recombinação homóloga com o alelo selvagem do cromossomo bacteriano.

Na **Figura 3.10**, é mostrada a localização genômica do gene *aroQ* (*Rv0948c*) em *M. tuberculosis*, o qual é provavelmente monocistrônico. Contudo, a fim de evitar possíveis efeitos pleiotrópicos sobre a transcrição dos genes adjacentes (*Rv0947c* e *uvrD*), uma deleção *in-frame*, não marcada, em que cerca de 85% da região codificante do gene *aroQ* é eliminada, foi produzida na construção do respectivo alelo mutante de *M. tuberculosis*.



Figura 3.10. Localização genômica do gene *aroQ* (*Rv0948c*) em *M. tuberculosis*, mostrando as regiões flanqueadoras (cerca de 1,5 kb) *upstream* e *downstream* usadas na construção do plasmídeo suicida p2NIL+COCA5. As setas pequenas, em azul, indicam *primers* usados na caracterização de linhagens.

Após as regiões flanqueadoras (1545 bp cada) *upstream* e *downstream* ao gene *aroQ* terem sido amplificadas por PCR, as mesmas foram purificadas em gel de agarose e utilizadas em uma *overlap PCR*, criando uma deleção de 273 bp na seqüência codificante do gene. O fragmento obtido, contendo 3045 bp, foi clonado no vetor pCR-Blunt e posteriormente subclonado no sítio de restrição *HindIII* do vetor p2NIL. O inserto do plasmídeo escolhido para a etapa final da construção (p2NIL+aroQC3) foi inteiramente seqüenciado, não apresentando mutações na

seqüência nucleotídica (dados não mostrados). Ao plasmídeo p2NIL+aroQC3 foi ligado o cassete de *PacI* contendo marcadores de seleção e o gene *sacB* do vetor pGOAL19, gerando o plasmídeo suicida p2NIL+COCA5 (**Figura 3.11**).

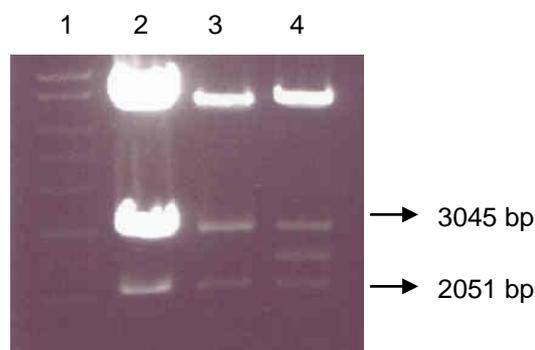


Figura 3.11. Construção do plasmídeo suicida p2NIL+COCA5, contendo um alelo mutante com uma deleção de 273 bp na seqüência codificante do gene *aroQ* (*Rv0948c*) de *M. tuberculosis*. 1: MM; 2: p2NIL+COCA5; 3: p2NIL+COCA7; 4: p2NIL+COCA8. Os plasmídeos foram clivados com *Bam*HI, podendo-se observar os fragmentos de 3045 bp (correspondente ao alelo mutante MTB *aroQ* e DNA flanqueador) e de 2051 bp (do cassete de *PacI*).

Na **Figura 3.12**, é mostrada a localização genômica do gene **aroQ* (*Rv1885c*) em *M. tuberculosis*, o qual é o segundo de um operon provavelmente composto por seis genes. Portanto, a fim de evitar possíveis efeitos pleiotrópicos sobre a transcrição dos demais genes do operon, uma deleção *in-frame*, não marcada, em que quase 95% da região codificante do gene **aroQ* é eliminada, foi produzida na construção do respectivo alelo mutante de *M. tuberculosis*.

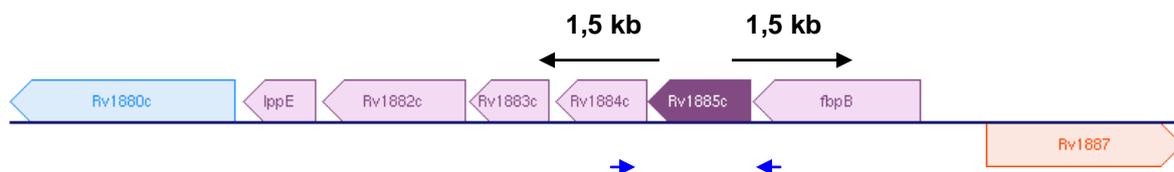


Figura 3.12. Localização genômica do gene **aroQ* (*Rv1885c*) em *M. tuberculosis*, o qual faz parte de um operon com mais cinco genes (em roxo). As regiões flanqueadoras (cerca de 1,5 kb) *upstream* e *downstream* usadas na construção do plasmídeo suicida p2NIL+COCA3 estão indicadas. As setas pequenas, em azul, indicam *primers* usados na caracterização de linhagens.

Após as regiões flanqueadoras (1525 bp cada) *upstream* e *downstream* ao gene **aroQ* terem sido amplificadas por PCR, purificadas em gel de agarose e utilizadas em uma *overlap PCR*, criando uma deleção de 564 bp na seqüência codificante do gene, um procedimento de clonagem semelhante ao da construção do plasmídeo p2NIL+COCA5 foi realizado, exceto que o fragmento obtido, nesse caso, foi clonado entre os sítios de restrição *Bam*HI e *Kpn*I do vetor p2NIL. O plasmídeo suicida foi denominado p2NIL+COPA3 (**Figura 3.13**).

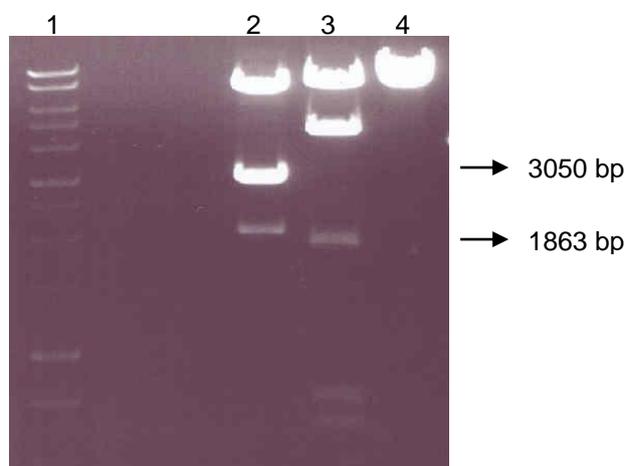


Figura 3.13. Construção do plasmídeo suicida p2NIL+COPA3, contendo um alelo mutante com uma deleção de 564 bp na seqüência codificante do gene **aroQ* (*Rv1885c*) de *M. tuberculosis*. 1: MM; 2: p2NIL+COPA3 clivado com *Bam*HI; 3: p2NIL+COPA3 clivado com *Eco*RI; 4: p2NIL+COPA3 clivado com *Pac*I. Em 2, pode-se observar o fragmento de 3050 bp (correspondente ao alelo mutante MTB **aroQ* e DNA flanqueador); em 3, o de 1863 bp (do cassete de *Pac*I).

3.1.4. Eletroporação de *M. tuberculosis* H37Rv e isolamento de mutantes

Cerca de 3 µg de DNA de cada plasmídeo suicida (p2NIL+COCA5 e p2NIL+COPA3) foram separadamente eletroporados em células de *M. tuberculosis* H37Rv. Como os produtos dos genes MTB *aroQ* e MTB **aroQ* estão relacionados à biossíntese de fenilalanina e tirosina, e visto que muitos mutantes

de rotas de biossíntese de aminoácidos são auxotróficos para certos compostos, duas condições experimentais foram testadas: Middlebrook 7H10 e Middlebrook 7H10 suplementado com 40 µg/ml de fenilalanina e 40 µg/ml de tirosina. Após cerca de 6 semanas de incubação a 37°C, colônias azuis Hyg^r Kan^r (SCOs) foram obtidas para ambas as construções, COCA5 (4 colônias) e COPA3 (1 colônia), apenas em Middlebrook 7H10 suplementado com os dois aminoácidos aromáticos. Assim, a suplementação do meio de cultura com fenilalanina e tirosina se mostrou importante ao isolamento de linhagens potencialmente mutantes para os genes *aroQ* e **aroQ* de *M. tuberculosis*.

Em seguida, colônias individuais, C5 (COCA5) e P1 (COPA3), foram semeadas em 7H10 na ausência de antibióticos, para que o segundo evento de recombinação homóloga ocorresse. Como o plasmídeo suicida final contém o gene *sacB*, as células são sensíveis a sacarose. Nessa etapa, linhagens SCO podem dar origem a células selvagens (reversão) ou mutantes, dependendo do local em que ocorrer o segundo *crossover*. Nas condições testadas, após 2 semanas de incubação a 37°C, observou-se somente o crescimento da colônia C5. A razão pela qual a colônia P1 não cresceu nessa etapa do experimento, mesmo após até 6 semanas de incubação a 37°C, em *streakings* independentes e novas eletroporações, é desconhecida. Prosseguiu-se, então, com a colônia C5, a qual foi semeada em placas de 7H10 com e sem sacarose. Após 4 semanas de incubação a 37°C, colônias C5 brancas sensíveis a sacarose foram obtidas, observando-se uma diminuição significativa (aproximadamente 10⁴ cfu) do número de colônias em placas com sacarose em comparação a placas sem sacarose. As colônias foram então testadas quanto à sensibilidade a canamicina,

para distinguir linhagens DCO Kan^s de mutantes espontâneos resistentes a sacarose, ou seja, linhagens SCO Kan^r. Inicialmente, 40 colônias C5 brancas resistentes a sacarose foram testadas em placas de 7H10 com e sem canamicina. O DNA genômico de colônias Kan^s foi preparado para posterior análise por PCR e seqüenciamento.

3.1.5. Caracterização e complementação dos prováveis mutantes

Aparentemente, linhagens SCO para o gene MTB **aroQ* podem ser obtidas *in vitro*. Porém, por razões desconhecidas, essas células não são viáveis durante a etapa em que ocorre o segundo evento de recombinação homóloga, mesmo com suplementação adequada no meio de cultura. Trata-se de uma situação inusitada, mas é possível que, devido ao número muito baixo de colônias obtidas após as eletroporações (apenas duas, no total), a respectiva linhagem SCO para o gene MTB **aroQ* tenha um defeito de crescimento que só se manifesta em longo prazo. Cabe mencionar que, no segundo experimento realizado de forma independente, a colônia obtida (P2) foi semeada em 7H10 na ausência de antibióticos com e sem suplementação dos dois aminoácidos aromáticos; mesmo assim, nenhum crescimento foi observado (dados não mostrados).

Uma outra explicação possível para a inviabilidade das colônias P1 e P2 (e, conseqüentemente, não ocorrência da segunda recombinação homóloga) é que a região genômica adjacente ao gene MTB **aroQ* é extremamente rica em G+C, ultrapassando os 65%. Isso pode resultar na formação de complexas estruturas secundárias localizadas, que dificultam eventos de recombinação ou,

alternativamente, favorecem a recombinação entre o alelo mutante e apenas um dos lados do alelo cromossômico. Embora alguns autores relatem que o tamanho do DNA flanqueador inserido junto com a mutação seja importante para o sucesso da mutagênese por troca alélica em *M. tuberculosis*, é provável que a ausência de regiões genômicas complicadas seja um fator decisivo para a obtenção de DCOs (sejam mutantes ou o tipo selvagem) (Parish *et alii*, 1999; Gordhan & Parish, 2001). De qualquer forma, o tamanho do DNA flanqueador inserido junto com a deleção no gene MTB *aroQ* (1,5 kb de cada lado da mutação) é suficiente para a ocorrência de recombinação homóloga, e o fato de nenhum DCO ter sido obtido pode apenas refletir uma baixa frequência de recombinação.

Os genótipos das colônias C5 brancas Kan^s (DCOs) foram caracterizados por PCR de colônia, usando *primers* específicos, que permitem distinguir entre a provável linhagem DCO mutante, o tipo selvagem e SCOs, como esquematizado na **Figura 3.9**. Mais de 100 mutantes em potencial para o gene MTB *aroQ* foram testados, e na **Figura 3.14** está mostrado o resultado para 20 colônias.

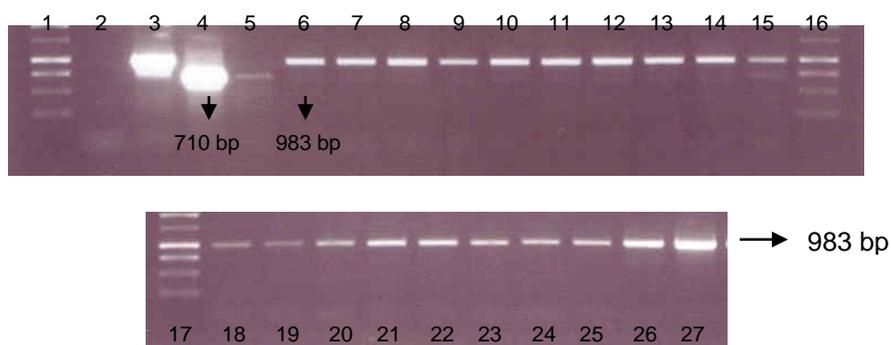


Figura 3.14. Análise por PCR de colônia das prováveis linhagens mutantes para o gene *aroQ* (CM citoplasmática) de *M. tuberculosis*. 1, 16 e 17: MM. PCRs realizadas com 2: água (controle negativo); 3: DNA genômico de *M. tuberculosis* (controle positivo); 4: p2NIL+COCA5; 5: DNA extraído de linhagem SCO; 6-15 e 18-27: DNA extraído de linhagens DCO (mutantes em potencial). Um fragmento de 983 bp é visualizado em 3 e em todas as linhagens DCO analisadas. Um

fragmento de 710 bp (indicando a deleção de 273 bp introduzida) é visualizado em 4 e 5. Apenas 20 linhagens DCO representativas são mostradas.

Como mostrado na **Figura 3.14**, o genótipo de todos os prováveis mutantes para o gene MTB *aroQ* (CM citoplasmática) testados se revelou idêntico ao do tipo selvagem. Visto que mais de 100 colônias C5 Kan^s tiveram seu DNA analisado por PCR (10 das quais também por seqüenciamento) e nenhuma linhagem DCO mutante pôde ser isolada (apenas linhagens DCO selvagens, apontando claramente para eventos de reversão), a ausência de mutantes utilizando esse método de troca alélica sugere que, nas condições testadas, o gene *aroQ* é essencial ao crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis*.

A estratégia de mutagênese por troca alélica usando plasmídeos suicidas é em geral realizada em duas etapas: primeiro são isoladas linhagens SCO (seleção) e, a partir delas, linhagens DCO (contra-seleção). Desta maneira, pode-se determinar se um gene é essencial, pois as linhagens SCO serão viáveis, mas, na segunda etapa, somente linhagens DCO contendo o gene selvagem – e não aquelas contendo o alelo mutante – estarão presentes (Parish & Stoker, 2000a). Por definição, um gene é considerado essencial quando não pode, nas condições experimentais testadas, ser inativado, ou seja, não se obtém um mutante para aquele loco (Stoker *et alii*, 2005). Além disso, a mutagênese por troca alélica em duas etapas é mais eficiente em locos em que a frequência de recombinação homóloga é baixa, uma vez que uma única linhagem SCO é suficiente para o passo seguinte (Parish & Stoker, 2000b).

Como todas as mais de 100 colônias C5 Kan^s testadas apresentaram o mesmo genótipo que o do tipo selvagem, sem que nenhuma linhagem DCO

mutante Hyg^s Kan^s fosse obtida, confirmou-se que o segundo *crossover* está de fato ocorrendo no loco correspondente ao gene MTB *aroQ* e que a incapacidade de obtenção de mutantes não é devida a uma total falta de recombinação homóloga nessa região. Pelo contrário: a frequência de recombinação homóloga para o gene MTB *aroQ* parece ser normal, visto que, na etapa final de isolamento, em que as colônias C5 foram testadas quanto à sensibilidade a canamicina, o número de mutantes espontâneos resistentes a sacarose (linhagens SCO Kan^r, em que o segundo *crossover* não ocorreu) sempre foi baixo, na proporção de 3:37 (cerca de 8%). Esse indício reforça, portanto, a provável essencialidade do gene *aroQ* ao metabolismo de *M. tuberculosis*.

É necessário considerar alguns pontos importantes em relação à definição de essencialidade em *M. tuberculosis*. Em primeiro lugar, a comprovação de que um gene é essencial em *M. tuberculosis* é muito mais difícil e laboriosa do que nas micobactérias de crescimento rápido, como *M. smegmatis*. A falha na obtenção de mutantes pode ser causada pela existência de células que, embora viáveis, possuem taxas de crescimento mais baixas que a linhagem selvagem. Há diversos relatos na literatura de linhagens mutantes de *M. tuberculosis* cujas taxas de crescimento podem ser até duas ou três vezes menores que a linhagem selvagem (Pavelka & Jacobs, 1999; Parish & Stoker, 2000a; Lamichhane *et alii*, 2006). Por essa razão, teve-se o cuidado de, na etapa de contra-seleção, em que as colônias C5 foram semeadas em placas de 7H10 com e sem sacarose, prolongar o tempo de incubação a 37°C por até 6 semanas, a fim de que linhagens mutantes com taxa de crescimento menor e morfologia diminuta pudessem ser detectadas. Entretanto, não foi esse o caso. Após 6 semanas de incubação,

considerou-se que não haveria mais células viáveis. Além disso, a incubação prolongada apresenta dificuldades, como dessecação do meio de cultura.

Em segundo lugar, a disponibilidade de meios de cultura adequados para o crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis* constitui um problema, pois nem sempre a composição de certos meios definidos (especialmente sólidos) pode ser alterada sem que haja diminuição significativa do tempo normal de geração ou mesmo comprometimento da viabilidade do bacilo (Allen, 1998). No caso das mutações introduzidas nos genes das CMs de *M. tuberculosis*, essa dificuldade experimental não representou uma limitação, já que a ausência dos respectivos produtos finais (fenilalanina e tirosina) poderia, caso mutantes tivessem sido obtidos, ser compensada pela adição desses aminoácidos ao meio de cultura. E, como fenilalanina e tirosina foram utilizadas durante a realização dos experimentos, a falta de suplementos no meio de cultura não explica por que linhagens DCO mutantes para o gene MTB *aroQ* não puderam ser obtidas. Uma possibilidade seria que o prefenato formado a partir de corismato pela CM serve a uma função essencial desconhecida, adicional à biossíntese de fenilalanina e tirosina. Essa hipótese é, no entanto, pouco provável.

Além disso, a linhagem SCO Hyg^r Kan^r para o gene MTB *aroQ* cresce normalmente em Middlebrook 7H10 (meio sólido) e Middlebrook 7H9 (meio líquido) sem suplementação dos dois aminoácidos aromáticos, como posteriormente verificado (dados não mostrados). Esse dado evidencia, portanto, que a linhagem SCO Hyg^r Kan^r para o gene MTB *aroQ* não possui nenhum defeito de crescimento *in vitro*. Dessa forma, o uso de concentrações superiores a 40 µg/ml de fenilalanina e 40 µg/ml de tirosina no meio de cultura também não

permitiria excluir a possibilidade de que o gene *aroQ* não é essencial em *M. tuberculosis*. Tomou-se ainda o cuidado de não adicionar casaminoácidos ao meio de cultura, os quais são tóxicos e letais a *M. tuberculosis* (Parish *et alii*, 1999; Pavelka & Jacobs, 1999). Embora não existam dados experimentais sobre o transporte de fenilalanina e tirosina em células de *M. tuberculosis*, há um homólogo de AroP2 (transportador de aminoácidos aromáticos) no genoma (Cole *et alii*, 1998). Finalmente, deve-se mencionar que *M. tuberculosis* cresce em meio mínimo na ausência de aminoácidos aromáticos – como, por exemplo, o meio definido de Sauton, que leva em sua composição, entre outros reagentes, glicerol, citrato e asparagina (Allen, 1998). A necessidade de prefenato no meio de cultura é, como ressaltado, uma hipótese improvável. Mas, se houver uma ramificação metabólica a partir de prefenato que não a biossíntese de fenilalanina e tirosina, isso explicaria a inviabilidade de mutantes para o gene MTB *aroQ*.

O prefenato formado pela CM é, em certas bactérias, convertido em arogenato, um intermediário metabólico que também é usado na biossíntese de fenilalanina e/ou tirosina, dependendo do microrganismo (Calhoun *et alii*, 2001; Dosselaere & Vanderleyden, 2001). Em *P. aeruginosa*, o arogenato pode ser usado como fonte exclusiva de carbono e nitrogênio (Fischer *et alii*, 1997). Em *M. tuberculosis*, há indícios de que a proteína monofuncional TyrA utilize preferencialmente arogenato como substrato (Song *et alii*, 2005). Contudo, o papel do arogenato em micobactérias é totalmente desconhecido.

A via do chiquimato é considerada essencial em *M. tuberculosis*, pois o gene *aroK* (cujo produto efetua a quinta etapa enzimática) não pode ser inativado, mesmo com suplementação de corismato e outros compostos aromáticos no meio

de cultura (Parish & Stoker, 2002). Como as funções e principalmente a regulação das várias enzimas da via ainda não são inteiramente compreendidas em micobactérias, é possível que, em *M. tuberculosis*, essa rota metabólica (que aparentemente exibe menos redundância em relação a *E. coli*) apresente ramificações específicas, incluindo *downstream* ao corismato. Quanto à biossíntese dos aminoácidos aromáticos, apenas dois genes, *pheA* (biossíntese de fenilalanina) e *trpD* (biossíntese de triptofano) foram estudados através de mutagênese por troca alélica em *M. tuberculosis* (Parish *et alii*, 1999).

Segundo a técnica de mutagênese com o transposon *Himar1* (TraSH) desenvolvida por Sasseti *et alii* (2003), que define genes necessários ao crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis*, o gene MTB *aroQ* (*Rv0948c*) não é essencial. Contudo, a abordagem de Sasseti *et alii* (2003) tem limitações. Experimentalmente, genes considerados essenciais pela técnica puderam ser inativados, também ocorrendo exatamente o contrário. Curiosamente, esse é o caso do gene *trpD* de *M. tuberculosis*, tido como essencial pelo método de Sasseti *et alii* (2003) e que foi, no entanto, inativado por Parish *et alii* (1999), dando origem a uma linhagem auxotrófica para triptofano que confere níveis de proteção superiores aos da BCG em camundongos (Smith *et alii*, 2001). Já linhagens DCO mutantes para o gene *pheA* (tido como não essencial pela metodologia TraSH) não puderam ser obtidas, mesmo com suplementação de fenilalanina no meio de cultura: apenas SCOs foram isolados (Parish *et alii*, 1999).

O último dado é particularmente relevante ao presente trabalho, sendo um indicativo de que os produtos de genes *downstream* à biossíntese de corismato (especialmente relacionados à biossíntese de fenilalanina e tirosina) podem

efetivamente ser indispensáveis ao crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis*, por razões que ainda não estão claras. Embora a proteína MTB AroQ seja provavelmente monofuncional (e os dados obtidos para a enzima recombinante no item 3.1.2 sugerem que sim), deve-se considerar a possibilidade de que, *in vivo*, ela se associe a outra proteína. Se for esse o caso, e este complexo bifuncional (ou multifuncional) for essencial ao metabolismo de *M. tuberculosis*, então explica-se por que linhagens DCO mutantes para o gene MTB *aroQ* não podem ser isoladas. É preciso lembrar que a regulação da biossíntese dos aminoácidos aromáticos varia imensamente entre as bactérias, e que os genes *aroQ* são fortes candidatos à formação de complexos enzimáticos com outras proteínas, principalmente da via do chiquimato (Calhoun *et alii*, 2001; Dosselaere & Vanderleyden, 2001). No actinomiceto *Amycolatopsis methanolica*, demonstrou-se que uma CM monofuncional se associa como dímero, de forma não covalente, a uma 3-desoxi-D-arabino-heptulose 7-fosfato sintase (a primeira enzima da via do chiquimato), dando origem a um complexo heteromérico de 160 kDa (Euverink *et alii*, 1995). Quando esse complexo bifuncional é separado por cromatografia, a atividade enzimática de ambas as enzimas é diminuída, e a da CM não é mais alostericamente inibida por fenilalanina e tirosina. Cabe salientar que essas enzimas são codificadas por genes diferentes, associando-se posteriormente (Kloosterman *et alii*, 2003).

De qualquer forma, a falta do produto do gene MTB *aroQ* não parece ser compensada pela atividade da proteína MTB *AroQ, que ou desempenha um papel fisiologicamente limitado como CM na biossíntese de fenilalanina e tirosina, ou interage com outras rotas bioquímicas. Não se deve desconsiderar que as

CMs de *M. tuberculosis*, além de sua clara localização celular distinta, podem, também, exibir atividades temporais diferenciadas, de acordo com a maior ou menor demanda por prefenato durante a fase de infecção, por exemplo.

Se mutantes para os genes MTB *aroQ* e MTB **aroQ* tivessem sido obtidos, eles seriam complementados com suas respectivas seqüências codificantes, e, para tal, plasmídeos específicos de complementação foram construídos.

O promotor nativo e cerca de 50 bp *downstream* ao gene MTB *aroQ* (provavelmente monocistrônico) foram clonados, junto com a respectiva seqüência codificante, no vetor de complementação pINT3, gerando o plasmídeo pINT3+aroQCC3 (**Figura 3.15**).

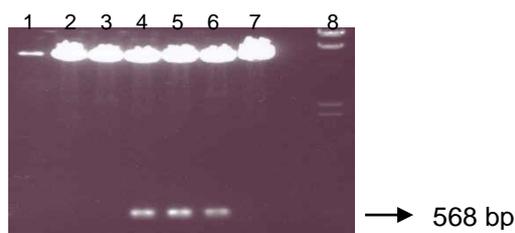


Figura 3.15. Construção do plasmídeo pINT3+aroQCC3, que contém o promotor nativo e a seqüência codificante do gene MTB *aroQ* (em 4, 5 e 6). 8: MM.

O gene MTB **aroQ* (provavelmente parte de um operon de seis genes), teve a respectiva seqüência codificante clonada, sob controle do promotor *hsp60*, no vetor pAPA3, gerando o plasmídeo pAPA3+aroQPC5 (**Figura 3.16**).

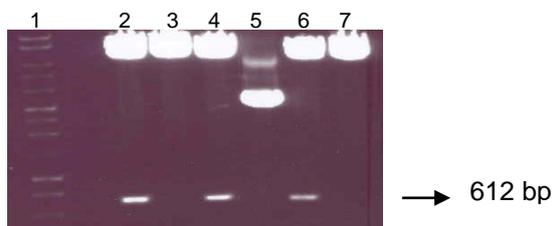


Figura 3.16. Construção do plasmídeo pAPA3+aroQPC5, que contém a seqüência codificante do gene MTB **aroQ* clonada sob controle do promotor *hsp60* de *M. tuberculosis* (em 2, 4 e 6). 1: MM.

