

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

MARCELO DE CÁSSIO BARRETO DE OLIVEIRA

**Caracterização estrutural e funcional do transportador do
tipo ABC de glutamina de *Mycobacterium tuberculosis***

SÃO PAULO

2021

MARCELO DE CÁSSIO BARRETO DE OLIVEIRA

Caracterização estrutural e funcional do transportador do tipo ABC de glutamina de *Mycobacterium tuberculosis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientadora: Dra. Andrea Balan Fernandes

Versão Original

SÃO PAULO

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Barreto de Oliveira, Marcelo de Cássio
Caracterização estrutural e funcional do
transportador do tipo ABC de glutamina de
Mycobacterium tuberculosis / Marcelo de Cássio
Barreto de Oliveira; orientador Andrea Balan
Fernandes. -- São Paulo, 2021.
203 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Transportadores ABC. 2. Mycobacterium
tuberculosis. 3. Exportadores. 4. Importadores. 5.
tuberculose. I. Balan Fernandes, Andrea,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Marcelo de Cássio Barreto de Oliveira

Título da Tese: Caracterização estrutural e funcional do transportador do tipo ABC de glutamina de *Mycobacterium tuberculosis*

Orientadora: Dra. Andrea Balan Fernandes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/....../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **768/2015** referente ao projeto intitulado: "*Caracterização Estrutural e Funcional do Transportador do Tipo ABC de Glutamina de Mycobacterium tuberculosis*" sob a responsabilidade de Marcelo de Cássio Barreto de Oliveira e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Andrea Balan Fernandes**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 06 de outubro de 2015

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Produção de anticorpos policlonais à partir de proteínas de microrganismos de importância médica", protocolada sob o CEUA nº 6600060820, sob a responsabilidade de **Luis Carlos de Souza Ferreira e equipe; Ana Carolina Ramos Moreno; Andrea Balan Fernandes; Stephany da Costa Torres; Marcelo de Cássio Barreto de Oliveira; Victor Bolsanelli Cioffi; Larissa Magri Dias** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 14/09/2020.

We certify that the proposal "Production of polyclonal antibodies from proteins of microorganisms of medical importance", utilizing 120 Isogenics mice (120 females), protocol number CEUA 6600060820, under the responsibility of **Luis Carlos de Souza Ferreira and team; Ana Carolina Ramos Moreno; Andrea Balan Fernandes; Stephany da Costa Torres; Marcelo de Cássio Barreto de Oliveira; Victor Bolsanelli Cioffi; Larissa Magri Dias** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 09/14/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: **48 meses**

Depto/Setor: [Microbiologia](#)

Origem: [Biotério Central FMUSP](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: **Fêmeas**

Idade ou peso: **6 a 14 semanas**

Linhagem: [C57BL/6](#)

N amostral: **120**

São Paulo, 15 de setembro de 2020



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

DEDICATÓRIA

À minha família pelo amor e apoio
incondicional que me permitiram alcançar
esse sonho. Ao Ahlex pelo companheirismo
nesses quase 10 anos.
Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter guiado meus passos até aqui e permitido que esses tenham sido dias inesquecíveis.

Aos meus pais, José Antônio e Sônia Maria, pelo amor acalentador, pelos ricos valores que me ensinaram e por me incentivar na paixão pelo conhecimento. Às minhas irmãs Bruna e Fernanda, por todos os momentos de felicidade compartilhados e pelo apoio em todas as horas.

Ao Ahlex, pelo incentivo constante, pela troca de experiência, pelo exemplo de ética e evolução profissional e pessoal e, principalmente, por se compreensível por tantas ausências nesses últimos anos.

À Dra. Andrea Balan, um agradecimento especial, por acreditar nesse aluno que bateu em sua porta com um sonho e que nem ao menos sabia correr um gel de proteína. Obrigado pela sabedoria compartilhada e pelos momentos que me fizeram crescer como profissional e como pessoa.

À Dra. Cristiane Tambascia por nossos cafés científicos, com os quais aprendi muito. Mais do que isso, obrigado pela amizade sincera e carinhosa. À Dra. Andréia Navarro por compartilhar seu conhecimento e me permitir fazer parte do momento marcante que foi a chegada do Pedro em sua vida. À Msc. Pâmela Pena, amiga de todas as horas, obrigado por cada momento em que me apoiou, me ouviu e me suportou. Obrigado pelas sessões musicais e as alegrias do dia a dia. Aos futuros mestres Cindy Lee e Danilo, obrigado por cada momento compartilhado e pelos conselhos nas horas de dificuldade. À Msc. Brenda Oliveira, amiga foram momentos de muita alegria, obrigado por todo suporte e por sempre ver o copo meio-cheio. Às Dras. Lilia Iriarte e Sindy Cabarca, pelas diversas conversas e por me permitir conhecer outra cultura através de vocês.

Aos meus novos amigos e que se tornaram uma brisa de ar fresco no final desse doutorado Lucas, Victor e Stephany, vocês são mais que especiais e lhes desejo toda sorte do mundo. Obrigado por estarem ao meu lado todos os dias e por dividirem as lutas e bons momentos.

Ao Dr. Marko Hyvönen e seu grupo, que me receberam de maneira extraordinária em Cambridge e que me ensinaram a fazer Ciência com qualidade e ética. Com certeza foram dias que

mudaram minha vida para sempre. Em especial os agradecimentos à Beata, Tom, Katharina, Xuelu, Tom, Matthew, Claire e Margherita por todo suporte e experiências compartilhadas.

À Dra. Isabel de Moraes, que tão bem me recebeu no NPL e que não mediu esforços para que esse projeto fosse realizado e com o qual eu pude aprender ainda mais sobre proteínas de membrana. Especialmente, agradeço aos membros do seu grupo, Tristan e seu maravilhoso português, Rosana e seu jeitinho brasileiro que se tornou um porto seguro para mim, e Inês sempre sorrindo. Estendo os agradecimentos à Tatiana e Orode por todos os momentos divididos dentro ou fora do Research Complex.

Não poderia deixar de agradecer à minhas amigas mais que especiais Tábata, Catharina, Priscila Bury e Laura (Colômbia), com vocês eu aprendi que a vida é doce e muito feliz. Vocês têm um lugar especial em meu coração. Um agradecimento mais que especial às Dras. Ana Carolina Moreno e Fernanda Amarante, não apenas por terem ajudado em diversos experimentos realizados, como também por serem pessoas extraordinárias que admiro muito.

Ao Dr. Enéas de Carvalho do Instituto Butantan pela ajuda nos experimentos de dicroísmo circular e debates científicos e a Dra. Luciana César de Cerqueira Leite do Instituto Butantã por gentilmente nos ceder à cepa de BCG.

Um agradecimento a Dra. Cristina Viana Niero que gentilmente nos cedeu cepas de *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* H37Ra e ao Prof. André Kipnis que nos cedeu plasmídeos para expressão em micobactérias e a cepa de *M. abscessus*.

Aos grandes amigos que encontrei nesse departamento Edmar, Brenda, Marília, Sair, Fernanda, Jennifer, Karine, Mariângela, Mônica, Fagner, Lennon, Luana, Bruna, Nicolas, Paula, Natiely, Aléxia, Marianna, Gaby, Rúbens, Shahab, Camilinha, Felipe, Kerstin, Cris Zimpel, Alê Banari, Antônio, Maysa e Aline, com vocês a caminhada se tornou mais leve e divertida. À minha grande amiga Mariana Rangel que me recebeu tão bem em Cambridge, que dividiu seu tempo e atenção comigo e que me fez me sentir em casa. Aos futuros doutores Samuel e Robert Andreatta pela ajuda nos experimentos e por toda gentileza que sempre me trataram. As grandes amigas que fiz durante a especialização Fernanda, Luciana, Natália, Camila e Cris Silver, foi maravilhoso conhecer vocês.

Aos professores Luís Carlos Ferreira, Rita Café Ferreira, Ana Márcia Guimaraes, Gabriel Padilha, Márcio Dias, Kelly Ishida e Cristiane Guzzo por todas as vezes que cederam seus laboratórios para realização de algum experimento e que tanto me ensinaram. Um agradecimento

especial para os professores Gregório Cabrera, Luiziana Silva e Marilis do Valle, com vocês eu aprendi muito durante o estágio PAE e a paixão pela Microbiologia só aumentou.

Ao professor Wellington Araújo por gentilmente nos ceder seu laboratório e equipamento para realização dos últimos experimentos e a professora Márcia Maier por nos permitir realizar alguns ensaios em seu laboratório durante a epidemia.

Por fim, a todos os funcionários do ICB, cujo trabalho permitiu que esse projeto e tantos outros fossem realizados. E à Universidade de São Paulo que me permitiu conhecer pessoas extraordinárias e desenvolver Ciência no mais elevado nível.

Este projeto foi realizado no Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada – transportadores, localizado no Instituto de Ciências Biomédicas II. Agradecemos o financiamento das seguintes agências: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projetos regulares 2015/14514-1 e 2018/20162-9, bolsa de doutorado 2015/17476-3 e bolsa BEPE 2018/26/740-4. Projeto Newton Advanced Fellowship, U. Cambridge-USP, e CAPES.

“A Ciência atua na fronteira entre o conhecimento e a ignorância sem medo de admitir que não sabemos. Não há nenhuma vergonha nisso. A única vergonha é fingir que temos todas as respostas.”

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

OLIVEIRA, M. C. B. **Caracterização estrutural e funcional do transportador do tipo ABC de glutamina de *Mycobacterium tuberculosis***. 2021. Tese (Doutorado em Microbiologia – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021)

A tuberculose consiste na principal doença infecciosa mundial, sendo responsável por milhares de óbitos. Causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), apresenta-se como uma doença de difícil diagnóstico e limitadas opções de tratamento. Os transportadores ABC, do inglês *ATP-Binding Cassette*, representam a principal classe de proteínas transportadoras em MTB, e embora sejam altamente relevantes no processo de resistência às drogas e sobrevivência no macrófago, pouco se sabe sobre a função específica destes. A função da maioria dos sistemas descritos ou sua essencialidade durante a infecção, tem sido atribuída por abordagens genômicas ou proteômicas com funções putativas. Desde a primeira revisão sobre o tema, em 2000, os estudos mais específicos de tais transportadores têm revelado uma enorme diversidade funcional e estrutural, aumentando o interesse na área. Entre esses sistemas, destaca-se o alvo de estudo deste trabalho, o transportador Rv2563-Rv2564, cuja função putativa ainda não é conhecida. Baseados em análises de bioinformática identificamos que o transportador apresenta domínios e características estruturais de transportadores da superfamília MacB, cujos principais representantes estão relacionados ao efluxo de drogas e reciclagem de componentes da membrana, e que juntamente com outro transportador de *M. tuberculosis* (Rv0072-Rv0073), com o qual compartilha alta similaridade sequencial/estrutural, estão presentes somente em bactérias do complexo *M. tuberculosis*, indicando que pode haver duplicidade de funções. A partir de diferentes construções, foram obtidos os domínios periplasmáticos da permease Rv2563 (Rv2563per), a permease completa e o domínio de ligação ao ATP (ATPase). Embora não tenhamos conseguido obter o complexo de forma estável, foram obtidos cristais da permease que difrataram a 4.95 Å de resolução. A região periplasmática da proteína de membrana Rv2563 foi caracterizada em ensaios de difração circular e utilizada para a obtenção de anticorpos em camundongos C57BL/6. Ensaios de Western blot, pull-down, espectrometria de massas e RT-PCR, revelaram que o transportador é transcrito de forma constitutiva nas condições analisadas e não sofreu regulação pela presença de antibióticos no meio de cultivo. Os dados sugerem que sua participação pode estar relacionada às condições de estresse celular. O conjunto de dados obtidos neste trabalho consiste na primeira compilação de estudos sobre este transportador que pode ser um excelente alvo para desenvolvimentos de novos fármacos, testes diagnósticos e imunógenos.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Tuberculose; Transportadores ABC; Sistemas MacB; Rv2563-Rv2564; Estrutura de proteínas.

ABSTRACT

OLIVEIRA, M. C. B. **Structural and functional characterization of ABC transporter of glutamine from *Mycobacterium tuberculosis***. 2021. Thesis (Doctorate in Microbiology - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2021)

Tuberculosis is the main infectious disease worldwide, being responsible for thousands of deaths. Caused by the *Mycobacterium tuberculosis* bacillus (MTB), it is a disease that is difficult to diagnose and has limited treatment options. ABC transporters, ATP-Binding Cassette, represent the main class of transport proteins in MTB, and although they are highly relevant in the process of drug resistance and survival in the macrophage, little is known about their specific function. The function of most of the systems described, or their essentiality during infection, has been attributed by genomic or proteomic approaches with putative functions. Since the first review on the subject, in 2000, more specific studies of such transporters have revealed an enormous functional and structural diversity, increasing interest in the area. Among these systems, the study target of this work stands out, the Rv2563-Rv2564 transporter, whose putative function is not yet known. Based on bioinformatics analysis, we identified that the transporter presents domains and structural characteristics of transporters from the MacB superfamily, whose main representatives are related to drug efflux and recycling of membrane components, and that together with another *M. tuberculosis* transporter (Rv0072-Rv0073), with which it shares high sequential/structural similarity, are present only in *M. tuberculosis* complex bacteria, indicating that there may be duplication of functions. From different constructs, the periplasmic domains of the permease Rv2563 (Rv2563per), the complete permease and the ATP binding domain (ATPase) were obtained. Although we were unable to stably obtain the complex, permease crystals were obtained which diffracted at 4.95Å resolution. The periplasmic region of the membrane protein Rv2563 was characterized in circular dichroism assays and used to obtain antibodies in C57BL/6 mice. Western blot, pull-down, mass spectrometry and RT-PCR assays, revealed that the transporter is constitutively transcribed under the conditions analyzed and was not regulated by the presence of antibiotics in the culture medium. Data suggest that their participation may be related to cellular stress conditions. The data set obtained in this work consists of the first compilation of studies on this transporter that can be an excellent target for the development of new drugs, diagnostic tests, and immunogens.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Tuberculosis; ABC Transporters; MacB Superfamily; Rv2563-Rv2564; Protein structure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Figura 1 - Mecanismo de infecção de <i>M. tuberculosis</i> e patogênese da tuberculose pulmonar	31
Figura 2 - Principais países com alta incidência de tuberculose em 2019	32
Figura 3 - Linha do tempo do MTB e seu impacto em saúde	36
Figura 4 - A parede celular complexa de MTB, confere alta resistência a compostos de origem externa	38
Figura 5 - Famílias de transportadores	40
Figura 6 - Domínios NDB de transportadores ABC	41
Figura 7 - Proteínas ligadoras de substrato em transportadores ABC	42
Figura 8 - As proteínas Rv2563 e Rv2564 de MTB apresentam domínios similares aos da superfamília MacB de transportadores ABC	70

Capítulo I

Figura 9 - Caracterização dos domínios presentes nas proteínas Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073	101
Figura 10 - Busca de proteínas no PDB com características estruturais semelhantes à Rv2563 e Rv2564	103
Figura 11 - O modelo do transportador Rv2563/Rv2564 de MTB apresenta características de transportadores ABC do tipo VII	106
Figura 12 - Comparação do modelo da transmembrana Rv2563 com demais proteínas de sistemas tripartites e conservação	108
Figura 13 - Comparação da Rv2563 com proteínas transmembrana da superfamília MacB revela similaridade estrutural, mas não sequencial	110
Figura 14 - Análise filogenética de diferentes proteínas pertencentes a sistemas tripartites, MacB, FtsX, Lol e HrtB	112
Figura 15 - A comparação dos domínios periplasmáticos mostra que a região periplasmática da Rv2563 apresenta os subdomínios Porter e Sabre, presentes em proteínas do sistema MacB	114
Figura 16 - Características estruturais do domínio Rv2564 de MTB	116

Figura 17 - Comparação das sequências de aminoácidos das proteínas dos sistemas Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073	118
Figura 18 - Distribuição dos componentes Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073 em diferentes espécies de <i>Mycobacterium</i>	120
Figura 19 - Filogenia das permeases e ATPases dos sistemas Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073 de MTB	122
Figura 20 - Contexto genômico dos operons Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073 de MTB	124

Capítulo II

Figura 21 - Os testes de expressão da Rv2563-GFP mostram que a expressão em células Lemo21(DE3) em meios auto-indutores são mais eficientes	129
Figura 22 - O DM mostrou-se como o melhor detergente para a solubilização e purificação da Rv2563	131
Figura 23 - DLS das amostras de Rv2563 na presença de DM e LMNG	133
Figura 24 - Purificação e cristalização da Rv2563	135
Figura 25 - Reconstrução da Rv2563 em nanodiscos contendo lipídios e a proteína MSP1 como <i>scaffold</i>	136
Figura 26 - A proteína Rv2564 foi expressa e purificada na presença de ATP e cloreto de magnésio	138
Figura 27 - O ensaio de reconstituição do transportador Rv2563-Rv2564 mostra proteínas co-eluindo sem formação do transportador completo	140
Figura 28 - Co-expressão do transportador Rv2563-Rv2564 utilizando o sistema pRSF-Duet ...	142
Figura 29 - Delineamento experimental e produção do domínio periplasmático Rv2563per	145
Figura 30 - Espectro de dicroísmo circular do Rv2563per e comparação com o domínio periplasmático da MacB de <i>E. coli</i>	147
Figura 31 - O espectro da Rv2563per apresenta maior estruturação em ambiente ácido	148
Figura 32 - Padrão de dispersividade do domínio Rv2563per avaliado por DLS em diferentes condições	150
Figura 33 - O domínio Rv2563per apresenta-se como um homodímero em solução, mostrando a capacidade da Rv2563 em formar o poro na membrana celular como esperado	151

Capítulo III

Figura 34 - Titulação dos anticorpos anti-Rv2563per e Western blot para detecção da Rv2563 em extratos de culturas de <i>M. tuberculosis var bovis</i> BCG	156
Figura 35 - Os anticorpos anti-Rv2563per foram capazes de atravessar a micomembrana e interagir com o domínio periplasmático da permease Rv2563	157
Figura 36 - Identificação de Rv2563 nas diferentes fases da curva de crescimento de <i>M. tuberculosis var. bovis</i> BCG	159
Figura 37 – Avaliação da concentração inibitória mínima de <i>M. tuberculosis var bovis</i> BCG por diferentes antibióticos utilizando a metodologia REMA	160
Figura 38 - Efeito da presença de antibióticos na produção da permease Rv2563 em culturas de MTB	161
Figura 39 - Extração e produção do cDNA de MTB	163
Figura 40 - Perfil de expressão relativa dos genes <i>rv2563-rv2564</i> de <i>M. tuberculosis var bovis</i> BCG na presença de antibióticos	164
Figura 41 - Crescimento de <i>M. tuberculosis var bovis</i> BCG na presença dos antibióticos e perfil de expressão dos genes <i>rv2563/rv2564</i> e <i>rv0072/rv0073</i>	166
Figura 42 - Ensaio de <i>pull-down</i> para identificar possíveis interações do domínio Rv2563per com proteínas presentes no extrato de <i>M. tuberculosis var bovis</i> BCG	167
Figura 43 - O domínio Rv2563per não interage diretamente com células pulmonares e monócitos e nem apresenta capacidade de ativação de monócito <i>in vitro</i>	170
Figura 44 – A estratégia vacinal utilizando a Rv2563per gerou sobretudo uma resposta do tipo Th2 em modelo murino	171
Figura 45 - Predição do epítomos lineares da Rv2563 e comparação com transmembranas da família MacB	173
Figura 46 - Predição do epítomos lineares da Rv2564 e comparação com as ATPases da família MacB	174
Figura 47 - Predição dos epítomos apresentados pelos principais alelos brasileiros para MHC-I e MHC-II e predição de epítomos conformacionais	175

