

Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Cristina Kraemer Zimpel

Adaptação de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis* a hospedeiros: uma análise genômica e transcricional

A tuberculose (TB) é uma doença causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) que infectam humanos e animais. Membros do MTBC possuem evolução clonal, porém apesar da grande similaridade genômica demonstram diferenças em adaptabilidade hospedeira e grau de virulência. Enquanto *Mycobacterium tuberculosis* é o principal causador da TB humana, *Mycobacterium bovis* possui uma ampla gama de hospedeiros com persistência populacional variável. Para melhor compreender diferenças fenotípicas entre ambas as espécies, esta tese foi desenvolvida com dois objetivos: (i) avaliar filogenomicamente a população de *M. bovis* isolados de bovinos e animais selvagens distribuídos mundialmente, e prover estimativas de datação evolutiva da origem desse patógeno; (ii) comparar o perfil transcriptômico de *M. bovis* SP38 e *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro* e identificar vias metabólicas ativas utilizando análise de balanço de fluxo (FBA) associada a transcriptoma. Primeiramente, a análise filogenômica, incluindo aproximadamente 2.000 genomas de *M. bovis* isolados de 23 países, identificou a existência de pelo menos quatro linhagens distintas (Lb1, Lb2, Lb3 e Lb4) abrangendo a distribuição atual da doença. Essas linhagens se agrupam de acordo com a localização geográfica e com complexos clonais (CC), mas não com espécie hospedeira. Além disso, análises evolutivas indicam possível origem de diversificação de *M. bovis* há 715 e 3.556 anos, com surgimento mais tardio no Novo Mundo e Oceania, provavelmente devido relações econômicas entre os países. Por seguinte, a análise de RNA-seq de *M. tuberculosis* e *M. bovis* a partir de culturas *in vitro* demonstrou diferenças significativas na expressão gênica envolvendo genes relacionados à metabolismo de parede celular, com regulação positiva de PDIM (*phthiocerol dimycocerosates*) em *M. bovis* e regulação positiva de SL-1 (sulfolipídio), lipídeos contendo trealose e glicolipídios em *M. tuberculosis*. Entre os genes mais expressos, *M. bovis* apresentou regulação positiva em genes relacionados ao regulon SigK e sistema de secreção ESX-1, por sua vez, *M. tuberculosis* demonstrou regulação positiva em genes associados a metabolismo de nitrato e sistemas toxina-antitoxina. Ainda, FBA sugere diferenças no metabolismo central de carbono, especialmente no uso de glutamato em direção ao GABA shunt em *M. tuberculosis*, ou à produção de cisteína em *M. bovis*. É possível que essas diferenças sejam observadas devido *M. bovis* ser classificado como um microaerófilo e *M. tuberculosis* um aeróbio obrigatório. Por fim, os estudos reportados expandem significativamente o conhecimento sobre a estrutura populacional de *M. bovis* e seu metabolismo, quando comparado ao organismo modelo, *M. tuberculosis*. Os resultados podem também servir como base para pesquisas futuras, relacionadas ao uso de genômica para entender padrões de distribuição da doença e virulência, assim como entender como essas micobactérias respondem a condições ambientais que podem explicar suas características de virulência e adaptabilidade hospedeira.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mycobacterium bovis*. Genômica. Transcriptômica. Análise de balance de fluxo.

## Host adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*: a genomic and transcriptional approach

Abstract Tuberculosis (TB) is caused by the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), a bacterial group of clonally evolved pathogens that infect humans and animals. Despite a high genetic similarity, MTBC members demonstrate different host tropism and virulence. While *Mycobacterium tuberculosis* is the main causative agent of human TB and is highly adapted to this host species, *Mycobacterium bovis* has a broader host range with variable populational persistence. In order to provide insights into phenotypic differences between both pathogens, this four-chapter thesis was developed with two major aims: (i) to perform a phylogenomic analysis to understand the populational structure of *M. bovis* isolated from cattle and wildlife worldwide and to provide dating estimates for the origin of this pathogen; and (ii) to compare the global transcriptional profiles of *M. bovis* SP38 and *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro* and identify their activated metabolic pathways using flux balance analysis (FBA) coupled with transcriptomics. First, the phylogenomic analysis, including approximately 2,000 *M. bovis* genomes from 23 countries, identified at least four distinct lineages of *M. bovis* (Lb1, Lb2, Lb3, and Lb4) underlying the current disease distribution. These lineages clustered according to geographical origin and clonal complexes (CC), but not host species. Additionally, data divergence analysis indicates that extant *M. bovis* originated between 715- and 3,556-years BP (before present), with later emergence in the New World and Oceania, likely influenced by trades among countries. Next, RNA-seq from *M. tuberculosis* and *M. bovis* grown *in vitro* showed significant differences involving genes related to cell wall metabolism, with upregulation of PDIM (*phthiocerol dimycocerosates*) in *M. bovis*, and upregulation of SL-1 (sulfolipid), trehalose lipids, and glycolipids in *M. tuberculosis*. Among the top expressed genes, SigK regulon and secretion system ESX-1 were upregulated in *M. bovis*, while genes of the nitrate metabolism and toxin-antitoxin systems were upregulated in *M. tuberculosis*. Furthermore, FBA suggests major differences in central carbon metabolism between species, particularly in the use of glutamate to fuel the GABA shunt in *M. tuberculosis*, but cysteine production in *M. bovis*. We speculate that some of these differences occur because *M. bovis* is a microaerophile and *M. tuberculosis* an obligate aerobe. In conclusion, the studies reported herein greatly expanded our knowledge of the populational structure of *M. bovis* and its metabolism in comparison to the model organism *M. tuberculosis*. These results will serve as basis for further research related to the use of genomics to understand disease transmission and virulence, as well as to how these mycobacteria respond to microenvironmental conditions that can sustain their virulence and host tropism traits.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Mycobacterium bovis*. Genomics. Transcriptomics. Flux balance analysis.