3.2. Corismato mutases em *M. smegmatis*

3.2.1. Identificação, amplificação e clonagem em vetor de expressão dos genes MSM *aroQ* (MSMEG5513) e MSM **aroQ* (MSMEG2114)

Como previamente descrito e analisado no item 3.1, *M. smegmatis*, à semelhança de *M. tuberculosis*, também provavelmente possui duas CMs monofuncionais, não fusionadas a outras proteínas ou domínios protéicos e codificadas por genes distintos. Embora a anotação completa do genoma de *M. smegmatis* mc²155 ainda não tenha sido publicada, os dados preliminares do projeto de seqüenciamento genômico, disponibilizados pelo *Institute for Genomic Research* (<http://www.tigr.org>), revelam que duas proteínas hipotéticas conservadas (MSMEG5513 e MSMEG2114) correspondem, respectivamente, às ORFs homólogas Rv0948c e Rv1885c de *M. tuberculosis* H37Rv.

A ORF MSMEG5513 de *M. smegmatis* tem 78,3% de identidade com a proteína MTB AroQ, e, como mostrado no alinhamento múltiplo da **Figura 3.2**, a maioria dos resíduos do sítio ativo é conservada em relação aos do domínio EcCM e do domínio CM da proteína bifuncional TyrA de *E. coli*. As mesmas variações básicas observadas na seqüência de aminoácidos da proteína MTB AroQ estão presentes na ORF MSMEG5513, incluindo as mutações previstas *in silico* que mantêm ou aumentam a atividade catalítica de CM do domínio EcCM (Lassila *et alii*, 2005). O gene correspondente de *M. smegmatis* foi, portanto, denominado *aroQ* (MSMEG5513), o qual codifica uma CM (MSM AroQ) de 104 aa e massa molecular estimada de 11,75 kDa.

coli (TYRA_ECOLI) e CMPs de outras bactérias. Os peptídeos-sinais das CMPs estão realçados em turquesa, e, em cinza, a maior parte da extremidade C-terminal das proteínas *AroQ, sem equivalente em *E. coli*. Os resíduos do sítio catalítico do domínio EcCM estão indicados por * e H, e realçados em verde os conservados em *M. smegmatis*. A Arg11 do domínio EcCM (numerada), ausente nas proteínas *AroQ, tem uma equivalente em outra posição (Arg134 na proteína MSM *AroQ), realçada em verde na seqüência das proteínas *AroQ. Vermelho: aa idênticos. Verde: aa com alta similaridade.

Da mesma forma que a proteína MTB *AroQ, o homólogo de *M. smegmatis* é exportado. Como mostrado na **Figura 3.18**, o provável sítio de clivagem da proteína MSM *AroQ se situa na extremidade N-terminal, entre Ala33 e Asp34, gerando um peptídeo-sinal de 33 aa e uma proteína madura de 161 aa, conforme a opção de redes neurais do programa SignalP (Nielsen *et alii*, 1997). A massa molecular da proteína madura é estimada em 17,69 kDa.

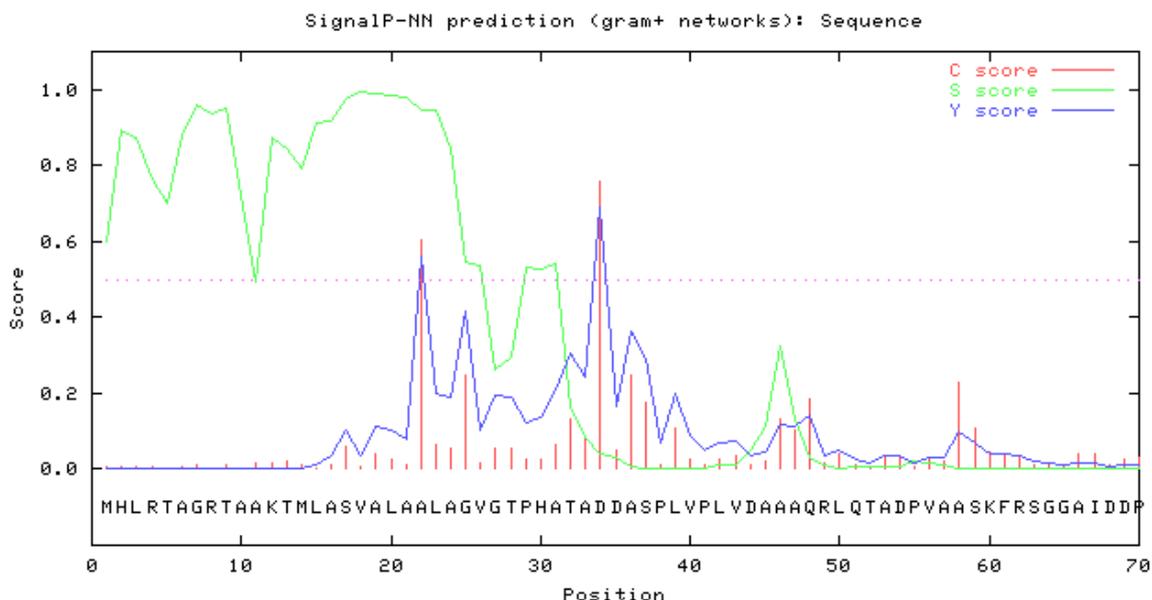


Figura 3.18. Predição do sítio de clivagem (entre Ala33 e Asp34) da proteína MSM *AroQ usando o programa SignalP. Os 70 primeiros aa são mostrados.

A organização genômica dos genes *aroQ* em micobactérias é bastante semelhante, como pode ser visualizado na **Figura 3.19** e na **Figura 3.20**, em que

as regiões cromossômicas contendo cada gene *aroQ* e **aroQ* de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. smegmatis* mc²155 foram comparadas com as de outras espécies. Há, no entanto, algumas características específicas.

Na **Figura 3.19**, observa-se que, além de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, também outras micobactérias representativas do MTC (como *M. bovis*) e do MAC (como *M. avium*) possuem genes *aroQ* homólogos, os quais não parecem fazer parte de operons, sendo monocistrônicos. Em certo sentido, esse dado reforça o caráter monofuncional das proteínas AroQ em *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* e outras micobactérias, principalmente quando se leva em conta o tamanho das regiões intergênicas que separam os genes *aroQ* dos genes vizinhos: em *M. tuberculosis*, a distância entre o gene *aroQ* e o gene *uvrD* (*Rv0949*) adjacente, por exemplo, é de quase 300 bp.

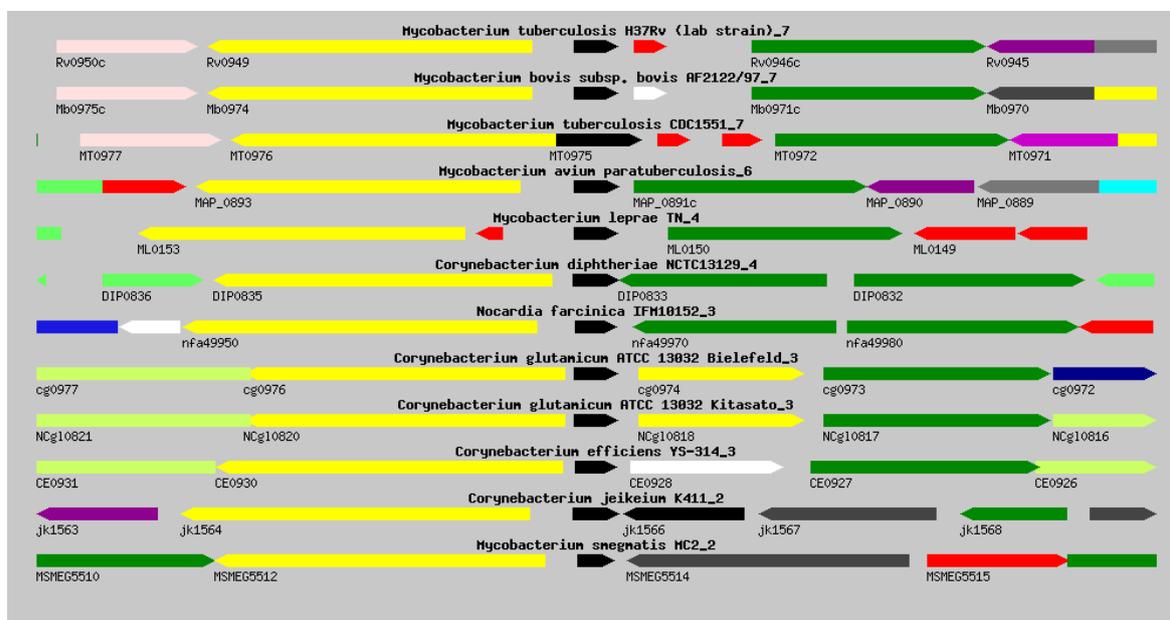


Figura 3.19. Organização genômica da região contendo o gene *aroQ* (setas pretas no centro da figura) em *M. tuberculosis* H37Rv, *M. smegmatis* mc²155, outras micobactérias e espécies filogeneticamente relacionadas. O gene *uvrD* (*Rv0949*) de *M. tuberculosis* tem homólogos em todas as espécies.

Na **Figura 3.19**, ainda observa-se que o gene *uvrD* (que codifica uma DNA helicase) de *M. tuberculosis* tem homólogos em todas as espécies analisadas, na vizinhança dos genes *aroQ*. Em uma rápida análise da região intergênica entre os genes *aroQ* e *uvrD* de *M. tuberculosis*, não foi encontrado nenhum provável sítio de ligação a ribossomo (RBS) para o gene MTB *aroQ*; já o gene *uvrD* possui um RBS. Em *M. smegmatis*, tanto o gene *aroQ* como o gene *uvrD* possuem seus próprios RBSs (dados não mostrados). Desta maneira, embora a organização genômica dos genes *aroQ* seja semelhante em micobactérias, a regulação dos mesmos deve ser diferenciada, sendo curioso o fato de o gene MTB *aroQ* não apresentar um RBS típico – o qual deve, contudo, existir.

Em *M. leprae*, como anteriormente mencionado, o gene ML0151c, homólogo ao gene MTB *aroQ*, codifica a única CM presente nessa micobactéria, não ocorrendo nenhum homólogo ao gene MTB **aroQ*, como pode ser observado na **Figura 3.20** (em que *M. leprae* não foi incluída).

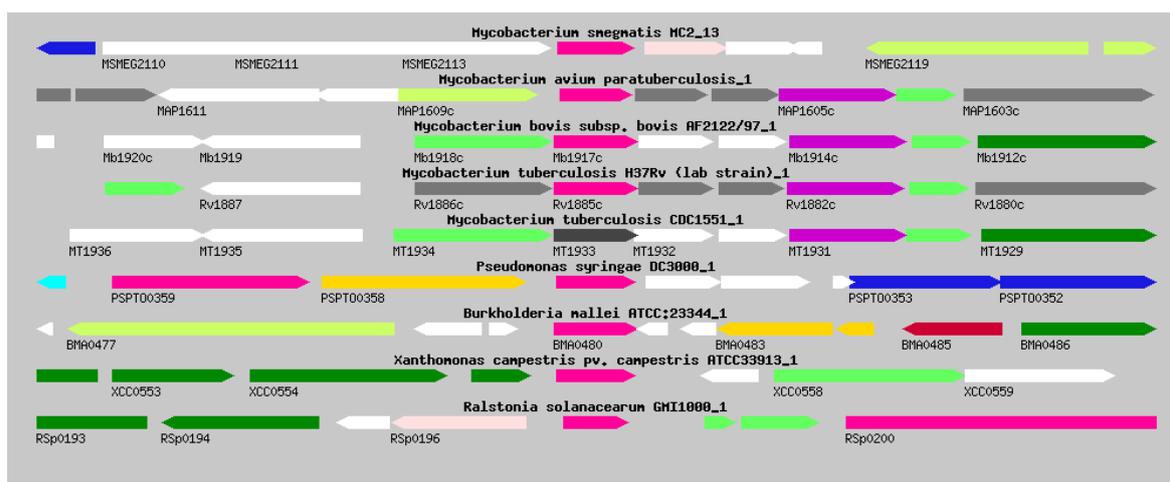


Figura 3.20. Organização genômica da região contendo o gene **aroQ* (setas rosas no centro da figura) em *M. tuberculosis* H37Rv, *M. smegmatis* mc²155, outras micobactérias e espécies bacterianas. O gene **aroQ* é um pseudogene em *M. leprae*, que não foi incluída na análise comparativa.

Os genes **aroQ* parecem fazer parte de operons, ao menos em micobactérias (**Figura 3.20**). Mas, curiosamente, tanto em *M. tuberculosis* como *M. smegmatis*, possuem seus próprios RBSs, adicionalmente ao do respectivo operon (dados não mostrados). Esse dado é discutido em maior profundidade no item **3.3**, em que as seqüências promotoras foram experimentalmente analisadas.

A fim de realizar estudos comparativos entre as CMs de *M. tuberculosis* e as proteínas MSM AroQ e MSM **AroQ*, uma metodologia semelhante à descrita no item **3.1** foi aplicada a *M. smegmatis*, lembrando que, embora não patogênica, essa espécie representa uma ferramenta biológica valiosa para a análise da função e expressão de inúmeros genes em micobactérias.

As regiões codificantes de ambos os genes, MSM *aroQ* (MSMEG5513) e MSM **aroQ* (MSMEG2114), de *M. smegmatis* foram amplificadas por PCR e clonadas no vetor de expressão pET-23a(+). Após, a atividade de CM das respectivas proteínas recombinantes foi testada em extratos brutos de células de *E. coli*, confirmando que as enzimas MSM AroQ e MSM **AroQ* são, de fato, CMs (item **3.2.2**). A mutagenese por troca alélica dos genes MSM *aroQ* e MSM **aroQ* também foi realizada, sendo que, nas condições testadas, uma linhagem DCO mutante para o gene MSM **aroQ* pôde ser obtida (itens **3.2.3-3.2.5**).

Na **Figura 3.21**, é mostrada a clonagem da região codificante do gene *aroQ* (MSMEG5513) de *M. smegmatis* entre os sítios de restrição *NdeI* e *BamHI* do vetor de expressão pET-23a(+). O inserto do plasmídeo recombinante pET-23a(+)-msmCMC1 (contendo 315 bp) foi inteiramente seqüenciado. Nenhuma mutação foi detectada na respectiva seqüência nucleotídica (dados não mostrados).

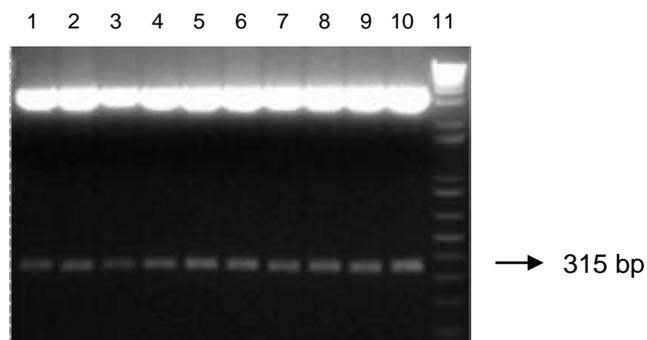


Figura 3.21. Clonagem do gene estrutural MSM *aroQ* (MSMEG5513) de *M. smegmatis* mc²155 no vetor de expressão pET-23a(+). O clone 1 (pET-23a(+)-msmCMC1, contendo o inserto de 315 bp) foi escolhido para seqüenciamento e testes de expressão protéica em *E. coli* (em 1). 11: MM.

Na **Figura 3.22**, é mostrada a clonagem da região codificante do gene **aroQ* (MSMEG2114) de *M. smegmatis* entre os sítios de restrição *NdeI* e *BamHI* do vetor de expressão pET-23a(+). O gene estrutural **aroQ* foi amplificado sem a seqüência correspondente ao peptídeo-sinal, a fim de que, na etapa posterior de expressão, a proteína madura fosse produzida (**Figura 3.17**). O inserto do plasmídeo recombinante pET-23a(+)-msmCMP1 (contendo 486 bp) foi inteiramente seqüenciado. Nenhuma mutação foi detectada na respectiva seqüência nucleotídica (dados não mostrados).

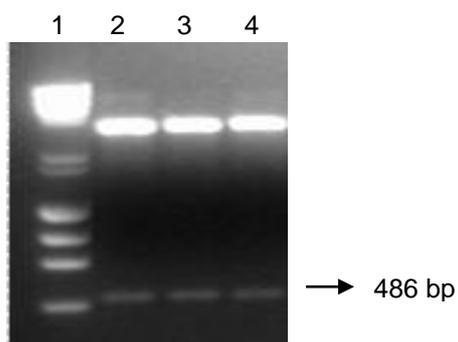


Figura 3.22. Clonagem do gene estrutural MSM **aroQ* (MSMEG2114) de *M. smegmatis* mc²155 no vetor de expressão pET-23a(+). O clone 1 (pET-23a(+)-msmCMP1, contendo o inserto de 486 bp) foi escolhido para seqüenciamento e testes de expressão protéica em *E. coli* (em 2). 1: MM.

3.2.2. Expressão em *E. coli* e teste da atividade enzimática das proteínas MSM AroQ (MSMEG5513) e MSM *AroQ (MSMEG2114)

Os plasmídeos pET-23a(+)-msmCMC1 (contendo o gene MSM *aroQ*) e pET-23a(+)-msmCMP1 (contendo o gene MSM **aroQ*) foram individualmente eletroporados em células de *E. coli* BL21(DE3). Procedeu-se, então, a expressão de cada proteína recombinante, segundo protocolos padronizados e condições variáveis de expressão protéica (temperatura de incubação, presença/ausência de indutor, aeração, etc). Os resultados estão apresentados na **Figura 3.23** e na **Figura 3.24**, em que se observa a expressão das respectivas CMs de *M. smegmatis* na fração solúvel de extratos de células de *E. coli* BL21(DE3).

A expressão da proteína MSM AroQ na fração solúvel de células de *E. coli* BL21(DE3) é mostrada na **Figura 3.23**, sendo observada uma proteína de tamanho compatível ao esperado (11,75 kDa).

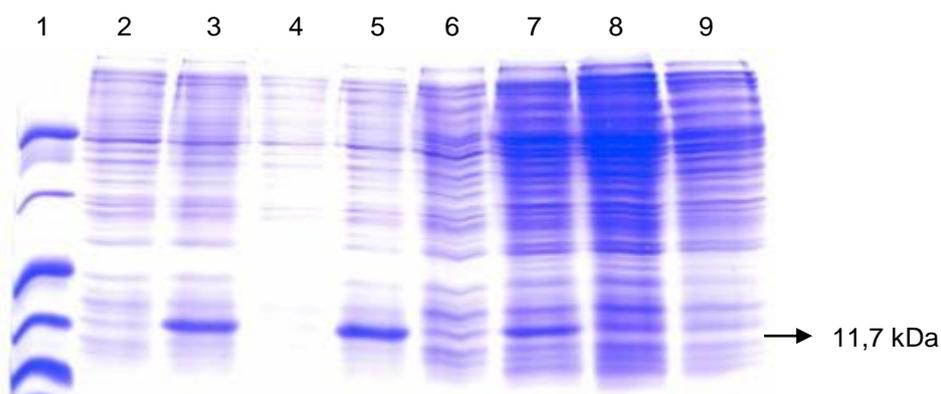


Figura 3.23. Expressão da proteína MSM AroQ (MSMEG5513) na fração solúvel de extratos brutos de células de *E. coli* BL21(DE3). 1: MM; 2, 4, 6 e 8: controle, *E. coli* BL21(DE3) + pET-23a(+); 3, 5, 7 e 9: *E. coli* BL21(DE3) + pET-23a(+)-msmCMC1. 2, 3, 6 e 7: expressão sem IPTG; 4, 5, 8 e 9: expressão com 0,5 mM de IPTG. A expressão da proteína MSM AroQ (11,7 kDa) foi monitorada por 24 h após as culturas de *E. coli* BL21(DE3) terem atingido $OD_{600} = 0,4$, sendo mostrado o perfil protéico em 3 h (2-5) e 6 h (6-9) de crescimento celular.

Como mostrado na **Figura 3.23**, não houve alterações significativas na expressão da proteína MSM AroQ em relação à presença ou ausência de IPTG no meio de cultura durante as primeiras 3 h após as culturas de *E. coli* BL21(DE3) terem atingido $OD_{600} = 0,4$. No entanto, na presença de 0,5 mM de IPTG, a expressão da proteína MSM AroQ desaparece entre 3 e 6 h pós-indução. Entre 6 e 12 h de crescimento celular, na ausência de IPTG, a produção da proteína recombinante diminui consideravelmente (dados não mostrados). Assim, a expressão máxima dessa proteína recombinante ocorre, nas condições testadas, durante as primeiras 3 h de crescimento, com e sem IPTG.

A expressão da proteína MSM *AroQ em *E. coli* se mostrou complexa e bastante baixa, mesmo variando a temperatura de incubação entre 30 e 37°C e a concentração de IPTG entre 0,5 e 1 mM. Contudo, observou-se a expressão de uma proteína recombinante de tamanho compatível ao esperado (cerca de 17,5 kDa) na fração solúvel de células de *E. coli* BL21(DE3) (**Figura 3.24**).

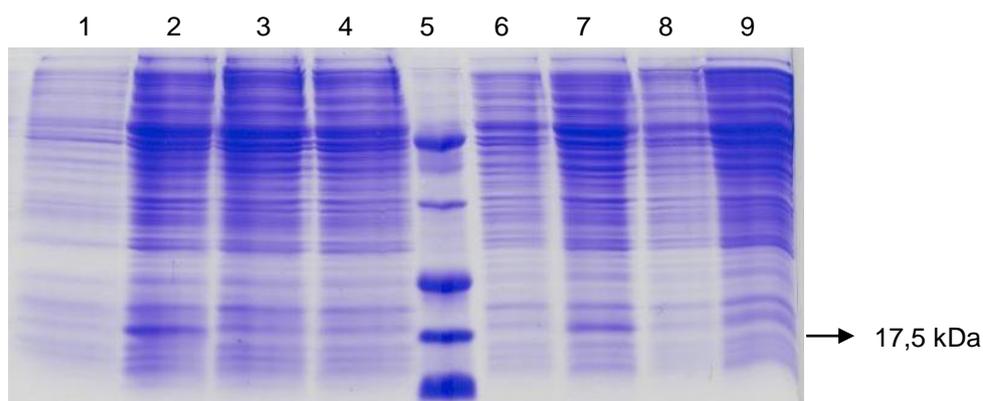


Figura 3.24. Expressão da proteína MSM *AroQ (MSMEG2114) na fração solúvel de extratos brutos de células de *E. coli* BL21(DE3). 1, 3, 6 e 8: controle, *E. coli* BL21(DE3) + pET-23a(+); 5: MM; 2, 4, 7 e 9: *E. coli* BL21(DE3) + pET-23a(+)-msmCMP1. 1, 2, 6 e 7: expressão sem IPTG; 3, 4, 8 e 9: expressão com 0,5 mM de IPTG. A expressão da proteína MSM *AroQ (cerca de 17,5 kDa) foi monitorada por 48 h após as culturas de *E. coli* BL21(DE3) terem atingido $OD_{600} = 0,4$, sendo mostrado o perfil protéico em 12 h (1-4) e 24 h (6-9) de crescimento celular.

A expressão da proteína MSM *AroQ ocorreu na ausência de IPTG, entre 12 e 24 h de crescimento celular após as culturas de *E. coli* BL21(DE3) terem atingido $OD_{600} = 0,4$, sem variações significativas na quantidade de proteína recombinante produzida nesse intervalo de tempo (**Figura 3.24**). Após 48 h de crescimento celular, não se observa mais a expressão da proteína MSM *AroQ em células de *E. coli* BL21(DE3) (dados não mostrados).

Em seguida, as frações solúveis de extratos brutos de células de *E. coli* BL21(DE3) contendo a proteína recombinante MSM AroQ ou MSM *AroQ foram testadas quanto à atividade de CM, usando o mesmo ensaio de detecção enzimática anteriormente empregado na caracterização das proteínas MTB AroQ e MTB *AroQ. Como controle, foi considerada a fração solúvel do extrato bruto de células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET-23a(+). A atividade específica de CM em células de *E. coli* expressando o produto do gene *aroQ* de *M. smegmatis* foi aproximadamente 113 vezes superior à observada em células de *E. coli* contendo o plasmídeo controle, como mostrado na **Tabela 3.4**. Já a atividade específica de CM em células de *E. coli* expressando o produto do gene **aroQ* de *M. smegmatis* foi aproximadamente 131 vezes superior à observada em células de *E. coli* contendo o plasmídeo controle. Esses dados confirmam que as proteínas MSM AroQ e MSM *AroQ, (correspondentes às ORFs MSMEG5513 e MSMEG2114, respectivamente) têm atividade enzimática específica de CM e indicam que as mesmas são produzidas na sua forma ativa em células de *E. coli*. Assim, conclui-se que *M. smegmatis*, além de uma CMP representada pela proteína MSM *AroQ, também possui uma CMC representada pela proteína MSM AroQ, de forma similar a *M. tuberculosis*.

Tabela 3.4. Medida da atividade enzimática de CM em extratos de células de *E. coli* BL21(DE3) expressando as proteínas MSM AroQ e MSM *AroQ.

Extrato celular	Atividade específica (U/mg) ^b	Razão extrato clonado/controle
Controle ^a	1,643	1
MSM AroQ (MSMEG5513)	186,31	113,40
Controle	1,204	1
MSM *AroQ (MSMEG2114)	158,29	131,47

^aExtrato controle: células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o plasmídeo pET-23a(+); extrato clonado: células de *E. coli* BL21(DE3) contendo o respectivo plasmídeo recombinante.

^bA medida da atividade específica de cada extrato foi realizada em duplicata.

Apesar da baixa quantidade de proteína recombinante obtida na expressão da proteína MSM *AroQ em *E. coli*, nas condições testadas, a atividade específica encontrada para ambas as enzimas de *M. smegmatis* nos extratos celulares pode ser considerada alta e semelhante, a despeito de possíveis diferenças na eficiência catalítica de cada CM individual e do fato de que não exibem altos níveis de identidade entre si.