Capítulo IV

Figura 48 - Obtenção da proteína Rv2564 a partir da construção Rv2564-Bla e atividade de ATPase	179
Figura 49 - Sistema Rad Display para estudo das interações entre a hélice de associação da Rv2563 e a ATPase Rv2564	182
Figura 50 - Expressão e purificação das hélices de associação das permeases Rv2563 de <i>M. tuberculosis</i> e BtuC, MalF e MalG dos transportadores ABC de <i>E. coli</i>	183
Figura 51 - Ensaio de interação entre a hélices da Rv2563 e dos transportadores ABC de <i>E. coli</i> contra a Rv2564	184

Conclusões e perspectivas

Figura 52 - Compilação dos principais fatos identificados durante a pesquisa	189
--	-----

Anexos

Capítulo II

Figura A1 - Ensaio de DLS realizados para a Rv2563 em diferentes detergentes, com a presença e ausência de glicerol na amostra	233
Figura A2- Ensaio de DLS realizados para a Rv2563per em diferentes condições de buffer, concentração de sais, presença de aminoácidos e variação da concentração de proteína	242

Capítulo III

Figura A3 - Análises de bioinformática realizadas com as proteínas transmembranas Rv2563 e Rv0072 de MTB, LolC, LolE, MacB e FtsX de <i>E. coli</i>	249
---	-----

LISTA DE TABELAS

Introdução

Tabela 1 - Linhagens que compõem o MTBC	35
---	----

Capítulo III

Tabela 2: Proteínas originadas do ensaio de Pull-down identificadas na espectrometria de massas	168
---	-----

Anexos

Materiais e Métodos

Tabela A1 - Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem dos genes e fragmentos de interesse em diferentes vetores	206
Tabela A2 - Condições de expressão dos genes de interesse e produção das proteínas em larga escala em células de <i>E. coli</i>	208
Tabela A3 - Condições de purificação das proteínas estudadas neste trabalho e expressas em larga escala	209
Tabela A4 – Oligonucleotídeos para qPCR Transportadores Rv2563-2564 e Rv0072-0073 pelo sistema SYBR Green	212
Tabela A5 - Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem do tipo LIC de fragmentos codificadores de hélices de associação das proteínas de interesse	213

Capítulo I

Tabela A1 – Pesquisa dos transportadores ABC Rv2563-2564 e Rv0072-0073 na plataforma Patric (Figuras 9, 18, 19 e 20)	215
Tabela A2 – Sequências utilizadas para a produção da árvore filogenética Rv2563 X Família MacB e homólogos	221

Capítulo II

Tabela A1 – Construções obtidas e testadas nesse trabalho e condições dos testes de expressão realizados225

Capítulo III

Tabela A1 – Lista de anticorpos utilizados e produzidos nesse trabalho para os ensaios de citometria, western blot, imunomicroscopia, whole-cell ELISA e ELISA247

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

°C – graus Celsius
μL- microlitro
3C – protease do Rinovírus Humano (HRV 3C)
9.9 MAG - monooleína
ABC - *ATP Binding Cassette*
ANT - antraciclina
ATP – trifosfato de adenosina
BCG - Bacilo de Calmette e Guérin
BlastP - Basic Local Alignment Search Tool
BSA- albumina sérica bovina
C12E8- Octaethylene Glycol Monododecyl Ether
CD – Dicroísmo circular
CH - *Coupling Helix*
CHAPS - 3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-PropaneSulfonate]
CHAPSO - 3-[(3-cholamidopropyl) dimethyl ammonio] -2- Hydroxy-1- Propanesulfonate
CLOR - cloranfenicol
CPX - ciprofloxacina
CYMAL-5 - 5-Cyclohexyl-1-Pentyl-β-D-Maltoside
DDM - n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside
D-Glu – D-glucosamina
DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz
DM - n-Decyl-β-D-Maltopyranoside
DOX – doxorubicina
DRB - daunorrubicina
E. coli – *Escherichia coli*
EcfS - componente S
EcfT - componente T
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
ETH - etambutol
FHA - *Fork-head associated domain*
FLQ - fluoroquinolonas)
g – gravidade
GFP - *Green Fluorescent Protein*
GST- glutationa S-transferase
His-tag – cauda de histidina
HIV – Human imunodeficiency vírus
IMAC - *Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography*
INH - isoniazida
IPTG - Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kDa- kiloDaltons
KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes e Genomes
LB – Luria Bertani
LDAO - Dodecyldimethyl aminoxid

LIC - Clonagem independente de ligação
LIC - *Ligation Independent Cloning*
LMNG - Lauryl maltose neopentyl glycol
LPS - lipopolissacarídeo
M. smegmatis – *Mycobacterium smegmatis*
M. thermoresistibile – *Mycobacterium thermoresistibile*
MATE - *Multidrug and Toxic-compound Extrusion*
MBP - maltose binding protein
Mce – *Mammalian cell entry*
mDAP - ácido mesodiaminopimélico
MDR-TB - Multidrug-resistant tuberculosis
MFS - *Major Facilitator Superfamily*
MgCL₂ – cloreto de magnésio
MIC - Concentração Inibitória Mínima
MIC – concentração mínima inibitória
ml – mililitro
MSP1-membrane scaffold protein 1
MTB – *Mycobacterium tuberculosis*
MTBC - *Mycobacterium tuberculosis* Complex
NaCl – cloreto de sódio
NAG - N-acetilglucosamina
NAM - ácido N-acetilmurânico
NaN₃ – azida sódica
NCBI - National Center for Biotechnology Information
NDB - *Nucleotide Binding Domain*
Ni-NTA - níquel-ácido nitrilotriacético acoplado a beads de agarose
NM – nanômetros
NOR - norfloxacin
OG - n-Octyl-β-DGlucopyranoside
OMS- Organização Mundial de Saúde
PBS – tampão fosfato
PCR - reação em cadeia da polimerase
PDB – Protein Data Bank
pH – potencial Hidrogênionico
POPC - 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina
POPG 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol
PUR – puromicina
RIF - rifampicina
R-IMAC- *Reverse Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography*
RND - *Resistance Nodulation Division*
S. aureus – *Staphylococcus aureus*
SBP - *Substrate-binding protein*
SEC- Cromatografia de exclusão molecular
SMR - *Small Multidrug Resistance*
STM - estreptomicina
STM - estreptomicina

SUMO - small ubiquitin modifying protein;
TAE - Tris-acetato-EDTA
TB - tuberculose
TET - tetraciclina
TEV – Protease do *Tobacco Etch Virus*
TMB - 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TMD - *Transmembrane Domain*)
Tris-HCL - tris(hidroximetil)aminometano-ácido clorídrico
U/ μ L- unidade por microlitro
UDM - n-Undecyl- β -D- malto pyranoside
XDR-TB - Extensively drug-resistant tuberculosis

SUMÁRIO

1. Introdução	29
1.1 A tuberculose e seu impacto em saúde pública	30
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e sua origem	34
1.3 O envoltório celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	36
1.4 A família dos transportadores ABC	39
1.5 Os transportadores ABC em <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	43
1.6 Justificativa	69
2. Objetivos	72
2.1. Objetivos Gerais	73
3. Materiais e Métodos	74
3.1 Capítulo I	75
3.1.1 Análises de bioinformática dos componentes do transportador Rv2563/Rv2564 e identificação de homólogos	75
3.2 Capítulo II	76
3.2.1 Clonagem, expressão e purificação	76
3.2.1.1 Clonagem dos genes do transportador e domínios para expressão heteróloga em <i>E. coli</i>	76
3.2.1.2 Expressão heteróloga e purificação dos componentes solúveis do transportador Rv2563-2564	77
3.2.1.3 Expressão heteróloga e purificação da proteína de membrana Rv2563	78
3.2.1.4 Microscopia de fluorescência para avaliação da expressão heteróloga de Rv2563-GFP em <i>E. coli</i>	79
3.2.1.5 Quantificação de fluorescência de células de <i>E. coli</i> após expressão da Rv2563-GFP	80

3.2.1.6	Cromatografia de exclusão molecular com detecção de fluorescência (F-SEC) para identificação dos melhores detergentes para purificação e estabilização da proteína Rv2563	80
3.2.1.7	Gel de fluorescência para avaliação da expressão e purificação da Rv2563-GFP ..	81
3.2.1.8	Quantificação das proteínas de interesse pelo método de Bradford	81
3.2.2	Ensaio biofísico e ensaio cristalográfico	81
3.2.2.1	Análise da polidispersividade da Rv2563 e Rv2563per em diferentes condições empregando-se espalhamento dinâmico de luz (DLS)	81
3.2.2.2	Ensaio de Dicroísmo Circular (CD) do domínio Rv2563per para avaliação do enovelamento e conteúdo de estruturas secundárias em diferentes condições	82
3.2.2.3	Análise dos estados oligoméricos da Rv2563per por cromatografia de exclusão molecular analítica e gel nativo (Native Page)	83
3.2.2.4	Cristalização do domínio Rv2563per pelo método de difusão de vapor	83
3.2.2.5	Reconstituição do transportador Rv2563-2564 para ensaios biofísicos, estruturais e funcionais	84
3.2.2.6	Ensaio de cristalização da proteína de membrana Rv2563	84
3.2.2.7	Cristalização em Mesofase Lípidica (LCP) da proteína Rv2563	84
3.2.2.8	Reconstituição da proteína Rv2563 em nanodiscos para ensaios estruturais e funcionais	85
3.3	Capítulo III	85
3.3.1	Ensaio funcional e imunológico	85
3.3.1.1	Avaliação dos títulos de anticorpo Anti-Rv2563per gerados na imunização de camundongos C57BL/6 por ELISA indireto	85
3.3.1.2	Crescimento de <i>M. tuberculosis var bovis BCG</i> em diferentes condições de cultivo	86
3.3.1.3	Identificação de concentrações sub-inibitórias de antibióticos por meio do ensaio de Microtitulação com Resazurina (REMA)	86
3.3.1.4	Produção de anticorpos policlonais contra o domínio Rv2563per	87
3.3.1.5	Identificação da produção da proteína Rv2563 em extratos de <i>M. tuberculosis var bovis BCG</i> pela técnica de Western Blot	88

3.3.1.6	Identificação de possíveis ligantes Rv2563 utilizando-se ensaios de pull-down seguidos de análises por espectrometria de massas	88
3.3.1.7	Determinação da capacidade de reconhecimento da proteína Rv2563 pelos anticorpos anti-Rv2563per na membrana interna de <i>M. tuberculosis var bovis</i> BCG por Whole-cell ELISA	89
3.3.1.8	Avaliação da capacidade de reconhecimento da permease Rv2563 pelos anticorpos anti-Rv2563per em células de <i>M. tuberculosis var bovis</i> BCG utilizando-se microscopia de fluorescência	89
3.3.1.9	Determinação da capacidade de interação do domínio Rv2563per com células mamíferas empregando-se citometria de fluxo	90
3.3.1.10	Avaliação da capacidade do domínio Rv2563per na ativação de macrófagos	90
3.3.1.11	Avaliação do tipo de resposta imune gerado pelo domínio Rv2563per em modelo murino	91
3.3.1.12	Avaliação da expressão dos transportadores <i>Rv2563-2564</i> e <i>Rv0072-0073</i> em diferentes condições de cultivo pela técnica de qPCR	92
3.4	Capítulo IV	93
3.4.1	Ensaio funcionais e imunológicos	93
3.4.1.1	Obtenção das construções da proteína Rad1 apresentando hélices de associação da proteína Rv2563	93
3.4.1.2	Expressão heteróloga e da proteína RadA apresentando a hélice de associação da Rv2563 para ensaio de interação com ATPases	94
3.4.1.3	Avaliação da atividade de ATPase da Rv2564-B1a	95
3.4.1.4	Análise de interação entre a ATPase Rv2564 e a hélice de associação da proteína Rv2563 por Biointerferometria de Biocamada (BLI)	96
4.	Resultados	97
	Capítulo I	99
	Análises de Bioinformática do Transportador Rv2563-Rv2564.....	100
	A predição de domínios realizada para os componentes do transportador Rv2563-Rv2564 indica maior similaridade com proteínas de transportadores do tipo MacB	100

Os modelos das estruturas tridimensionais de Rv2563 e Rv2564 se ajustam às estruturas de proteínas MacB	102
Modelo da estrutura do transportador e características funcionais.....	104
A comparação da Rv2563 com as estruturas de sistemas disponíveis, revela similaridade com as transmembranas de transportadores da família MacB	106
O domínio periplasmático da Rv2563 (Rv2563per) não é conservado e pode indicar divergência de função do transportador	113
O modelo da Rv2564 conserva motivos funcionais no domínio catalítico e apresenta um domínio regulatório adicional em comparação com ATPases da família MacB	115
A filogenia do transportador Rv2563/Rv2564 e comparação com Rv0072/Rv0073	117
O contexto genômico dos operons Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073 revela regiões passíveis de recombinação e presença de genes relacionados à síntese de compostos essenciais de membrana	123
Conclusão do capítulo	125

Capítulo II

Caracterização estrutural e biofísica do transportador Rv2563-Rv2564	127
A expressão da Rv2563 foi otimizada para os ensaios de caracterização estrutural e biofísica	127
Os detergentes DM e DDM apresentaram a melhor solubilização da proteína Rv2563, sendo que o DM foi padronizado para a purificação	130
A Rv2563 se apresentou mais estável e homogênea na presença dos detergentes DM e LMNG	132
A Rv2563 foi cristalizada pelo método de difusão de vapor que resultaram em cristais com difração a 4.9 Å	134
A Rv2563 foi inserida com sucesso em nanodiscos lipídicos	136
A Rv2564 foi expressa e purificada a partir da construção Rv2564-Halo	137
As tentativas de formação do complexo Rv2563-Rv2564 com as proteínas purificadas mostraram que as proteínas são eluídas independentemente	139
Produção do transportador a partir da co-expressão dos genes clonados em vetor pRSF .	140

Produção do domínio periplasmático da Rv2563 (Rv2563per) visando caracterização estrutural e funcional	143
O domínio periplasmático da Rv2563 é mais estruturado em condições ácidas	146
Alterações no pH, concentração de sais e concentração proteica causam efeitos na polidispersividade do domínio Rv2563per	148
O domínio periplasmático da proteína Rv2563 apresenta-se como um dímero	150
Conclusão do capítulo	152

Capítulo III

Capítulo III	154
Caracterização funcional do transportador Rv2563-Rv2564	154
Os anticorpos anti-Rv2563per produzidos em camundongos C57BL/6 apresentaram altos títulos e capacidade de reconhecimento da proteína Rv2563 nativa	154
Os anticorpos anti-Rv2563per são capazes de atravessar a micomembrana e reconhecer a proteína Rv2563	156
A tradução do transportador Rv2563-Rv2564 é constante ao longo da curva de crescimento de <i>M. tuberculosis var bovis</i> BCG	158
A presença de antibióticos no meio de cultivo não alterou a transcrição do transportador Rv2563-Rv2564	159
O ensaio de Pull-down foi capaz de capturar alguns possíveis parceiros de interação da Rv2563	166
O domínio Rv2563per não apresenta interação direta e capacidade de ativação de células mamíferas	168
A imunização com o domínio Rv2563per sugere ativação de um tipo de resposta Th2 ...	171
Comparação do perfil de imunogenicidade do transportador Rv2563-Rv2564 com os transportadores da família MacB de proteínas	172
Conclusão do capítulo	176

Capítulo IV

Capítulo IV	177
Ensaio complementares	178
A Rv2564 recombinante purificada a partir de células de <i>E. coli</i> é funcional	178

Avaliação do potencial de interação da hélice de associação da permeasse Rv2563 com a Rv2564 e sua especificidade	180
Conclusões do capítulo	184
5. Conclusões e Perspectivas	186
6. Referências	190
Anexos	204

1. INTRODUÇÃO

1.1A tuberculose e seu impacto em saúde pública

A tuberculose (TB) é uma patologia infecciosa milenar causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) que se manifesta principalmente em sua forma pulmonar, podendo ainda causar infecções em ossos, sistema nervoso central, infecção generalizada, infecções do sistema gástrico, entre outros (AAGAARD et al., 2009; TIEMERSMA et al., 2011; SHEHZAD et al., 2015; PAI et al., 2016). O agente etiológico foi primeiramente descrito por Robert Koch em 1882 e apesar dos inúmeros esforços para sua erradicação, ainda configura entre as principais causas de morte na era atual, detendo o posto de principal causa de óbitos entre as doenças infecciosas (BARRY et al., 2009; LIENHARDT et al., 2012; LEUNG; LANGE; ZHANG, 2013).

A tuberculose pode ser apresentada na forma *ativa*, onde o paciente apresenta sintomas e é capaz de transmitir a doença para outros hospedeiros suscetíveis, e na forma *latente*, na qual os pacientes são portadores do bacilo, não apresentam sintomas ou transmitem a doença, mas são passíveis de desenvolver a forma ativa em qualquer momento de suas vidas. Os estudos demonstram que 5 a 15% dos pacientes infectados com TB irão desenvolver doença ativa em algum momento de sua vida. Ainda nesse cenário, sem o devido tratamento cerca de 50% dos pacientes com doença ativa irão evoluir para óbito (TIEMERSMA et al., 2011; ANDREWS et al., 2012; WHO, 2019).

A tuberculose inicia-se quando pacientes suscetíveis inalam o microrganismo presente em gotículas e aerossóis formados por pacientes com doença ativa (dose infectante de 5 a 10 microrganismos). Após a entrada pelo trato respiratório, o bacilo é fagocitado por macrófagos, principal célula alvo da infecção, por meio da interação com diversos receptores celulares. Nos macrófagos, o MTB ativa uma série de mecanismos de silenciamento da resposta imunológica, incluindo a fusão do fagossomo com o lisossomo, e a migração para o parênquima pulmonar é facilitada acentuando a infecção de outros macrófagos e células dendríticas (RUSSELL, 2001; STEWART et al., 2005; BEHAR; DIVANGAHI; REMOLD, 2010; BOSEDASGUPTA et al., 2014; MANJUNATHA; SMITH, 2015).

A infecção dessas células evoca uma resposta imunológica mais robusta, cuja principal característica é o recrutamento de outras células imunes como macrófagos, neutrófilos, células T e células B que isolam as células infectadas, formando o granuloma característico da TB. Na doença latente, o granuloma é capaz de restringir os bacilos que permanecem em fase de dormência, onde a regulação gênica, o metabolismo e a replicação são diferentes quando comparados com os bacilos em fase exponencial de desenvolvimento. Na doença ativa,

incluindo a causada por ativação de doença latente, as células sofrem necrose e com o rompimento do granuloma ocorre a disseminação do bacilo (Figura 1) (RUSSELL, 2007; CAWS et al., 2008; TORRADO; COOPER, 2013; HARTMAN-ADAMS; CLARK; JUCKETT, 2014; VERGNE; GILLERON; NIGOU, 2015; PAI et al., 2016).