Como no caso de *M. tuberculosis* (espécie patogênica), a razão pela qual existem duas CMs monofuncionais em *M. smegmatis* (espécie não patogênica), sendo uma periplasmática, permanece desconhecida. Por sinal, a presença de uma CMP em *M. smegmatis* é um forte indício de que talvez essas proteínas exportadas não sejam fatores de virulência, como sugerido por Prakash *et alii* (2005) e Sasso *et alii* (2005) para a enzima homóloga de *M. tuberculosis*. Esses autores, baseando-se apenas nos dados disponíveis para *S. typhimurium* e *P. aeruginosa*, sem considerar as peculiaridades observadas em micobactérias, como *M. smegmatis* (que possui uma CMP funcional, como demonstrado no presente trabalho) e *M. leprae* (que não possui uma CMP funcional), propõem que, devido à sua natureza secretada, a proteína MTB *AroQ esteja ligada a algum aspecto desconhecido da patogenicidade de *M. tuberculosis*. Porém,

nenhuma análise de expressão gênica *in vivo* foi, até o momento, realizada para o gene MTB *aroQ. E, diante dos resultados obtidos para a proteína MSM *AroQ e o observado em *M. leprae*, isso não pode ser conclusivamente afirmado.

Uma vez que genes codificadores de uma ciclohexadienil desidratase ou uma ciclohexadienil desidrogenase periplasmática também não foram encontrados em *M. tuberculosis*, a proteína MTB *AroQ pode simplesmente ser uma 'sobrevivente' de uma rota biossintética extinta. Calhoun *et alii* (2001) levantam tal hipótese, observando que, em *S. typhimurium*, ocorre uma situação semelhante à verificada em *M. tuberculosis*: presença de uma CMP e ausência de enzimas periplasmáticas *downstream* ao prefenato. No entanto, a situação pode ser diferente em *M. smegmatis*. Em uma busca de similaridade realizada no banco de dados do *Institute for Genomic Research* (<http://www.tigr.org>), a proteína *PheC (PA3475) de *P. aeruginosa*, que codifica uma ciclohexadienil desidratase periplasmática, foi comparada com ORFs de *M. smegmatis*. O resultado foi a identificação de uma ORF (MSMEG3450) que tem 49,1% de identidade (67,7% de similaridade) com a proteína *PheC de *P. aeruginosa*. Além disso, usando a opção de redes neurais do programa SignalP, a ORF MSMEG3450 codifica, claramente, uma proteína exportada (dados não mostrados). Desta maneira, é possível que, em *M. smegmatis*, haja uma rota completa de biossíntese de fenilalanina no periplasma, como em *P. aeruginosa*. Em termos evolutivos, pode-se grosseiramente dizer que *M. tuberculosis* é uma espécie que, embora não parasita, está de certa forma se encaminhando para tal – sendo *M. leprae* um exemplo extremo, em que há uma perda maciça de rotas biossintéticas e dependência absoluta do hospedeiro para a replicação. Por outro

lado, *M. smegmatis* parece exibir uma maior plasticidade metabólica, devido à sua natureza saprofítica e à intensa competição existente entre as bactérias que vivem no solo. A presença de uma rota biossintética aromática no periplasma poderia, portanto, significar uma vantagem seletiva.

3.2.3. Construção dos plasmídeos suicidas p2NIL+CHOC1 e p2NIL+CHOP1

Diante dos resultados apresentados para as proteínas MSM AroQ e MSM *AroQ, e dada a provável essencialidade do gene *aroQ* em *M. tuberculosis*, tornou-se interessante analisar geneticamente os genes *aroQ* e **aroQ* de *M. smegmatis* e avaliar sua importância relativa ao metabolismo desta micobactéria. Para tal, plasmídeos suicidas contendo as regiões flangeadoras *upstream* e *downstream* a cada gene *aroQ* de *M. smegmatis* foram construídos, segundo um método análogo ao descrito para a mutagenese por troca alélica dos genes MTB *aroQ* e MTB **aroQ* (item 3.1.3). Entretanto, na criação das deleções, não se utilizou uma *overlap PCR*, e sim uma ligação *in-frame* das seqüências correspondentes a uma pequena porção das extremidades N-terminal e C-terminal de cada região codificante (entre 10 e 15 aa).

Na **Figura 3.25**, é mostrada a localização genômica do gene *aroQ* (MSMEG5513) em *M. smegmatis*, o qual é provavelmente monocistrônico. Contudo, a fim de evitar possíveis efeitos polares sobre a transcrição dos genes adjacentes (*pcrA* e MSMEG5514), uma deleção *in-frame*, não marcada, em que mais de 90% da região codificante do gene *aroQ* é eliminada, foi produzida na construção do respectivo alelo mutante de *M. smegmatis*.

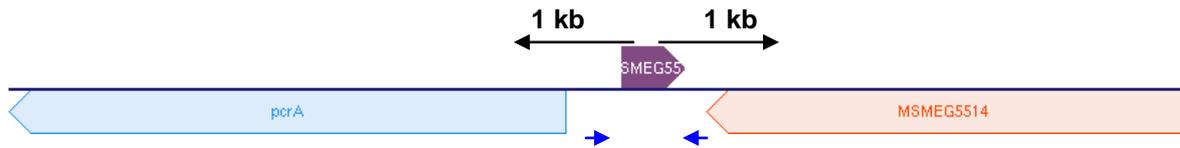


Figura 3.25. Localização genômica do gene *aroQ* (MSMEG5513) em *M. smegmatis*, mostrando as regiões flanqueadoras (cerca de 1 kb) *upstream* e *downstream* usadas na construção do plasmídeo suicida p2NIL+CHOC1. As setas pequenas, em azul, indicam *primers* usados na caracterização de linhagens.

O plasmídeo suicida p2NIL+CHOC1, gerado pela ligação, nos sítios de restrição *HindIII* e *NotI* do vetor p2NIL, de regiões flanqueadoras (cerca de 1 kb cada) *upstream* e *downstream* ao gene MSM *aroQ*, foi projetado a fim de criar uma deleção de 283 bp na seqüência codificante do gene-alvo de *M. smegmatis* (**Figura 3.26**).

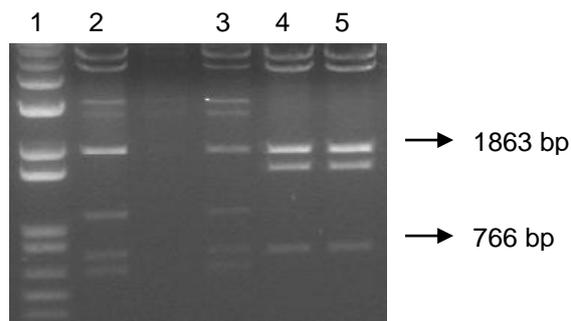


Figura 3.26. Construção do plasmídeo suicida p2NIL+CHOC1, contendo um alelo mutante com uma deleção de 283 bp na seqüência codificante do gene *aroQ* (MSMEG5513) de *M. smegmatis*. 1: MM; 2 e 3: p2NIL+CHOC1 e CHOC2 clivados com *EcoRI*; 3 e 4: p2NIL+CHOC1 e CHOC2 clivados com *BamHI*.

Na **Figura 3.27**, é mostrada a localização genômica do gene **aroQ* (MSMEG2114) em *M. smegmatis*, o qual é provavelmente monocistrônico. Uma deleção *in-frame*, não marcada, em que mais de 90% da região codificante do gene **aroQ* é eliminada, foi produzida na construção do respectivo alelo mutante de *M. smegmatis*, evitando possíveis efeitos polares sobre a transcrição dos genes adjacentes.

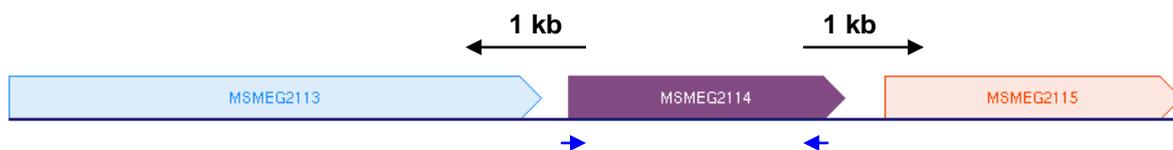


Figura 3.27. Localização genômica do gene **aroQ* (MSMEG2114) em *M. smegmatis*, mostrando as regiões flanqueadoras (cerca de 1 kb) *upstream* e *downstream* usadas na construção do plasmídeo suicida p2NIL+CHOP1. As setas pequenas, em azul, indicam *primers* usados na caracterização de linhagens.

A região cromossômica em que se situa o gene MSM **aroQ* é extremamente rica em G+C, chegando a 70%. Isso constituiu um problema durante a amplificação por PCR das regiões flanqueadoras *upstream* e *downstream* ao gene-alvo, as quais só puderam ser obtidas mediante a utilização de 10% de DMSO na mistura de reação e uma alta temperatura de anelamento (dados não mostrados). O plasmídeo suicida p2NIL+CHOP1 foi gerado pela ligação, nos sítios de restrição *Bam*HI e *Kpn*I do vetor p2NIL, de regiões flanqueadoras (cerca de 1 kb cada) ao gene MSM **aroQ*, criando uma deleção de 510 bp na respectiva seqüência codificante de *M. smegmatis*. Como mostrado na **Figura 3.28**, seis prováveis recombinantes foram obtidos, metade dos quais contendo o cassete de *Pacl* do vetor pGOAL19 na orientação direta, e a outra metade na orientação reversa.

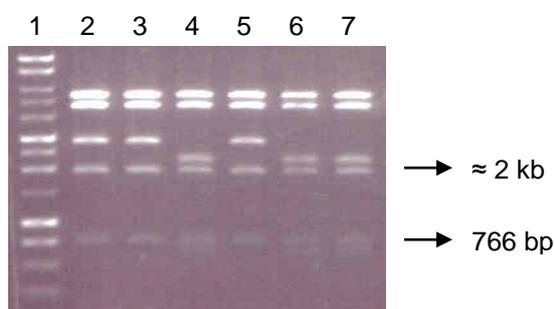


Figura 3.28. Construção do plasmídeo suicida p2NIL+CHOP1, contendo um alelo mutante com uma deleção de 510 bp na seqüência codificante do gene **aroQ* (MSMEG2114) de *M. smegmatis*. 1: MM; 2: p2NIL+CHOP1 clivado com *Eco*RI; 3 a 7: CHOP2 a CHOP6 clivados com *Eco*RI. A diferença no padrão de restrição se refere à orientação (direta ou reversa) do cassete de *Pacl* nos plasmídeos.

3.2.4. Eletroporação de *M. smegmatis* mc²155 e isolamento de mutantes

Cerca de 3 µg de DNA de cada plasmídeo suicida (p2NIL+CHOC1 e p2NIL+CHOP1) foram separadamente eletroporados em células de *M. smegmatis* mc²155. Levando em consideração a função dos produtos dos genes MSM *aroQ* e MSM **aroQ*, duas condições experimentais foram testadas: Middlebrook 7H10 e Middlebrook 7H10 suplementado com 40 µg/ml de fenilalanina e 40 µg/ml de tirosina. Para fins comparativos, também foi testado o isolamento de mutantes em placas de Lemco e Lemco suplementado com 40 µg/ml de fenilalanina e 40 µg/ml de tirosina. Em meio Lemco, de composição complexa e indefinida, *M. smegmatis* cresce mais rapidamente. Após cerca de 10 dias de incubação a 37°C, colônias azuis Hyg^r Kan^r (SCOs) foram obtidas para ambas as construções, CHOC1 (7 colônias) e CHOP1 (16 colônias), nas quatro condições experimentais testadas. O maior número de SCOs foi obtido em Lemco e Lemco suplementado com fenilalanina e tirosina. A presença dos dois aminoácidos aromáticos, portanto, não se mostrou importante ao isolamento de prováveis mutantes para os genes *aroQ* e **aroQ* de *M. smegmatis*, mesmo em Middlebrook 7H10.

Em seguida, colônias individuais, Cosmos3 (CHOC1) e Possum7 (CHOP1), foram semeadas em 7H10 (e também Lemco) na ausência de antibióticos, para que o segundo evento de recombinação homóloga ocorresse. Nas condições testadas, entre 10 e 15 dias de incubação a 37°C, observou-se o crescimento de ambas as linhagens SCO, Cosmos3 e Possum7. Como esperado, o crescimento das linhagens foi mais vigoroso em Lemco, com e sem suplementação. Em seguida, as colônias Cosmos3 e Possum7 foram semeadas em placas de 7H10

(e também Lemco) com e sem sacarose. Após 15 a 20 dias de incubação a 37°C, colônias brancas derivadas de Cosmos3 e Possum7 e sensíveis a sacarose foram obtidas, observando-se uma diminuição de aproximadamente 10^4 cfu do número de colônias em placas com sacarose em comparação a placas sem sacarose. Cerca de 120 colônias derivadas de Cosmos3 e 80 colônias derivadas de Possum7, resistentes a sacarose, foram então testadas em placas de 7H10 na ausência e presença de canamicina e higromicina, para distinguir linhagens DCO Kan^s (mutantes em potencial) de mutantes espontâneos resistentes a sacarose. Por fim, o DNA genômico de colônias Kan^s foi preparado para posterior análise por PCR e seqüenciamento.

3.2.5. Caracterização e complementação dos prováveis mutantes

Os genótipos das colônias brancas derivadas de Cosmos3 Kan^s (DCOs) foram caracterizados por PCR de colônia, usando *primers* específicos, que permitem distinguir entre a provável linhagem DCO mutante, o tipo selvagem e SCOs, como esquematizado na **Figura 3.25**. Mais de 120 mutantes em potencial para o gene MSM *aroQ* foram testados, e na **Figura 3.29** está mostrado o resultado para sete colônias.

Os genótipos das colônias brancas derivadas de Possum7 Kan^s (DCOs) também foram caracterizados por PCR de colônia, usando *primers* específicos, como esquematizado na **Figura 3.27**. Sessenta prováveis linhagens DCO mutantes para o gene MSM *aroQ* foram testadas. Na **Figura 3.30** está mostrado o resultado para cinco colônias.

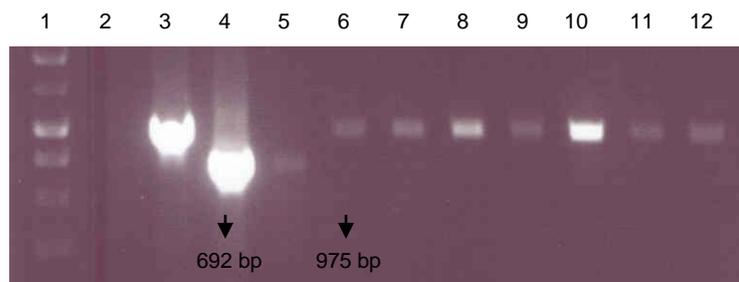


Figura 3.29. Análise por PCR de colônia das prováveis linhagens mutantes para o gene *aroQ* (CM citoplasmática) de *M. smegmatis*. 1: MM. PCRs realizadas com 2: água (controle negativo); 3: DNA genômico de *M. smegmatis* (controle positivo); 4: p2NIL+CHOC1; 5: DNA extraído de linhagem SCO; 6-12: DNA extraído de linhagens DCO (mutantes em potencial). Um fragmento de 975 bp é visualizado em 3 e em todas as linhagens DCO analisadas. Um fragmento de 692 bp (indicando a deleção de 283 bp introduzida) é visualizado em 4 e 5. Sete linhagens DCO Kan^S representativas são mostradas.

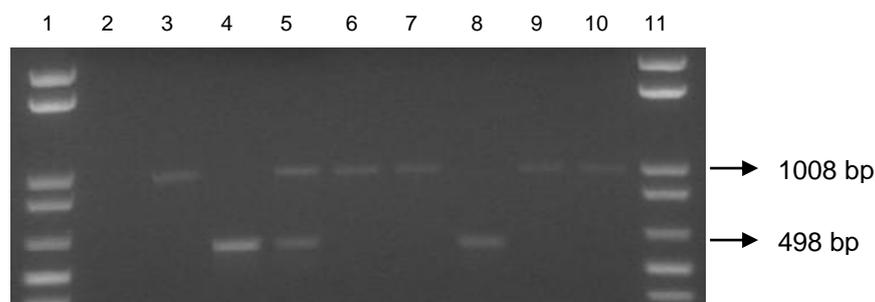


Figura 3.30. Análise por PCR de colônia das prováveis linhagens mutantes para o gene **aroQ* (CM periplasmática) de *M. smegmatis*. 1 e 11: MM. PCRs realizadas com 2: água (controle negativo); 3: DNA genômico de *M. smegmatis* (controle positivo); 4: p2NIL+CHOP1; 5: DNA extraído de linhagem SCO; 6-10: DNA extraído de linhagens DCO (mutantes em potencial). Um fragmento de 1008 bp é visualizado em 3 e em 5-7 e 9-10. Um fragmento de 498 bp (indicando a deleção de 510 bp introduzida) é visualizado em 4, 5 (SCO) e 8 (DCO mutante: Possum7-1). Cinco linhagens DCO Kan^S representativas são mostradas.

O genótipo de todos os prováveis mutantes para o gene MSM *aroQ* (CM citoplasmática) testados se revelou idêntico ao do tipo selvagem (**Figura 3.29**). Visto que mais de 120 colônias derivadas de Cosmos3 Kan^S tiveram seu DNA analisado por PCR (5 das quais também por seqüenciamento) e nenhuma linhagem DCO mutante pôde ser isolada (apenas linhagens DCO selvagens, indicando a ocorrência do segundo *crossover* e eventos de reversão), a ausência

de mutantes utilizando esse método de troca alélica sugere que, nas condições testadas, o gene *aroQ* é essencial ao crescimento *in vitro* de *M. smegmatis*, à semelhança do observado em *M. tuberculosis*.

Por outro lado, o gene MSM **aroQ* (CM periplasmática) pôde ser inativado em quatro colônias derivadas de Possum7 Kan^s, de um total de 60 analisadas por PCR de colônia (**Figura 3.30**). Essas quatro linhagens DCO mutantes para o gene **aroQ* de *M. smegmatis* tiveram a região de inserção da mutação no cromossomo totalmente seqüenciada; verificou-se, em todas, a presença de uma deleção de 510 bp equivalente à introduzida pelo plasmídeo suicida p2NIL+CHOP1 (dados não mostrados). Dessa forma, comprovou-se que o alelo selvagem correspondente ao gene MSM **aroQ* foi substituído pelo alelo mutante. Portanto, o gene **aroQ* não é essencial ao crescimento *in vitro* de *M. smegmatis*.

Como observado em *M. tuberculosis*, a linhagem SCO Hyg^r Kan^r para o gene MSM *aroQ* cresce normalmente em Middlebrook 7H9 e Lemco líquido sem suplementação dos dois aminoácidos aromáticos, indicando que a mesma não possui, a princípio, nenhum defeito de crescimento *in vitro*. O mesmo foi observado para a linhagem SCO Hyg^r Kan^r para o gene MSM **aroQ* (dados não mostrados). Durante o isolamento de prováveis linhagens mutantes para os genes MSM *aroQ* e MSM **aroQ*, tomou-se o mesmo tipo de cuidado aplicado a *M. tuberculosis*: incubação prolongada das placas na etapa de contra-seleção com sacarose, uso de aminoácidos ultrapuros (em concentrações não tóxicas e não letais) e, adicionalmente, seleção das colônias em meios de composição definida (Middlebrook) e composição indefinida (Lemco). Mesmo assim, nas quatro condições experimentais testadas, não foi possível a obtenção de mutantes para

o gene *aroQ* de *M. smegmatis*. O fato de todas as colônias derivadas de Cosmos3 Kan^s exibirem o mesmo genótipo que o do tipo selvagem indica que, além da ocorrência do segundo *crossover*, a frequência de recombinação homóloga não é baixa ou ineficiente no loco em questão.

Embora o metabolismo de aminoácidos aromáticos seja totalmente desconhecido em *M. smegmatis*, é provável que, como *M. tuberculosis*, fenilalanina e tirosina sejam transportadas para o interior celular, pois um transportador de aminoácidos aromáticos está presente em *M. smegmatis*, conforme a anotação prévia do genoma (<http://www.tigr.org>). Assim, torna-se complexo explicar por que o gene MSM *aroQ* não pode ser inativado, ainda mais com a existência de um segundo gene de CM nessa micobactéria (o qual é funcional e pode ser inativado). É possível, no entanto, que o produto do gene *aroQ* represente a CM fisiologicamente dominante no metabolismo de *M. smegmatis*. E, como sugerido para *M. tuberculosis*, também é possível que a proteína MSM AroQ se associe *in vivo* a outra enzima, formando um complexo bifuncional cuja função seria essencial. Além disso, como parece haver uma rota extracelular completa de biossíntese de fenilalanina em *M. smegmatis*, é provável que a mesma sirva a um propósito específico, não sendo capaz de suprir adequadamente a demanda citoplasmática de tal aminoácido.

De qualquer forma, o que se conclui é que a regulação da biossíntese dos aminoácidos aromáticos deve ser complexa e variar em certo grau entre as micobactérias. Em *M. tuberculosis*, exposta a baixos níveis nutricionais dentro dos macrófagos, o metabolismo está primariamente adaptado a longos períodos de escassez de compostos, incluindo aminoácidos aromáticos (cuja biossíntese

poderia, especulativamente, ser ativada durante a latência). Há muitas evidências a favor, como a observação de que mutantes de *M. tuberculosis* auxotróficos para leucina, triptofano e arginina não sobrevivem ou se multiplicam no interior de macrófagos (Hondalus *et alii*, 2000; Smith *et alii*, 2001; Gordhan *et alii*, 2002). Em *M. smegmatis*, o modo de vida saprofítico e competitivo certamente impõe outras adaptações metabólicas, principalmente quando se leva em conta que a biossíntese dos aminoácidos aromáticos é extremamente custosa em termos energéticos e o *pool* intracelular de corismato deve ser regulado de forma eficiente, contemplando todas as rotas bioquímicas e enzimas que dependem desse composto para a síntese de metabólitos-chave.

Das quatro linhagens DCO mutantes derivados de Possum7, uma foi escolhida para caracterização bioquímica e microbiológica. Esta linhagem, denominada Possum7-1, também foi complementada com o plasmídeo pINT3+aroQCC3, que contém o promotor nativo e a seqüência codificante do gene *aroQ* de *M. tuberculosis* (**Figura 3.15**). O vetor de complementação pINT3 se integra em cópia única no cromossomo micobacteriano; dessa forma, não se observam efeitos advindos da superexpressão de genes clonados em vetores replicativos (Roberts *et alii*, 2003).

No gráfico da **Figura 3.31**, pode-se observar que, em meio Lemco, não há diferença significativa entre as taxas de crescimento da linhagem selvagem *M. smegmatis* mc²155, do mutante Possum7-1 e do mutante Possum7-1 complementado. No entanto, em meio M9 suplementado com 20 mM de glicose, na ausência de 40 µg/ml de cada aminoácido aromático (fenilalanina, tirosina e triptofano), o mutante Possum7-1 apresenta uma taxa de crescimento

ligeiramente menor que a do tipo selvagem e do mutante Possum7-1 complementado, embora isso não configure um defeito de crescimento (**Figura 30.32**). Nessa última condição, fica ainda evidente que o produto do gene *aroQ* de *M. tuberculosis* é ativo em células de *M. smegmatis*.

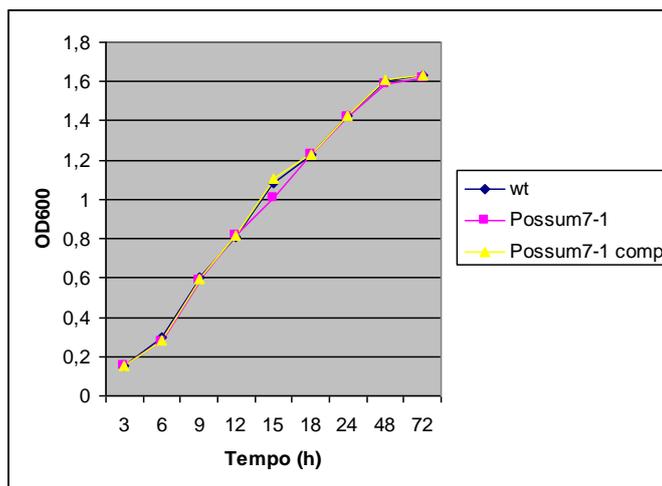


Figura 3.31. Curvas de crescimento da linhagem selvagem *M. smegmatis* mc²155 (wt), do mutante Possum 7-1 e do mutante Possum7-1 complementado com o gene MTB *aroQ* (Possum7-1 comp) em meio Lemco.

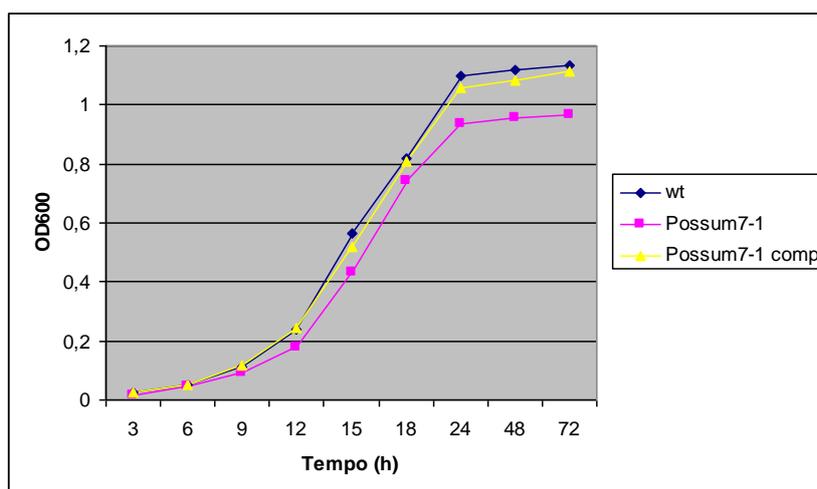


Figura 3.32. Curvas de crescimento da linhagem selvagem *M. smegmatis* mc²155 (wt), do mutante Possum 7-1 e do mutante Possum7-1 complementado com o gene MTB *aroQ* (Possum7-1 comp) em meio M9 suplementado com 20 mM de glicose e ausência de aminoácidos aromáticos.

Em M9 suplementado com 20 mM de glicose e 40 µg/ml de cada um dos três aminoácidos aromáticos, não há diferença significativa entre as taxas de crescimento do tipo selvagem, do mutante Possum7-1 e do mutante Possum7-1 complementado, as quais são ligeiramente superiores às apresentadas no gráfico da **Figura 3.32** (dados não mostrados).