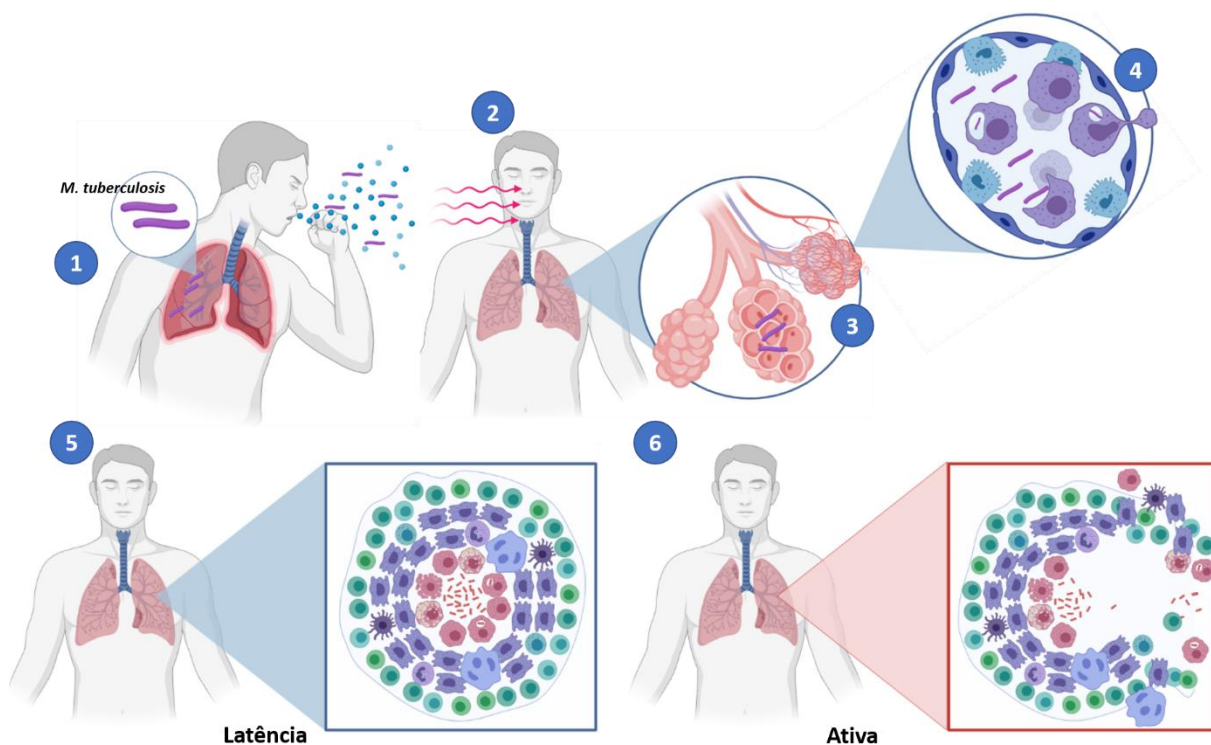


Figura 1- Mecanismo de infecção de *M. tuberculosis* e patogênese da tuberculose pulmonar. Pacientes com doença ativa expõem os microrganismos viáveis ao tossir através de aerossóis (1). O microrganismo ao ser inalado por um paciente suscetível (2), alcança os alvéolos pulmonares deste (3), onde é fagocitado por macrófagos e outras células do sistema imune que auxiliam na sua translocação para o parênquima pulmonar. O bacilo também pode alcançar de espaços no tecido alveolar (4). A infecção se estabelece no parênquima pulmonar estimulando o recrutamento de células imunes como células B, células T, dendríticas e macrófagos que formarão o granuloma. Esta estrutura contém bactérias livres e dentro dos macrófagos. Na doença latente o granuloma permanece íntegro e as bactérias ficam contidas (5), enquanto na doença ativa ocorre grande proliferação do MTB, rompimento do granuloma e início da disseminação e transmissão. Elaborado pelo próprio autor, baseado em PAI et al., 2016.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2019, foram estimados cerca de 10 milhões de novos casos, sendo 66% concentrados na Índia, China, Indonésia, Filipinas, Paquistão, Nigéria, Bangladesh e África do Sul. O número de óbitos causados pela TB em 2019 foi avaliado em 208.000 entre pacientes HIV (Human Immunodeficiency Virus) positivos e 1,2 milhões entre pacientes negativos. Estes números colocam a TB como uma das 10 principais causas de óbito no mundo, de acordo com a figura 2 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

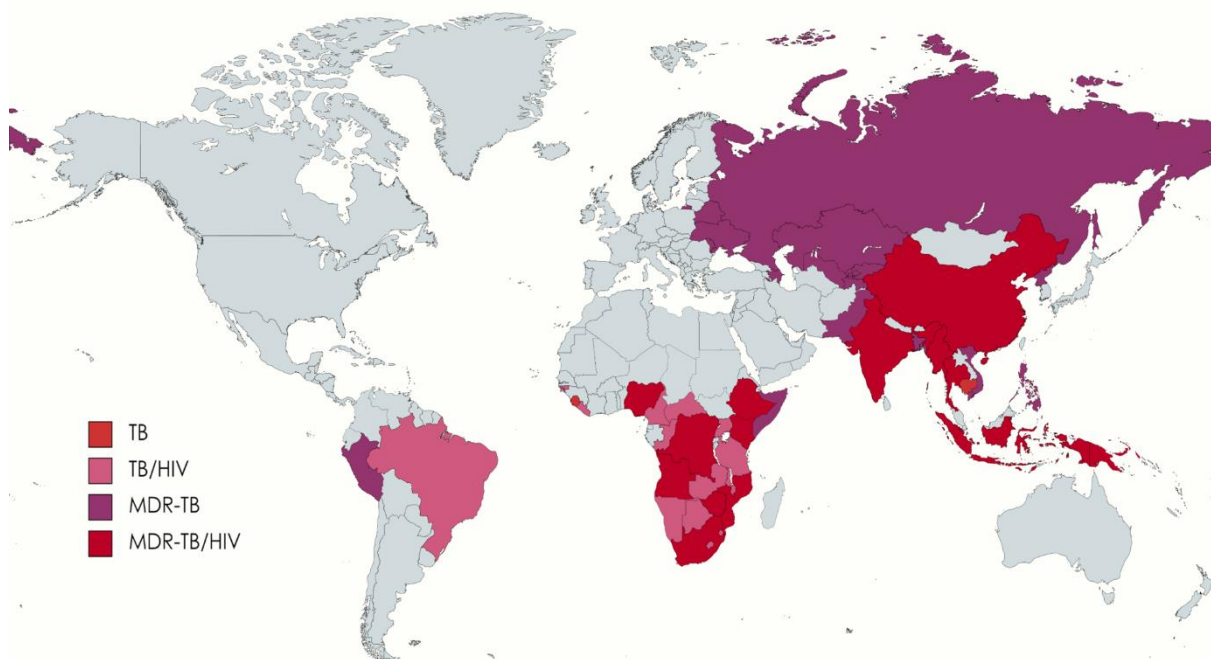


Figura 2 – Principais países com alta incidência de tuberculose em 2019. Uma das principais características da TB é sua relação com a pobreza e elevados níveis de subdesenvolvimento. As maiores incidências correspondem aos países da África, Ásia e leste europeu. No Brasil, temos uma das maiores prevalências das Américas, sendo expressivos os casos de co-infecção pelo vírus HIV. Elaborado pelo próprio autor, baseado em WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020.

No Brasil, somente em 2019, foram notificados 77,4 mil novos casos e 4,5 mil óbitos e muitos problemas são associados à doença. Ainda, de grande importância, é a presença de TB em populações vulneráveis como portadores de HIV (8,4% de co-infecção), população carcerária (8978 novos casos em 2020), população em situação de rua (2071 novos casos) e população indígena, que apresenta números elevados de incidência e óbitos (BARRAL-NETTO et al., 2008; ROMA SÁNCHEZ, 2008; ALVAREZ et al., 2011; SANTOS et al., 2015; SAÚDE, 2021).

A TB se destaca por ser uma doença relacionada à pobreza, devido sua alta incidência em populações em situações de carência, subnutrição, falta de saneamento básico, baixa escolaridade, entre outros, mas também, pelo fato de causar um enorme impacto econômico para o país como para o paciente. A OMS estima que 49% dos pacientes tiveram custos econômicos catastróficos por causa da TB, sendo que muitos pacientes perdem sua capacidade produtiva durante a doença e tratamento (ROMA SÁNCHEZ, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020; SAÚDE, 2021).

O diagnóstico da TB é outro fato que causa enorme impacto em saúde pública e no próprio curso natural da doença, uma vez que os métodos mais sensíveis de alto custo, ainda não se encontram totalmente disponíveis à população, e os métodos mais baratos apresentam baixa

sensibilidade. Os métodos usados para o diagnóstico incluem: (i) a baciloscopia ou busca ativa da presença dos bacilos álcool-ácido resistentes em escarro, de baixo custo e menor sensibilidade; (ii) o teste de Mantoux ou prova tuberculínica, que funciona como um método de triagem, no qual um extrato de micobactéria é injetado intradérmicamente no paciente e avalia-se a reação imune local, susceptível à influência da vacinação com BCG e do prévio contato do paciente com micobactérias ambientais; (iii) a cultura microbiológica, que consiste no padrão ouro, mas que pode levar até trinta dias para um resultado e é passível de contaminações; (iv) o método de liberação de interferon por células T do paciente mediante exposição a antígenos de MTB; (v) e os métodos moleculares, que embora sensíveis ainda não se apresentam amplamente acessíveis à população (BABADY; WENGENACK, 2012; NORBIS et al., 2013; SUH et al., 2013; DA SILVA ANTUNES; PINTO; TRAJMAN, 2014; DUROVNI et al., 2014; OSÓRIO FERRI et al., 2014; DROBNIEWSKI et al., 2015; JEFFERSON et al., 2015; MOOSAZADEH; KHANJANI; PARSAAE, 2015).

Em relação às medidas profiláticas e tratamento para TB, a vacina atualmente disponível é a aplicação do Bacilo de Calmette e Guérin (BCG), eficaz na redução de casos de tuberculose e meningite causada pelo MTB em crianças, mas que não é eficaz na proteção de adultos contra a tuberculose pulmonar. Além disso, a vacina pode influenciar o resultado de alguns testes imunológicos, dificultando a diferenciação de pacientes com doença ativa dos vacinados. Embora algumas novas vacinas estejam em desenvolvimento, incluindo algumas em testes clínicos avançados, a vacinação ainda não se apresenta como uma ferramenta relevante para a erradicação da TB (AAGAARD et al., 2009; HOKEY; GINSBERG, 2013; ORME, 2013; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

O tratamento da TB pulmonar é realizado em um esquema de 4 fármacos, durante seis meses. Os antibióticos utilizados são a isoniazida, o etambutol, a pirazinamida e a rifampicina. Esse é considerado o regime inicial de escolha, o qual, infelizmente, tem se mostrado cada vez mais ineficiente devido ao crescente aumento do isolamento de cepas resistentes de MTB. As cepas de resistência múltipla (*Multidrug-resistant tuberculosis*, MDR-TB) são resistentes aos dois principais antibióticos no tratamento da TB, a isoniazida e a rifampicina, e as cepas de resistência extensiva (*Extensively drug-resistant tuberculosis*, XDR-TB) apresentam resistência aos medicamentos de primeira escolha e, ao menos um dos medicamentos de segunda escolha, os quais incluem aminoglicosídeos injetáveis como a amicacina e as fluoroquinolonas (MATTEELLI; ROGGI; CARVALHO, 2014; TAVANAEE SANI et al., 2015; WALLS et al., 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Outro fator importante é o tempo de tratamento que pode levar de 6 a 12 meses, principalmente no caso de infecções por cepas resistentes, o que culmina em altas taxas de abandono do tratamento. Novos fármacos contra o MTB têm sido pesquisados, porém, uma das mais novas opções de tratamento de cepas resistentes, um inibidor de ATP sintetase, já apresenta caso de cepas resistentes ao seu emprego (NOVOA-APONTE; SOTO OSPINA, 2014; SZUMOWSKI; LYNCH, 2015; CHIM et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

Todos os fatores e características descritos acima, tornam a TB uma doença de grande importância em saúde pública e enorme impacto econômico-social. Por essa soma de fatores a TB é alvo de campanha mundial pela OMS, visando sua erradicação através do tratamento, diminuição dos custos catastróficos, que correspondem a qualquer perda de renda ocasionada ao paciente pelo diagnóstico e tratamento da tuberculose, e incentivo ao desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, opções farmacológicas e profiláticas (WHO, 2013, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

1.2 *Mycobacterium tuberculosis* e sua origem

O MTB faz parte de um grupo de espécies adaptadas ao homem e causadoras de tuberculose, o “Complexo *Mycobacterium tuberculosis*” (MTBC), formado por *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. bovis*, as espécies recentemente adicionadas *M. mungi* e *M. orygis*, além de duas subespécies *M. caprae* e *M. pinnipedii*. As espécies do complexo podem ser divididas em 7 linhagens, conforme a Tabela 1.

M. africanum é um importante agente causador da tuberculose, sendo responsável por metade dos casos na África Ocidental, enquanto o *M. bovis*, originalmente de bovinos, também pode causar doenças em humanos similares à causada pelo MTB. Atualmente, a incidência de tuberculose por *M. bovis* é baixa, graças ao advento da pasteurização, mas tem aumentado em pacientes imunocomprometidos, especialmente aqueles infectados com HIV. As bactérias pertencentes ao MTBC apresentam cerca de 99,95% de identidade genética e, embora haja claramente uma grande similaridade em nível de genoma, os membros apresentam preferências diferentes quanto ao hospedeiro, mecanismos de patogenicidade e fenótipos (DE JONG; ANTONIO; GAGNEUX, 2010; ZIMPEL et al., 2017; BRITES et al., 2018; GAGNEUX, 2018).

Tabela 1 - Linhagens que compõem o MTBC.

Linhagens	Espécies	Localização
1	<i>M. tuberculosis</i>	Filipinas e o Oceano Índico
2	<i>M. tuberculosis</i>	Ásia Oriental
3	<i>M. tuberculosis</i>	Índia e África Oriental
4	<i>M. tuberculosis</i>	Europa e Américas
5	<i>M. africanum</i> 1	África Ocidental
6	<i>M. africanum</i> 2	África Ocidental
7	<i>M. tuberculosis</i>	Etiópia
Outgroup	<i>M. canettii</i>	África e Pacífico
Animais	<i>M. bovis</i> , <i>M. pinnipedii</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. orygis</i>	Variada

Baseada em DE JONG; ANTONIO; GAGNEUX, 2010; ZIMPEL et al., 2017; BRITES et al., 2018; GAGNEUX, 2018.

O *M. canettii* é uma micobactéria muito próxima ao complexo MTBC, com alta semelhança genética, porém se diferencia por realizar troca horizontal de genes, apresentar colônias não-rugosas e produção em altos níveis de um esfingolipídio fenólico (PGL-Tb1). A doença causada por *M. canettii* é similar ao espectro de doença observado no complexo MTBC, apenas poucos isolados foram identificados até hoje, contudo acredita-se que esse número seja subestimado devido a grande semelhança com o *M. tuberculosis* (VAN SOOLINGEN et al., 1997; PFYFFER et al., 1998; GOH et al., 2001).

A história do MTB está intimamente ligada à história da humanidade, com sinais de TB sendo encontrados em esqueletos europeus e do Oriente Médio de 4000 anos, até a descrição da tuberculose por Hipócrates na Grécia antiga. Na Europa dos séculos 16 e 17, a tuberculose era uma das principais doenças infecciosas da época, com milhares de mortes associadas. Atualmente é amplamente aceito que o MTB se originou na África há mais de 7.000 anos a partir de micobactérias ambientais. Com a ajuda do estabelecimento da agricultura, pecuária, estabelecimento da civilização e aumento da densidade populacional, houve a seleção de cepas virulentas e especializadas que se disseminaram entre a população suscetível (ARRIAZA et al., 1995; ZINK et al., 2001; BOS et al., 2014; MÜLLER; ROBERTS; BROWN, 2014; HERSHKOVITZ et al., 2015; DONOGHUE, 2016). A figura três destaca alguns marcos na história do MTB e da tuberculose no mundo.

Acreditava-se que o bacilo era um microrganismo que evoluiu à partir do *M. bovis*, no entanto, novos estudos têm mostrado que a única diferença entre os membros do MTBC

corresponde aos polimorfismos em certos genes, sugerindo, portanto, que ambos os bacilos evoluíram em paralelo (ARRIAZA et al., 1995; BOS et al., 2014).

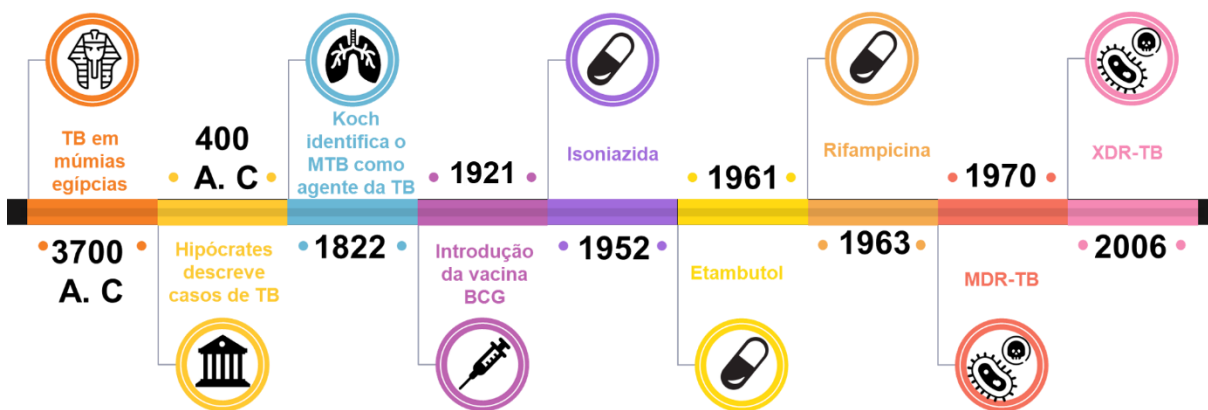


Figura 3 – Linha do tempo do MTB e seu impacto em saúde. A história do MTB é intimamente ligada ao ser humano, tendo seu ancestral migrado para a população humana a partir do estabelecimento da agricultura e pecuária pelos povos da Mesopotâmia. Na antiga Grécia, relatos de Hipócrates descrevem uma patologia muito semelhante à tuberculose, sendo que somente em 1822, o MTB fora identificado como agente patogênico da TB. A introdução da vacina e desenvolvimento da terapia causaram grande impacto na transmissão para crianças e no número de óbitos em adultos, no entanto, não foram capazes de evitar sua disseminação entre a população mundial. Elaborado pelo próprio autor.

1.3 O envoltório celular de *Mycobacterium tuberculosis*

O MTB é um bacilo reto ou ligeiramente curvo, imóvel e que não esporula. Exibe um tempo de geração extremamente lento de 20 a 22 horas, colônias acromogênicas, com aspecto de camurça rugosa, crescendo entre 14 a 28 dias a 37°C em meio sólido, sendo extremamente sensível às contaminações (FORBES et al., 2018).

Filogeneticamente relacionado às actinobactérias, apresenta grande quantidade de C-G em seu DNA e um envelope celular extremamente complexo, que pode ser corado em vermelho pela coloração de Ziehl-Neelsen devido às características de sua parede celular, uma vez que esta retém a fucsina mesmo após a lavagem com álcool-ácido (RUSSELL et al., 2014).

Estudos recentes de crio-microscopia eletrônica aliados à tomografia sugerem que a micomembrana do MTB, é organizada de forma semelhante à parede externa de Gram negativos, apresentando uma estrutura similar a uma membrana externa e que apresenta proteínas com função de porinas. A Figura 4 apresenta um esquema deste complexo envoltório (CHATTERJEE, 1997; HOFFMANN et al., 2008; ZUBER et al., 2008; SANI et al., 2010; DULBERGER; RUBIN; BOUTTE, 2020).

O bacilo possui membrana citoplasmática, parede celular e cápsula. A membrana plasmática é formada por uma bicamada fosfolipídica e proteínas de membrana, entre as quais

muitos transportadores, incluindo os pertencentes à família *ATP-Binding Cassette transporters* (Transportadores ABC). O envoltório celular, denominada micomembrana, é formada por uma camada de peptidoglicano associado à lipoarabinomananas, uma camada de arabinogalactonas, e ácidos micólicos, além de outros componentes exclusivos das micobactérias, como trealosedimicolato, trealose monomicolato, glicose monomicolato, dialicerol monomicolato monomicolato, dialicerato, glicol monomérico, glicol monomérico, monolisado monomérico, monomicolato de dialisado, monomicolato de glicerol, pentacilos trealoses, sulfolipídios, glicolipídios fenólicos (WOLFE et al., 2010). O espaço periplasmático, entre a parede bacteriana e a membrana plasmática, é estreito e externamente à parede, encontra-se uma cápsula formada principalmente por ácidos micólicos livres e alguns polissacarídeos que desempenham um papel na virulência das cepas de *M. tuberculosis* (SANI et al., 2010; SARATHY; DARTOIS; LEE, 2012; VINCENT et al., 2018; DAFFÉ; MARRAKCHI, 2019; KALSCHUEUR et al., 2019; MAITRA et al., 2019).