A fim de detectar possíveis diferenças nos níveis de atividade de CM em extratos brutos de células de *M. smegmatis* mc²155, do mutante Possum7-1 e do mutante Possum7-1 complementado, foi desenvolvido um protocolo experimental em que, após crescimento de cada linhagem em M9 suplementado com 20 mM de glicose (na ausência de aminoácidos aromáticos), as mesmas foram lisadas por tratamento combinado de lisozima e sonicação (Parish & Wheeler, 1998). As frações citoplasmática e 'periplasmática' não foram separadas por esse protocolo, medindo-se a atividade total de CM presente nos extratos celulares.

O protocolo se mostrou reprodutível, e, como mostrado na **Tabela 3.5**, há uma pequena diminuição da atividade enzimática total de CM no extrato bruto de células do mutante Possum7-1, em comparação às medidas em *M. smegmatis* mc²155 e no mutante Possum7-1 complementado, quando crescidas em M9 contendo 20 mM de glicose e sem aminoácidos aromáticos.

Tabela 3.5. Medida da atividade enzimática total de CM em extratos brutos de células de *M. smegmatis* crescidas em M9 + 20 mM de glicose.

Extrato celular	Atividade total de CM (U) ^c	Razão linhagem teste/controle (%)
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 ^a	8,12	100
Possum7-1	7,658	94,31
Possum7-1 comp ^b	8,073	99,42

^aControle: linhagem *M. smegmatis* mc²155.

^bMutante Possum7-1 complementado.

^cA medida da atividade total de CM é expressa em unidades (nmol de produto por min) por 50 ml de cultura crescida em M9 contendo 20 mM de glicose.

Em conclusão, embora a linhagem mutante Possum7-1 exiba uma taxa de crescimento e atividade total de CM ligeiramente menores em comparação às apresentadas pela linhagem *M. smegmatis* mc²155 e pelo mutante Possum7-1 complementado, essa diferença não é significativa, indicando que, nas condições testadas, a proteína AroQ provavelmente constitui a principal CM presente em *M. smegmatis*. Além disso, a mesma também é capaz de compensar a falta do produto do gene **aroQ* na respectiva linhagem mutante.

3.3. Estudo da região promotora dos genes *aroQ* e **aroQ* de *M. tuberculosis*

Tendo em vista a existência de duas CMs monofuncionais (ao menos *in vitro*) em *M. tuberculosis* e a possibilidade de que sejam diferencialmente reguladas, buscou-se estudar a atividade das regiões promotoras dos genes MTB *aroQ* e MTB **aroQ* em células de *M. smegmatis* crescidas em diferentes condições. Os resultados iniciais sugerem que, nas várias condições experimentais testadas, os promotores do gene MTB *aroQ* e do operon *fbpB* (que contém o gene MTB **aroQ*) são constitutivamente expressos, e que, se houver regulação *in vivo*, ela é discreta. Outro resultado interessante é que, além do promotor do operon *fbpB*, o gene MTB **aroQ* possui seu próprio RBS e uma seqüência promotora com atividade *in vitro* comparável à do operon.

Cabe ressaltar que não há nenhum estudo que analise a atividade e/ou a expressão dos genes de CM em *M. tuberculosis*. Dessa forma, os dados a seguir apresentados constituem um primeiro passo para o entendimento da função e regulação dos mesmos no bacilo da TB.

3.3.1. Amplificação e clonagem da seqüência promotora do gene *aroQ*, do operon *fbpB* e da região intergênica *fbpB*-**aroQ*

Como anteriormente descrito e representado na **Figura 3.10** e na **Figura 3.12**, o gene MTB *aroQ* é provavelmente monocistrônico, enquanto o gene MTB **aroQ* faz parte de um operon de seis genes. O operon *fbpB*, que contém o gene MTB **aroQ*, é composto por genes importantes ao metabolismo e à virulência de *M. tuberculosis*: *fbpB* (que codifica o antígeno secretado 85B, envolvido na biogênese de dimicolato de trealose), *rpfC* (que codifica um fator que promove a reativação de células dormentes) e *lppE* (que codifica uma lipoproteína conservada) (**Figura 3.12**). A função das ORFs Rv1883c e Rv1882c ainda não foi experimentalmente determinada. Em uma análise preliminar, observou-se que, entre os genes *fbpB* e **aroQ* de *M. tuberculosis*, há uma pequena região intergênica de 18 bp. Da mesma forma, ocorre um provável RBS (5'-GGCGC-3') imediatamente *upstream* à região codificante do gene MTB **aroQ*, o qual não é considerado na anotação original do genoma de *M. tuberculosis* (Cole *et alii*, 1998). Isso nos levou a supor que, além da seqüência promotora do operon *fbpB*, também houvesse um segundo promotor para o gene MTB **aroQ*.

Para testar tanto essa hipótese como a atividade da região promotora do gene monocistrônico MTB *aroQ*, as seqüências de DNA *upstream* a cada gene, MTB *aroQ* e MTB **aroQ*, bem como ao operon *fbpB*, foram amplificadas por PCR e clonadas no vetor pSM128, que contém o gene repórter *lacZ* (Dussurget *et alii*, 1999). Na **Figura 3.33**, estão indicadas as seqüências de DNA *upstream* a cada região gênica/intergênica usadas na construção dos plasmídeos repórteres

baseados em pSM128, os quais foram posteriormente eletroporados em *M. smegmatis* para a medida da atividade enzimática de β -galactosidase. A seqüência promotora do operon *fbpB*, contendo 215 bp, foi denominada P1, e a região intergênica *fbpB*-**aroQ*, contendo 267 bp, foi denominada P2.

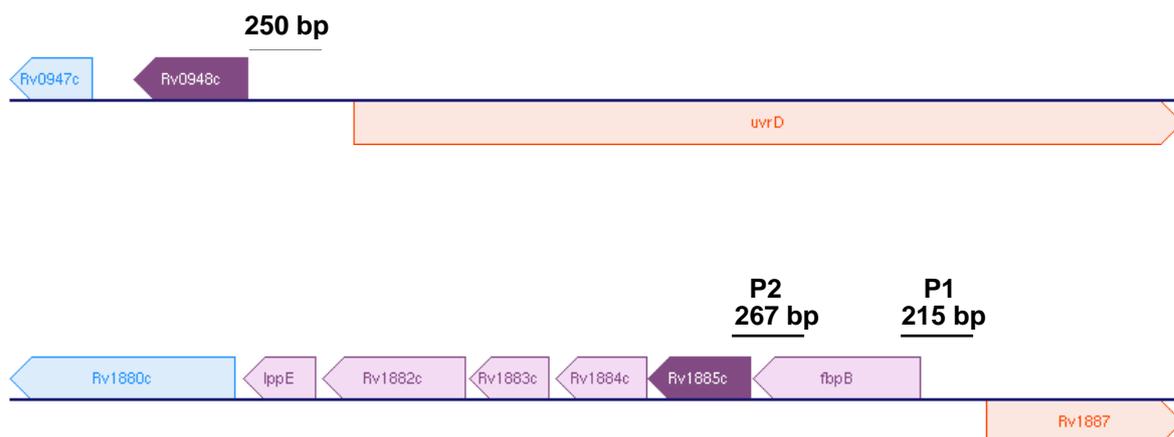


Figura 3.33. Construções usadas na análise da atividade promotora do gene *aroQ*, do operon *fbpB* (P1) e da região intergênica *fbpB*-**aroQ* (P2) de *M. tuberculosis*. Aproximadamente 200 bp *upstream* a cada região gênica/intergênica (juntamente com uma quantidade variável de DNA da extremidade 5') foram amplificados por PCR e clonados na orientação direta e reversa no vetor pSM128, que contém o gene repórter *lacZ*.

Na **Figura 3.34**, está mostrada uma das construções realizadas, a clonagem do provável promotor P2, contendo a região intergênica *fbpB*-**aroQ* de *M. tuberculosis*, no vetor pSM128.

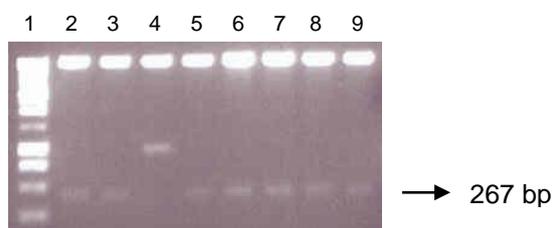


Figura 3.34. Clonagem do provável promotor P2, contendo a região intergênica *fbpB*-**aroQ* de *M. tuberculosis*, no vetor pSM128. 1: MM; 2, 3 e 5 a 9: plasmídeos recombinantes pSM128-**aroQ* clivados com *KpnI*. Em 4, observa-se a clonagem de um fragmento originado da ligação em *tandem* de P2.

3.3.2. Eletroporação de *M. smegmatis* mc²155 e isolamento de mutantes

Uma vez construídos os plasmídeos repórteres pSM128-*aroQ*, pSM128-*fbpB* e pSM128-**aroQ*, os mesmos foram individualmente eletroporados em células de *M. smegmatis*. O vetor pSM128 é um vetor integrativo baseado no micobacteriófago L5, e se insere em cópia única no genoma de micobactérias (Dussurget *et alii*, 1999). Os transformantes eletroporados com o vetor pSM128 (controle), pSM128-*aroQd*, pSM128-*fbpBd* e pSM128-**aroQd* foram selecionados em placas de Lemco com estreptomicina, tendo sido obtido um grande número de transformantes para cada construção (os quais estão listados na **Tabela 3.6**). Três transformantes independentes para cada plasmídeo recombinante foram testados, em duplicata, quanto à atividade promotora em várias condições experimentais: Lemco, meio mínimo e meio mínimo suplementado com concentrações variáveis de fenilalanina, tirosina e/ou triptofano (1 a 5 mM). Em seguida, os extratos brutos de células de *M. smegmatis* contendo cada plasmídeo repórter foram preparados segundo o método de Parish & Wheeler (1998), e mediu-se a atividade de β -galactosidase.

Tabela 3.6. Linhagens transformantes derivadas de *M. smegmatis* contendo os plasmídeos repórteres pSM128-*aroQ*, pSM128-*fbpB* e pSM128-**aroQ* usados na análise da atividade promotora.

Linhagem transformante	Plasmídeo repórter integrado	Orientação do promotor ^a
CAN1	pSM128- <i>aroQr</i>	reversa
CAN2	pSM128- <i>aroQd</i>	direta
PAN1	pSM128- <i>fbpBd</i>	direta
PAN2	pSM128- <i>fbpBr</i>	reversa
PAN3	pSM128- <i>*aroQd</i>	direta
PAN4	pSM128- <i>*aroQr</i>	reversa

^aEm relação ao gene repórter *lacZ* de pSM128.

3.3.3. Análise da atividade promotora

As linhagens derivadas de *M. smegmatis* contendo os plasmídeos repórteres pSM128 (controle), pSM128-*aroQd*, pSM128-*fbpBd* e pSM128-**aroQd* estão listadas na **Tabela 3.6**. Os transformantes contendo promotores de *M. tuberculosis* na orientação reversa (em relação ao gene repórter *lacZ* de pSM128) foram incluídos como controle adicional na realização dos experimentos. Primeiramente, cada linhagem transformante de *M. smegmatis* foi crescida em Lemco e testada quanto à atividade de β -galactosidase. Os resultados estão apresentados no gráfico da **Figura 3.35**.

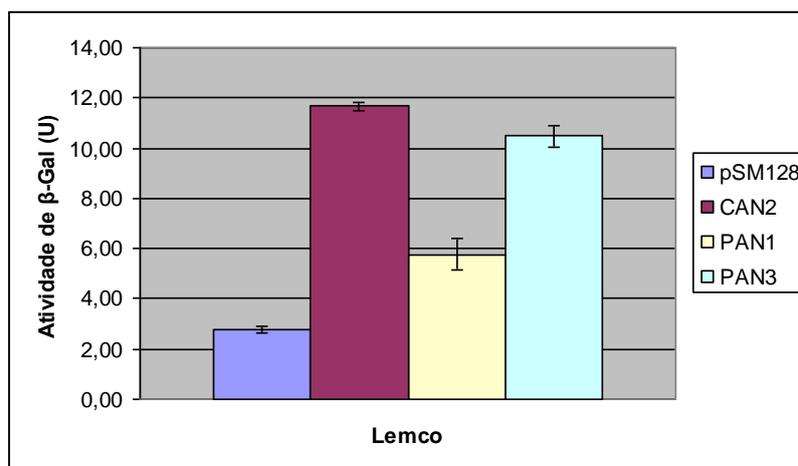


Figura 3.35. Análise da atividade promotora do gene *aroQ* (CAN2), do operon *fbpB* (PAN1) e do gene **aroQ* (PAN3) de *M. tuberculosis* em células de *M. smegmatis* crescidas em Lemco. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de três transformantes independentes, ensaiados em duplicata para a atividade de β -galactosidase (β -Gal). Uma unidade (U) de β -Gal equivale a 1 nmol de *o*-nitrofenilgalactopiranosídeo produzido por min por mg de proteína.

A análise quantitativa da atividade promotora das seqüências de DNA testadas, usando o sistema promotor clonado-*lacZ* no vetor integrativo pSM128,

mostrou que em meio enriquecido (Lemco) todas apresentam níveis detectáveis de expressão: $11,66 \pm 0,189$ para o gene *aroQ* (CAN2), $5,76 \pm 0,623$ para o operon *fbpB* (PAN1) e $10,47 \pm 0,439$ para o gene **aroQ* (PAN3) de *M. tuberculosis*, como mostrado na **Figura 3.35**. Em uma escala arbitrária, os promotores dos genes *aroQ* e **aroQ* foram considerados fracos, e o promotor do operon *fbpB* muito fraco. Portanto, comprovou-se que o provável promotor P2, contendo a região intergênica *fbpB-*aroQ* de *M. tuberculosis*, possui, de fato, atividade promotora no sistema testado. O fato de o promotor do operon *fbpB* (P1) ter atividade muito fraca é significativo, principalmente quando comparado à atividade do promotor do gene **aroQ* (P2).

Como a condição inicial testada foi meio enriquecido, especulou-se que, em meio mínimo, pudessem ser observadas algumas variações. Para verificar essa hipótese, as mesmas linhagens derivadas de *M. smegmatis* foram crescidas em meio mínimo suplementado com 20 mM de glicose (**Figura 3.36**).

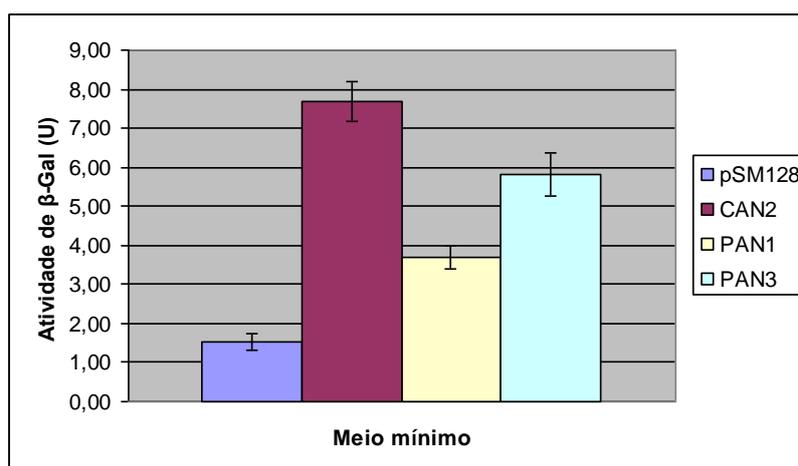


Figura 3.36. Análise da atividade promotora do gene *aroQ* (CAN2), do operon *fbpB* (PAN1) e do gene **aroQ* (PAN3) de *M. tuberculosis* em células de *M. smegmatis* crescidas em meio mínimo. Cada valor representa a média \pm desvio padrão de três transformantes independentes, ensaiados em duplicata para a

atividade de β -galactosidase (β -Gal). Uma unidade (U) de β -Gal equivale a 1 nmol de *o*-nitrofenilgalactopiranosídeo produzido por min por mg de proteína.

Como mostrado no gráfico da **Figura 3.36**, embora a atividade dos promotores de *M. tuberculosis* seja menor em meio mínimo (em comparação à observada em meio enriquecido), deve-se levar em conta que, nessa condição, o crescimento celular é restrito, o que poderia sugerir uma possível ativação dos respectivos promotores. Entretanto, esse não parece ser o caso, pois os níveis de expressão de todos os promotores é mais ou menos equivalente aos observados em Lemco, e a pequena diminuição da atividade não chega a ser significativa. Novamente, na condição testada, o promotor P2 de *M. tuberculosis* se mostrou funcional e com atividade promotora superior à do promotor P1.

Em seguida, as linhagens derivadas de *M. smegmatis* contendo cada plasmídeo repórter foram crescidas em meio mínimo suplementado com 20 mM de glicose e 1 mM de fenilalanina, 1 mM de tirosina ou 1 mM de triptofano. O objetivo era verificar se a transcrição dos genes *aroQ* e **aroQ* e do operon *fbpB* de *M. tuberculosis* é controlada pela presença de aminoácidos aromáticos. Os níveis de atividade promotora das linhagens CAN2, PAN1 e PAN3 crescidas em meio mínimo suplementado com 20 mM de glicose e 1 mM de fenilalanina ou 1 mM de tirosina são comparáveis aos observados em células crescidas em meio mínimo na ausência desses aminoácidos (dados não mostrados). Observou-se um leve incremento da atividade promotora, que pode ser explicado pelo aumento, em baixo nível, da taxa de crescimento celular, devido à adição de cada aminoácido no meio de cultura. Quando as células foram crescidas em meio mínimo suplementado com 20 mM de glicose e 1 mM de triptofano, contudo,

houve um aumento razoável dos níveis de atividade promotora, principalmente nas linhagens derivadas de *M. smegmatis* contendo os plasmídeos repórteres pSM128-*aroQ* e pSM128-**aroQ*, sugerindo que os promotores desses genes podem estar sujeitos a um certo nível de regulação, nas condições testadas. Os resultados estão apresentados no gráfico da **Figura 3.37**.

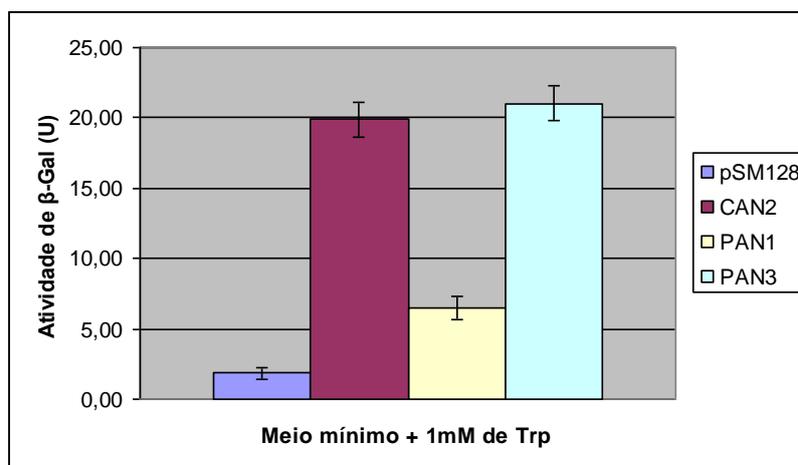


Figura 3.37. Análise da atividade promotora do gene *aroQ* (CAN2), do operon *fbpB* (PAN1) e do gene **aroQ* (PAN3) de *M. tuberculosis* em células de *M. smegmatis* crescidas em meio mínimo suplementado com 1 mM de triptofano (Trp). Cada valor representa a média \pm desvio padrão de três transformantes independentes, ensaiados em duplicata para a atividade de β -galactosidase (β -Gal). Uma unidade (U) de β -Gal equivale a 1 nmol de *o*-nitrofenilgalactopiranosídeo produzido por min por mg de proteína.

Na última série de condições testadas, as células de *M. smegmatis* contendo cada construção promotor clonado-*lacZ* foram crescidas em meio mínimo suplementado com 5 mM de fenilalanina, tirosina ou triptofano. Não foi observado nenhum nível significativo de repressão quando da adição de 5 mM de fenilalanina ou tirosina no meio de cultura, embora tenha sido detectado um aumento geral da atividade promotora. Novamente, isso pode ser um resultado indireto do aumento da taxa de crescimento celular, devido à adição de cada

aminoácido no meio de cultura. Na **Figura 3.38A**, é apresentado o resultado para a suplementação de meio mínimo com 5 mM de fenilalanina (os resultados com 5 mM de tirosina são equivalentes). A adição de 5 mM de triptofano no meio de cultura resultou em um aumento significativo da atividade promotora, principalmente do promotor do gene **aroQ*, o qual, como observado no caso da adição de 1 mM de triptofano, exibe níveis de expressão comparáveis ao do gene *aroQ* (**Figura 3.38B**). Esse último dado demonstra, inequivocadamente, que a região intergênica *fbpB*-**aroQ* de *M. tuberculosis* constitui um promotor ativo, e que o mesmo apresenta um certo nível de regulação por triptofano.

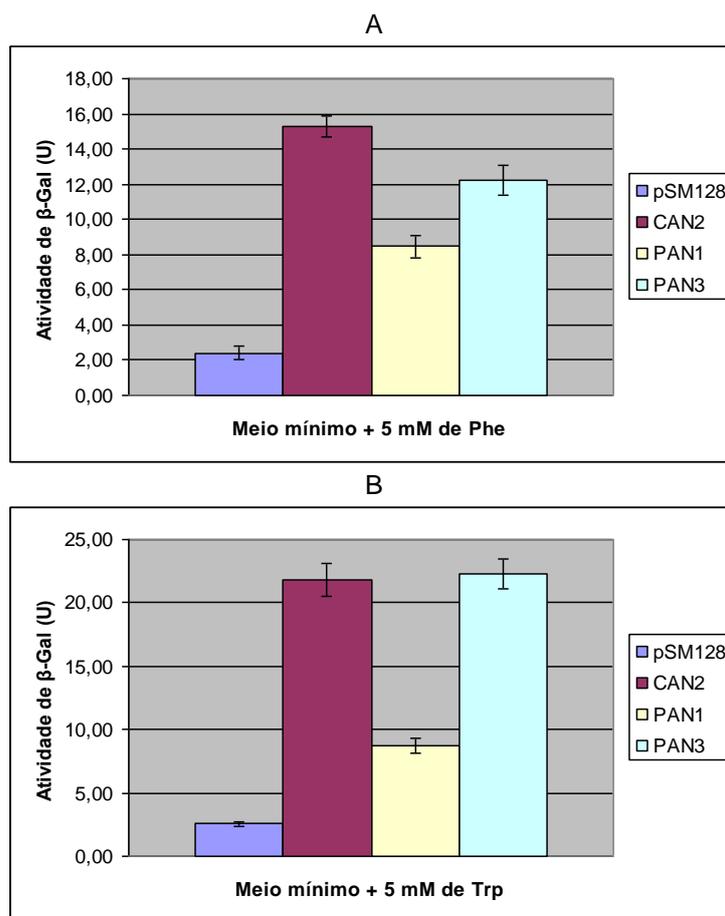


Figura 3.38. Análise da atividade promotora do gene *aroQ* (CAN2), do operon *fbpB* (PAN1) e do gene **aroQ* (PAN3) de *M. tuberculosis* em células de *M.*

smegmatis crescidas em meio mínimo suplementado com (A) 5 mM de fenilalanina (Phe) ou (B) 5 mM de triptofano (Trp). Cada valor representa a média \pm desvio padrão de três transformantes independentes, ensaiados em duplicata para a atividade de β -galactosidase (β -Gal). Uma unidade (U) de β -Gal equivale a 1 nmol de *o*-nitrofenilgalactopiranosídeo produzido por min por mg de proteína.

O emprego da CM na biossíntese de fenilalanina e tirosina nos microrganismos mostra uma alta diversidade em termos de número de isoenzimas, propriedades regulatórias e associação com outros domínios catalíticos, freqüentemente formando complexos bifuncionais ou multifuncionais. Na maioria das vezes, a regulação de uma rota biossintética ocorre na primeira etapa da via, em nível transcricional e/ou de atividade enzimática. Assim, as enzimas que iniciam as várias rotas metabólicas a partir do corismato desempenham um papel central no metabolismo de compostos aromáticos e na regulação da distribuição desse precursor comum (Dosselaere & Vanderleyden, 2001). Para o funcionamento correto das rotas metabólicas que partem de corismato, a integração entre os mecanismos que controlam os processos de transcrição, tradução e atividade enzimática é essencial, e certamente existem diferentes níveis de complexidade regulatória nas micobactérias. Como anteriormente mencionado, a regulação da via do chiquimato e das rotas metabólicas *downstream* ao corismato é vital aos microrganismos em termos energéticos, sendo a biossíntese dos aminoácidos aromáticos particularmente custosa. E, uma vez que as bactérias podem direcionar até 90% da energia metabólica para a síntese de proteínas, os aminoácidos aromáticos representam a quase totalidade da síntese de compostos aromáticos. Portanto, os mecanismos regulatórios que controlam a atividade da via do chiquimato estão intimamente relacionados às concentrações celulares de fenilalanina, tirosina e triptofano

(Herrmann, 1995). Além disso, fenilalanina e tirosina derivam de um segundo precursor comum, o prefenato, e a regulação da biossíntese desses dois aminoácidos pode apresentar mecanismos compartilhados de controle na etapa de conversão de corismato em prefenato.

Acredita-se que, no interior dos macrófagos, a disponibilidade de nutrientes e aminoácidos é bastante limitada, e *M. tuberculosis* deve se adaptar a essa condição específica, principalmente durante o período de latência. Em um estudo em que foi avaliada a sobrevivência em longo prazo, em condições de privação de nutrientes, de mutantes de *M. tuberculosis* auxotróficos para triptofano, histidina e prolina, detectou-se que os dois primeiros não são capazes de sobreviver à privação *in vitro* do respectivo aminoácido (Parish, 2003). Além disso, o crescimento desses dois mutantes auxotróficos também é restrito *in vivo* em macrófagos, e a expressão dos promotores dos genes *trpD*, *trpE* e *trpE2* (relacionados à biossíntese de triptofano) de *M. tuberculosis* é constitutiva.

Nas condições testadas, a atividade dos promotores do gene *aroQ*, do operon *fbpB* e do gene **aroQ* de *M. tuberculosis* parece, no sistema baseado em pSM128, ser constitutiva, como observado no crescimento das linhagens CAN2, PAN1 e PAN3 em Lemco, meio mínimo e meio mínimo suplementado com 1 mM ou 5 mM de fenilalanina ou tirosina. No crescimento das mesmas linhagens em meio mínimo suplementado com 1 mM ou 5 mM de triptofano, há uma aparente indução da atividade dos promotores do gene MTB *aroQ* e em especial do gene MTB **aroQ*, a qual em termos comparativos não chega, no entanto, a ser marcante. Os resultados obtidos estão de acordo com o padrão geral que, acredita-se, caracteriza *M. tuberculosis*, em que os genes de biossíntese de

aminoácidos são constitutivamente expressos. No presente caso, a principal evidência para tal é que a adição de concentrações variáveis (1 mM ou 5 mM) de fenilalanina ou tirosina ao meio de cultura não resulta na diminuição da atividade promotora dos genes MTB *aroQ* e MTB **aroQ*.

No caso dos promotores dos genes *trpD* e *trpE* de *M. tuberculosis* (embora tenha se utilizado Middlebrook 7H9 no experimento), também não se observa indução ou repressão mediante a adição de até 40 µg/ml de triptofano no meio de cultura, e a atividade desses promotores é muito baixa (*trpD*) ou baixa (*trpE*) (Parish, 2003). Em *Streptomyces coelicolor*, um actinomiceto filogeneticamente próximo a *M. tuberculosis*, o operon *trp* é primariamente regulado pela fase de crescimento, e não pela disponibilidade de triptofano (Hu *et alii*, 1999). Isso pode explicar a aparente indução observada para os promotores dos genes MTB *aroQ* e MTB **aroQ* em meio mínimo suplementado com 1 mM ou 5 mM de triptofano. Portanto, diferentemente de *E. coli* e outras bactérias, em que a biossíntese dos aminoácidos aromáticos é geralmente regulada de forma significativa em nível transcricional, o mesmo parece não ocorrer em micobactérias.

Se, pelo contrário, houver regulação transcricional *in vivo* da biossíntese de fenilalanina e tirosina em *M. tuberculosis*, quanto aos genes de CM, ela é discreta. Recentemente, Seliverstov *et alii* (2005) analisaram vários elementos que controlam a biossíntese de triptofano, cisteína e leucina em actinomicetos, para os quais foram encontradas seqüências conservadas *upstream* à região codificante dos genes desses operons. Não foram encontradas seqüências regulatórias conservadas *upstream* aos genes dos operons de fenilalanina e tirosina em *M. tuberculosis* e outras micobactérias (como *M. bovis*, *M. leprae* e *M.*

marinum). E, embora a regulação alostérica da proteína *AroQ de *M. tuberculosis* ainda seja motivo de debate, há evidências circunstanciais indicando que a atividade da mesma é influenciada pela concentração celular de fenilalanina, tirosina e triptofano (Prakash *et alii*, 2005; Qamra *et alii*, 2006).

A atividade dos promotores dos genes MTB *aroQ* e MTB **aroQ* foi considerada baixa, e, em comparação ao estudo realizado com os promotores dos genes *trpD* e *trpE* de *M. tuberculosis*, está dentro do esperado: no estudo de Parish (2003), usando Middlebrook 7H9, o promotor do gene *trpD* apresenta atividade de $2,8 \pm 0,8$ U de β -galactosidase, e o do gene *trpE* de $16,3 \pm 2,6$ U de β -galactosidase. Os níveis de atividade são semelhantes quando o meio é suplementado com 40 μ g/ml de triptofano. A baixa atividade apresentada pelos promotores dos genes *aroQ* e **aroQ* e do operon *fbpB* de *M. tuberculosis* pode ser explicada por várias razões, começando que, durante a realização dos experimentos, não foram analisados pontos específicos ao longo do crescimento em Lemco e meio mínimo, e sim a atividade promotora total após um período de crescimento definido. Em segundo lugar, embora tenha sido usado meio mínimo, mesmo nessa condição ainda há uma certa abundância de fontes de carbono e nitrogênio: se a fonte de nitrogênio tivesse sido precisamente manipulada, talvez o resultado final fosse diferente (Pashley *et alii*, 2006). Finalmente, há um relato na literatura indicando que, em certas condições, o uso do sítio de integração do micobacteriófago L5, em que se baseia o vetor pSM128, não é favorável para a transcrição de alguns genes integrados a partir de seus promotores nativos, os quais não seriam expressos de forma eficiente e/ou correta (Murry *et alii*, 2005). Esse dado é discutível, pois, no presente trabalho, foram incluídas como controle

linhagens derivadas de *M. smegmatis* em que os respectivos promotores de *M. tuberculosis* estavam clonados na orientação reversa (em relação ao gene repórter *lacZ* de pSM128); o nível de atividade de β -galactosidase para essas construções foi idêntico ao do plasmídeo pSM128, mostrando que as construções na orientação direta são efetivamente funcionais.

De qualquer forma, o fato mais significativo, no presente estudo, é a demonstração de que a seqüência de DNA contendo a região intergênica *fbpB*-**aroQ* de *M. tuberculosis* possui atividade promotora em nível próximo ou igual ao do gene MTB *aroQ*. Em comparação à atividade promotora muito fraca do operon *fbpB*, esse dado pode parecer contraditório, mas deve-se considerar que, em bactérias, muitos genes são regulados por múltiplos promotores, e vários estudos vêm indicando que *M. tuberculosis* não é uma exceção (Smith *et alii*, 2005). Além disso, o gene *rpfC* (*Rv1884c*) de *M. tuberculosis*, que faz parte do operon *fbpB* e se situa imediatamente *downstream* ao gene **aroQ*, parece ser diretamente regulado pelo fator σ alternativo SigD (Raman *et alii*, 2004). O mesmo ocorre com o gene seguinte do operon, *Rv1883c*, que codifica uma proteína hipotética conservada. Como o gene MTB **aroQ*, o gene *Rv1883c* também possui um RBS próprio em potencial. Essas particularidades sugerem que, em certas situações, os genes de CM podem ser diferencialmente regulados em *M. tuberculosis*, como, por exemplo, durante fases específicas da infecção. Cabe mencionar que, em *S. typhimurium*, o gene **aroQ* é induzido *in vivo*; contudo, sua importância durante a infecção ainda é desconhecida (Bumann, 2002).

Por fim, o fato de que o promotor do gene MTB *aroQ* é constitutivamente expresso em todas as condições testadas é relevante, uma vez que corrobora os

dados de essencialidade – indicando que a atividade de CM é constantemente necessária e que, provavelmente, a respectiva proteína MTB AroQ representa a forma dominante no metabolismo de fenilalanina e tirosina em *M. tuberculosis*.

3.4. Fosforilase de nucleosídeos purínicos em *M. tuberculosis*

O gene *deoD* de *M. tuberculosis*, cujo produto pode supostamente estar relacionado a mecanismos que participam da regulação da latência em micobactérias, ainda que de forma indireta, também foi investigado em termos genéticos. Para tal, um plasmídeo suicida contendo as regiões flanqueadoras *upstream* e *downstream* ao gene *deoD* de *M. tuberculosis* foi construído, segundo um método análogo ao descrito para a mutagênese por troca alélica dos genes MTB *aroQ* e MTB **aroQ* (item 3.1.3). Em seguida, este plasmídeo foi eletroporado em células de *M. tuberculosis*, para que ocorresse a substituição gênica do alelo *deoD* selvagem por uma versão mutante. Na etapa final de isolamento de mutantes, procurou-se avaliar a efetiva participação da PNP durante o estágio de latência do bacilo e a importância dessa enzima à via de salvamento das purinas – cujos dados na literatura ainda são escassos.

3.4.1. Construção do plasmídeo suicida p2NIL+deoDLR1.8

Na **Figura 3.39**, é mostrada a localização genômica do gene *deoD* (*Rv3307*) em *M. tuberculosis*, o qual provavelmente constitui um operon de dois genes com o gene *pmmB*, que codifica uma fosfomanomutase. Uma deleção *in-*

frame, não marcada, em que 95% da região codificante do gene *deoD* é eliminada, foi produzida na construção do respectivo alelo mutante de *M. tuberculosis*, de forma a não interferir na transcrição do operon e de genes adjacentes. Na criação da deleção, foi utilizada a técnica de *overlap PCR*, e as seqüências correspondentes aos oito primeiros e oito últimos aminoácidos das extremidades N-terminal e C-terminal da região codificante do gene *deoD* de *M. tuberculosis* foram unidas, juntamente com o DNA flanqueador *upstream* e *downstream*.

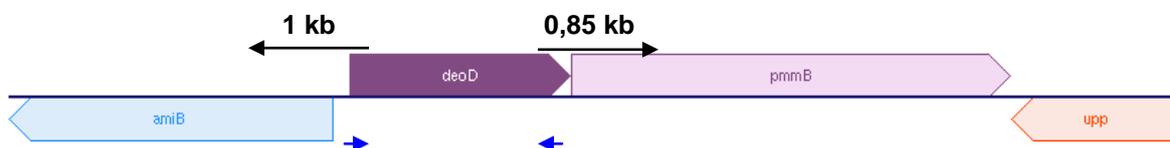


Figura 3.39. Localização genômica do gene *deoD* (*Rv3307*) em *M. tuberculosis*, mostrando as regiões flanqueadoras *upstream* (cerca de 1 kb) e *downstream* (cerca de 0,85 kb) usadas na construção do plasmídeo suicida p2NIL+deoDLR1.8. As setas pequenas, em azul, indicam *primers* usados na caracterização de linhagens.

O fragmento de cerca de 1,85 kb gerado dessa forma foi projetado a fim de criar uma deleção de 780 bp na seqüência codificante do gene-alvo de *M. tuberculosis*, sendo clonado no sítio de restrição *Bam*HI do vetor p2NIL. O inserto do plasmídeo escolhido para a etapa final da construção (p2NIL+deoDB5) foi inteiramente seqüenciado, não apresentando mutações na seqüência nucleotídica (dados não mostrados). Ao plasmídeo p2NIL+deoDB5 foi ligado o cassete de *PacI* contendo marcadores de seleção e o gene *sacB* do vetor pGOAL19, gerando o plasmídeo suicida p2NIL+deoDLR1.8. Como a presença do gene *sacB* pode, durante as etapas de clonagem em *E. coli*, tornar o plasmídeo instável, ocasionando deleções e rearranjos, duas versões do plasmídeo suicida

p2NIL+deoDLR1.8 foram utilizadas nas eletroporações em *M. tuberculosis*, uma em que o cassete de *Pacl* encontra-se clonado na orientação direta (denominada p2NIL+deoDLR1.8 D1) e outra em que o cassete encontra-se clonado na orientação reversa (denominada p2NIL+deoDLR1.8 D6), como mostrado na **Figura 3.40**.

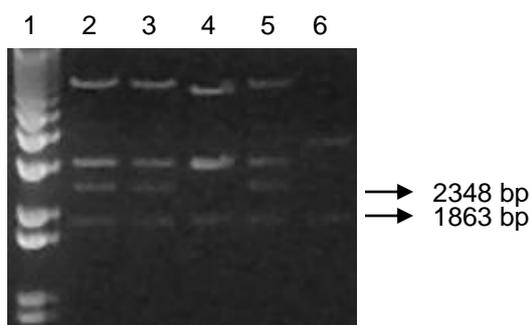


Figura 3.40. Construção do plasmídeo suicida p2NIL+deoD1.8 D6, contendo um alelo mutante com uma deleção de 780 bp na seqüência codificante do gene *deoD* (*Rv3307*) de *M. tuberculosis*. 1: MM; 2: p2NIL+deoD1.8 D6 clivado com *EcoRI*; 3 a 6: prováveis recombinantes clivados com *EcoRI*. Em 4 e 6, pode-se observar plasmídeos em que provavelmente ocorreu instabilidade devido à presença do gene *sacB* de *B. subtilis*.

3.4.2. Eletroporação de *M. tuberculosis* H37Rv e isolamento de mutantes

Cerca de 5 µg de DNA de cada versão do plasmídeo suicida p2NIL+deoD1.8 (D1 e D6) foram separadamente eletroporados em células de *M. tuberculosis* H37Rv. Após cerca de 5 semanas de incubação a 37°C, colônias azuis Hyg^r Kan^r (SCOs) foram obtidas para ambas as construções, D1 (3 colônias) e D6 (3 colônias), em Middlebrook 7H10. Como as colônias derivadas de D1 eram menores que as derivadas de D6, indicando uma taxa de crescimento mais baixa, as primeiras foram incubadas a 37°C por até 7 semanas.

Em seguida, colônias individuais, D1 e D6, foram semeadas em 7H10 na ausência de antibióticos, para que o segundo evento de recombinação homóloga ocorresse. Após 2 semanas de incubação a 37°C, observou-se somente o crescimento da colônia D6. Contudo, a colônia D1 pôde ser visualizada após cerca de 3 semanas de incubação a 37°C, novamente indicando que sua taxa de crescimento era mais baixa, em comparação à da colônia D6. Na etapa seguinte de contra-seleção, as colônias foram semeadas em placas de 7H10 com e sem sacarose. Após 4 semanas de incubação a 37°C, colônias D6 brancas resistentes a sacarose foram obtidas; no entanto, não se observou o crescimento de nenhuma colônia D1 nessa etapa do experimento. A contra-seleção com sacarose foi repetida por mais duas vezes, incluindo também os outros dois SCOs Hyg^r Kan^r obtidos para D1 na etapa inicial. Novamente, nenhuma colônia D1 resistente a sacarose pôde ser obtida. As colônias D6 resistentes a sacarose foram então testadas quanto à sensibilidade a canamicina, para distinguir linhagens DCO Kan^s (mutantes em potencial) de mutantes espontâneos resistentes a sacarose. Aproximadamente 120 colônias D6 resistentes a sacarose foram testadas em placas de 7H10 com e sem canamicina e higromicina. O DNA genômico de quase 100 colônias Kan^s foi preparado para posterior análise por PCR e seqüenciamento.

3.4.3. Caracterização e complementação dos prováveis mutantes

Apesar de a única diferença existente entre as versões D1 e D6 do plasmídeo suicida p2NIL+deoDLR1.8 ser a orientação do cassete de *Pacl*,

colônias D1 resistentes a sacarose não puderam ser obtidas, indicando, provavelmente, que o gene *sacB* de *B. subtilis* causou algum tipo de instabilidade nesse plasmídeo. Segundo nossa hipótese, isso não teria sido detectado durante a construção do plasmídeo suicida, e, dessa forma, a expressão do gene *sacB* foi afetada na etapa de contra-seleção com sacarose.

Independentemente desse resultado, os genótipos das colônias D6 resistentes a sacarose Kan^s (DCOs) foram caracterizados por PCR de colônia, usando *primers* específicos, que permitem distinguir entre a provável linhagem DCO mutante, o tipo selvagem e SCOs, como esquematizado na **Figura 3.39**. Quase 100 mutantes em potencial para o gene *deoD* de *M. tuberculosis* foram analisados, e na **Figura 3.41** está mostrado o resultado para 24 colônias.

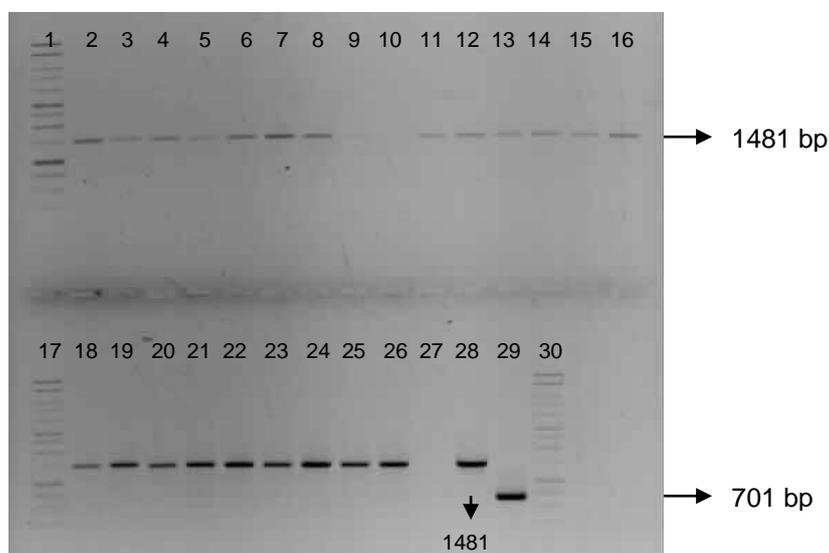


Figura 3.41. Análise por PCR de colônia das prováveis linhagens mutantes para o gene *deoD* de *M. tuberculosis*. 1, 17 e 30: MM. PCRs realizadas com 2-16 e 18-26: DNA extraído de linhagens DCO (mutantes em potencial); 27: água (controle negativo); 28: DNA genômico de *M. tuberculosis* (controle positivo); 29: DNA extraído de linhagem SCO. Um fragmento de 1481 bp (correspondente ao alelo selvagem) é visualizado em 28 e em todas as linhagens DCO analisadas. Um fragmento de 701 bp (indicando a deleção de 780 bp introduzida) é visualizado em 29. Apenas 24 linhagens DCO Kan^s representativas são mostradas.

Como mostrado na **Figura 3.41**, a análise por PCR de colônia de quase 100 linhagens DCO Kan^s revelou a presença de fragmentos de DNA correspondentes ao gene *deoD* intacto de *M. tuberculosis*, indicando que a recombinação homóloga na respectiva região cromossômica está dando origem somente ao tipo selvagem. Visto que um grande número de colônias derivadas de D6 Kan^s foi testado, sem que nenhuma linhagem DCO mutante fosse isolada, a ausência de mutantes utilizando esse método de troca alélica sugere que, nas condições testadas, o gene *deoD* é essencial ao crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis*. Contudo, segundo a técnica de mutagênese com o transposon *Himar1* (TraSH), o gene *deoD* não é classificado como essencial ao crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis* (Sasseti *et alii*, 2003).

Essa aparente contradição pode ser explicada por várias razões, a começar que a metodologia TraSH tem limitações: diversos genes considerados não essenciais a *M. tuberculosis* têm se mostrado essenciais ou importantes *in vitro*, e muitos genes comprovadamente essenciais não são representados pela técnica (Rodriguez *et alii*, 2002; Sareen *et alii*, 2003; Movahedzadeh *et alii*, 2004; Pethe *et alii*, 2004; T. Parish, comunicação pessoal). Em segundo lugar, o método de troca alélica usado no presente de trabalho, que se baseia em plasmídeos suicidas não replicativos e no isolamento de prováveis mutantes em duas etapas (favorecendo, portanto, a ocorrência do segundo *crossover*, em qualquer lado da mutação introduzida), sugere fortemente que, se há uma tendência marcante à obtenção de linhagens DCO com genótipo idêntico ao do tipo selvagem, não sendo observada nenhuma linhagem DCO mutante, o gene deve ser essencial. Isso porque o segundo evento de recombinação homóloga deve forçosamente

ocorrer durante a etapa de contra-seleção com sacarose: caso contrário, as colônias testadas quanto à sensibilidade a canamicina não passariam de linhagens SCO que adquiriram resistência espontânea a sacarose (Gordhan & Parish, 2001). Esse não foi o caso para o gene *deoD* de *M. tuberculosis*, em que as quase 100 linhagens DCO Kan^s testadas claramente apresentavam, sem exceção, o genótipo idêntico ao do tipo selvagem. Há ainda que se considerar algumas características específicas de *M. tuberculosis*.

Em termos gerais, o metabolismo das micobactérias e de *M. tuberculosis* não é excepcional. Em relação ao metabolismo de carboidratos, à produção de energia e à biossíntese de metabólitos simples e mesmo de macromoléculas, *M. tuberculosis* se assemelha à maioria das bactérias, e o bacilo sintetiza todos os aminoácidos, lipídeos, nucleotídeos, etc, essenciais à sua sobrevivência – além de possuir, evidentemente, macromoléculas únicas (Cole *et alii*, 1998; Wheeler & Blanchard, 2005). Dessa forma, as micobactérias são capazes de utilizar, em condições laboratoriais, uma ampla gama de fontes de carbono e nitrogênio, ao passo que, durante as diferentes fases da infecção, quando agem como patógenos, alteram seu metabolismo, sendo capazes de assimilar metabólitos externos oriundos das células do hospedeiro. Há muitos nutrientes disponíveis para *M. tuberculosis* e outros patógenos intracelulares nos tecidos e fluidos do hospedeiro, como ácidos orgânicos, aminoácidos, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, etc (Wheeler & Ratledge, 1994). Dependendo do tecido, há uma certa abundância de metabólitos pré-formados, os quais podem ser prontamente assimilados e utilizados pelas micobactérias em diversos processos celulares. Nesse contexto, a disponibilidade de precursores de ácidos nucléicos e de

nucleotídeos e nucleosídeos de purinas e pirimidinas não é uma exceção, e tanto *M. leprae* como *M. avium* são capazes de assimilá-los e direcioná-los às respectivas vias de salvamento (Wheeler, 1987a; Wheeler, 1987b).

Não sendo um parasita intracelular obrigatório (como *M. leprae*), *M. tuberculosis* claramente não perdeu a capacidade de sintetizar os compostos indispensáveis ao seu crescimento *in vitro*, razão pela qual não necessita de nenhum metabólito pré-formado para se multiplicar em diversos meios laboratoriais, de composição química indefinida ou definida (Wheeler & Ratledge, 1994; Allen, 1998). A partir de uma única fonte de carbono, junto com uma fonte de nitrogênio e outros elementos essenciais, *M. tuberculosis* cresce bem *in vitro*. O crescimento pode ser acelerado pela adição de certos compostos, mas não se trata de uma necessidade; o longo tempo de geração de *M. tuberculosis* está relacionado a particularidades da biossíntese de ácidos nucléicos, e não a uma baixa atividade metabólica (Wheeler & Ratledge, 1994). Por esse motivo, e supondo que o gene *deoD* não seria essencial *in vitro* (em que a biossíntese *de novo* dos nucleotídeos de purinas parece ser indispensável, ao contrário do que pode ocorrer *in vivo*), não foram incluídos suplementos purínicos durante o isolamento de mutantes de *M. tuberculosis* em Middlebrook 7H10.

Cabe aqui salientar três pontos. Primeiro: a mutação projetada para o gene *deoD* de *M. tuberculosis* não deveria, a princípio, interferir na viabilidade das células, pois os genes da biossíntese *de novo* de purinas não são afetados e a produção desses nucleotídeos deve ser normal. Segundo: como já mencionado, 7H10 é um meio sintético de composição definida, que contém todos os nutrientes necessários para o crescimento 'normal' de *M. tuberculosis*, incluindo precursores

simples a partir dos quais o bacilo é comprovadamente capaz de sintetizar o anel purínico (Malathi & Ramakrishnan, 1966). Além disso, na preparação de 7H10, é adicionado o suplemento OADC, que contém traços de certos aminoácidos e outros compostos nitrogenados. Terceiro: em experimentos ainda preliminares, foi adicionado 20 μ M de hipoxantina a placas de 7H10 em que a linhagem SCO derivada de D6 foi crescida. Os resultados são idênticos aos obtidos em 7H10 sem suplementação, sendo que a concentração de hipoxantina escolhida se baseou em dados que se aproximam da concentração provavelmente encontrada *in vivo* pelo bacilo e em um estudo em que foi isolado um mutante para o gene *purC* de *M. tuberculosis* (Wheeler & Ratledge, 1994; Jackson *et alii*, 1999). Em conclusão, a falta ou escassez de purinas no meio de cultura não explica por que o gene *deoD* de *M. tuberculosis* não pôde, nas condições testadas, ser inativado – ainda mais que esses compostos devem estar sendo produzidos pelas células (não sendo, contudo, capazes de compensar a ausência da PNP).

Além disso, em *E. coli*, mutantes deficientes na produção de PNP crescem normalmente em meio mínimo, sem necessidade de suplementação (Zalkin & Nygaard, 1996). No entanto, o metabolismo de purinas, especialmente a via de salvamento, ainda é pouco estudado em micobactérias, e pode haver variações importantes (Mizrahi *et alii*, 2005). Wheeler (1987a) sugere que, em algumas micobactérias, a biossíntese *de novo* dos nucleotídeos de purinas é reprimida *in vivo* em certo grau, onde a respectiva via de salvamento seria quantitativamente significativa. Esse parece ser o caso de *M. leprae*, que, embora possua todos os genes necessários à síntese *de novo* de purinas conservados, preferencialmente hidrolisa nucleotídeos exógenos a nucleosídeos, absorvendo os últimos (Wheeler,

2001). Como ocorre em *E. coli*, os nucleosídeos pré-formados adquiridos externamente podem ser usados na síntese de nucleotídeos e também como fonte de carbono e nitrogênio (Zalkin & Nygaard, 1996). Em *M. smegmatis*, um mutante para o gene *purF* (que codifica a primeira enzima da síntese *de novo* de purinas) exibe um fenótipo atípico, perdendo rapidamente a viabilidade em culturas de fase estacionária privadas de oxigênio, mesmo com suplementação de purinas no meio (Keer *et alii*, 2001). Também em *M. smegmatis*, a adenosina não é um substrato para a PNP (Chen *et alii*, 2002). Nesse último aspecto, as micobactérias diferem bastante dos demais microorganismos, pois são capazes de diretamente fosforilar adenosina, mas não pela atividade da PNP.

A adenosina também não é um substrato para a PNP em *M. tuberculosis*; no entanto, há uma enzima, ainda não identificada, que realiza a clivagem de adenosina a adenina (Parker *et alii*, 2004). Outra característica interessante é a presença de uma adenosina quinase em *M. tuberculosis*. As adenosinas quinases são enzimas da via de salvamento das purinas responsáveis pela fosforilação de adenosina a AMP, e não são comumente encontradas em bactérias. Na verdade, a adenosina quinase de *M. tuberculosis* foi a primeira enzima bacteriana caracterizada (Long *et alii*, 2003). Mutantes para o gene da adenosina quinase foram obtidos em *M. smegmatis* e *M. tuberculosis*, indicando que seu produto não é essencial *in vitro* (Chen *et alii*, 2002; Long *et alii*, 2003).

Desta maneira, a via de salvamento das purinas em *M. tuberculosis* apresenta características específicas, e, no presente trabalho, sugerimos que a provável essencialidade do gene *deoD* seja devida a duas razões. A primeira é que um dos fatores limitantes ao crescimento de *M. tuberculosis* é a baixa taxa de

biossíntese de ácidos nucléicos: enquanto *E. coli* leva cerca de 1 h para replicar o genoma e *M. smegmatis* cerca de 2 h, *M. tuberculosis* gasta entre 10 e 11 h (Harshey & Ramakrishnan, 1977; Wheeler & Ratledge, 1994). Nesse sentido, é possível que a via de salvamento das purinas tenha se especializado ao máximo em *M. tuberculosis*, objetivando aproveitar os diversos substratos purínicos presentes no ambiente extracelular e, ao mesmo tempo, reciclar eficientemente os nucleotídeos endógenos, tornando-se indispensável. Isso explicaria por que, mesmo com a adição de hipoxantina ao meio de cultura, o gene *deoD* de *M. tuberculosis* não pode ser mutado: o bacilo necessitaria das duas rotas metabólicas intactas para garantir a complexa replicação do genoma. Na falta de componentes centrais de uma via (como a PNP), as células se tornam inviáveis. Deve-se lembrar que, durante a fase de latência, a disponibilidade de nutrientes é muito baixa, e *M. tuberculosis* se encontra sob intensa pressão do sistema imune do hospedeiro. Assim, a via de salvamento das purinas desempenharia um papel especialmente relevante, atuando na reciclagem e interconversão das bases purínicas e garantindo a baixa atividade metabólica do bacilo.