Estima-se que o genoma do MTB codifica cerca de 140 proteínas da micomembrana, mas até o momento nenhuma foi caracterizada. Em *Mycobacterium smegmatis*, a porina MspA foi identificada e caracterizada estruturalmente, e a deleção do gene correspondente levou à diminuição da permeabilidade do bacilo à glicose, fosfato, íons metálicos e aminoácidos. Esta porina é composta por oito monômeros majoritariamente compostos por fitas β que formam um canal na micomembrana, além de uma grande protuberância externa. O interior desta porina apresenta 16 resíduos ácidos que geram uma rede altamente negativa, o que explica a preferência por cátions. Curiosamente, nenhuma proteína semelhante foi identificada em MTB (NIEDERWEIS, 2003; SONG et al., 2008; NIEDERWEIS et al., 2010; CHIARADIA et al., 2017).

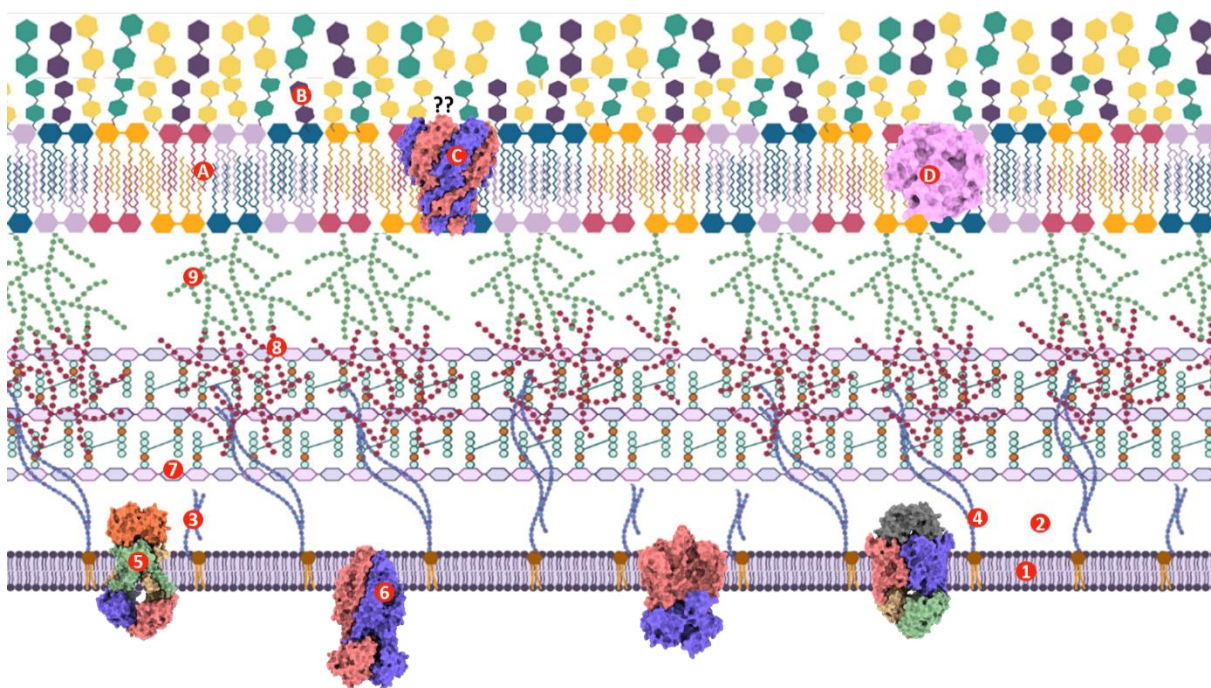


Figura 4 – A complexa parede celular de MTB confere alta resistência a compostos de origem externa. O MTB apresenta um envoltório celular único e que de certo ponto se assemelha muito à organização de uma membrana Gram-negativa. De dentro para fora, o envoltório é formado pela membrana citoplasmática bilipídica (aprox. 7 nm) (1), a qual apresenta uma enorme quantidade de proteínas de membrana integradas e associadas, incluindo muitos transportadores (5) (6) que atuam no tráfico das mais diversas moléculas. O periplasma (2). Ancoradas à membrana citoplasmática encontram-se lipomannanos que cruzam o periplasma (3) (14 nm) até a camada de peptídeoglicanos(7) (6,3 nm). Ligadas às lipomannanos encontram-se as arabinogalactanas (8,9), seguidas de uma camada extensa de ácidos micólicos (A). Na camada mais externa é possível encontrar ácidos micólicos livres e polissacarídeos (B), formando a cápsula (35 nm) (7). A presença de hidrolases como a MPT51 (FbpC1) (PDB: 1R88) tem sido identificada nesta camada (D) e especula-se a presença de micoporinas (C), como a identificada em *M. smegmatis* (PDB: 1UNN). Elaborado pelo próprio autor, baseado em DAFFÉ; MARRAKCHI, 2019; KALSCHEUER et al., 2019 e DULBERGER; RUBIN; BOUTTE, 2020.

A formação da parede celular do MTB é um processo extremamente complexo e requer diversas transformações pós-traducionais, que incluem fosforilação e pupilação. A parede celular tem um papel extremamente importante na regulação e crescimento do MTB em diferentes condições no hospedeiro, apresentando várias moléculas que induzem ou inibem a resposta imune, e constitui um

importante alvo para o desenvolvimento de fármacos e vacinas (CERDA-MAIRA; DARWIN, 2009; SAMANOVIC; LI; DARWIN, 2013; DULBERGER; RUBIN; BOUTTE, 2020).

1.4 A família dos transportadores ABC

O MTB apresenta proteínas de membrana importantes para o transporte de diversas moléculas, esses sistemas de transporte correspondem às quatro superfamílias principais: *ATP Binding Cassette* (ABC) que são consideradas transportadoras primárias, uma vez que utilizam ATP como fonte de energia para o sistema; *Small Multidrug Resistance* (SMR), *Resistance Nodulation Division* (RND) e *Major Facilitator Superfamily* (MFS), que são considerados transportadores secundários porque usam a força motora de prótons (H^+ ou Na^+) como energia. A *Multidrug and Toxic-compound Extrusion* (MATE) é outra superfamília importante de transportadores, mas não relatada até o momento no MTB (BRAIBANT; GILOT; CONTENT, 2000; PIDDOCK, 2006; SARATHY; DARTOIS; LEE, 2012; WONG et al., 2014).

Os transportadores ABC constituem uma superfamília de proteínas presentes nos três domínios da vida, utilizam a hidrólise de duas moléculas de ATP que resultam em mudanças conformacionais nos componentes do sistema e que culminam com o transporte do substrato (DAVIDSON, 2002; LICHT; SCHNEIDER, 2011). A composição geral de um transportadores ABC consiste em duas proteínas transmembranas, responsáveis pela formação do poro na membrana citoplasmática. Esses domínios transmembrana (TMD, do inglês *Transmembrane Domain*) podem apresentar de 4 a 12 hélices alfa e interagem com o domínio ATPase (NDB, do inglês *Nucleotide Binding Domain*) através das chamadas hélices de acoplamento (CH, do inglês *Coupling Helix*) (VAN DER DOES; TAMPÉ, 2004; HOLLENSTEIN; FREI; LOCHER, 2007; LEE et al., 2007; WILKENS, 2015; LOCHER, 2016).

Em sistemas importadores há a presença de um terceiro componente, a proteína ligadora de substrato (SBP, do inglês *Substrate-binding protein*), domínio responsável por identificar, capturar e transportar o substrato até o poro formado pelas TMDs (SCHEEPERS; LYCKLAMA A NIJEHOLT; POOLMAN, 2016). Os transportadores podem ser formados por um único gene que codifica TMD e NBD, como no caso de alguns exportadores, ou nas mais variadas combinações, como por exemplo dímeros de TMDs com duas ATPases codificadas por genes diferentes, dímeros de NBDs e heterodímeros de TMDs, NBDs no N-terminal, SBPs fusionadas à TMDs (LICHT; SCHNEIDER, 2011; THOMAS et al., 2020; THOMAS; TAMPÉ, 2020).

Os transportadores ABC eram classificados em dois grandes grupos: *importadores*, responsáveis pela captação de substratos a partir do meio externo e direcionamento para o interior citoplasmático, e *exportadores*, responsáveis pela extrusão de moléculas tóxicas e fármacos, reciclagem de componentes da membrana, exportação de componentes de parede externa e de fatores de virulência (HIGGINS, 2001; DAVIDSON; CHEN, 2004; LOCHER, 2009). Até recentemente, acreditava-se que os importadores estavam presentes apenas em procariotos enquanto os exportadores espalhados em todos os três domínios, porém, estudos têm apresentado fortes evidências da presença de transportadores do tipo importador em eucariotos como *Chlamydomonas reinhardtii* e *Cyanophora paradoxa* (CHOI; FORD, 2021). Atualmente, tais transportadores são classificados em sete famílias, conforme apresentado na figura 5.

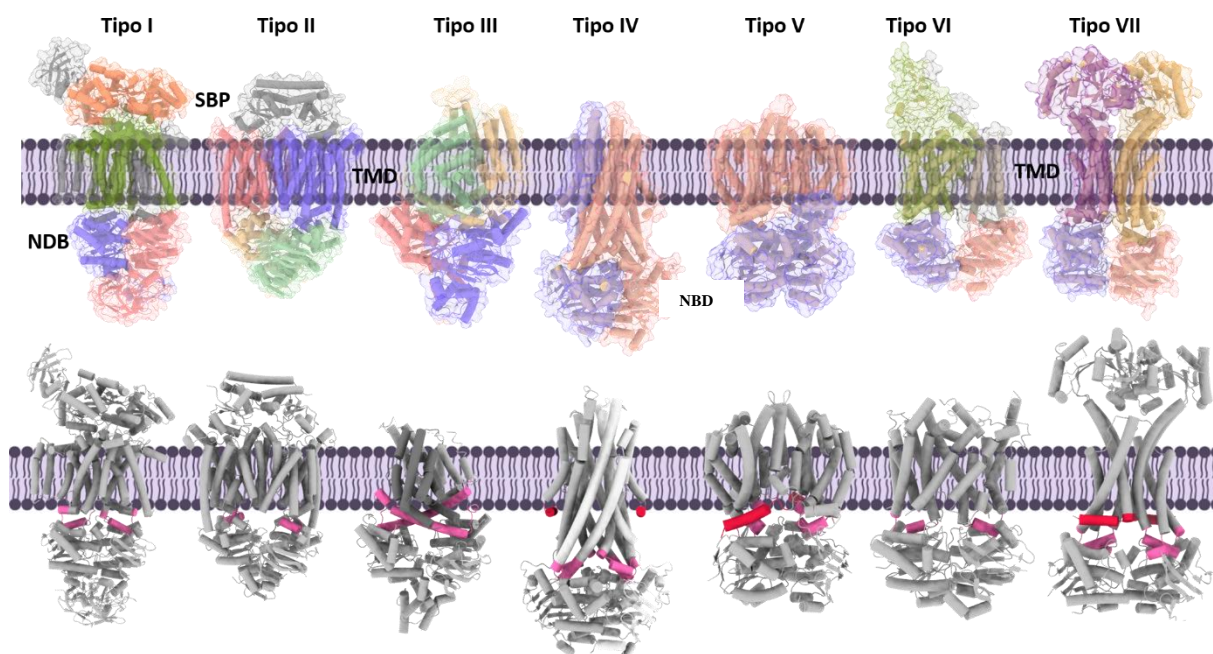


Figura 5 – Famílias de transportadores ABC. Os transportadores ABC são constituídos, em geral, por um domínio transmembrana (TMD, *transmembrane domain*) e um domínio que hidrolisa ATP (ATPase, ou NBD, Nucleotide-binding domain); os importadores podem ainda apresentar um domínio periplasmático responsável pela ligação do substrato (SBP, Substrate-binding protein). Atualmente são propostas 7 famílias distintas de transportadores, baseados na sua estrutura terciária e quaternária (1). Em comum, todos apresentam duas hélices dos domínios TMDs que se conectam aos domínios NBDs, as hélices de associação (CH-coupling helix), responsáveis pela sinalização do transporte e indução de mudanças conformacionais no sistema. Elaborado pelo próprio autor, baseado em THOMAS; TAMPÉ, 2020.

As NBDs são proteínas de ligação ao ATP responsáveis pela quebra do ATP e liberação da energia para a translocação do substrato. Apresentam um núcleo do tipo RecA, que estruturalmente consiste em uma folha-beta de seis fitas rodeada por quatro hélices-alfa.

Envolvendo este núcleo estão dois subdomínios, ABC β e ABC α , formados por folha β antiparalela de três fitas e um subdomínio α -helicoidal, respectivamente, conforme figura 6.

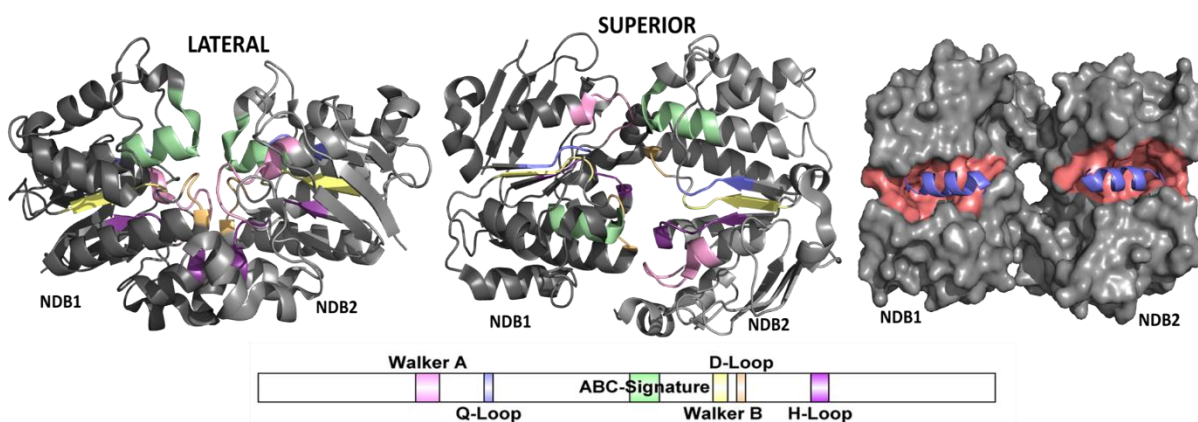


Figura 6 – Domínios NDB de transportadores ABC. Os domínios NDB são responsáveis pela ligação das duas moléculas de ATP, na interface formada pela interação dos domínios. A ligação e quebra desse ATP é responsável por mudanças conformacionais que atuam na translocação do substrato. As NDBs apresentam os motivos conservados, Walker A que forma um loop responsável pela ligação dos fosfatos α e β de di e trinucleotídeos; Q-loop, que apresenta uma glutamina essencial para o ataque nucleofílico necessário para o hidrólise do ATP; ABC-signature, também chamado de Walker C, responsável por ser um sensor do fosfato γ ; Walker B, coordena o Mg^{2+} e polariza a água necessária para a hidrólise de ATP; D-loop, que contém um aspartato invariável e o H-loop, que possui uma histidina invariável responsável pela polarização da água necessária para o ataque nucleofílico ao ATP. A interação com o domínio TMD ocorre através das hélices de associação (em azul) que se encontram enterradas em um pocket presente no NDB (em rosa).

As NDBs apresentam alguns motivos conservados que são encontrados em todas as ATPases de transportadores ABC, entre os quais, os motivos: (i) Walker A ou P-loop, formado pelo consenso GxxGxGKST (onde x representa qualquer resíduo); (ii) A-loop, domínios responsáveis pela ligação aos fosfatos e com o nucleotídeo (OSWALD; HOLLAND; SCHMITT, 2006; REES; JOHNSON; LEWINSON, 2009); (iii) Q-loop apresenta uma glutamina conservada responsável pelo ataque nucleofílico durante a hidrólise de ATP; (iv) motivo assinatura de transportadores ABC, LSGGQ, envolvido na hidrólise de ATP como um sensor do fosfato-gama e como um sinal para os motivos transmembranares. Está diretamente ligado à dimerização das NDBs na presença do ATP; (v) motivo Walker B que apresenta um consenso formado por 4 resíduos alifáticos seguidos por 2 resíduos negativos e é responsável por coordenar o íon Mg^{2+} e polarizar a água responsável pelo ataque ao ATP durante a hidrólise.

As TMDs são os componentes do transportador de menor conservação no transportador, embora apresentem uma estrutura secundária em forma de hélice-alfa (ou hélice de acoplamento, *coupling helix*, CH) bastante característica que contém o motivo conservado glutamato-alanina-alanina (EAA). Essas estruturas fazem contato com os NDBs em um pocket

de interação e induzem modificações estruturais que culminam com a quebra do ATP e passagem do substrato pelo transportador (CROW et al., 2017).

As proteínas ligadoras de substratos (SBPs) são responsáveis pela afinidade e especificidade do transportador e podem apresentar um único substrato ou múltiplos substratos. Existem SBPs que interagem com um único transportador, enquanto outras podem interagir com mais de um. Em microrganismos Gram positivos e no MTB, essas proteínas estão ligadas à membrana citoplasmática através de uma cauda lipídica e em Gram negativos elas estão livres no periplasma. Essas proteínas apresentam dois lobos conectados por uma alça, entre os quais se encontra o pocket de ligação ao substrato. A ligação do substrato promove o fechamento dos domínios (movimento chamado de *Venus-trap*), e em contato com os TMDs, induzem mudanças conformacionais que estimulam a liberação do substrato para o interior do poro formado (BERNTSSON et al., 2010; GOURIDIS et al., 2014; DE BOER et al., 2019). São agrupadas em seis grupos (*clusters*) diferentes (A-F) baseados na região de interligação dos lobos (Figura 7, em salmão) (BERNTSSON et al., 2010; GOURIDIS et al., 2014; SCHEEPERS; LYCKLAMA A NIJEHOLT; POOLMAN, 2016).

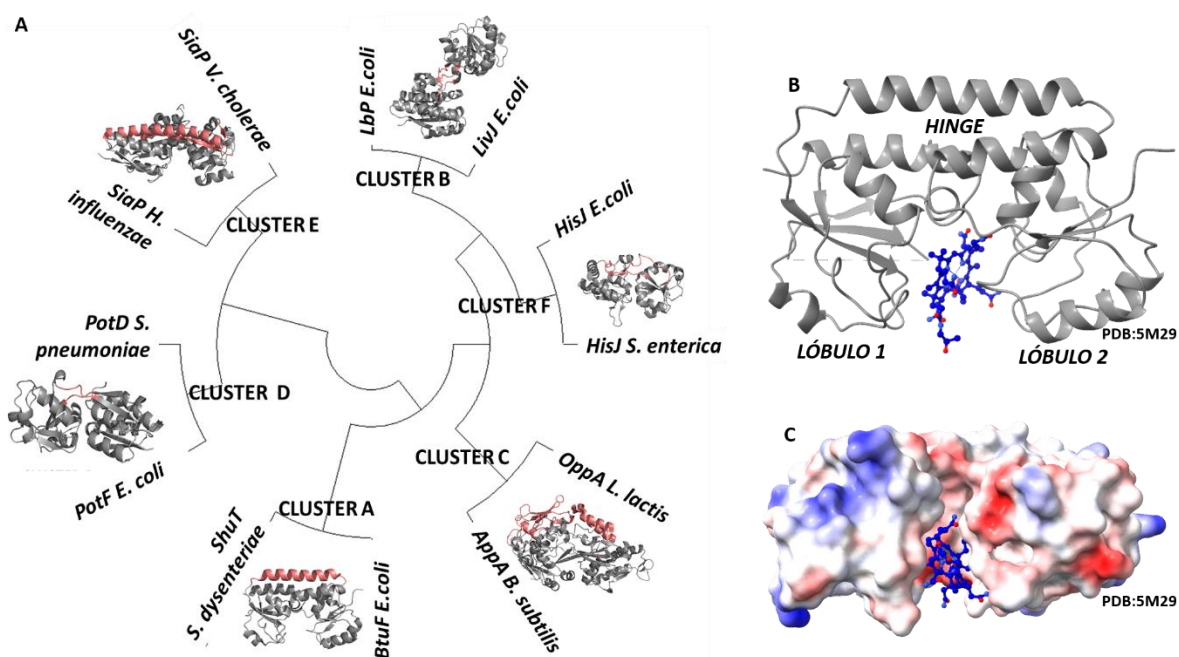


Figura 7 – Proteínas ligadoras de substrato em transportadores ABC. Em geral, transportadores do tipo importador, apresentam um domínio responsável pelo reconhecimento e ligação do substrato (SBP). A proteína é formada por dois lóbulos interconectados por uma região que pode se apresentar de diferentes maneiras, definindo 6 grupos ou *clusters* (A, B, C, D, E e F). O pocket de interação do substrato se encontra entre os lóbulos e a região de conexão entre eles. Elaborado pelo próprio autor.

Em relação às famílias de transportadores ABC, os tipos I, II e III compreendem principalmente transportadores importadores, enquanto os tipos IV e V são na sua maioria exportadores, embora sistemas importadores já tenham sido descritos com a arquitetura do tipo IV, os tipos VI atuam como extratores, removendo componentes da membrana interna para transferi-los para proteínas parceiras, e os tipos VII compreendem os transportadores que compõem as bombas tripartidas de efluxo, responsáveis pela extrusão de macrolídeos e de toxina termolábil. (MAVRICI et al., 2014; CROW et al., 2017; FITZPATRICK et al., 2017; GREENE et al., 2018; TANG et al., 2019; REMPEL et al., 2020; THOMAS; TAMPÉ, 2020).

1.5 Os transportadores ABC em *Mycobacterium tuberculosis*

O MTB teve seu primeiro genoma sequenciado e publicado em 1998 (COLE et al., 1998a, 1998b), e em 2000 foi publicada a primeira revisão a descrever transportadores ABC presentes em MTB por BRAIBANT e colaboradores. Em 2020, nosso grupo publicou uma revisão atualizada que incluiu transportadores adicionais, uma compilação de estudos funcionais e de dados estruturais de componentes de transportadores ABC de MTB (OLIVEIRA e BALAN, 2020). Esta revisão é apresentada a seguir.



Review

The ATP-Binding Cassette (ABC) Transport Systems in *Mycobacterium tuberculosis*: Structure, Function, and Possible Targets for Therapeutics

Marcelo Cassio Barreto de Oliveira and Andrea Balan *

Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508000, Brazil; mbarretoliveira@hotmail.com

* Correspondence: abalan@usp.br; Tel.: +55-(11)3091-7745

Received: 10 October 2020; Accepted: 12 November 2020; Published: 4 December 2020



Simple Summary: *Mycobacterium tuberculosis* is a bacterium of great medical importance because it causes tuberculosis, a disease that affects millions of people worldwide. Two important features are related to this bacterium: its ability to infect and survive inside the host, minimizing the immune response, and the burden of clinical isolates that are highly resistant to antibiotics treatment. These two phenomena are directly affected by cell envelope proteins, such as proteins from the ATP-Binding Cassette (ABC transporters) superfamily. In this review, we have compiled information on all the *M. tuberculosis* ABC transporters described so far, both from a functional and structural point of view, and show their relevance for the bacillus and the potential targets for studies aiming to control the microorganism and structural features.

Abstract: *Mycobacterium tuberculosis* is the etiological agent of tuberculosis (TB), a disease that affects millions of people in the world and that is associated with several human diseases. The bacillus is highly adapted to infect and survive inside the host, mainly because of its cellular envelope plasticity, which can be modulated to adapt to an unfriendly host environment; to manipulate the host immune response; and to resist therapeutic treatment, increasing in this way the drug resistance of TB. The superfamily of ATP-Binding Cassette (ABC) transporters are integral membrane proteins that include both importers and exporters. Both types share a similar structural organization, yet only importers have a periplasmic substrate-binding domain, which is essential for substrate uptake and transport. ABC transporter-type importers play an important role in the bacillus physiology through the transport of several substrates that will interfere with nutrition, pathogenesis, and virulence. Equally relevant, exporters have been involved in cell detoxification, nutrient recycling, and antibiotics and drug efflux, largely affecting the survival and development of multiple drug-resistant strains. Here, we review known ABC transporters from *M. tuberculosis*, with particular focus on the diversity of their structural features and relevance in infection and drug resistance.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; ABC transporters; structure; drug-efflux; importers; mce proteins

1. Introduction

M. tuberculosis is the agent responsible for tuberculosis, with about 10 million people infected in the world in 2018, of which 1.2 million died in 2019 [1]. To make this scenario worse, many individuals have latent infections that are reactivated at some point in their lives, especially among those with other immunodeficient diseases such as co-infection with the HIV virus (human immunodeficiency virus). The bacillus has a cytoplasmic membrane, cell wall, and an external capsule formed mainly

by polysaccharides that play a relevant role in the virulence of *M. tuberculosis* strains. The inner membrane is formed by a phospholipid bilayer with several integral membrane proteins, among which the important family of ATP-dependent transporters, the ATP-Binding Cassette (ABC) transporters, are also present. The cell wall or mycomembrane is formed by a thin layer of peptidoglycan associated with lipoarabinomannan and a layer of arabinogalactones. In addition, there are mycolic acids and other important components specific to the mycobacteria, such as different types of phosphosugars, trehalose, glycerol sulfolipids, and phenolic glycolipids [2].

Transport across the cell membrane is extremely important for the bacterium. Different molecules and substrates are required for diverse cellular processes. Species from the *M. tuberculosis* complex (MTBC) and strains from pathogenic groups have around 160 to 200 proteins dedicated to the ATP-dependent transport systems according to the TransportDB webserver [3] indicating the relevance of this protein family for the genus. In *M. tuberculosis*, 2.5% of the genome encodes components of ABC transporters, indicating their critical role in the maintenance of cellular homeostasis. These transporters, in addition to being responsible for the transport of important molecules such as sugars, amino acids, and many others, also act as efflux pumps of external agents and are thereby responsible for resistance to antibiotics [4]. Structurally, ABC transporters consist of a canonical set of two transmembrane domains (TMDs) that form a pore for the passage of the substrate (TMDs) and two nucleotide-binding domains (NDBs) that provide energy for substrate translocation through ATP hydrolysis. These components can be translated into independent polypeptides or joined in various possible combinations, forming homodimers or heterodimers [5]. In addition, ABC import systems have a third component, a periplasmic substrate-binding protein (SBP), which is responsible for the uptake and delivery of the substrate into the pore formed by the TMDs [6]. Based on the layout and architecture of the TMDs, ABC transporters can be divided into seven families, three importer families, and four exporter families [7]. Using bioinformatics analysis, structural characterization, and data mining, we have classified *M. tuberculosis* ABC transporter components into aforementioned families (Figure 1).

Most ABC importer systems that have been identified in *M. tuberculosis* so far belong to group I and include systems dedicated to the import of sugars, amino acids, peptides, and anions. However, four systems related to iron import have been classified into group II and a unique cobalt transporter into group III (Energy Coupling Factor, ECF).

M. tuberculosis ABC exporter systems fall into groups IV, V, and VII. It is interesting to observe that the secondary and or tertiary structural characteristics of some components do not fit their functional groups, as shown by experimental analysis. These components are IrtAB, BacA, Rv2563/64, Rv0072/73, Rv1747, and Rv0987/86. Functionally, IrtAB and BacA are importers, but their structures are very similar to the structures of ABC exporters. No periplasmic components were identified for these systems in the vicinity of the genome, and IrtAB also has an additional cytoplasmic domain which is thought to function in exportation. Similarly, Rv2563/64 and Rv0072/73 are structurally related to type VI transporters, although they have been associated with the import of amino acids due the presence of the NBD component. Rv2564 and Rv0073 are highly similar to the *E. coli* GlnQ protein, the ATPase subunit from the glutamine transporter [9]. Rv1747 and Rv0987/86, putative exporters, have a non-canonical domain architecture, with two cytoplasmic phosphorylated Fork-Head Associated (FHA) domains and two extracellular domains per TMD, respectively. This mixing of functions and structural features across families highlights how surprising and captivating the components of the *M. tuberculosis* inner membrane are and how little it is known about them and the proteins that belong to the bacillus envelope. Finally, we have the Mce proteins, whose function is critical for the bacillus existence. Nevertheless, their structural organization is not clear and only based on homology of the MceA-F components with the *E. coli* Mla proteins [10,11].

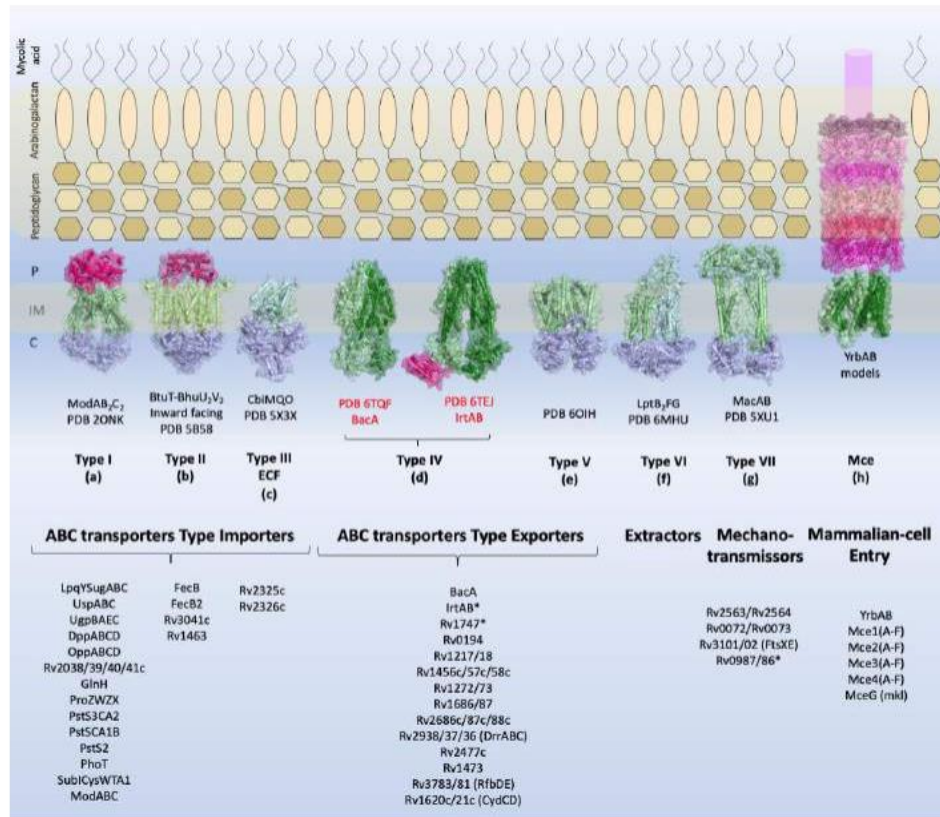


Figure 1. Overview of the types of ABC transporters and the components identified in *M. tuberculosis*. Schematic view of the *M. tuberculosis* cellular envelope is shown with the families of TMDABC transporters organized into importers (Types I–III), exporters (Types IV and V), extractors, and mechanotransmitters. Additionally, the structural representation of the Mce complex (Mammalian-cell entry proteins), which has two ABC-like TMDs, is shown. Representative structure of each transporter class is shown in the inner membrane: Type I, the molybdate transporter ModABC of *Archaeoglobus fulgidus* (PDB 2ONK); Type II, the vitamin transporter BtuT-BtuUV of *Burkholderia cenocepacia* (PDB 5B58); Type III, the cobalt energy-coupling factor transporter CbiMQO of *Rhodobacter capsulatus* (PDB 5 × 3X); Type IV, two ABC transporter type exporter of *M. tuberculosis* that had the three-dimensional structure resolved are shown: the ABC transporter of vitamin B12, BacA (gene Rv1819c) (PDB 6TQF), and the transporter of siderophores, IrtAB (PDB 6TEJ) (nomenclature in red); Type V, the transporter of O-antigen of *Aquifex aeolicus* VF5 (PDB 6OIH); Type VI, Cryo-EM structure of the *E. coli* LptB₂FG transporter (PDB 6MHU); Type VII, the structure of MacAB-like efflux pump from *Streptococcus pneumoniae* (PDB 5XU1); Mce complex, prediction of the structural organization of Mce transporter systems (Mce1–4); the two ABC components, YrdAB, and the periplasmic domains, proteins MceA to MceF were modelled using I-Tasser server [8] based on *E. coli* Mla components. The structures are shown in cartoon representation with a transparent surface. The substrate-binding proteins from Type I importers and the periplasmic domains of Mce complex are shown in pink shades; the transmembrane domains are shown in dark and pale green, and the nucleotide-binding domains are shown in blue. P: periplasm, IM: inner membrane, C: cytoplasm. The ABC transporters and components of *M. tuberculosis* described in this review are listed below the representative structures. Transporters marked with asterisk (*) have structural organization that does not fit the functional or structural classification.

In this review, we summarized the current understanding of the putative ABC transporters in *M. tuberculosis*, their structural properties, and their functional role in the bacillus. We highlight the fact that the number of transporters in *M. tuberculosis* must be much higher than described, since searches

for orthologues are hampered by the low sequence identity between these proteins and their poor functional characterization.

2. Identified ABC transporters in *Mycobacterium tuberculosis*

2.1. ABC Transporters Type Importer

ABC importers are present in prokaryotes but not in eukaryotes. They are responsible for the import of different substrates including oligopeptides, amino acids, inorganic anions, sugars, and metals. Because of such a diverse range of substrates, ABC importers are involved in many physiological processes, including transport, nutrition, virulence, and pathogenesis. Most ABC importers in *M. tuberculosis* are responsible for the bacillus adaptation in the human host. In this section, we describe the components and full ABC importers systems that were identified in *M. tuberculosis*, including their roles to keep the bacillus in full activity. We have subdivided them into five main groups according to their putative functions (Table 1).

Table 1. Genomic context and structural organization of the ATP-Binding Cassette (ABC) importers in *Mycobacterium tuberculosis*. Importers are presented in seven groups organized by putative function. Genes that belong to the genomic context are shown as arrows. The number of helices and structural organization predicted with TOPCONS [12] are shown in the structural organization column. Substrate-binding proteins are represented in pale pink; transmembrane domains in light and dark green; nucleotide-binding domains in purple; and the regulatory domain, when present, in pale purple. SID: siderophore interaction domain.

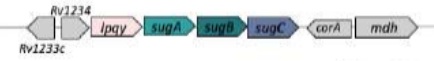




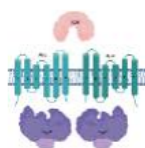

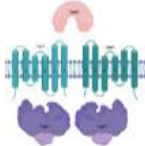
IMPORTERS		
ABC Systems/Genomic Organization	Genomic Organization	Structural Organization
Sugars		
LpqY/SugA/SugB/SugC (Rv1235/36/37/38) SBP-TM ₁ -TM ₂ -[NBD] _r (2x) Trehalose recycling involved in virulence and biofilm formation [13,14]		
UspC/UspB/UspA (Rv2318/17/16) SBP-TM ₁ -TM ₂ -[NBD] _r (2x) Amino-sugars [9,15]		
UgpB/UgpA/UgpE/UgpC (Rv2833c/32c/34c/35c) SBP-TM ₁ -TM ₂ -[NBD] _r (2x) Glycerophosphocholine [16,17]		
Rv2041c/Rv2040c/39c/38c SBP-TM ₁ -TM ₂ -[NBD] _r (2x) Amino-sugar Rv2041c—potential use for serodiagnostic and Vaccine development [18]		

Table 1. Cont.

IMPORTERS		
ABC Systems/Genomic Organization	Genomic Organization	Structural Organization
Peptides		
<p>DppA/DppB/DppC/DppD (Rv3666c/65c/64c/63c) SBP-TM₁-TM₂-[NBD_r]_(2x) Dipeptides (heme and hemoglobin?) [19]</p>		
<p>OppA/OppB/OppC/OppD (Rv1280c/83c/81c/82c) SBP-TM₁-TM₂-[NBD_r]_(2x) Oligopeptides (glutathione and bradykinin) [20]</p>		
Amino acids		
<p>Rv2563/Rv2564 Lipopolysaccharide export [ECD/TM/NBD_r]_(2x) Type VII Rv2564 is a potential biomarker for diagnosis development [21]</p>		
<p>Rv0072/Rv0073 Lipopolysaccharide export [ECD/TM/NBD_r]_(2x) Type VII [9]</p>		
<p>GlnH (Rv0411c) SBP glutamine/glutamate/aspartate [22]</p>		
<p>ProX/ProW/ProZ/ProV (Rv3759/5756/58) SBP-[TM/NBD_r]_(2x) Glycine/betaine/L-proline/carnitine/ choline [23]</p>		
Anions		
<p>SubI/CysI/CysW/CysA1 (Rv2400/99/98/97) SBP-TM₁-TM₂-[NBD_r]_(2x) Sulfate Members of sulfate transporter and sulfate assimilation pathway are essential and targets for drug development [24]</p>		
<p>ModA/ModB/ModC (Rv1857/Rv1858/Rv1859) SBP-[TM/NBD_r]_(2x) Molybdate ModC is a good target as biomarker and potential for vaccine development [25]</p>		

Table 1. Cont.

IMPORTERS		
ABC Systems/Genomic Organization	Genomic Organization	Structural Organization
<p>PstS3/PstC2/PstA2 (Rv0928/29/30)</p> <p>SBP-TM₁-TM₂</p> <p>Phosphate</p> <p>SBPs are potential targets for inhibition and vaccine development [26]</p>		
<p>PstS1/PstC1/PstA1/PstB* (Rv0934/35/36/33)</p> <p>SBP-TM₁-TM₂-[NBD]_(2x)</p> <p>Phosphate</p> <p>Potential drug targets; PstS1 is a good biomarker for diagnosis [27]</p>		
<p>PstS2 (Rv0932)</p> <p>SBP</p> <p>Phosphate [26]</p>		
<p>PhoT (Rv0820)</p> <p>NBD</p> <p>Phosphate [9]</p>		
Metals		
<p>FecB (Rv3040c)</p> <p>SBP</p> <p>FeIII-dicitrate</p> <p>Potential drug target and vaccine development [28]</p>		
<p>FecB2 (Rv0265c)</p> <p>SBP</p> <p>Iron/heme [9]</p>		
<p>Rv3041c</p> <p>NBD</p> <p>iron-hydroxamate [9]</p>		
<p>Rv1463</p> <p>NBD</p> <p>Fe-S cluster assembly [29]</p>		
<p>SBP/TM₁/NBD₁-TM₂/NBD₂</p> <p>Siderophore [30]</p>		
Hydrophilic compounds		
<p>BacA* (Rv1819c)</p> <p>[TM/NBD]_(2x)</p> <p>Vitamin B12 [31,32]</p>		
Energy-Coupling Factors		
<p>Rv2325c/Rv2326c</p>		

2.1.1. Sugars Transporters

M. tuberculosis metabolism presents particularities, such as its ability to survive within the macrophage where nutrient limitations exist, when compared to other free-living bacteria, such as *M. smegmatis*, and other pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae* [33]. *M. tuberculosis*, through the glyoxylate cycle, uses lipids as the main carbon source for survival in mice. However, this fact may obscure the importance of carbohydrate transporters. The deletion of the disaccharide transporters has proven to influence infection and pathogenicity [34,35], showing that the bacillus performs metabolic transition depending on its location in the host. The bacterium has four operons that code for ABC transporters dedicated to carbohydrate transport, unlike *M. smegmatis*, an environmental species that has 19 ABC sugar transporters, highlighting the differences imposed by the different natural environments of these microorganisms [36,37].