A segunda hipótese levantada é que a PNP de *M. tuberculosis* efetivamente participa de algum mecanismo, ainda não conhecido, que liga o catabolismo de purinas à resposta severa. Ainda faltam evidências conclusivas para tal em micobactérias, mas, se for esse o caso, então o acúmulo de guanosina hiperfosforilada, nas condições de crescimento testadas, seria tóxico ou mesmo letal a *M. tuberculosis*. A alta concentração de ppGpp (que regula tanto negativamente como positivamente a transcrição de um grande número de genes) poderia causar um desequilíbrio em diversas rotas metabólicas, novamente

levando a um fenótipo inviável (Magnusson *et alii*, 2005). Mutantes para genes da via de salvamento das purinas são descritos na literatura, e, curiosamente, a maioria exibe fenótipos atípicos, sugerindo uma correlação, ainda que indireta, entre a atividade de seus respectivos produtos e os níveis intracelulares de ppGpp (os quais se encontram alterados).

Em *Listeria monocytogenes*, um patógeno intracelular, um mutante para o gene *hpt* (que codifica uma hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase), bloqueado na via de salvamento das purinas, exibe adesão extremamente baixa a superfícies (em relação ao tipo selvagem) e é avirulento em camundongos. Além disso, apresenta deficiência de ppGpp, sugerindo que a via de salvamento das purinas é necessária para a biossíntese de ppGpp e, conseqüentemente, à resposta severa da bactéria no hospedeiro (Taylor *et alii*, 2002). Um mutante para o gene *deoD* de *Streptococcus thermophilus* apresenta, ao contrário, altos níveis de ppGpp e sobrevivência a choque térmico significativamente aumentada em relação ao tipo selvagem, também sugerindo uma ligação entre a via de salvamento das purinas e a resposta severa (Varcamonti *et alii*, 2003).

Em *B. subtilis* e *S. coelicolor*, há boas evidências de que os efeitos mediados pela proteína RelA durante a latência estão ligados à modulação dos níveis de GTP, que serve de substrato à síntese de ppGpp (Braeken *et alii*, 2006). Além disso, o ppGpp inibe a atividade da inosina monofosfato desidrogenase, a primeira enzima da via da biossíntese *de novo* de GTP (Cashel *et alii*, 1996). Também há um relato interessante na literatura sugerindo que a resposta severa em *B. subtilis* difere, em relação a *E. coli*, quanto à regulação dos promotores de rRNA: o ppGpp parece controlar a atividade dos promotores de rRNA afetando

indiretamente os *pools* de GTP, ao contrário dos efeitos diretos exercidos pelo ppGpp e pela concentração inicial do nucleotídeo na expressão de rRNA em *E. coli* (Krásny & Gourse, 2004). Já em *T. thermophilus*, a atividade dos promotores de rRNA depende diretamente dos níveis celulares de GTP e da inibição da inosina monofosfato desidrogenase (Kasai *et alii*, 2006).

Em *M. tuberculosis*, há apenas um operon de rRNA; em *E. coli*, comparativamente, há sete (Wheeler & Ratledge, 1994). Além do longo tempo de duplicação do cromossomo, a taxa de transcrição do operon de rRNA também é longa em *M. tuberculosis*, contribuindo para o alto tempo de geração do bacilo (Harshey & Ramakrishnan, 1977). Portanto, como níveis elevados de guanosina hiperfosforilada reprimem a transcrição de genes relacionados tanto à replicação de DNA como à síntese de RNAs estáveis, é possível que a ausência da PNP ocasione um fenótipo fatal em *M. tuberculosis*. E, dada a possibilidade de que a via de salvamento das purinas contribua decisivamente à biossíntese de ácidos nucléicos, isso se manifestaria prontamente *in vitro*.

O promotor nativo do gene *deoD* de *M. tuberculosis* foi clonado, junto com a respectiva seqüência codificante, no vetor de complementação pINT3, gerando o plasmídeo pINT3+deoDC1 (**Figura 3.42**).

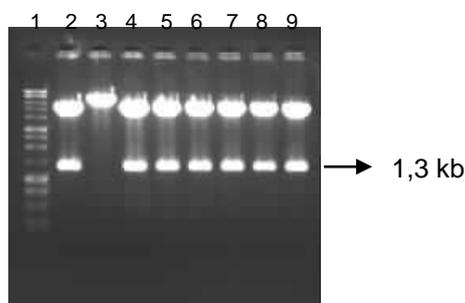


Figura 3.42. Construção do plasmídeo pINT3+deoDC1, que contém o promotor nativo e a seqüência codificante do gene *deoD* de *M. tuberculosis* (em 2 e 4-9). 1: MM. Um fragmento de aproximadamente 1,3 kb é visualizado em 2 e 4-9.

3.5. Fosforilase de nucleosídeos purínicos em *M. smegmatis*

Embora a PNP de *M. smegmatis* ainda não tenha sido experimentalmente caracterizada, os dados preliminares obtidos do *Institute for Genomic Research* (<http://www.tigr.org>) indicam a presença de uma enzima homóloga (MSMEG1697) no genoma, a qual possui quase 78% de identidade com a seqüência de aminoácidos da PNP de *M. tuberculosis* (esta última purificada por Basso *et alii*, 2001). Além disso, todos os resíduos do sítio ativo da proteína MSMEG1697 são conservados em relação à enzima de *M. tuberculosis*.

Na **Figura 3.43**, observa-se que a organização genômica da região contendo o gene *deoD* é similar nas micobactérias. Com exceção de *M. smegmatis*, em que o gene *deoD* parece ser monocistrônico, em todas as outras espécies o mesmo provavelmente faz parte de um operon de dois genes com o gene *pmmB*, que codifica uma potencial fosfomanomutase.

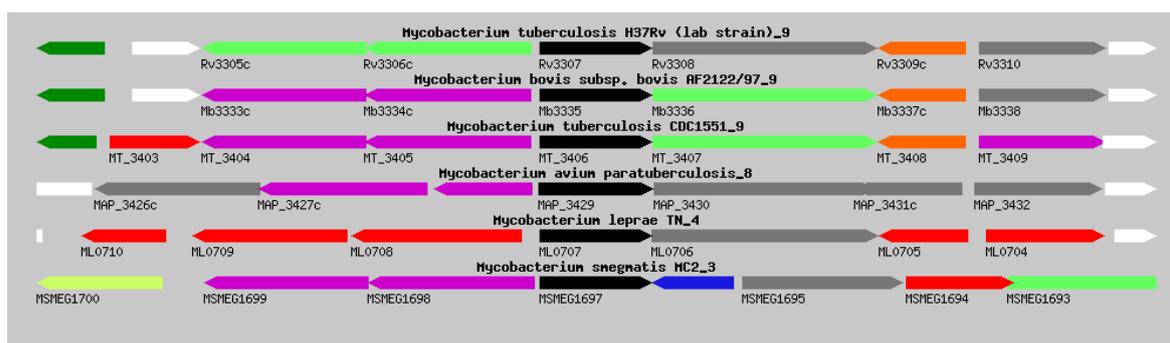


Figura 3.43. Organização genômica da região contendo o gene *deoD* (setas pretas no centro da figura) em *M. tuberculosis* H37Rv (*Rv3307*), *M. smegmatis* mc²155 (MSMEG1697) e outras micobactérias.

Diante da provável essencialidade do gene *deoD* em *M. tuberculosis*, e a fim de estudar o papel desse gene no metabolismo de *M. smegmatis*, o mesmo foi

investigado em termos genéticos, segundo a metodologia de troca alélica utilizada ao longo do presente trabalho. Os resultados indicam que, também em *M. smegmatis*, o gene *deoD* é essencial.

3.5.1. Construção do plasmídeo suicida p2NIL+DODO

Na **Figura 3.44**, é mostrada a localização genômica do gene *deoD* (MSMEG1697) em *M. smegmatis*, o qual é provavelmente monocistrônico. As ORFs adjacentes, MSMEG1696 e MSMEG1698, codificam, respectivamente, um regulador transcricional da família TetR e a proteína AmiB, que participa da complexa regulação da acetamidase, uma enzima que utiliza acetamida como fonte de carbono (Parish *et alii*, 1997; Roberts *et alii*, 2003). Uma deleção *in-frame*, não marcada, em que 90% da região codificante do gene *deoD* é eliminada, foi produzida na construção do respectivo alelo mutante de *M. smegmatis*, objetivando não causar efeitos polares na vizinhança.

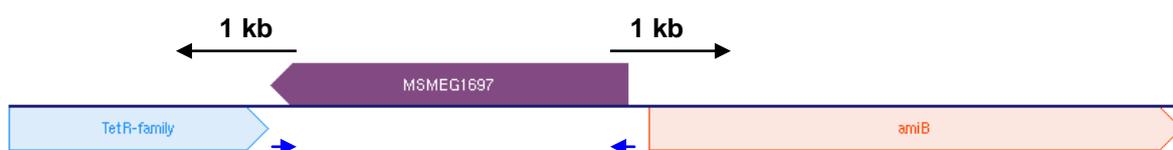


Figura 3.44. Localização genômica do gene *deoD* (MSMEG1697) em *M. smegmatis*, mostrando as regiões flanqueadoras (cerca de 1 kb) *upstream* e *downstream* usadas na construção do plasmídeo suicida p2NIL+DODO. As setas pequenas, em azul, indicam *primers* usados na caracterização de linhagens.

As regiões flanqueadoras de cerca de 1 kb foram unidas através de um sítio de restrição específico (*ClaI*), e o fragmento final foi direcionalmente clonado

entre os sítios de restrição *Hind*III e *Bam*HI do vetor p2NIL, criando uma deleção de 735 bp na seqüência codificante do gene-alvo de *M. smegmatis*. O inserto do plasmídeo escolhido para a etapa final da construção (p2NIL+deoD1697) foi inteiramente seqüenciado, não apresentando mutações na seqüência nucleotídica. Ao plasmídeo p2NIL+deoD1697 foi ligado o cassete de *PacI* contendo marcadores de seleção e o gene *sacB* do vetor pGOAL19, gerando o plasmídeo suicida p2NIL+DODO (dados não mostrados).

3.5.2. Eletroporação de *M. smegmatis* mc²155 e isolamento de mutantes

Cerca de 3 µg de DNA do plasmídeo suicida p2NIL+DODO foram eletroporados em células de *M. smegmatis* mc²155. A PNP de *E. coli* pode utilizar vários substratos na reação de fosforólise, como adenosina, guanosina e inosina (Zalkin & Nygaard, 1996). Em *M. smegmatis*, já foi determinado que a PNP não utiliza adenosina como substrato (Chen *et alii*, 2002). O mesmo ocorre em *M. tuberculosis* (Parker *et alii*, 2004). Provavelmente, uma hidrolase ainda não caracterizada utiliza a adenosina como substrato em *M. smegmatis* (Chen *et alii*, 2002). Assim, os prováveis mutantes para o gene *deoD* de *M. smegmatis* foram selecionados em quatro condições experimentais: Middlebrook 7H10, Middlebrook 7H10 suplementado com 10 µM de guanosina, Lemco e Lemco suplementado com 10 µM de guanosina. Não foram considerados os respectivos ribonucleotídeos e desoxirribonucleotídeos, uma vez que, na utilização de nucleotídeos exógenos, as micobactérias (à semelhança de outros microrganismos) primeiro realizam a desfosforilação desses compostos, para

então transportá-los via membrana citoplasmática, ou seja, absorvem os nucleosídeos (Wheeler, 1987a; Wheeler, 1987b; Zalkin & Nygaard, 1996). Entre 10 e 12 dias após a eletroporação de *M. smegmatis* com o plasmídeo p2NIL+DODO, em incubação a 37°C, colônias azuis Hyg^r Kan^r (SCOs) foram obtidas, nas quatro condições experimentais testadas. Não foram observadas diferenças significativas no número de SCOs entre placas de 7H10 e Lemco, com e sem suplementação com 10 µM de guanosina.

Em seguida, uma colônia isolada, Dodo1, foi semeada em 7H10 (e também Lemco) na ausência de antibióticos, a fim de que o segundo *crossover* ocorresse. Após aproximadamente 14 dias de incubação a 37°C, observou-se o crescimento da linhagem derivada de Dodo1, tanto em 7H10 como em Lemco, com e sem suplementação com 10 µM de guanosina. A colônia derivada de Dodo1 foi, então, preparada para a etapa de contra-seleção com sacarose, sendo semeada em placas de 7H10 (e também Lemco) com e sem sacarose. Há relatos na literatura sugerindo que, em *M. smegmatis*, a contra-seleção com 5% (w/v) ou mesmo 10% (w/v) de sacarose é mais eficiente que a concentração usual de 2% (w/v), empregada em *M. tuberculosis* e *M. bovis* (Parish *et alii*, 2001; Roberts *et alii*, 2003). Assim, a contra-seleção foi efetuada com concentrações finais de 5% (w/v) e 10% (w/v) de sacarose nos meios de cultura. Após 14 a 21 dias de incubação a 37°C, um grande número de colônias brancas derivadas de Dodo1, sensíveis a sacarose, foi obtido. Observou-se uma diminuição de cerca de 10⁴ cfu do número de colônias em placas com sacarose em comparação a placas sem sacarose. Aproximadamente 180 colônias derivadas de Dodo1, resistentes a sacarose, foram testadas em placas de 7H10 na ausência e presença de canamicina e

higromicina. O DNA genômico de colônias Kan^s (mutantes em potencial) foi preparado para posterior análise por PCR e seqüenciamento.

3.5.3. Caracterização e complementação dos prováveis mutantes

Os genótipos das colônias Dodo1 resistentes a sacarose Kan^s (DCOs) foram caracterizados por PCR de colônia, usando *primers* específicos, que permitem distinguir entre a provável linhagem DCO mutante, o tipo selvagem e SCOs, como esquematizado na **Figura 3.44**. Quase 140 mutantes em potencial para o gene *deoD* de *M. tuberculosis* foram analisados, e na **Figura 3.45** está mostrado o resultado para 16 colônias.

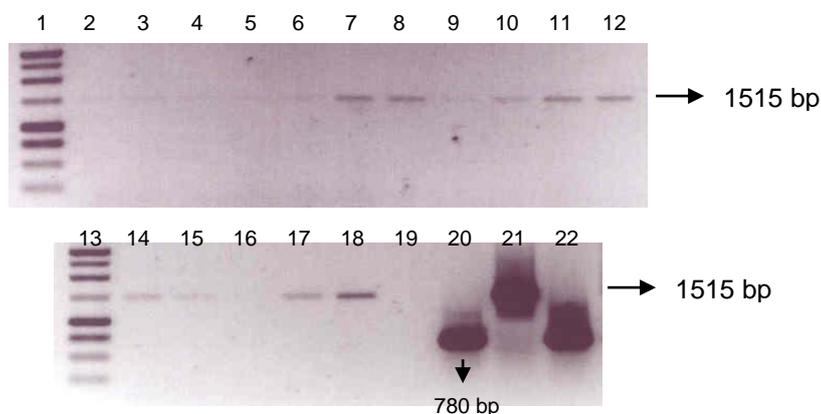


Figura 3.45. Análise por PCR de colônia das prováveis linhagens mutantes para o gene *deoD* de *M. smegmatis*. 1 e 13: MM. PCRs realizadas com 2-12 e 14-18: DNA extraído de linhagens DCO (mutantes em potencial); 19: água (controle negativo); 20: DNA extraído de linhagem SCO; 21: DNA genômico de *M. smegmatis* (controle positivo); 22: p2NIL+DODO. Um fragmento de 1515 bp (correspondente ao alelo selvagem) é visualizado em 21 e em todas as linhagens DCO analisadas. Um fragmento de 780 bp (indicando a deleção de 735 bp introduzida) é visualizado em 20. Apenas 16 linhagens DCO Kan^s são mostradas.

Como mostrado na **Figura 3.45**, a análise por PCR de colônia de quase 140 linhagens DCO Kan^s revelou a presença de fragmentos de DNA de tamanho

idêntico ao do gene *deoD* selvagem de *M. smegmatis*. Linhagens para as quais a amplificação foi pouco clara (como em 16 na **Figura 3.45**) foram novamente testadas, e o resultado foi exatamente o mesmo (dados não mostrados). Dessa forma, na respectiva região cromossômica, o segundo evento de recombinação homóloga está dando origem somente ao tipo selvagem, e, como nenhuma linhagem DCO mutante pôde ser isolada, a ausência de mutantes utilizando esse método de troca alélica sugere que, como em *M. tuberculosis*, o gene *deoD* é essencial ao crescimento *in vitro* de *M. smegmatis*.

Mutantes com auxotrofia para purinas (adenina e guanina) foram isolados por Guilhot *et alii* (1994) em *M. smegmatis*, utilizando a técnica de mutagênese com o transposon Tn611 (inserido em um plasmídeo termossensível). Esses mutantes representavam uma porcentagem mínima (entre 0,2 e 0,4%) de clones nas bibliotecas de transposição construídas; além disso, alguns desses mutantes exibiam fenótipos complicados e redundantes, e os que puderam ser obtidos definitivamente requeriam suplementação com purinas na etapa de isolamento. Posteriormente, esses mesmos mutantes foram usados em um estudo de complementação em *M. tuberculosis*, sendo identificados os genes originalmente mutados em *M. smegmatis*: *purC* e *purL* (Jackson *et alii*, 1996).

Quando cultivado em condições de privação de oxigênio, outro mutante, para o gene *purF* de *M. smegmatis*, tem sobrevivência e viabilidade extremamente diminuída em comparação ao tipo selvagem (Keer *et alii*, 2001). Essa característica fisiológica ainda não é totalmente compreendida, mas os autores sugerem que o fenótipo alterado não se deve à auxotrofia para purinas, e sim à deficiência de um ou mais intermediários na rota de biossíntese das purinas

(os quais poderiam estar ligados à cadeia respiratória). Nesse contexto, é interessante que o 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo (AICAR), um dos precursores imediatos do IMP, seja um regulador negativo da atividade da citocromo *c* oxidase em certas espécies (Soberón *et alii*, 2001). Além disso, o trabalho de Shleeva *et alii* (2004) confirma o fenótipo atípico do mutante para o gene *purF* de *M. smegmatis* e levanta a possibilidade de que, nas condições testadas, ocorra a formação de células viáveis, mas não cultiváveis. Esta é uma explicação plausível para a não obtenção de mutantes para o gene *deoD* de *M. smegmatis* (que, nesse caso, não seria essencial): a ausência de atividade da PNP, ao desregular as concentrações intracelulares de purinas e metabólitos relacionados, poderia levar a um estado fisiológico próximo à dormência, e as células, embora viáveis, não seriam cultiváveis. Há um número crescente de trabalhos descrevendo a formação de células não cultiváveis em *M. smegmatis* (Lee *et alii*, 1998; Mayuri *et alii*, 2002; Shleeva *et alii*, 2004).

Se, ao contrário, como indicam os dados obtidos no presente trabalho, o gene *deoD* for mesmo essencial à sobrevivência *in vitro* de *M. smegmatis*, haveria três razões possíveis para tal. Primeira: como existem variações no metabolismo de purinas em micobactérias (a adenosina não é um substrato para a PNP, por exemplo), a PNP pode desempenhar uma função adicional ou, alternativamente, ser importante à regulação (direta ou indireta) dos níveis de um metabólito purínico, como IMP ou mesmo AICAR. Em *Lactobacillus lactis*, mutantes para o gene *guaA* (da via de salvamento das purinas) apresentam um fenótipo misto de resistência a estresse oxidativo e choque térmico, o qual se deve, provavelmente, ao acúmulo de ppGpp (Rallu *et alii*, 2000). Além de ocasionar o acúmulo

excessivo e/ou nocivo de ppGpp no interior celular, a ausência da PNP em *M. smegmatis* poderia, portanto, interferir na atividade de proteínas essenciais ao metabolismo, cuja regulação depende de um ou mais compostos purínicos que não podem ser substituídos *in vitro*. Cabe aqui ressaltar que a escolha da concentração de guanósina usada na suplementação dos meios 7H10 e Lemco se baseou em dados empíricos da literatura (Wheeler & Ratledge, 1994; Zalkin & Nygaard, 1996). É possível, contudo, que uma concentração superior a 10 µM de guanósina seja necessária durante a etapa de isolamento de mutantes para esse loco de *M. smegmatis* – tal hipótese está sendo atualmente testada. Em *M. tuberculosis*, por exemplo, um mutante para o gene *ino1*, essencial ao crescimento e à virulência do bacilo, só pôde ser isolado mediante o uso de uma concentração muito alta (77 mM) de inositol, o que é bastante incomum (Movahedzadeh *et alii*, 2004). Porém, no caso de *M. smegmatis*, deve-se levar em conta que, além de 7H10, também foi utilizado Lemco, e a suplementação com guanósina não se mostrou importante à obtenção de linhagens SCO Hyg^r Kan^r (seleção) e linhagens DCO Kan^s (contra-seleção) (item 3.5.2).

Em segundo lugar, à semelhança da hipótese sugerida para a essencialidade do gene *deoD* em *M. tuberculosis*, é possível que a taxa de biossíntese de ácidos nucléicos dependa concomitantemente das duas rotas purínicas, *de novo* e de salvamento, para a replicação do genoma e a transcrição eficiente dos genes de RNA estável. *M. smegmatis* possui dois operons de rRNA, e, *in vitro*, seu tempo de geração, influenciado pela taxa de biossíntese de DNA e principalmente de RNA, é de aproximadamente 3 h. Além disso, o genoma de *M. smegmatis* tem um conteúdo de G+C bastante alto (67,4%) e quase 7 Mbp

(comparativamente, o tamanho do genoma de *M. tuberculosis* é de 4,4 Mbp), evidenciando a importância dos nucleotídeos de guanina à estrutura do cromossomo. A relação entre síntese de RNA e metabolismo de purinas também é exemplificada por um mecanismo fisiológico comum em bactérias, o chamado GRDC (*growth rate-dependent control*), que controla o número de ribossomos de acordo com a taxa de crescimento celular. Esse mecanismo foi pouco estudado em micobactérias (Verma *et alii*, 1999; Cox, 2004; Arnvig *et alii*, 2005). Contudo, a atividade do promotor do gene *guaA* de *M. tuberculosis* foi analisada em células de *M. smegmatis*, tendo sido encontrada, nessa região cromossômica, uma seqüência de DNA similar à presente nos promotores de RNA estável (Kamalakannan *et alii*, 2002). Na região promotora dos genes *guaA* e *deoD* de *M. smegmatis* também há uma seqüência de DNA rica em G+C, a qual provavelmente, devido à sua composição e estrutura, corresponde ao motivo existente nos promotores de *rrn* (<http://www.tigr.org> e dados não mostrados). Esse dado aprofunda ainda mais o envolvimento entre a via de salvamento das purinas e a biossíntese de ácidos nucleicos, indicando que a transcrição de genes centrais à rota (*guaA* e *deoD*) pode estar sob controle direto dos mecanismos que regulam o número de ribossomos e o crescimento celular. A maioria dos genes relacionados a processos como replicação de DNA, divisão celular e biossíntese de ribossomos é essencial em *M. smegmatis*, e, diante disso e do acima exposto, a essencialidade do gene *deoD* não seria uma surpresa (Greendyke *et alii*, 2002; Dziadek *et alii*, 2003; Raghunand & Bishai, 2006).

Finalmente, há que se considerar as possíveis conseqüências decorrentes da inibição (ou ausência) da atividade da PNP e os níveis intracelulares de

ppGpp. Células de *M. smegmatis*, quando crescidas em condições de estresse nutricional, acumulam ppGpp e caracteristicamente alteram sua morfologia (Ojha *et alii*, 2000). A inativação do gene *relA* de *M. smegmatis* ocasiona efeitos opostos, afetando drasticamente a morfologia e a viabilidade celular; os níveis de expressão dos genes *hspX* e *eis* (os quais são diferencialmente regulados durante a resposta severa) também são alterados (Dahl *et alii*, 2005). Dessa forma, como sugerido para *M. tuberculosis*, o eventual acúmulo de ppGpp em *M. smegmatis* poderia causar a ativação e/ou inibição de diversas rotas metabólicas importantes, levando a um fenótipo inviável. Embora a correlação entre a atividade da PNP e a concentração celular de guanosina hiperfosforilada ainda não esteja precisamente estabelecida, muitas linhas de evidência reforçam a regulação dos níveis de GTP (substrato direto para a síntese de ppGpp) pela via de salvamento das purinas em bactérias, cuja inibição acarreta efeitos múltiplos e contraditórios – se não letais (Cashel *et alii*, 1996; Braeken *et alii*, 2006).

4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A TB é um sério problema de saúde pública em todo o mundo, e a complexidade dos fatores envolvidos na reemergência e disseminação da doença exige que novas estratégias e programas efetivos de combate a *M. tuberculosis* sejam continuamente desenvolvidos. Nesse sentido, o conhecimento de aspectos básicos da biologia de micobactérias patogênicas e não patogênicas é fundamental, uma vez que, como têm revelado os diversos projetos de seqüenciamento genômico e estudos de expressão gênica em grande escala, esses microrganismos apresentam características metabólicas e fisiológicas únicas – relacionadas tanto à existência de genes de função desconhecida como, também, a sofisticados mecanismos regulatórios entre patógeno e hospedeiro. A fim de caracterizar e compreender o funcionamento desses genes e mecanismos, é necessária a implementação de metodologias adequadas e avançadas, sendo a manipulação genética de micobactérias indispensável para que alvos moleculares tidos como essenciais sejam, de fato, validados quanto a seu futuro potencial farmacológico. Genes e rotas metabólicas essenciais ao crescimento *in vitro* de *M. tuberculosis* constituem bons alvos para o desenvolvimento de novas drogas anti-TB, pois a inibição de suas funções deve resultar na morte do bacilo.

No presente trabalho, demonstrou-se experimentalmente que, tanto em *M. tuberculosis* como *M. smegmatis*, ocorrem duas CMs monofuncionais, de localização celular distinta e, nas condições testadas, com expressão constitutiva

dos respectivos promotores. Esses dados representam uma novidade: até o momento, não foi descrita uma organização genômico-bioquímica semelhante em outras espécies de bactérias, em que as CMs citoplasmáticas da classe AroQ geralmente fazem parte, como domínios protéicos, de enzimas bifuncionais. Além disso, como claramente se depreende da seqüência primária de aminoácidos das CMs citoplasmáticas de *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, essas proteínas empregam resíduos alternativos – em comparação aos do sítio ativo do domínio EcCM – em sua estrutura. Futuros experimentos de mutagênese sítio dirigida devem esclarecer o papel e a importância de tais resíduos à atividade enzimática das CMs citoplasmáticas micobacterianas.