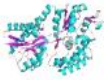












One of the sugar importers identified in the *M. tuberculosis* genome is encoded by the *lpqYsugABC* operon responsible for the expression of the SBP LpqY, the TMDs SugAB and SugC, and the NBD. The putative function of this transporter is the recycling of trehalose, a particular disaccharide not present in mammals but that is formed during the production of mycolic acids [14]. Structurally, the transporter is predicted to have six transmembrane helices in each of the TMDs, as predicted by the TopCons server [12]. The SugC domain shows a high similarity with the MalK protein from *E. coli*, where the presence of a regulatory domain (Table 1, represented in clear purple) is also possible. Biophysical assays on the SugC domain of this importer have shown a classical NBD behavior with optimal activity at pH 7.5 [38]. Trehalose metabolism appears to be involved in vitro in biofilm formation, which in turn is associated with the in vivo drug resistance of mycobacteria [13]. Studies have shown that trehalose analogues are able to inhibit biofilm formation and decrease bacterial growth in *M. smegmatis*. In the same study, it was also shown that this transporter is essential for anti-growth and anti-biofilm activities, hence proving its importance for the capture of trehalose and trehalose analogues [13]. Finally, the same transporter is also required for the growth of mycobacteria in C57BL/6J mouse spleen [34] and survival in primary murine macrophages [39].

The *uspABC* operon encodes another *M. tuberculosis* sugar transporter (UspABC) consisting of a SBP (UspC) and two TMDs (UspAB) [9]. The absence of the NBD domain in the operon suggests that this transporter might share this domain with other transporters. The TMDs are predicted to have six TM helices each. The SBP UspC contains an N-terminal extension (residues 7–29) that is responsible for anchoring the domain to the membrane. The three-dimensional structure of UspC was determined in 2016. Biochemical assays demonstrated that UspC preferentially bound amino sugars such as chitobiose, a characteristic that shows the ability of the bacillus to use scarce sources of nutrients during intracellular infection and the recycling of amino acids from its own cell wall [15] (Table 2). UspABC has been reported as an essential transporter for in vitro growth in transposon mutagenesis assays [40,41].

The third ABC sugar transport system in *M. tuberculosis*, UgpABCE, is formed by the SBP UgpB, the TMDs UgpA and UgpE, and the NBD UgpC [9] (Table 1). This transporter has been associated with the binding of glycerolphosphocholine (GPC) and other glycerolphosphodiester [16] (Table 2). It appears to play an important role in the recycling of glycerophospholipid metabolites [17]. It is probable that *M. tuberculosis* uses these substrates as a source of nitrogen and carbon inside the phagosome. Genes of this transporter have been defined as non-essential during in vitro growth [46], but essential during infection [34]. Finally, the Rv2038c/39c/40c/41c transporter also binds sugars but its specific substrate is still unknown. Genes from this transporter were reported as non-essential for in vitro growth [46,47] but play an essential role during infection in vivo in mice [40]. The SBP Rv2041c was highly expressed in conditions of low pH and oxygen depletion and in phagosome infection, both in dormant and active infections. Together with other *M. tuberculosis* antigens, this protein transporter was successfully used for the serodiagnosis of patients with active tuberculosis [18] (Table 1). In addition, Rv2041c was related to high levels of TNF- α , IL-6 and IL-12p40 in bovine macrophages and induced an increase in the secretion of IFN- γ and TNF- α in lymphocytes, either in latent and active tuberculosis in

mice models [48]. The structural organization of these four transporters indicates that they all belong to the type I ABC importer systems classification [9].

Table 2. *M. tuberculosis* ABC transporters whose structure was solved. FHA-1 and FHA-2: Fork-Head Associated domains (1 and 2) from the Rv1747 transporter; SBP: substrate-binding protein; ECD: extracellular domain.

Transporter Component	3D Structure	PDB	Ligand	Reference
Rv2318 (UspC) SBP type II, sugar		5K2Y; 5K2X	-	[15]
Rv2833c (UgpB) SBP type II, sugar		6R1B; 4MF1	GPC -	[17]
Rv3666c (DppA) SBP type II, peptides		6E4D	SSVT	[19]
Rv0411c (GlnH) SBP type II, amino acids		6H20 6HIU 6H2T	Asn Asp Glu	[22]
Rv2400c (SubI) SBP type II, anion		6DDN	SO ₄	-
Rv0928 (PstS3) SBP type II, anion		4LVQ	PO ₄	[42]
Rv0934 (PstS1) SBP type II, anion		1PC3	PO ₄	[43]
Rv0263c (FecB2) SBP type III, iron		4PM4	-	-
Rv1348/Rv1349 (IrtAB), full transporter, iron		6TEJ; 6TEK	- -	[30]
Rv1819c (BacA) Full transporter		6TQF; 6TQE	AMP-PNP	[32]
Rv1747_FHA-1 Lipooligosaccharides, drugs		6CCD	-	[44]
Rv1747_FHA-2 Lipooligosaccharides, drugs		6CAH	-	[44]
Rv3101 (FtsX) ECD, division		4N8N 4N8O	-	[45]

2.1.2. Peptides Transporters

M. tuberculosis has two ABC transport systems, DppABCD and OppABCD, which are dedicated to the transport of dipeptides and oligopeptides, respectively [9] (Table 1).

The DppABCD import system has similarities with the orthologous system in *E. coli* and is formed of an SBP DppA, two TMDs (DppB–DppC) with six predicted TM helices, and an NDB (DppD). DppA shows the classic SBP type II topology, where a pocket for substrate binding is formed at the interface of the two subdomains. The three-dimensional structure of *M. tuberculosis* DppA was solved with the tetrapeptide SSVT in the ligand-binding pocket (PDB: 6E4D) [19]. Peculiarly, in the same study, the authors explored the additional possibility of DppA to bind heme and hemoglobin through the growth of a *dpp* mutant that was impaired in medium with hemin and human hemoglobin as source of iron [49]. While the *M. tuberculosis* strain with deletion in *dppD* has shown a decreasing survival in the early stages of infection, the deletion of *dppC* in the *M. bovis* bacille Calmette–Guérin (BCG) was responsible for an attenuated phenotype [50]. Finally, the DppABCD transporter is associated with the regulation of genes involved in cell wall remodeling in *M. tuberculosis*, since its deletion caused decreased survival in the lungs and spleen in mice but no change in the virulence phenotypes [34,46].

The transporter OppABCD has a structural organization similar to the Dpp system, consisting of an SBP (OppA), two TMDs (OppB–OppC) with six predicted TM helices each, and an NDB (OppD) (Table 1). This transporter is essential for the growth of *M. tuberculosis* in a C57BL/6J mouse spleen and infections model [34,47]. The OppABCD system was shown to bind the tripeptide glutathione and the nonapeptide bradykinin, suggesting that it can transport a wide range of substrates. In macrophages infected with *M. tuberculosis*, this transporter seems to be responsible for reducing the levels of glutathione, an ability that was lost in the *oppD* mutant. Moreover, in the *M. tuberculosis opp* deleted strain lower levels of methyl glyoxal and a decreased ability to promote apoptosis and the production of IL-6, IL-1 β , and TNF- α were observed, which evidences the interference of the transporter with the innate immune response [20].

2.1.3. Amino Acid Transporters

The putative ABC components related to amino acid transport identified in *M. tuberculosis* include the transporter ProXVWZ (glycine and betaine), Rv2563/64 and Rv0072/73, and the SBP GlnH (glutamine/glutamate/aspartate) [9]. Rv2563/Rv2564 and Rv0072/Rv0073 share a similar structural organization, with two NBDs and two TMDs (four helices each) that present an external periplasmic domain that spans the cell envelope (Table 1). The structural organization and function of these transporters is still uncertain. While the TMD organization is similar to that observed in the MacB family, whose members are responsible for the efflux of macrolides, division regulation, and lipoprotein or protein effectors release [51–54], the NBDs from the Rv0073 and Rv2564 share a more than 70% amino acid sequence identity with ATPases from glutamine transporter-type importers, causing some doubts about their true function [55,56]. A protein microarray study has shown that Rv2564 is immunogenic and reacts positively with serum from TB-infected patients, while showing no reactivity in control patients' samples [21]. The transporters Rv0072/Rv0073 and Rv2563/Rv2564 are described as non-essential for *M. tuberculosis* in vitro growth, as many clinical isolates show a partial or complete deletion of Rv0072/Rv0073 [40,46,47].

GlnH is a periplasmic binding protein and its structure was solved in complex with glutamine, glutamate, and asparagine [22] (Table 2); it has structural feature similar to the SBPs of anion transporters. Genes up and downstream of *glnH* encode, respectively, the permease GlnX and the kinase PknG, which phosphorylates the protein GarA, either in *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*. The phosphorylation of GarA culminates in the cancellation of the repression of the metabolism of glutamic acid [22]. Finally, the amino acid transporter ProXVWZ is similar to the glycine betaine transporters that are found in various bacteria. It is formed by the substrate binding-protein domain ProX, the TMDs ProW and ProZ, and the NBD ProV [9]. In other microorganisms, this type of transporter is responsible for the control of osmoregulation through osmoactive compounds, such as glycine betaine, proline, and others that

do not show metabolic activity even in high concentrations. *M. tuberculosis* ProX binds polyphenols such as phloretin, which can be used as a carbon source [23]. Mutants of the *proXVWZ* operon showed problems in accumulating glycine betaine, deficiency in survival and growth in macrophages, and impaired the bacillus growth in a medium with a high osmolarity [57].

2.1.4. Anion Transporters

M. tuberculosis has at least four complete ABC transporter systems for anion transport that share similar structural organization with conserved type II SBPs, TMDs with six predicted TM helices and NBDs with regulatory domains [9,58] (Table 1).

SubICysTWA is a sulfate transporter formed by the periplasmic binding protein SubI, the TMDs CysT and CysW and the NBD CysA1. This transporter is part of an important pathway for the production of L-cysteine, methionine, mycothiol and other cofactors that draw attention to them as potential targets for drug development [58,59]. Mutants of this transporter affect the growth of the bacterium in vitro and its survival in macrophages during infection [34,40,46,47]. Studies have shown that strains with mutations in *cysA1* and *subI* were unable to capture sulfur [60] and showed an increased sensitivity to several antibiotics compared to the wild-type strain where genes encoding this transporter were upregulated in depletion of sulfur [28]. The three-dimensional structure of the periplasmic binding protein SubI was solved in the presence of sulfate (PDB: 6DDN), revealing a conserved binding site (Table 2).

ModABC is highly conserved with respect to the *E. coli* molybdate importer system and imports molybdate ions that are used as cofactor in a series of enzymes that act on the *M. tuberculosis* metabolism [61,62]. The transporter system is constituted of SBP (ModA), two TMDs (ModB) and two NBDs (ModC) (Table 1). ModC was identified as one of the antigens present in the urine of patients with active pulmonary TB it is therefore a possible biomarker for point-of-care diagnostics in combination with other MTB antigens [25]. A *M. tuberculosis* mutant lacking ModA protein has shown a lower survival rate in lungs of mice and attenuated infectious phenotype when compared to the wild-type strain but showed in vitro growth faster [46]. Moreover, the gene was non-essential during the infection of *M. tuberculosis* in macrophages [34,40].

Phosphate uptake in *M. tuberculosis* is organized in four operons: *pstS1pstC1pstA2pstB* (SBP-TMD-TMD-NDB), *pstS3pstC2pstA1* (SBP-TMD-TMD), *phoT* (NDB), and *pstS2* (SBP) (Table 1). It is still unclear if the uncomplete systems can be completed by components from other operons or if they assemble by combining the various components from different operons [9,63,64]. The three SBPs are present in the mycobacterial surface and they seem to be upregulated during the starvation of phosphate [26,64]. The *pstS3pstC2pstA2* expression was dependent of the two-component system SenX3-RegX3, during phosphate starvation. PstA1, PstC2, and PstS3 proteins are essential for in vivo growth and macrophage survival, and PhoT protein is essential for virulence [65]. The *pknD* gene is located downstream of the *pstS3pstC2pstA2* operon and encodes a serine/threonine kinase that plays a key role in phosphate regulation and in the activity of the transporters (Table 1). Mutations in *pknD*, induced a similar phenotype to *pstS* mutants, altering the survival ability of the bacillus in macrophages and the lungs of mice [66]. PstS1 and PstS3 have similar identical three-dimensional structures that were solved in the presence of phosphate [42,43]. Another interesting observation is that under phosphate deprivation conditions, the bacillus shows an isoniazid tolerance phenotype [67]. A high level of expression of the *pstB* in response to fluoroquinolone treatment was also observed suggesting that the expression of this gene is associated with fluoroquinolone resistance [68]. Finally, PstS proteins are highly immunogenic and hence good targets for the development of new diagnostic approaches [27] (Table 2).

2.1.5. Metal Transporters

M. tuberculosis uses ABC transporter components for the uptake of metals, mostly related to survival and virulence [69–72]. ABC proteins include FecB (SBP), FecB2 (SBP), Rv3041c (NDB), Rv1463

(NDB), and IrtA/IrtB, a non-canonical importer of siderophores [9,29,73,74]. The *fecB* gene encodes a substrate binding-protein homologous to *E. coli* FecB that binds iron from ferric citrate. The expression of FecB orthologous in *M. avium* was directly influenced by the iron concentration [75]. Mutants of *M. tuberculosis fecB*, have shown to be susceptible to several antibiotics, suggesting a direct relationship between FecB and intrinsic resistance to these drugs. This effect was probably due to changes in the permeability of the cell envelope caused by changes in iron metabolism [28]. The FecB2 is the second SBP identified in *M. tuberculosis* and its structure, as reported in the Protein Data Bank (PDB: 4PM4), shows a classic type III substrate binding-protein topology [76], with two subdomains $\alpha\beta$ connected by a small α -helical hinge (Table 2). Possible functions for FecB2 include heme binding, uptake, degradation and interaction with proteins coupled to heme. The *fecB2* mutant showed reduced growth in a medium with heme as the unique iron source, in comparison with the parental strain [49]. Rv3041c consists of an NBD protein that has not yet been characterized [9]. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) found in *rv3041c* could be responsible for phenotypes of resistance to rifampicin, ofloxacin, streptomycin and the resistance observed in MDR strains [77].

The *M. tuberculosis* operon *rv1461-1466* encodes a system for biogenesis of iron-sulfur cluster. Fe-S clusters are co-factors that require multiple protein systems for their biosynthesis and are related to several functions such as DNA repair, amino acid metabolism, nitrogen fixation, and others [78]. While *rv1460* encodes the operon regulator, *rv1463* encodes the NBD SufC. All the genes from this cluster are essential for *M. tuberculosis* growth [29]. During iron-limiting conditions, *M. tuberculosis* upregulates the expression of iron-related genes, such as the siderophores carboxymycobactin (cMyco) and lipophilic mycobactin [74].

The *irtA* and *irtB* genes encode an ABC-type transporter, with fused membrane-spanning and ATPase domains similar to those seen for Type V transporters (Figure 1). However, biochemical analyses and the three-dimensional structure of this transporter have shown that IrtA has an additional N-terminal domain, positioned in the same side of the ATPase, which works as a siderophore-interaction domain (SID) [30] (Table 2). The siderophore interaction domain from IrtA is specifically required for the transport of the lipid-bound mycobactin, but not for carboxymycobactin, which also can be diffused through the inner membrane [30]. On the other hand, the siderophore domain is responsible for the uptake of carboxymycobactin from inside the cell and deliver it to the TMDs for its exportation [79]. This way, IrtA also could act as carboxymycobactin exporter working in synergy with IrtB. The mutation of *irtAB* operon in *M. tuberculosis* affects the growth in iron-deficient conditions in vitro, the efficient utilization of iron from Fe-carboxymycobactin, as well as replication of the bacillus in human macrophages [80] and in mouse lungs [40]. This transporter is essential to the bacillus survival during iron deficiency and is required for its replication in macrophages and mice [74,81].

2.1.6. Hydrophilic Compounds

Although the transporter Rv1819c (BacA) has an overall fold similar to Type IV ABC transporters (Figure 1), with two copies of TMD, each one has six transmembrane helices that are fused to an individual NBD (Table 2). As observed in Type IV ABC transporters (exporters), the Rv1819c substrate is located in the interface between the two TMDs. Interestingly, this transporter has a large occluded water-filled cavity that spans across the whole lipid membrane. Its function was determined as an importer of hydrophilic compounds, such as vitamin B12 and bleomycin [32]. Studies have shown that a mutant bacillus of *rv1819c* loses the ability to maintain chronic infection in murine models and increases resistance to bleomycin [82]. Besides the previous functions attributed to Rv1819c, it is also speculated to play a role in the transport of peptides and drugs [31].

2.1.7. Energy-Coupling Factor Transporter (ECF)

The ABC transporters type III (ECF, energy-coupling factor) are a special case of importers. These systems do not use a classic SBP, as seen for type I and II importers. The TMDs called EcfT and EcfS are structurally and functionally different (Table 1). EcfT is predicted to have between four

and eight helices and makes direct contact with the two subunits of the NBDs. On the other hand, EcfS or S-component, is formed by six-helix cylinder embedded in the membrane and it is responsible for substrate binding. In some characterized ECF transporters, NBDs and the T-component interact with more than one type of S-component [82]. The operon *rv2325-rv2326* is a homologue to the ECF transporter of *E. coli* and *Lactobacillus brevis* and encodes a putative transmembrane component similar to T-component and the NBD, respectively. Recently, only the S-component was identified in the *M. tuberculosis* genome.

2.2. ABC Transporters Type Exporters

M. tuberculosis has at least 28 identified genes encoding components of ABC transporter type exporters, from which 26 form 14 complete systems subdivided into four main functional categories: (i) recycling/transport of membrane components (two systems), (ii) electron transport chain (ETC) (one system), (iii) virulence and adaptation (two systems), and (iv) drug efflux (nine systems). The genomic organization show the genes are organized in operons that also contain related genes that, depending on the function, will help in transport. Based on secondary structure predictions, domain analyses, and the prediction of the number of transmembrane helices, these transporters show a variety of structural organizations that go beyond the classical architecture of two NBDs and two TMDs. Furthermore, both transporters and components have shown a functional plasticity in *M. tuberculosis* and related species.

2.2.1. Transporters Involved in the Recycling and Transport of Membrane Components and Liposaccharides

Two complete systems were identified in this group: RfbDE and Rv1747. RfbDE is encoded by *rv3783* and *rv3781*, respectively, which are separated by a gene encoding a putative sugar transferase (Table 3).

The membrane-spanning (RfbD) and nucleotide-binding domains (RfbE) share homology with components of O-antigen and lipopolysaccharide exporter from different species [94,95]. RfbE and RfbD have also orthologues in *M. leprae* [96]. The inactivation of their respective orthologues in *M. smegmatis* has suggested that they are involved in the biosynthesis of cell wall components and arabinogalactan, working as a potential flippase candidate that exports the lipid intermediate containing the galactan structure prior to its arabinosylation [97]. RfbE was identified as one of the most expressed proteins in the proteomic analysis of a one-year-old dormant *M. tuberculosis* [98] bacillus and is highly abundant in multidrug-resistant and susceptible *M. tuberculosis* isolates [99]. RfbDE seems to be essential for in vitro growth [40,46] and is required for growth in C57BL/6J mouse spleen [34]. The relevance of arabinogalactan for the bacillus makes this transporter an excellent target for therapeutics.