Em relação aos estudos da atividade promotora dos genes *aroQ* e **aroQ* de *M. tuberculosis*, os mesmos representam um passo inicial para o entendimento da função e regulação da biossíntese de aminoácidos aromáticos em micobactérias, em que os dados experimentais são escassos ou simplesmente inexistentes. Evidentemente, em *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*, a biossíntese dos aminoácidos aromáticos deve exibir particularidades ainda não conhecidas, e ensaios adicionais de expressão gênica precisam ser realizados, dada tanto a importância da via do chiquimato como a provável essencialidade dos genes *aroQ* em ambas as espécies. De qualquer forma, os dados preliminares referentes à expressão constitutiva do gene MTB *aroQ* corroboram os obtidos para a essencialidade, reforçando o valor da enzima correspondente como alvo para o desenvolvimento de agentes antimicobacterianos promissores. Deve-se ainda considerar a ausência de tal rota metabólica no hospedeiro humano (de modo que futuros inibidores não acarretem possíveis problemas de toxicidade) e o fato de

que as CMs exibem baixa conservação de seqüência entre si (de modo que inibidores específicos sejam desenvolvidos, não havendo problemas de resistência cruzada). É igualmente plausível desenvolver inibidores que atuem simultaneamente sobre ambas as CMs de *M. tuberculosis*, o que seria extremamente vantajoso em termos de minimizar o risco de surgimento de resistência espontânea ao agente anti-TB usado.

A provável essencialidade do gene *deoD* à sobrevivência *in vitro* de *M. tuberculosis* também constitui um bom indício de que a PNP é um alvo interessante para o desenvolvimento de futuras drogas anti-TB, principalmente devido à relação entre a via de salvamento das purinas e a taxa de biossíntese de ácidos nucleicos e a latência. A latência é um fenômeno fisiológico central e indispensável ao sucesso da infecção, pelo bacilo da TB, no hospedeiro humano. A identificação e validação de alvos moleculares ativos durante essa fase da doença representam, portanto, um avanço significativo em busca de uma quimioterapia anti-TB mais eficiente. Para tal, a construção de uma linhagem merodiplóide para o gene *deoD* de *M. tuberculosis* (em que uma segunda cópia funcional do loco será fornecida) deverá comprovar definitivamente, em termos genéticos, a essencialidade da PNP nessa micobactéria. Pretende-se, ainda, estabelecer um modelo *in vitro* de latência em *M. smegmatis*, em que a expressão do gene *deoD* será quantitativamente avaliada e permitirá estabelecer a relação entre via de salvamento das purinas, níveis de ppGpp e dormência.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, S. & Jensen, R. A. (1988) Phylogenetic distribution of components of the overflow pathway to L-phenylalanine within the enteric lineage of bacteria. *Curr. Microbiol.* 16: 295-302.
- Allen, B. W. (1998) Mycobacteria: general culture methodology and safety considerations. In: Parish, T. & Stoker, N. G. (eds.) *Methods in Molecular Biology*, vol. 101: *Mycobacteria Protocols*. Humana Press, Totowa.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schäffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res.* 25: 3389-3402.
- Andries, K.; Verhasselt, P.; Guillemont, J.; Gohlmann, H. W.; Neefs, J. M.; Winkler, H.; Van Gestel, J.; Timmerman, P.; Zhu, M.; Lee, E.; Williams, P.; de Chaffoy, D.; Huitric, E.; Hoffner, S.; Cambau, E.; Truffot-Pernot, C.; Lounis, N.; Jarlier, V. (2005) A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 307: 223-227.
- Arnvig, K. B.; Gopal, B.; Papavinasasundaram, K. G.; Cox, R. A.; Colston, M. J. (2005) The mechanism of upstream activation in the *rrnB* operon of *Mycobacterium smegmatis* is different from the *Escherichia coli* paradigm. *Microbiology* 151: 467-473.
- Avarbock, D.; Salem, J.; Li, L.-S.; Wang, Z.-M.; Rubin, H. (1999) Cloning and characterization of a bifunctional RelA/SpoT homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene* 233: 261-269.
- Bardarov, S.; Bardarov, S., Jr.; Pavelka, M. S., Jr.; Sambandamurthy, V.; Larsen, M.; Tufariello, J.; Chan, J.; Hatfull, G.; Jacobs, W. R., Jr. (2002) Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG, and *M. smegmatis*. *Microbiology* 148: 3007-3017.
- Bardarov, S.; Kriakov, J.; Carriere, C.; Yu, S.; Vaamonde, C.; McAdam, R. A.; Bloom, B. R.; Hatfull, G. F.; Jacobs, W. R., Jr. (1997) Conditionally replicating mycobacteriophages: a system for transposon delivery to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10961-10966.
- Barry, C. E., III (2001) *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis? Response from Barry III. *Trends Microbiol.* 9: 473-474.
- Barry, C. E., III; Slayden, R. A.; Sampson, A. E.; Lee, R. E. (2000) Use of genomics and combinatorial chemistry in the development of new antimycobacterial drugs. *Biochem. Pharmacol.* 59: 221-231.
- Bashyam, M. D.; Kaushal, D.; Dasgupta, S. K.; Tyagi, A. K. (1996) A study of the mycobacterial transcriptional apparatus: identification of novel features in promoter elements. *J. Bacteriol.* 178: 4847-4853.
- Basso, L. A.; Santos, D. S.; Shi, W.; Furneaux, R. H.; Tyler, P. C.; Schramm, V. L.; Blanchard, J. S. (2001) Purine nucleoside phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*: analysis of inhibition by a transition-state analogue and dissection by parts. *Biochemistry* 40: 8196-8203.

- Bekal, S.; Niblack, T. L.; Lambert, K. N. (2003) A chorismate mutase from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* shows polymorphisms that correlate with virulence. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 439-446.
- Bentley, R. (1990) The shikimate pathway: a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25: 307-384.
- Bermúdez-Cruz, R. M.; Ramírez, F.; Kameyama-Kawabe, L.; Montañez, C. (2005) Conserved domains in polynucleotide phosphorylase among eubacteria. *Biochimie* 87: 737-745.
- Betts, J. C.; Lukey, P. T.; Robb, L. C.; McAdam, R. A.; Duncan, K. (2002) Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol. Microbiol.* 43: 717-731.
- Blokpoel, M. C. J.; Murphy, H. N.; O'Toole, R.; Wiles, S.; Runn, E. S. C.; Stewart, G. R.; Young, D. B.; Robertson, B. D. (2005) Tetracycline-inducible gene regulation in mycobacteria. *Nucleic Acids Res.* 33: e22.
- Bradford, M. M.; McRorie, R. A.; Williams, W. L. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Braeken, K.; Moris, M.; Daniels, R.; Vanderleyden, J.; Michiels, J. (2006) New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. *Trends Microbiol.* 14: 45-54.
- Brennan, P. J. (2003) Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 83: 91-97.
- Brennan, P. J. & Nikaido, H. (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 29-63.
- Brooks, L. (1998) Chemical mutagenesis of mycobacteria. In: Parish, T. & Stoker, N. G. (eds.) *Methods in Molecular Biology*, vol. 101: *Mycobacteria Protocols*. Humana Press, Totowa.
- Brosch, R.; Gordon, S. V.; Marmiesse, M.; Brodin, P.; Buchrieser, C.; Eiglmeier, K.; Garnier, T.; Gutierrez, C.; Hewinson, G.; Kremer, K.; Parsons, L. M.; Pym, A. S.; Samper, S.; van Soolingen, D.; Cole, S. T. (2002) A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 3684-3689.
- Bumann, D. (2002) Examination of *Salmonella* gene expression in an infected mammalian host using the green fluorescent protein and two-colour flow cytometry. *Mol. Microbiol.* 43: 1269-1283.
- Bzowska, A.; Kulikowska, E.; Shugar, D. (2000) Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. *Pharmacol. Ther.* 88: 349-425.
- Calhoun, D. H.; Bonner, C. A.; Gu, W.; Xie, G.; Jensen, R. A. (2001) The emerging periplasm-localized subclass of AroQ chorismate mutases, exemplified by those from *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Biol.* 2: 0030.1-0030.16.
- Camacho, L. R.; Ensergueix, D.; Perez, E.; Gicquel, B.; Guilhot, C. (1999) Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 34: 257-267.
- Camus, J.-C.; Pryor, M. J.; Médigue, C.; Cole, S. T. (2002) Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 148: 2967-2973.

- Carroll, P.; Muttucumaru, D. G. N.; Parish, T. (2005) Use of a tetracycline-inducible system for conditional expression in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3077-3084.
- Cashel, M.; Gentry, D. R.; Hernandez, V. J.; Vinella, D. (1996) The stringent response. In: Neidhardt, F. C. (ed.) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 2nd ed. ASM Press, Washington, D. C.
- CDC – Centers for Disease Control and Prevention. (2006) Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs – worldwide, 2000-2004. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 55: 301-305.
- Chatterji, D. & Ojha, A. K. (2001) Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 160-165.
- Chen, C. K.; Barrow, E. W.; Allan, P. W.; Bansal, N.; Maddry, J. A.; Suling, W. J.; Barrow, W. W.; Parker, W. B. (2002) The metabolism of 2-methyladenosine in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 148: 289-295.
- Chen, P.; Gomez, J.; Bishai, W. R. (2000) Mycobacterial transcription regulation in stationary phase. In: Hatfull, G. F. & Jacobs, W. R., Jr. (eds.) *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, Washington, D. C.
- Chook, Y. M.; Gray, J. V.; Ke, H.; Lipscomb, W. N. (1994) The monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis*: structure determination of chorismate mutase and its complexes with a transition state analog and prephenate, and implications for the mechanism of the enzymatic reaction. *J. Mol. Biol.* 240: 476-500.
- Chook, Y. M.; Ke, H.; Lipscomb, W. N. (1993) Crystal structures of the monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis* and its complex with a transition state analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8600-8603.
- Cole, S. T. (2002) Comparative mycobacterial genomics as a tool for drug target and antigen discovery. *Eur. Resp. J.* 20: Suppl. 36, 1s-9s.
- Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E., III; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B. G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
- Cole, S. T.; Eiglmeier, K.; Parkhill, J.; James, K. D.; Thomson, N. R.; Wheeler, P. R.; Honore, N.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Mungall, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R. M.; Devlin, K.; Duthoy, S.; Feltwell, T.; Fraser, A.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Lacroix, C.; Maclean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rutherford, K. M.; Rutter, S.; Seeger, K.; Simon, S.; Simmonds, M.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Stevens, K.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Woodward, J. R.; Barrell, B. G. (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409: 1007-1011.
- Connell, N. D. (1994) *Mycobacterium*: isolation, maintenance, transformation, and mutant selection. *Methods Cell Biol.* 45: 107-125.
- Connell, N. D. & Belanger, A. E. (2000) Mutants and mutagenesis. In: Hatfull, G. F. & Jacobs, W. R., Jr. (eds.) *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, Washington, D. C.

- Copley, S. D. & Knowles, J. R. (1985) The uncatalyzed Claisen rearrangement of chorismate to prephenate prefers a transition state of chairlike geometry. *J. Am. Chem. Soc.* 107: 5306-5308.
- Corbett, L. & Raviglione, M. (2005) Global burden of tuberculosis: past, present, and future. In: Cole, S. T.; Eisenach, K. D.; McMurray, D. N.; Jacobs, W. R., Jr. (eds.) *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. ASM Press, Washington, D. C.
- Cosma, C. L.; Sherman, D. R.; Ramakrishnan, L. (2003) The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 641-676.
- Cotton, R. G. H. & Gibson, F. (1965) The biosynthesis of phenylalanine and tyrosine: enzymes converting chorismic acid into prephenic acid and their relationships to prephenate dehydratase and prephenate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 100: 76-88.
- Cox, R. A. (2004) Quantitative relationships for specific growth rates and macromolecular compositions of *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Escherichia coli* B/r: an integrative theoretical approach. *Microbiology* 150: 1413-1426.
- Dahl, J. L.; Arora, K.; Boshoff, H. I.; Whiteford, D. C.; Pacheco, S. A.; Walsh, O. J.; Lau-Bonilla, D.; Davis, W. B.; Garza, A. G. (2005) The *relA* homolog of *Mycobacterium smegmatis* affects cell appearance, viability, and gene expression. *J. Bacteriol.* 187: 2439-2447.
- Dahl, J. L.; Kraus, C. N.; Boshoff, H. I. M.; Doan, B.; Foley, K.; Avarbock, D.; Kaplan, G.; Mizrahi, V.; Rubin, H.; Barry, C. E., III (2003) The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10026-10031.
- Daniel, T. M. (2006) The history of tuberculosis. *Respir. Med.* 100: 1862-1870.
- Davis, E. O.; Jenner, P. J.; Brooks, P. C.; Colston, M. J.; Sedgwick, S. G. (1992) Protein splicing in the maturation of *M. tuberculosis* RecA protein: a mechanism for tolerating a novel class of intervening sequence. *Cell* 71: 201-210.
- Dick, T.; Lee, B. H.; Murugasu-Oei, B. (1998) Oxygen depletion induced dormancy in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 163: 159-164.
- Dosselaere, F. & Vanderleyden, J. (2001) A metabolic node in action: chorismate-utilizing enzymes in microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* 27: 75-131.
- Draper, P. & Daffé, M. (2005) The cell envelope of *Mycobacterium tuberculosis* with special reference to the capsule and outer permeability barrier. In: Cole, S. T.; Eisenach, K. D.; McMurray, D. N.; Jacobs, W. R., Jr. (eds.) *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. ASM Press, Washington, D. C.
- Dussurget, O.; Timm, J.; Gomez, M.; Gold, B.; Yu, S.; Sabol, S. Z.; Holmes, R. K.; Jacobs, W. R., Jr.; Smith, I. (1999) Transcriptional control of the iron-responsive *fxbA* gene by the mycobacterial regulator IdeR. *J. Bacteriol.* 181: 3402-3408.
- Dziadek, J.; Rutherford, S. A.; Madiraju, M. V.; Atkinson, M. A.; Rajagopalan, M. (2003) Conditional expression of *Mycobacterium smegmatis* *ftsZ*, an essential cell division gene. *Microbiology* 149: 1593-1603.
- Ehrt, S.; Guo, X. V.; Hickey, C. M.; Ryou, M.; Monteleone, M.; Riley, L. W.; Schnappinger, D. (2005) Controlling gene expression in mycobacteria with anhydrotetracycline and Tet repressor. *Nucleic Acids Res.* 33: e21.

- Euverink, G. J.; Hessels, G. I.; Franke, C.; Dijkhuizen, L. (1995) Chorismate mutase and 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase of the methylotrophic actinomycete *Amycolatopsis methanolica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3796-3803.
- Fischer, R. S.; Song, J.; Gu, W.; Jensen, R. A. (1997) L-arogenate is a chemoattractant which can be utilized as the sole source of carbon and nitrogen by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 567-573.
- Frischkorn, K.; Sander, P.; Scholz, M.; Teschner, K.; Prammananan, T.; Böttger, E. C. (1998) Investigation of mycobacterial *recA* function: protein introns in the RecA of pathogenic mycobacteria do not affect competency for homologous recombination. *Mol. Microbiol.* 29: 1203-1214.
- Garnier, T.; Eiglmeier, K.; Camus, J.-C.; Medina, N.; Mansoor, H.; Pryor, M.; Duthoy, S.; Grondin, S.; Lacroix, C.; Monsempe, C.; Simon, S.; Harris, B.; Atkin, R.; Doggett, J.; Mayes, R.; Keating, L.; Wheeler, P. R.; Parkhill, J.; Barrell, B. G.; Cole, S. T.; Gordon, S. V.; Hewinson, R. G. (2003) The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 7877-7882.
- Gibson, F. (1999) The elusive branch-point compound of aromatic amino acid biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 24: 36-38.
- Glickman, M. S. & Jacobs, W. R., Jr. (2001) Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell* 104: 477-485.
- Gomez, J. E. & McKinney, J. D. (2004) *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis* 84: 29-44.
- Gordhan, B. G. & Parish, T. (2001) Gene replacement using pretreated DNA. In: Parish, T. & Stoker, N. G. (eds.) *Methods in Molecular Medicine*, vol. 54: *Mycobacterium Tuberculosis Protocols*. Humana Press, Totowa.
- Greendyke, R.; Rajagopalan, M.; Parish, T.; Madiraju, M. V. V. S. (2002) Conditional expression of *Mycobacterium smegmatis dnaA*, an essential DNA replication gene. *Microbiology* 148: 3887-3900.
- Greenstein, A. E.; Grundner, C.; Echols, N.; Gay, L. M.; Lombana, T. N.; Mietskowski, C. A.; Pullen, K. E.; Sung, P.-Y.; Alber, T. (2005) Structure/function studies of Ser/Thr and Tyr protein phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 9: 167-181.
- Gu, W.; Williams, D. S.; Aldrich, H. C.; Xie, G.; Gabriel, D. W.; Jensen, R. A. (1997) The AroQ and PheA domains of the bifunctional P-protein from *Xanthomonas campestris* in a context of genomic comparison. *Microb. Comp. Genomics* 2: 141-158.
- Guilford, W. J.; Copley, S. D.; Knowles, J. R. (1987) On the mechanism of the chorismate mutase reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 109: 5013-5019.
- Guilhot, C.; Otal, I.; Van Rompaey, I.; Martín, C.; Gicquel, B. (1994) Efficient transposition in mycobacteria: construction of *Mycobacterium smegmatis* insertional mutant libraries. *J. Bacteriol.* 176: 535-539.
- Gupta, S. & Chatterji, D. (2005) Stress responses in mycobacteria. *IUBMB Life* 57: 149-159.
- Harries, A. D. & Dye, C. (2006) Tuberculosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 100: 415-431.
- Harshey, R. M. & Ramakrishnan, T. (1977) Rate of ribonucleic acid chain growth in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J. Bacteriol.* 129: 616-622.
- Hasan, S.; Daugelat, S.; Rao, P. S. S.; Schreiber, M. (2006) Prioritizing genomic drug targets in pathogens: application to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Comput. Biol.* 2: 539-550.

- Hatfull, G. F. (2000) Molecular genetics of mycobacteriophages. In: Hatfull, G. F. & Jacobs, W. R., Jr. (eds.) *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, Washington, D. C.
- Helmstaedt, K.; Heinrich, G.; Merkl, R.; Braus, G. H. (2004) Chorismate mutase of *Thermus thermophilus* is a monofunctional AroH class enzyme inhibited by tyrosine. *Arch. Microbiol.* 181: 195-203.
- Hernández Pando, R.; Aguilar, L. D.; Infante, E.; Cataldi, A.; Bigi, F.; Martin, C.; Gicquel, B. (2006) The use of mutant mycobacteria as new vaccines to prevent tuberculosis. *Tuberculosis* 86: 203-210.
- Herrmann, K. M. (1995) The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. *Plant Physiol.* 107: 7-12.
- Herrmann, K. M. & Weaver, L. M. (1999) The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 473-503.
- Hijjar, M. A. (2005) Tuberculose: desafio permanente. *Cad. Saúde Pública* 21: 348-349.
- Hinds, J.; Mahenthalingam, E.; Kempell, K. E.; Duncan, K.; Stokes, R. W.; Parish, T.; Stoker, N. G. (1999) Enhanced gene replacement in mycobacteria. *Microbiology* 145: 519-527.
- Hingley-Wilson, S. M.; Sambandamurthy, V. K.; Jacobs, W. R., Jr. (2003) Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Immunol.* 4: 949-955.
- Ho, S. N.; Hunt, H. D.; Horton, R. M.; Pullen, J. K.; Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77: 51-59.
- Hondalus, M. K.; Bardarov, S.; Russell, R.; Chan, J.; Jacobs, W. R., Jr.; Bloom, B. R. (2000) Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 68: 2888-2898.
- Hopewell, P. C. (1992) Impact of human immunodeficiency virus infection on the epidemiology, clinical features, management and control of tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 15: 540-547.
- Hopewell, P. C. & Jasmer, R. M. (2005) Overview of clinical tuberculosis. In: Cole, S. T.; Eisenach, K. D.; McMurray, D. N.; Jacobs, W. R., Jr. (eds.) *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. ASM Press, Washington, D. C.
- Horton, R. M.; Cai, Z.; Ho, S. N.; Pease, L. R. (1990) Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 8: 528-535.
- Hu, D. S.-J.; Hood, D. W.; Heidstra, R.; Hodgson, D. A. (1999) The expression of the *trpD*, *trpC* and *trpBA* genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) is regulated by growth rate and growth phase but not by feedback repression. *Mol. Microbiol.* 32: 869-880.
- Husson, R. N.; James, B. E.; Young, R. A. (1990) Gene replacement and expression of foreign DNA in mycobacteria. *J. Bacteriol.* 172: 519-524.
- Jackson, M.; Berthet, F.-X.; Otal, I.; Rauzier, J.; Martín, C.; Gicquel, B.; Guilhot, C. (1996) The *Mycobacterium tuberculosis* purine biosynthetic pathway: isolation and characterization of the *purC* and *purL* genes. *Microbiology* 142: 2439-2447.
- Jackson, M.; Phalen, S. W.; Lagranderie, M.; Ensergueix, D.; Chavarot, P.; Marchal, G.; McMurray, D. N.; Gicquel, B.; Guilhot, C. (1999) Persistence and protective efficacy of a *Mycobacterium tuberculosis* auxotroph vaccine. *Infect. Immun.* 67: 2867-2873.

Jacobs, W. R., Jr.; Tuckman, M.; Bloom, B. R. (1987) Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle phasmid. *Nature* 327: 532-535.

Jain, V.; Sujatha, S.; Ojha, A. K.; Chatterji, D. (2005) Identification and characterization of *rel* promoter element of *Mycobacterium tuberculosis*.

Kamalakaran, V.; Ramachandran, G.; Narayanan, S.; Vasan, S. K.; Narayanan, P. R. (2002) Identification of a novel mycobacterial transcriptional regulator and its involvement in growth rate dependence and stringent control. *FEMS Microbiol. Lett.* 209: 261-266.

Kana, B. D. & Mizrahi, V. (2004) Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* in relation to the discovery of novel drugs and vaccines. *Tuberculosis* 84: 63-75.

Kang, B. K. & Schlesinger, L. S. (1998) Characterization of mannose receptor-dependent phagocytosis mediated by *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan. *Infect. Immun.* 66: 2769-2777.

Kasai, K.; Nishizawa, T.; Takahashi, K.; Hosaka, T.; Aoki, H.; Ochi, K. (2006) Physiological analysis of the stringent response elicited in an extreme thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 188: 7111-7122.

Kast, P.; Asif-Ullah, M.; Jiang, N.; Hilvert, D. (1996) Exploring the active site of chorismate mutase by combinatorial mutagenesis and selection: the importance of electrostatic catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5043-5048.

Kast, P.; Tewari, Y. B.; Wiest, O.; Hilvert, D.; Houk, K. N.; Goldberg, R. N. (1997) Thermodynamics of the conversion of chorismate to prephenate: experimental results and theoretical predictions. *J. Phys. Chem. B* 101: 10976-10982.

Kaufmann, S. H. E.; Cole, S. T.; Mizrahi, V.; Rubin, E.; Nathan, C. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. *J. Exp. Med.* 201: 1693-1697.

Keer, J.; Smeulders, M. J.; Williams, H. D. (2001) A *purF* mutant of *Mycobacterium smegmatis* has impaired survival during oxygen-starved stationary phase. *Microbiology* 147: 473-481.

Kendall, S. L.; Rison, S. C. G.; Movahedzadeh, F.; Frita, R.; Stoker, N. G. (2004) What do microarrays really tell us about *M. tuberculosis*? *Trends Microbiol.* 12: 537-544.

Kimerling, M. E.; Kluge, H.; Vezhnina, N.; Iacovazzi, T.; Demeulenaere, T.; Portaels, F.; Matthys, F. (1999) Inadequacy of the current WHO re-treatment regimen in a central Siberian prison: treatment failure and MDR-TB. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 3: 451-453.

Kloosterman, H.; Hessels, G. I.; Vrijbloed, J. W.; Euverink, G. J.; Dijkhuizen, L. (2003) (De)regulation of key enzyme steps in the shikimate pathway and phenylalanine-specific pathway of the actinomycete *Amycolatopsis methanolica*. *Microbiology* 149: 3321-3330.

Krásny, L. & Gourse, R. L. (2004) An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *EMBO J.* 23: 4473-4483.

Lambert, K. N.; Allen, K. D.; Sussex, I. M. (1999) Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific chorismate mutase from the phytoparasitic nematode *Meloidogyne javanica*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 328-336.

Lamichhane, G.; Raghunand, T. R.; Morrison, N. E.; Woolwine, S. C.; Tyagi, S.; Kandavelou, K.; Bishai, W. R. (2006) Deletion of a *Mycobacterium tuberculosis* proteasomal ATPase homologue gene produces a slow-growing strain that persists in host tissues. *J. Infect. Dis.* 194: 1233-1240.

- Lamichhane, G.; Zignol, M.; Blades, N. J.; Geiman, D. E.; Dougherty, A.; Grosset, J.; Broman, K. W.; Bishai, W. R. (2003) A postgenomic method for predicting essential genes at subsaturation levels of mutagenesis: application to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 7213-7218.
- Larsen, M. H. (2000) Some common methods in mycobacterial genetics. In: Hatfull, G. F. & Jacobs, W. R., Jr. (eds.) *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, Washington, D. C.
- Lassila, J. K.; Keefe, J. R.; Oelschlaeger, P.; Mayo, S. L. (2005) Computationally designed variants of *Escherichia coli* chorismate mutase show altered catalytic activity. *Protein Eng. Des. Sel.* 18: 161-163.
- Lee, A. Y.; Karplus, P. A.; Ganem, B.; Clardy, J. (1995a) Atomic structure of the buried catalytic pocket of *Escherichia coli* chorismate mutase. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 3627-3628.
- Lee, A. Y.; Stewart, J. D.; Clardy, J.; Ganem, B. (1995b) New insight into the catalytic mechanism of chorismate mutases from structural studies. *Chem. Biol.* 2: 195-203.
- Lee, B. H.; Murugasu-Oei, B.; Dick, T. (1998) Upregulation of a histone-like protein in dormant *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Gen. Genet.* 260: 475-479.
- Liu, D. R.; Cload, S. T.; Pastor, R. M.; Schultz, P. G. (1996) Analysis of active site residues in *Escherichia coli* chorismate mutase by site-directed mutagenesis. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 1789-1790.
- Long, M. C.; Escuyer, V.; Parker, W. B. (2003) Identification and characterization of a unique adenosine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 185: 6548-6555.
- MacBeath, G.; Kast, P.; Hilvert, D. (1998) A small, thermostable, and monofunctional chorismate mutase from the archeon *Methanococcus jannaschii*. *Biochemistry* 37: 10062-10073.
- Machowski, E. E.; Dawes, S.; Mizrahi, V. (2005) TB tools to tell the tale: molecular genetic methods for mycobacterial research. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37: 54-68.
- Magalhães, M. L. B.; Pereira, C. P.; Basso, L. A.; Santos, D. S. (2002) Cloning and expression of functional shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.25) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Protein Exp. Purif.* 26: 59-64.
- Magnusson, L. U.; Farewell, A.; Nyström, T. (2005) ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* 13: 236-242.
- Mahenthalingam, E.; Draper, P.; Davis, E. O.; Colston, M. J. (1993) Cloning and sequencing of the gene which encodes the highly inducible acetamidase of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 575-583.
- Malathi, V. G. & Ramakrishnan, T. (1966) Biosynthesis of nucleic acid purines in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Biochem. J.* 98: 594-597.
- Mayuri, G. B.; Das, T. K.; Tyagi, J. S. (2002) Molecular analysis of the dormancy response in *Mycobacterium smegmatis*: expression analysis of genes encoding the DevR-DevS two-component system, Rv3134c and chaperone α -crystallin homologues. *FEMS Microbiol. Lett.* 211: 231-237.
- McAdam, R. A.; Quan, S.; Smith, D. A.; Bardarov, S.; Betts, J. C.; Cook, F. C.; Hooker, E. U.; Lewis, A. P.; Woollard, P.; Everett, M. J.; Lukey, P. T.; Bancroft, G. J.; Jacobs, W. R., Jr.; Duncan, K. (2002) Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv transposon library reveals insertions in 351 ORFs and mutants with altered virulence. *Microbiology* 148: 2975-2986.

- McCarthy, T. R.; Torrelles, J. B.; MacFarlane, A. S.; Katawczik, M.; Kutzbach, B.; DesJardin, L. E.; Clegg, S.; Goldberg, J. B.; Schlesinger, L. S. (2005) Overexpression of *Mycobacterium tuberculosis manB*, a phosphomannomutase that increases phosphatidylinositol mannoside biosynthesis in *Mycobacterium smegmatis* and mycobacterial association with human macrophages. *Mol. Microbiol.* 58: 774-790.
- McFadden, J. (1996) Recombination in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 21: 205-211.
- McKinney, J. D. (2000) *In vivo veritas*: the search for TB drug targets goes live. *Nature Med.* 6: 1330-1333.
- Miller, J. H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Ministério da Saúde. (2006) <http://www.saúde.gov.br>
- Mizrahi, V.; Buckstein, M.; Rubin, H. (2005) Nucleic acid metabolism. In: Cole, S. T.; Eisenach, K. D.; McMurray, D. N.; Jacobs, W. R., Jr. (eds.) *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. ASM Press, Washington, D. C.
- Morsczeck, C. (2003) Strategies for mycobacterial genetics. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 251-259.
- Movahedzadeh, F.; Smith, D. A.; Norman, R. A.; Dinadayala, P.; Murray-Rust, J.; Russell, D. G.; Kendall, S. L.; Rison, S. C. G.; McAlister, M. S. B.; Bancroft, G. J.; McDonald, N. Q.; Daffé, M.; Av-Gay, Y.; Stoker, N. G. (2004) The *Mycobacterium tuberculosis ino1* gene is essential for growth and virulence. *Mol. Microbiol.* 51: 1003-1014.
- Murry, J. P. & Rubin, E. J. (2005) New genetic approaches shed light on TB virulence. *Trends Microbiol.* 13: 366-372.
- Murry, J.; Sasseti, C. M.; Moreira, J.; Lane, J.; Rubin, E. J. (2005) A new site-specific integration system for mycobacteria. *Tuberculosis* 85: 317-323.
- Nathan, C. & Shiloh, M. U. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8841-8848.
- Nguyen, L. & Thompson, C. J. (2006) Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm. *Trends Microbiol.* 14: 304-312.
- Nielsen, H.; Engelbrecht, J.; Brunak, S.; von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 10: 1-6.
- O'Callaghan, D.; Maskell, D.; Liew, F. Y.; Easmon, C. S. F.; Dougan, G. (1988) Characterization of aromatic- and purine-dependent *Salmonella typhimurium*: attenuation, persistence, and ability to induce protective immunity in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 56: 419-423.
- Ojha, A. K.; Mukherjee, T. K.; Chatterji, D. (2000) High intracellular level of guanosine tetraphosphate in *Mycobacterium smegmatis* changes the morphology of the bacterium. *Infect. Immun.* 68: 4084-4091.
- Ökvist, M.; Dey, R.; Sasso, S.; Grahn, E.; Kast, P.; Krengel, U. (2006) 1.6 Å crystal structure of the secreted chorismate mutase from *Mycobacterium tuberculosis*: novel topology revealed. *J. Mol. Biol.* 357: 1483-1499.
- Oliveira, J. S.; Pinto, C. A.; Basso, L. A.; Santos, D. S. (2001) Cloning and overexpression in soluble form of functional shikimate kinase and 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr. Purif.* 22: 430-435.

- Orme, I. M. (2001) The search for new vaccines against tuberculosis. *J. Leukoc. Biol.* 70: 1-10.
- Orme, I. M. & Cooper, A. M. (1999) Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol. Today* 20: 307-312.
- Papavinasasundaram, K. G.; Colston, M. J.; Davis, E. O. (1998) Construction and complementation of a *recA* deletion mutant of *Mycobacterium smegmatis* reveals that the intein in *Mycobacterium tuberculosis recA* does not affect RecA function. *Mol. Microbiol.* 30: 525-534.
- Parish, T. (2003) Starvation survival response of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 185: 6702-6706.
- Parish, T.; Gordhan, B. G.; McAdam, R. A.; Duncan, K.; Mizrahi, V.; Stoker, N. G. (1999) Production of mutants in amino acid biosynthesis genes of *Mycobacterium tuberculosis* by homologous recombination. *Microbiology* 145: 3497-3503.
- Parish, T.; Lewis, J.; Stoker, N. G. (2001) Use of the mycobacteriophage L5 excisionase in *Mycobacterium tuberculosis* to demonstrate gene essentiality. *Tuberculosis* 81: 359-364.
- Parish, T.; Mahenthiralingam, E.; Draper, P.; Davis, E. O.; Colston, M. J. (1997) Regulation of the inducible acetamidase gene of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 143: 2267-2276.
- Parish, T.; Smith, D. A.; Kendall, S.; Casali, N.; Bancroft, G. J.; Stoker, N. G. (2003) Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 71: 1134-1140.
- Parish, T.; Smith, D. A.; Roberts, G.; Betts, J.; Stoker, N. G. (2003) The *senX3-regX3* two-component regulatory system of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence. *Microbiology* 149: 1423-1435.
- Parish, T. & Stoker, N. G. (1998a) Electroporation of mycobacteria. In: Parish, T. & Stoker, N. G. (eds.) *Methods in Molecular Biology*, vol. 101: *Mycobacteria Protocols*. Humana Press, Totowa.
- Parish, T. & Stoker, N. G. (1998b) Mycobacteria: bugs and bugbears. In: Parish, T. & Stoker, N. G. (eds.) *Methods in Molecular Biology*, vol. 101: *Mycobacteria Protocols*. Humana Press, Totowa.
- Parish, T. & Stoker, N. G. (2000a) *glnE* is an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 182: 5715-5720.
- Parish, T. & Stoker, N. G. (2000b) Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis tlyA plcABC* mutant by gene replacement. *Microbiology* 146: 1969-1975.
- Parish, T. & Stoker, N. G. (2002) The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 148: 3069-3077.
- Parish, T.; Turner, J.; Stoker, N. G. (2001) *amiA* is a negative regulator of acetamidase expression in *Mycobacterium smegmatis*. *BMC Microbiol.* 1: 19.
- Parish, T. & Wheeler, P. R. (1998) Preparation of cell-free extracts from mycobacteria. In: Parish, T. & Stoker, N. G. (eds.) *Methods in Molecular Biology*, vol. 101: *Mycobacteria Protocols*. Humana Press, Totowa.
- Park, H.-D.; Guinn, K. M.; Harrell, M. I.; Liao, R.; Voskuil, M. I.; Tompa, M.; Schoolnik, G. K.; Sherman, D. R. (2003) Rv3133c/*dosR* is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 48: 833-843.

- Parker, W. B.; Barrow, E. W.; Allan, P. W.; Shaddix, S. C.; Long, M. C.; Barrow, W. W.; Bansal, N.; Maddy, J. A. (2004) Metabolism of 2-methyladenosine in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 84: 327-336.
- Pashley, C. A. & Parish, T. (2003) Efficient switching of mycobacteriophage L5-based integrating plasmids in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 229: 211-215.
- Pashley, C. & Stoker, N. G. (2000) Plasmids in mycobacteria. In: Hatfull, G. F. & Jacobs, W. R., Jr. (eds.) *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, Washington, D. C.
- Pavelka, M. S., Jr. & Jacobs, W. R., Jr. (1999) Comparison of the construction of unmarked deletion mutations in *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin, and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv by allelic exchange. *J. Bacteriol.* 181: 4780-4789.
- Pellicic, V.; Jackson, M.; Reyrat, J.-M.; Jacobs, W. R., Jr.; Gicquel, B.; Guilhot, C. (1997) Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10955-10960.
- Pellicic, V.; Reyrat, J.-M.; Gicquel, B. (1996a) Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J. Bacteriol.* 178: 1197-1199.
- Pellicic, V.; Reyrat, J.-M.; Gicquel, B. (1996b) Generation of unmarked directed mutations in mycobacteria, using sucrose counter-selectable suicide vectors. *Mol. Microbiol.* 20: 919-925.
- Pellicic, V.; Reyrat, J.-M.; Gicquel, B. (1998) Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol. Microbiol.* 28: 413-420.
- Pethe, K.; Swenson, D. L.; Alonso, S.; Anderson, J.; Wang, C.; Russell, D. G. (2004) Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13642-136427.
- Pittard, A. J. (1996) Biosynthesis of the aromatic amino acids. In: Neidhardt, F. C. (ed.) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 2nd ed. ASM Press, Washington, D. C.
- Pizarro-Cerdá, J. & Tedin, K. (2004) The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. *Mol. Microbiol.* 52: 1827-1844.
- Prakash, P.; Aruna, B.; Sardesai, A. A.; Hasnain, S. E. (2005a) Purified recombinant hypothetical protein coded by open reading frame Rv1885c of *Mycobacterium tuberculosis* exhibits a monofunctional AroQ class of periplasmic chorismate mutase activity. *J. Biol. Chem.* 280: 19641-19648.
- Prakash, P.; Pathak, N.; Hasnain, S. E. (2005b) *pheA* (Rv3838c) of *Mycobacterium tuberculosis* encodes an allosterically regulated monofunctional prephenate dehydratase that requires both catalytic and regulatory domains for optimum activity. *J. Biol. Chem.* 280: 20666-20671.
- Primm, T. P.; Andersen, S. J.; Mizrahi, V.; Avarbock, D.; Rubin, H.; Barry, C. E., III (2000) The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J. Bacteriol.* 182: 4889-4898.
- Qamra, R.; Prakash, P.; Aruna, B.; Hasnain, S. E.; Mande, S. C. (2006) The 2.15 Å crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* chorismate mutase reveals an unexpected gene duplication and suggests a role in host-pathogen interactions. *Biochemistry* 45: 6997-7005.
- Rachman, H.; Strong, M.; Ulrichs, T.; Grode, L.; Schuchhardt, J.; Mollenkopf, H.; Kosmiadi, G. A.; Eisenberg, D.; Kaufmann, S. H. E. (2006) Unique transcriptome signature of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* 74: 1233-1242.

- Raghunand, T. R. & Bishai, W. R. (2006) *Mycobacterium smegmatis whmD* and its homologue *Mycobacterium tuberculosis whiB2* are functionally equivalent. *Microbiology* 152: 2735-2747.
- Rallu, F.; Gruss, A.; Ehrlich, S. D.; Maguin, E. (2000) Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactobacillus lactis*: identification of intracellular stress signals. *Mol. Microbiol.* 35: 517-528.
- Raman, S.; Hazra, R.; Dascher, C. C.; Husson, R. N. (2004) Transcription regulation by the *Mycobacterium tuberculosis* alternative sigma factor SigD and its role in virulence. *J. Bacteriol.* 186: 6605-6616.
- Rao, V.; Gao, F.; Chen, B.; Jacobs, W. R., Jr.; Glickman, M. S. (2006) *Trans*-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses *Mycobacterium tuberculosis*-induced inflammation and virulence. *J. Clin. Invest.* 116: 1660-1667.
- Rastogi, N.; Legrand, E.; Sola, C. (2001) The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 20: 21-54.
- Reyrat, J.-M. & Kahn, D. (2001) *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis? *Trends Microbiol.* 9: 472-473.
- Reyrat, J.-M.; Pelicic, V.; Gicquel, B.; Rappuoli, R. (1998) Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect. Immun.* 66: 4011-4017.
- Rizzi, C.; Frazzon, J.; Ely, F.; Weber, P. G.; da Fonseca, I. O.; Gallas, M.; Oliveira, J. S.; Mendes, M. A.; de Souza, B. M.; Palma, M. S.; Santos, D. S.; Basso, L. A. (2005) DAHP synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning, expression, and purification of functional enzyme. *Protein Exp. Purif.* 40: 23-30.
- Roberts, C. W.; Roberts, F.; Lyons, R. E.; Kirisits, M. J.; Mui, E. J.; Finnerty, J.; Johnson, J. J.; Ferguson, D. J. P.; Coggins, J. R.; Krell, T.; Coombs, G. H.; Milhous, W. K.; Kyle, D. E.; Tzipori, S.; Barnwell, J.; Dame, J. B.; Carlton, J.; McLeod, R. (2002) The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites. *J. Infect. Dis.* 185: S25-S36.
- Roberts, G.; Muttucumar, D. G. N.; Parish, T. (2003) Control of the acetamidase gene of *Mycobacterium smegmatis* by multiple regulators. *FEMS Microbiol. Lett.* 221: 131-136.
- Rodriguez, G. M. (2006) Control of iron metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 14: 320-327.
- Rodriguez, G. M.; Voskuil, M. I.; Gold, B.; Schoolnik, G. K.; Smith, I. (2002) *ideR*, an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infect. Immun.* 70: 3371-3381.
- Rose, A. M. C.; Watson, J. M.; Graham, C.; Nunn, A. J.; Drobniowski, F.; Ormerod, L. P.; Darbyshire, J. H.; Leese, J. (2001) Tuberculosis at the end of the 20th century in England and Wales: results of a national survey in 1998. *Thorax* 56: 173-179.
- Russell, D. G. (2001) *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 569-577.
- Sambandamurthy, V. K. & Jacobs, W. R., Jr. (2005) Live attenuated mutants of *Mycobacterium tuberculosis* as candidate vaccines against tuberculosis. *Microbes Infect.* 7: 955-961.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

- Sampson, S. L.; Dascher, C. C.; Sambandamurthy, V. K.; Russell, R. G.; Jacobs, W. R., Jr.; Bloom, B. R.; Hondalus, M. K. (2004) Protection elicited by a double leucine and pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *Infect. Immun.* 72: 3031-3037.
- Sareen, D.; Newton, G. L.; Fahey, R. C.; Buchmeier, N. A. (2003) Mycothiol is essential for growth of *Mycobacterium tuberculosis* Erdman. *J. Bacteriol.* 185: 6736-6740.
- Sassetti, C. M.; Boyd, D. H.; Rubin, E. J. (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 48: 77-84.
- Sasso, S.; Ramakrishnan, C.; Gamper, M.; Hilvert, D.; Kast, P. (2005) Characterization of the secreted chorismate mutase from *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS J.* 272: 375-389.
- Schlesinger, L. S. (1993) Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J. Immunol.* 150: 2920-2930.
- Schneider, C. Z.; Basso, L. A.; Santos, D. S. (2003) The two monofunctional chorismate mutases from *Mycobacterium tuberculosis*. In: 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu. Livro de Resumos da XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, p. 76.
- Seliverstov, A. V.; Putzer, H.; Gelfand, M. S.; Lyubetsky, V. A. (2005) Comparative analysis of RNA regulatory elements of amino acid metabolism genes in Actinobacteria. *BMC Microbiology* 5: 54.
- Shi, W.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Tyler, P. C.; Furneaux, R. H.; Blanchard, J. S.; Almo, S. C.; Schramm, V. L. (2001) Structures of purine nucleoside phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* in complexes with immucillin-H and its pieces. *Biochemistry* 40: 8204-8215.
- Shimono, N.; Morici, L.; Casali, N.; Cantrell, S.; Sidders, B.; Ehrh, S.; Riley, L. W. (2003) Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the *mce1* operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15918-15923.
- Shleeva, M.; Mukamolova, G. V.; Young, M.; Williams, H. D.; Kaprelyants, A. S. (2004) Formation of 'non-culturable' cells of *Mycobacterium smegmatis* in stationary phase in response to growth under suboptimal conditions and their Rpf-mediated resuscitation. *Microbiology* 150: 1687-1697.
- Skeiky, Y. A. W. & Sadoff, J. C. (2006) Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nature Rev. Microbiol.* 4: 469-476.
- Smeulders, M. J.; Keer, J.; Speight, R. A.; Williams, H. D. (1999) Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. *J. Bacteriol.* 181: 270-283.
- Smith, D. A.; Parish, T.; Stoker, N. G.; Bancroft, G. J. (2001) Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. *Infect. Immun.* 69: 1142-1150.
- Smith, I. (2003) *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 463-496.
- Smith, I.; Bishai, W. R.; Nagaraja, V. (2005) Control of mycobacterial transcription. In: Cole, S. T.; Eisenach, K. D.; McMurray, D. N.; Jacobs, W. R., Jr. (eds.) *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. ASM Press, Washington, D. C.
- Smith, N. H.; Gordon, S. V.; de la Rua-Domenech, R.; Clifton-Hadley, R. S.; Hewinson, R. G. (2006) Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium bovis*. *Nature Rev. Microbiol.* 4: 670-681.

- Snapper, S. B.; Melton, R. E.; Mustafa, S.; Kieser, T.; Jacobs, W. R., Jr. (1990) Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 4: 1911-1919.
- Snewin, V.; Stewart, G.; Young, D. B. (2000) Genetic strategies for vaccine development. In: Hatfull, G. F. & Jacobs, W. R., Jr. (eds.) *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, Washington, D. C.
- Soberón, M.; Morera, C.; Kondorosi, A.; Lopez, O.; Miranda, J. (2001) A purine-related metabolite negatively regulates *fixNOQP* expression in *Sinorhizobium meliloti* by modulation of *fixK* expression. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 572-576.
- Song, J.; Bonner, C. A.; Wolinsky, M.; Jensen, R. A. (2005) The TyrA family of aromatic-pathway dehydrogenases in phylogenetic context. *BMC Biology* 3: 13.
- Stadthagen, G.; Korduláková, J.; Griffin, R.; Constant, P.; Bottová, I.; Barilone, N.; Gicquel, B.; Daffé, M.; Jackson, M. (2005) *p*-Hydroxybenzoic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* 280: 40699-40706.
- Stewart, G. R.; Patel, J.; Robertson, B. D.; Rae, A.; Young, D. B. (2005) Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. *PLoS Pathogens* 1: 269-278.
- Stewart, G. R.; Robertson, B. D.; Young, D. B. (2003) Tuberculosis: a problem with persistence. *Nature Rev. Microbiol.* 1: 97-105.
- Stoker, N. G.; Sander, P.; Reyrat, J.-M. (2005) Gene replacement systems. In: Cole, S. T.; Eisenach, K. D.; McMurray, D. N.; Jacobs, W. R., Jr. (eds.) *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. ASM Press, Washington, D. C.
- Stop TB Partnership & WHO – World Health Organization. (2006) The Global Plan to Stop TB, 2006-2015, WHO/HTM/STB/2006.35 (Geneva: World Health Organization).
- Štrajbl, M.; Shurki, A.; Kato, M.; Warshel, A. (2003) Apparent NAC effect in chorismate mutase reflects electrostatic transition state stabilization. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 10228-10237.
- Sträter, N.; Schnappauf, G.; Braus, G.; Lipscomb, W. N. (1997) Mechanisms of catalysis and allosteric regulation of yeast chorismate mutase from crystal structures. *Structure* 5: 1437-1452.
- Taylor, C. M.; Beresford, M.; Epton, H. A. S.; Sigee, D. C.; Shama, G.; Andrew, P. W.; Roberts, I. S. (2002) *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence. *J. Bacteriol.* 184: 621-628.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Tyagi, J. S. & Sharma, D. (2002) *Mycobacterium smegmatis* and tuberculosis. *Trends Microbiol.* 10: 68-69.
- van Helden, P. D.; Victor, T. C.; Warren, R. M.; van Helden, E. G. (2001) Isolation of DNA from *Mycobacterium tuberculosis*. In: Parish, T. & Stoker, N. G. (eds.) *Methods in Molecular Medicine*, vol. 54: *Mycobacterium Tuberculosis Protocols*. Humana Press, Totowa.
- Varcamonti, M.; Graziano, M. R.; Pezzopane, R.; Naclerio, G.; Arsenijevic, S.; De Felice, M. (2003) Impaired temperature stress response of a *Streptococcus thermophilus deoD* mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1287-1289.

- Verma, A.; Sampla, A. K.; Tyagi, J. S. (1999) *Mycobacterium tuberculosis* *rrn* promoters: differential usage and growth rate-dependent control. *J. Bacteriol.* 181: 4326-4333.
- Voskuil, M. I. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during environmental conditions associated with latency. *Tuberculosis* 84: 138-143.
- Voskuil, M. I.; Schnappinger, D.; Visconti, K. C.; Harrell, M. I.; Dolganov, G. M.; Sherman, D. R.; Schoolnik, G. K. (2003) Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J. Exp. Med.* 198: 705-713.
- Wards, B. J. & Collins, D. M. (1996) Electroporation at elevated temperatures substantially improves transformation efficiency of slow-growing mycobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 145: 101-105.
- Warner, D. F. & Mizrahi, V. (2006) Tuberculosis chemotherapy: the influence of bacillary stress and damage response pathways on drug efficacy. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 558-570.
- Wayne, L. G. & Sohaskey, C. D. (2001) Non-replicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 139-163.
- Wheeler, P. R. (1987a) Biosynthesis and scavenging of purines by pathogenic mycobacteria including *Mycobacterium leprae*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 2999-3011.
- Wheeler, P. R. (1987b) Enzymes for purine synthesis and scavenging in pathogenic mycobacteria and their distribution in *Mycobacterium leprae*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 3013-3018.
- Wheeler, P. R. (2001) Understanding the physiology of difficult, pathogenic bacteria from analysis of their genome sequences. *J. Med. Microbiol.* 50: 843-846.
- Wheeler, P. R. & Blanchard, J. S. (2005) General metabolism and biochemical pathways of tubercle bacilli. In: Cole, S. T.; Eisenach, K. D.; McMurray, D. N.; Jacobs, W. R., Jr. (eds.) *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. ASM Press, Washington, D. C.
- Wheeler, P. R. & Ratledge, C. (1994) Metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bloom, B. R. (ed.) *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*. ASM Press, Washington, D. C.
- WHO – World Health Organization. (1993) Tuberculosis: a global emergency. *World Health Forum* 14: 438.
- WHO – World Health Organization. (2004) Tuberculosis. <http://www.who.int/tb/en/>
- Winship, P. R. (1989) An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Res.* 17: 1266.
- Xia, T.; Song, J.; Zhao, G.; Aldrich, H.; Jensen, R. A. (1993) The *aroQ*-encoded monofunctional chorismate mutase (CM-F) protein is a periplasmic enzyme in *Erwinia herbicola*. *J. Bacteriol.* 175: 4729-4737.
- Xu, S.; Yang, Y.; Jin, R.; Zhang, M.; Wang, H. (2006) Purification and characterization of a functionally active *Mycobacterium tuberculosis* prephenate dehydrogenase. *Protein Exp. Purif.* 49: 151-158.
- Xue, Y.; Lipscomb, W. N.; Graf, R.; Schnappauf, G.; Braus, G. (1994) The crystal structure of allosteric mutase at 2.2-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10814-10818.
- Ygberg, S. E.; Clements, M. O.; Rytönen, A.; Thompson, A.; Holden, D. W.; Hinton, J. C. D.; Rhen, M. (2006) Polynucleotide phosphorylase negatively controls *spv* virulence gene expression in *Salmonella enterica*. *Infect. Immun.* 74: 1243-1254.

- Young, D. B. & Cole, S. T. (1993) Leprosy, tuberculosis, and the new genetics. *J. Bacteriol.* 175: 1-6.
- Young, D. B. & Dye, C. (2006) The development and impact of tuberculosis vaccines. *Cell* 124: 683-687.
- Young, D. B. & Stewart, G. R. (2002) Tuberculosis vaccines. *Br. Med. Bull.* 62: 73-86.
- Zahrt, T. C. (2003) Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect.* 5: 159-167.
- Zalkin, H. & Nygaard, P. (1996) Biosynthesis of purine nucleotides. In: Neidhardt, F. C. (ed.) *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 2nd ed. ASM Press, Washington, D. C.
- Zhang, S.; Kongsaree, P.; Clardy, J.; Wilson, D. B.; Ganem, B. (1996) Site-directed mutagenesis of monofunctional chorismate mutase engineered from the *E. coli* P-protein. *Bioorg. Med. Chem.* 4: 1015-1020.
- Zhang, S.; Pohnert, G.; Kongsaree, P.; Wilson, D. B.; Clardy, J.; Ganem, B. (1998) Chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli*: study of catalytic and regulatory domains using genetically engineered proteins. *J. Biol. Chem.* 273: 6248-6253.
- Zhang, X.; Zhang, X.; Bruce, T. C. (2005) A definitive mechanism for chorismate mutase. *Biochemistry* 44: 10443-10448.
- Zhang, Y. (2005) The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 529-564.
- Zhao, G.; Xia, T.; Aldrich, H.; Jensen, R. A. (1993) Cyclohexadienyl dehydratase from *Pseudomonas aeruginosa* is a periplasmic protein. *J. Gen. Microbiol.* 139: 807-813.