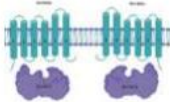

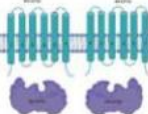
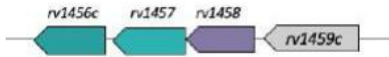
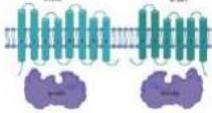
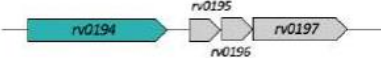
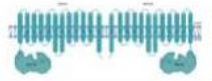

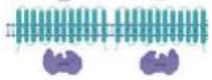


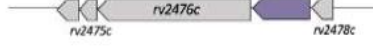

In the group of transporters dedicated to liposaccharides release, Rv1747 presents a quite interesting structural organization. Besides the canonical TMDs and NBDs present in exporters, it has two Fork-Head Associated domains (FHA-1 and FHA-2) in the cytoplasm side that are connected by an intrinsically disordered region of 150 amino acids [44]. The FHA are modular recognition domains with a high specificity for phospho-threonine (pThr) that participate in important cellular processes such as growth, division, differentiation, apoptosis, transcription, DNA repair, and protein degradation [100,101]. The structures of FHA-1 and FHA-2 were determined by X-ray crystallography and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, respectively [84] (Table 2). Indeed, this transporter is phosphorylated by the *M. tuberculosis* serine/threonine protein kinase (STPK) PknF [102], a gene that is in the same operon of *rv1747* [84,103,104] (Table 3). Studies have shown that the phosphorylation is essential for transporter function [105] and induces the phenomenon of the phase separation and clustering of the transporter in vitro in membrane models and live cells [84]. Although still not clear, this transporter has been associated with the translocation of bacterial cell wall components such as lipo-oligosaccharides or phosphatidyl-myo-inositol-mannosides (PIMs), antibiotic extrusion, and cell wall synthesis or remodeling [102]. Interestingly, the phosphorylated protein Rv2623 (USP) binds to

Rv1747, modulating the number of PIMs in the cellular envelope [106]. Its function is essential during the infection and pathogenesis of the bacteria [84,104,106].

Table 3. Genomic context and structural organization of ATP-binding cassette (ABC) export systems in *Mycobacterium tuberculosis*. The ABC exporters are divided into four groups according to their function. Genes that belong to the genomic context are shown as arrows. The predicted number and structural organization of TM helices and structural organization according TOPCONS are shown in the last column, where transmembrane domains (TMDs) are colored in clear and dark green, nucleotide-binding domains (NBDs) in purple, and regulatory domains (when present) in pale purple. FHA is the fork-head associated domain and ECD is the extracellular domain.

EXPORTERS		
ABC Systems/Genomic Organization	Genomic Organization	Structural Organization
Recycling of Membrane compounds/Liposaccharides		
RfbD/RfbE (Rv3783/Rv3781) [NBD _r /TM/ECD] _(2x) Cell wall biosynthesis, ABC-2 subfamily of integral membrane proteins [9]		
* Rv1747 [FHA _(2x) /NBD/TM] _(2x) Lipo-oligosaccharides/drug efflux [83]		
Electron transport chain (ETC)		
CydC/CydD (Rv1620c/Rv1621c) TM ₁ /NBD ₁ -TM ₂ /NBD ₂ Cytochrome biosynthesis [84]		
Virulence, adaptation		
* Rv0987/Rv0986 Adhesion component [ECD _{2x} /TM/NBD] _(2x) [85]		
FtsX/FtsE (Rv3101/Rv3102) Cell division [ECD/TM/NBD] _(2x) [86]		
Drug efflux		
DrrC/DrrB/DrrA (Rv2938/37/36) TM ₁ /TM ₂ -[NBD] _(2x) Daunorubicin/doxorubicin [87]		
Rv2686c/Rv2687c/Rv2688c TM ₁ /TM ₂ -[NBD] _(2x) Fluoroquinolones [88]		

Table 3. Cont.

EXPORTERS		
ABC Systems/Genomic Organization	Genomic Organization	Structural Organization
Rv1686c/Rv1687c [TM/NBD] _(2x) Multidrug efflux [9]		
Rv1273/Rv1272 [TM/NBD] _(2x) MSBA subfamily/Drug efflux [87]		
Rv1456c/Rv1457c/Rv1458c Antibiotic transport TM ₁ /TM ₂ -[NBD] _(2x) [89]		
Rv0194 Drug efflux transport [TM/NBD] _(2x) [90]		
Rv1217c/Rv1218c [TM/NBD] _(2x) [91]		
Rv1473 NBD Macrolides efflux [92,93]		
Rv2477c NBD Macrolides efflux [93]		

2.2.2. Electron Transport Chain (ETC)

The operon *cydABCD* in *M. tuberculosis* is responsible for cytochrome assembly and microaerobic respiration and plays an active role in the electron transport chain [107,108] (Table 3). While the genes *cydA* and *cydB*, similarly to *E. coli*, encode subunits I and II, respectively, of the cytochrome *bd*-quinol oxidase [85], the *cydC* and *cydD* genes each encode a polypeptide consisting of the TMD and NBD that will form a heterodimer ABC transporter (type V), responsible for cytochrome *bd* assembly and heme transport in *M. tuberculosis* [109] and *M. smegmatis* [85]. The genes *cydABCD* are upregulated during the exposure of *M. tuberculosis* to hypoxia and nitric oxide in vitro and during the chronic phase of infection [110]. Interestingly, the disruption of *cydC* also has been associated with the persistence of the bacillus in isoniazid-treated (INH-treated) mice without affecting growth or survival in untreated mice, suggesting a connection between this transporter and resistance mechanisms in *M. tuberculosis*. Proteins from the cytochrome assembly and microaerobic respiration are considered valid targets for drug discovery [111].

2.2.3. Virulence and Adaptation

The ABC transporter Rv0987/Rv0986 is homologous to the AttFGH transporter of *Agrobacterium tumefaciens*, which is known to be necessary for infection in plants due its participation in attachment and virulence [112,113]. In *M. tuberculosis*, *rv0986* and *rv0987* are essential for the in vitro growth of the H37Rv strain [40]. Mutants of *rv0986* showed an attenuated phenotype associated with the prevention of phagosome maturation and acidification in bone marrow macrophages from BALB/c

mice [114,115] and development in the central nervous system of BALB/c mice [86]. The transporter is associated with the exportation of substrate(s) that might be critical in the infection of different cells [9]. A bioinformatics analysis of Rv0987 predicted it to have 10 to 12 transmembrane helices, with two extracellular domains forming a complex organization that is not clearly classified (Table 3) [9]. Rv0986 is closely related to FtsE (a protein that is predicted to bind ATP and hydrolyse it) from FtsXE system, an ABC transporter implicated in the cell division of *M. tuberculosis* [9,87] and the cleavage of peptidoglycans [45]. The three-dimensional structure of the extracellular domain (ECD) transmembrane FtsX component has an unusual fold that binds the N-terminal segment of RipC (Rv2190c), a peptidoglycan peptidase, inducing conformational changes in this enzyme [45] (Table 2). The interaction of *M. tuberculosis* FtsX with FtsZ (homologue of eukaryotic tubulin) was observed in vivo and ex vivo, suggesting the role of this transporter in the Z-ring formation in the divisome [87].

2.2.4. Drug Efflux and Resistance in *M. tuberculosis*

The resistance of *M. tuberculosis* to the first and second lines of antibiotics is one of largest problems that challenges TB control strategies and therapy. The bacillus has a set of different tactics to decrease drug susceptibility, including the alteration of targets, the inactivation of the drugs, and cell envelope impermeability. The role of efflux pumps has been pointed as critical in this process. Different *M. tuberculosis* clinical isolates have shown increased levels of efflux pump gene expression, as well as the identification of critical SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) [4,116]. The results of these studies reveal the development of multi-drug resistant (MDR) strains that are resistant to at least two anti-TB drugs, rifampicin and isoniazid, and extensive-drug resistant (XDR) strains that are resistant to at least one of the second-line drugs [4].

The genome of *M. tuberculosis* has a large number of genes (2.5%) involved in drug efflux, where in the large ABC transporter family at least seven complete systems of exporters were identified, including two isolated NBDs. Five of them present a similar organization, and they are involved in the transport of macrolides and multi-drugs; these include DrrABC, Rv1686c/87c, Rv1273/Rv1272, Rv1456c/57c/58c, and Rv2686c/87c/88c. These transporters' topology presents two TMDs with six to eight TM helices each and two NBDs homodimers (Table 3). The DrrABC transporter is implicated in doxorubicin resistance and transport of surface lipid phthiocerol dimycocerosate (PDIM) [117] and daunorubicin. In *M. smegmatis*, DrrAB has shown to confer resistance to a number of clinically relevant but structurally unrelated antibiotics. where the ATP binding was positively regulated by the compounds. Moreover, treatment with reserpine and verapamil, which are classical inhibitors of ABC transporters, was capable to impair DrrAB function [118]. DrrAB also was over-expressed in MDR isolates [88,119]. This operon is needed for growth in C57BL/6 mouse spleen [34]. Not much is described in the literature for the Rv2686c/87c/88c transporter, which is still poorly studied, but it is known to be related to the efflux of fluoroquinolone [120,121]. Although Rv1686c/87c are non-essential genes for the in vitro growth of H37Rv [46], Rv1687c is upregulated in clinical isolates [122]. Genes rv1272/73 are non-essential for the in vitro growth of H37Rv [46], yet they are required for bacillus survival in primary murine macrophages [39] and primate lungs [123]. The analysis of the XDR clinical isolates of *M. tuberculosis* revealed a common SNP in Rv1273 [124]. The genes encoding the ABC transporter Rv1456c/57c/58c were overexpressed in the presence of ethambutol, isoniazid, rifampicin, and streptomycin in *M. tuberculosis* [90]. The disruption of components from this operon results in the growth defect of H37Rv in vitro [40,46,47].

Structurally different from the drug exporters described previously, the Rv0194 and Rv1217c/Rv1218c systems present large TMDs of 12 predicted helices. The transporter Rv0194 has two TMDs and two NBDs encoded by a single gene (Table 3). Disruption of the *rv0194* gene promotes the in vitro growth of H37Rv [46], although proteomics studies have shown that it is a non-essential gene [47,125]. On the other hand, *rv0194* is significantly upregulated under hypoxic conditions compared to under aerobic conditions [126]. The Rv0194 transporter is highly induced in rifampicin (RIF)-resistant and RIF-susceptible isolates [91], and its role is also implicated in the

efflux of ethidium bromide [127] and capreomycin/amikacin/kanamycin [128]. Rv1217c/Rv1218c transporters mediate resistance to different classes of antibiotics, such as novobiocins, pyrazolones, biaryl piperazines, bisanilinopyrimidines, pyrroles, and pyridines, and have been implicated in drug resistance in many clinical isolates [116]. The three-dimensional structure of Rv1219c, a TetR family transcriptional regulator, revealed a cavity with key aromatic residues essential for the binding of small drugs [92].

Finally, in the drug-efflux group, two isolated genes encode for ATPases. While Rv2477c has been associated with the efflux of kanamycin and amikacin in *M. tuberculosis* MDR and XDR clinical isolates, Rv1473 seems to be involved in macrolide transport [94].

2.3. Distribution of ABC Transporters across Different Species of *M. tuberculosis* Genus

In order to evaluate the distribution of the ABC transporters across different species of the genus *Mycobacterium*, we have organized a panel comparing the use of all the components previously described (Figure 2).

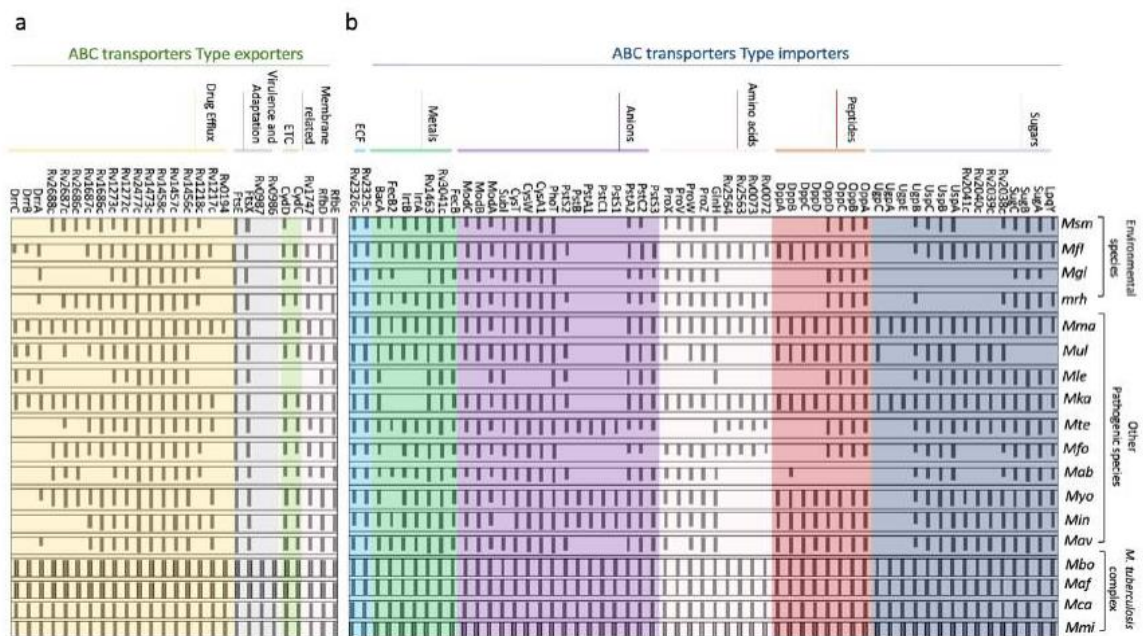


Figure 2. Distribution of the identified *M. tuberculosis* ABC transporters across species of *Mycobacterium* genus. (a) ABC export systems, (b) ABC (ABC) import systems. The amino acid sequences of *M. tuberculosis* components were used as a query for ortholog searching in the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) orthologist tool [129]. The species are classified into three groups: *M. tuberculosis* complex, other pathogenic species, and environmental species. Each bar corresponds to the amino acid sequence identity (100% to 0%) of that specific protein related to the *M. tuberculosis* putative ortholog. *Msm*: *M. smegmatis*, *Mfl*: *M. florentinum*, *Mgi*: *M. gilvum*, *Mrh*: *M. rhodesiae*, *Mma*: *M. marinum*, *Mul*: *M. ulcerans*, *Mle*: *M. leprae*, *Mka*: *M. kansasii*, *Mte*: *M. terrae*, *Mfo*: *M. fortuitum*. *Mab*: *M. abscessus*, *Myo*: *M. yongonense*, *Min*: *M. intracellulare*, *Mav*: *M. avium*, *Mbo*: *M. bovis*, *Maf*: *Maffricanum*, *Mca*: *M. canettii*, *Mmi*: *M. microti*.

Amino acid sequences from *M. tuberculosis* proteins were used as a query for blastP in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) [129] against the data bank of relevant species, including the *M. tuberculosis* complex members, other pathogenic species, and environmental species. The analysis of the ABC transporters importer systems revealed that all the transporters identified in *M. tuberculosis* are conserved in the members of the complex. Some of these ABC importers have orthologues in all the species, such as the systems ModABC, CysWTA, OppABCD (only missing in *M. abscessus*), BacA, and ECF and the components GlnH, PstS2/PstA2, PhoT, FecB, Rv3041c,

and Rv1463, suggesting that they might constitute a minimum set of importers. Nevertheless, there are other importers that are exclusive to the *M. tuberculosis* complex or just present in a few species, such as UgpABCE, which is also conserved in *M. kansasii* and *M. marinum* (two species not considered human pathogens); PstS1/PstC1/PstA1/PstB, conserved in *M. yongonense*, *M. intracellulare*, and *M. terrae*; and the transporters Rv0072/Rv0073 and Rv2563/Rv2564, also present in *M. florentinum*, *M. rhodesiae*, *M. kansasii*, *M. terrae*, and *M. fortuitum*. The analysis of the Rv0072/Rv0073 and Rv2563/Rv2564 transporters is particularly interesting since they are grouped with GlnH (ABC glutamine transporter), which is conserved in all the species. We have noticed the absence of IrtA/IrtB and FecB in *M. leprae*, *M. kansasii*, and *M. gilvum*. These systems are involved with iron/siderophores transport; hence their absence suggests that iron and siderophores are not relevant substrates for these species. Another mycobacterium that stands out is the *M. marinum*, which was the most similar to the *M. tuberculosis* complex in terms of the distribution of ABC importers. Studies of *M. marinum* have largely increased and gained interest due its genetic similarity with *M. tuberculosis* and its use as a pathogenesis model with zebra fish as the host (Figure 2).

The ABC exporters panel has revealed that species from the *M. tuberculosis* complex group conserve all the transporter components, forming a consistent large number of exporters when compared to the other species, including the pathogenic group. This appears to suggest that, in some way, these transporters are correlated to the mechanisms of infection and pathogenesis in humans. The RfbDE, PtsXE, Rv1456c/57c/58c, Rv1473, Rv2477, Rv1272/73, Rv1747, and CydCD transporters are conserved in all species (apart from Rv1747 and CydCD that are missing in *M. leprae*), indicating that they might be part of a conserved “core” of ABC transporters needed for physiological functions in the genus. Two transporters stood out for their almost exclusive presence in species of the *M. tuberculosis* complex, with *M. marinum* as an exception. However, it should be noted that this species is responsible for the development of the TB in fish, which is very similar to human TB. Components related to drug efflux vary a great deal, probably reflecting the need to be exposed to xenobiotic agents and drugs. From the list, *M. leprae* has the smallest genome, with only seven out of seventeen components analyzed. Finally, the DrrABC is present in all species of the *M. tuberculosis* complex and has orthologues in the five pathogenic species *M. florentinum*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. leprae*, and *M. kansasii* (Figure 2).

2.4. Mce Components of *Mycobacterium tuberculosis*

Although all *M. tuberculosis* ABC transporters fit structurally and functionally into the previously mentioned seven families, *M. tuberculosis* contains two (novel) ABC-like transmembrane proteins, YrbEA and YrbEB [10], and one ATPase termed MceG (mkl ATPase, Rv0655) [16] that belong to a large complex spanning the cellular envelope. YrbEA and YrbEB are encoded in four *mce* (from “Mammalian cell entry”) highly conserved operons where genes play essential roles in the entry of the microorganism into the mammalian cells and their survival within phagocytes [130–132] (Figure 3).

Each *mce* operon (Mce1 to Mce4) encodes six Mce proteins (MceA-F) that span the bacillus envelope and are bound to the inner membrane as part of the ABC complex formed by the YrbEA and YrbB components. All twenty-four Mce proteins have a conserved Mce domain, with unique C-terminal domains including the cholesterol uptake porter domain, RGD motifs for probable integrin binding, and DEF motifs. The initial functions attributed to Mce proteins included an important role in the host cell invasion through cholesterol-rich regions, immuno-modulation [131] and lipid or steroid transport [123]. However, their role seems to go much beyond this, as they have been implicated in (i) pathogenesis by inhibiting alveolar macrophage activity or eliciting immune response from the host; (ii) virulence, interfering with the granuloma formation and long-term survival of mycobacteria within the host [11,132]; and, lately, (iii) altering cytokine expression through interaction with ERK1/2, promoting cell proliferation through preventing the proteasomal degradation of eEF1A1 and enabling cell adherence and entry through interactions with integrins. Therefore, the use of these proteins as diagnosis markers for mycobacterial infection has been suggested [132–134]. Finally,

and interestingly, the *mce3* operon is absent in the non-pathogenic species *M. bovis*, *M. avium*, *M. bovis* BCG, and *M. smegmatis* [11], suggesting a specific role in virulence and survival in the human host.

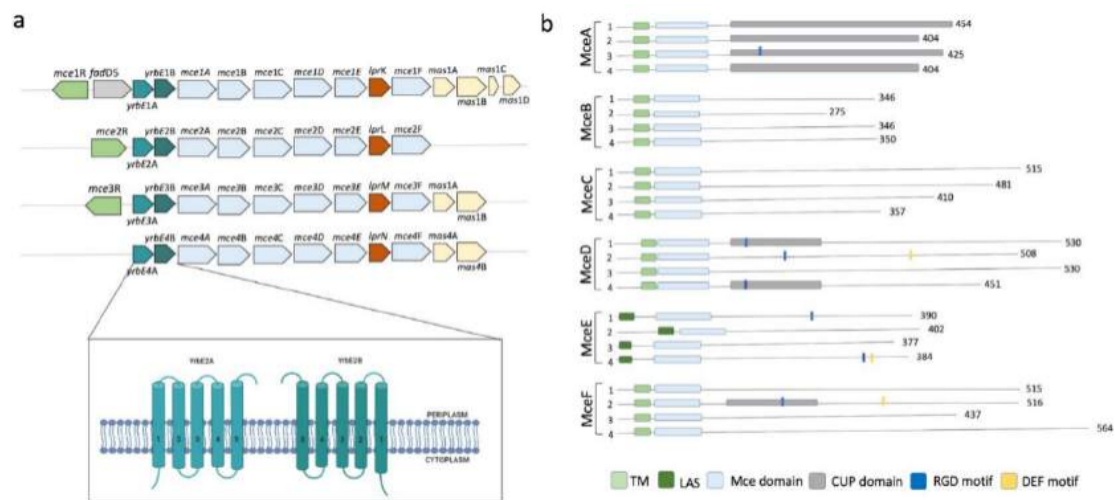


Figure 3. Characteristics of the Mce components of *Mycobacterium tuberculosis*. (a) Genomic organization of the four *mce* clusters. *mceR*: regulator (green); *fadD5* (gray); *yrbAB*: ABC transporter integral membrane components (cyan and green, respectively); *mceA* to *mceF*: periplasmic-binding proteins (clear blue); *lprKLMN*: (red); *masABCD*: (pale yellow). The topology of the transmembrane domains is shown in detail, consisting of 10 helical transmembranes, 5 from each component. (b) Different domains and motifs present in the periplasmic components of MceA, MceB, MceC, MceD, and MceF. TM: transmembrane region; LAS: lipid-associated region; CUP: cholesterol uptake porter domain; RGD: motifs for putative integrin binding; DEF: probably motif for ERK2 binding.

3. Conclusions

In this review, we have compiled the most relevant data regarding ABC transporters and components from the ABC importer and exporter systems present in *M. tuberculosis*. The number and type of ABC transporters present in *M. tuberculosis* are highly conserved in species that form the MTBC, which show a similar infection phenotype, virulence, and pathogenesis. It is evident that the distribution of the importers and exporters is determined by the availability of nutrients, hosts, or types of environment they use as a habitat. MTBC species have a large number of components dedicated to phosphate uptake, opposite to the other pathogenic and environmental species, indicating that phosphate might be a relevant element for the physiology and maintenance of the microorganism in the host.

Furthermore, many transporters have non-canonical structures, and even when they are organized in classic domains they are associated with unexpected functions. For example, the two ABC transporters IrtAB and BacA play a role as importers but have structures that are mostly similar to type IV exporters. Indeed, IrtAB has shown to export siderophore carboxymycobactin, and BacA has been related to the import of vitamin B12.

Altogether, the features presented in this review emphasize how diverse *M. tuberculosis* ABC transporters are. They also show how much investigation still is required to fully understand the structure-function mechanisms of this large protein family in one of the most important human pathogens.

Author Contributions: M.C.B.d.O. and A.B. were responsible for conceptualization, data curation, writing, review, and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: We thank to the financial agencies FAPESP (The São Paulo Research Foundation) process number 2016/20182-9 (M.C.B.O. fellowship), 2018/20162-9 (A.B. research grant) and CAPES (Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education).

Acknowledgments: The authors thank Isabel de Moraes and Marko Hyvonen for revising the manuscript and making important suggestions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO. *Global Tuberculosis Report 2019*; Global Tuberculosis Report 2019; Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2019.
2. Dulberger, C.L.; Rubin, E.J.; Boutte, C.C. The mycobacterial cell envelope—A moving target. *Nat. Rev. Microbiol.* **2020**, *18*, 47–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Elbourne, L.D.H.; Tetu, S.G.; Hassan, K.A.; Paulsen, I.T. TransportDB 2.0: A database for exploring membrane transporters in sequenced genomes from all domains of life. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D320–D324. [[CrossRef](#)]
4. Singh, R.; Dwivedi, S.P.; Gaharwar, U.S.; Meena, R.; Rajamani, P.; Prasad, T. Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *128*, 1547–1567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Reis, R.; Moraes, I. Structural biology and structure–function relationships of membrane proteins. *Biochem. Soc. Trans.* **2018**, *47*, 47–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Davidson, A.L.; Chen, J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 241–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Thomas, C.; Tampé, R. Structural and mechanistic principles of ABC Transporters. *Annu. Rev. Biochem.* **2020**, *89*, 605–636. [[CrossRef](#)]
8. Yang, J.; Zhang, Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W174–W181. [[CrossRef](#)]
9. Braibant, M.; Gilot, P.; Content, J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2000**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Ekiert, D.C.; Bhabha, G.; Isom, G.L.; Greenan, G.; Ovchinnikov, S.; Henderson, I.R.; Cox, J.S.; Vale, R.D. Architectures of lipid transport systems for the bacterial outer membrane. *Cell* **2017**, *169*, 273–285.e17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Kumar, A.; Chandolia, A.; Chaudhry, U.; Brahmachari, V.; Bose, M. Comparison of mammalian cell entry operons of mycobacteria: In silico analysis and expression profiling. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2005**, *43*, 185–195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Tsirigos, K.D.; Peters, C.; Shu, N.; Käll, L.; Elofsson, A. The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W401–W407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wolber, J.M.; Urbanek, B.L.; Meints, L.M.; Piligian, B.F.; Lopez-Casillas, I.C.; Zochowski, K.M.; Woodruff, P.J.; Swarts, B.M. The trehalose-specific transporter LpqY-SugABC is required for antimicrobial and anti-biofilm activity of trehalose analogues in *Mycobacterium smegmatis*. *Carbohydr. Res.* **2017**, *450*, 60–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kalscheuer, R.; Weinrick, B.; Veeraraghavan, U.; Besra, G.S.; Jacobs, W.R. Trehalose-recycling ABC transporter LpqY-SugA-SugB-SugC is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**. [[CrossRef](#)]
15. Fullam, E.; Prokes, I.; Fütterer, K.; Besra, G.S. Structural and functional analysis of the solute-binding protein UspC from *Mycobacterium tuberculosis* that is specific for amino sugars. *Open Biol.* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)]
16. Fenn, J.S.; Nepravishta, R.; Guy, C.S.; Harrison, J.; Angulo, J.; Cameron, A.D.; Fullam, E. Structural Basis of glycerophosphodiester recognition by the *Mycobacterium tuberculosis* substrate-binding protein UgpB. *ACS Chem. Biol.* **2019**, *14*, 1879–1887. [[CrossRef](#)]
17. Jiang, D.; Zhang, Q.; Zheng, Q.; Zhou, H.; Jin, J.; Zhou, W.; Bartlam, M.; Rao, Z. Structural analysis of *Mycobacterium tuberculosis* ATP-binding cassette transporter subunit UgpB reveals specificity for glycerophosphocholine. *FEBS J.* **2014**, *281*, 331–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kim, S.Y.; Shin, A.R.; Kim, H.J.; Cho, S.N.; Park, J.K.; Shin, S.J. Identification of Rv2041c, a Novel Immunogenic Antigen from *Mycobacterium tuberculosis* with serodiagnostic potential. *Scand. J. Immunol.* **2009**, *70*, 457–464. [[CrossRef](#)]

19. Mitra, A.; Ko, Y.H.; Cingolani, G.; Niederweis, M. Heme and hemoglobin utilization by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–14. [[CrossRef](#)]
20. Dasgupta, A.; Sureka, K.; Mitra, D.; Saha, B.; Sanyal, S.; Das, A.K.; Chakrabarti, P.; Jackson, M.; Gicquel, B.; Kundu, M.; et al. An oligopeptide transporter of *Mycobacterium tuberculosis* regulates cytokine release and apoptosis of infected macrophages. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12225. [[CrossRef](#)]
21. Deng, J.; Bi, L.; Tao, S.-C.; Zhang Correspondence, X.-E.; Zhou, L.; Guo, S.-J.; Fleming, J.; Jiang, H.-W.; Zhou, Y.; Gu, J.; et al. *Mycobacterium tuberculosis* proteome microarray for global studies of protein function and immunogenicity. *Cell Rep.* **2014**, *9*, 2317–2329. [[CrossRef](#)]
22. Bhattacharyya, N.; Nkumama, N.; Newland-smith, Z.; Lin, L.; Yin, W.; Cullen, R.E. An aspartate-specific solute-binding protein regulates protein kinase G activity to controls glutamate metabolism in Mycobacteria. *mBio* **2018**, *9*, e00931-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zhao, J.H.; Chen, J.H.; Wang, Y.; Wang, Z.P.; He, Y.X. The putative compatible solute-binding protein ProX from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Biochemical characterization and crystallographic data. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* **2018**, *74*, 231–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Campanini, B.; Pieroni, M.; Raboni, S.; Bettati, S.; Benoni, R.; Pecchini, C.; Costantino, G.; Mozzarelli, A. Inhibitors of the sulfur assimilation pathway in bacterial pathogens as enhancers of antibiotic therapy. *Curr. Med. Chem.* **2015**, *22*, 187–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kim, S.H.; Lee, N.E.; Lee, J.S.; Shin, J.H.; Lee, J.Y.; Ko, J.H.; Chang, C.L.; Kima, Y.S. Identification of mycobacterial antigens in human urine by use of immunoglobulin g isolated from sera of patients with active pulmonary tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 1631–1637. [[CrossRef](#)]
26. Målen, H.; Søfteland, T.; Wiker, H.G. Antigen analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv culture filtrate proteins. *Scand. J. Immunol.* **2008**, *67*, 245–252. [[CrossRef](#)]
27. Hwang, W.H.; Lee, W.K.; Ryoo, S.W.; Yoo, K.Y.; Tae, G.S. Expression, purification and improved antigenicity of the *Mycobacterium tuberculosis* PstS1 antigen for serodiagnosis. *Protein Expr. Purif.* **2014**. [[CrossRef](#)]
28. Xu, W.; DeJesus, M.A.; Rücker, N.; Engelhart, C.A.; Wright, M.G.; Healy, C.; Lin, K.; Wang, R.; Park, S.W.; Ioerger, T.R.; et al. Chemical genetic interaction profiling antibiotic resistance in *Mycobacterium*. *Antimicrob. Chemother* **2017**, *61*, 1–15. [[CrossRef](#)]
29. Willemse, D.; Weber, B.; Masino, L.; Warren, R.M.; Adinolfi, S.; Pastore, A.; Williams, M.J. Rv1460, a SufR homologue, is a repressor of the suf operon in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0200145. [[CrossRef](#)]
30. Arnold, F.M.; Weber, M.S.; Gonda, I.; Gallenito, M.J.; Adenau, S.; Egloff, P.; Zimmermann, I.; Hutter, C.A.J.; Hürlimann, L.M.; Peters, E.E.; et al. The ABC exporter IrtAB imports and reduces mycobacterial siderophores. *Nature* **2020**, *580*, 413–417. [[CrossRef](#)]
31. Slotboom, D.J.; Ettema, T.W.; Nijland, M.; Thangaratnarajah, C. Bacterial multi-solute transporters. *FEBS Lett.* **2020**, 1–10. [[CrossRef](#)]
32. Rempel, S.; Gati, C.; Nijland, M.; Thangaratnarajah, C.; Karyolaimos, A.; de Gier, J.W.; Guskov, A.; Slotboom, D.J. A mycobacterial ABC transporter mediates the uptake of hydrophilic compounds. *Nature* **2020**, *580*, 409–412. [[CrossRef](#)]
33. Warner, D.F. *Mycobacterium tuberculosis* metabolism. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2015**, *5*, 1–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sassetti, C.M.; Rubin, E.J. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12989–12994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Soni, D.K.; Dubey, S.K.; Bhatnagar, R. ATP-binding cassette (ABC) import systems of *Mycobacterium tuberculosis*: Target for drug and vaccine development. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 207–220. [[CrossRef](#)]
36. Niederweis, M. Nutrient acquisition by mycobacteria. *Microbiology* **2008**, *154*, 679–692. [[CrossRef](#)]
37. Titgemeyer, F.; Amon, J.; Parche, S.; Mahfoud, M.; Bail, J.; Schlicht, M.; Rehm, N.; Hillmann, D.; Stephan, J.; Walter, B.; et al. A genomic view of sugar transport in *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 5903–5915. [[CrossRef](#)]
38. Sabharwal, N.; Varshney, K.; Rath, P.P.; Gourinath, S.; Das, U. Biochemical and biophysical characterization of nucleotide binding domain of Trehalose transporter from *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *152*, 109–116. [[CrossRef](#)]
39. Rengarajan, J.; Bloom, B.R.; Rubin, E.J. Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 8327–8332. [[CrossRef](#)]

40. Griffin, J.E.; Gawronski, J.D.; DeJesus, M.A.; Ioerger, T.R.; Akerley, B.J.; Sasseti, C.M. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002251. [[CrossRef](#)]
41. Hingley-Wilson, S.M.; Loughheed, K.E.; Ferguson, K.; Leiva, S.; Williams, H.D. Individual *Mycobacterium tuberculosis* universal stress protein homologues are dispensable in vitro. *Tuberculosis* **2010**, *90*, 236–244. [[CrossRef](#)]
42. Ferraris, D.M.; Spallek, R.; Oehlmann, W.; Singh, M.; Rizzi, M. Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* phosphate binding protein PstS3. *Proteins Struct. Funct. Bioinform.* **2014**, *82*, 2268–2274. [[CrossRef](#)]
43. Vyas, N.K.; Vyas, M.N.; Quioco, F.A. Crystal structure of *M. tuberculosis* ABC phosphate transport receptor: Specificity and charge compensation dominated by ion-dipole interactions. *Structure* **2003**. [[CrossRef](#)]
44. Heinkel, F.; Shen, L.; Richard-Greenblatt, M.; Okon, M.; Bui, J.M.; Gee, C.L.; Gay, L.M.; Alber, T.; Av-Gay, Y.; Gsponer, J.; et al. Biophysical characterization of the tandem fha domain regulatory module from the *Mycobacterium tuberculosis* ABC Transporter Rv1747. *Structure* **2018**, *26*, 972–986.e6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mavrici, D.; Marakalala, M.J.; Holton, J.M.; Prigozhin, D.M.; Gee, C.L.; Zhang, Y.J.; Rubin, E.J.; Alber, T. *Mycobacterium tuberculosis* FtsX extracellular domain activates the peptidoglycan hydrolase, RipC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 8037–8042. [[CrossRef](#)]
46. Dejesus, M.A.; Gerrick, E.R.; Xu, W.; Park, S.W.; Long, J.E.; Boutte, C.C.; Rubin, E.J.; Schnappinger, D.; Ehrt, S.; Fortune, S.M.; et al. Comprehensive essentiality analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* genome via saturating transposon mutagenesis. *mBio* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)]
47. Sasseti, C.M.; Boyd, D.H.; Rubin, E.J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **2003**, *48*, 77–84. [[CrossRef](#)]
48. Kim, S.Y.; Shin, A.R.; Lee, B.S.; Kim, H.J.; Jeon, B.Y.; Cho, S.N.; Park, J.K.; Shill, S.J. Characterization of immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* Rv2041c protein. *J. Bacteriol. Virol.* **2009**, *39*, 183–193. [[CrossRef](#)]
49. Mitra, A.; Speer, A.; Lin, K.; Ehrt, S.; Niederweis, M. PPE Surface Proteins Are Required for Heme Utilization by *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)]
50. Stewart, G.R.; Patel, J.; Robertson, B.D.; Rae, A.; Young, D.B. Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. *PLoS Pathog.* **2005**, *1*, e33. [[CrossRef](#)]
51. Fitzpatrick, A.W.P.; Llabrés, S.; Neuberger, A.; Blaza, J.N.; Bai, X.C.; Okada, U.; Murakami, S.; Van Veen, H.W.; Zachariae, U.; Scheres, S.H.W.; et al. Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*. [[CrossRef](#)]
52. Crow, A.; Greene, N.P.; Kaplan, E.; Koronakis, V. Structure and mechanotransmission mechanism of the MacB ABC transporter superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 12572–12577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Greene, N.P.; Kaplan, E.; Crow, A.; Koronakis, V. Antibiotic resistance mediated by the MacB ABC transporter family: A structural and functional perspective. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Okada, U.; Yamashita, E.; Neuberger, A.; Morimoto, M.; van Veen, H.W.; Murakami, S. Crystal structure of tripartite-type ABC transporter MacB from *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1336. [[CrossRef](#)]
55. Nguyen, L.; Walburger, A.; Houben, E.; Koul, A.; Muller, S.; Morbitzer, M.; Klebl, B.; Ferrari, G.; Pieters, J. Role of protein kinase G in growth and glutamine metabolism of *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* **2005**, *16*, 5852–5856. [[CrossRef](#)]
56. Nohno, T.; Saito, T.; Hong, J.S. Cloning and complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* glutamine permease operon (glnHPQ). *Mol. Gen. Genet.* **1986**, *205*, 260–269. [[CrossRef](#)]
57. Meza, A.N.; Cambui, C.C.N.; Moreno, A.C.R.; Fessel, M.R.; Balan, A. *Mycobacterium tuberculosis* CysA2 is a dual sulfurtransferase with activity against thiosulfate and 3-mercaptopyruvate and interacts with mammalian cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–13. [[CrossRef](#)]
58. Choi, G.E.; Eom, S.H.; Jung, K.H.; Son, J.W.; Shin, A.R.; Shin, S.J.; Kim, K.H.; Chang, C.L.; Kim, H.J. CysA2: A candidate serodiagnostic marker for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Respirology* **2010**, *15*, 636–642. [[CrossRef](#)]
59. Wooff, E.; Michell, S.L.; Gordon, S.V.; Chambers, M.A.; Bardarov, S.; Jacobs, W.R.; Hewinson, R.G.; Wheeler, P.R. Functional genomics reveals the sole sulphate transporter of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its relevance to the acquisition of sulphur in vivo. *Mol. Microbiol.* **2002**, *43*, 653–663. [[CrossRef](#)]

60. Williams, M.J.; Kana, B.D.; Mizrahi, V. Functional analysis of molybdopterin biosynthesis in mycobacteria identifies a fused molybdopterin synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 98–106. [[CrossRef](#)]
61. Camacho, L.R.; Ensergueix, D.; Perez, E.; Gicquel, B.; Guilhot, C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **1999**, *34*, 257–267. [[CrossRef](#)]
62. Braibant, M.; Lefèvre, P.; De Wit, L.; Ooms, J.; Peirs, P.; Huygen, K.; Wattiez, R.; Content, J. Identification of a second *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding proteins of an ABC phosphate transporter. *FEBS Lett.* **1996**. [[CrossRef](#)]
63. Lefèvre, P.; Braibant, M.; De Wit, L.; Kalai, M.; Röeper, D.; Grötzinger, J.; Delville, J.P.; Peirs, P.; Ooms, J.; Huygen, K.; et al. Three different putative phosphate transport receptors are encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* genome and are present at the surface of *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 2900–2906. [[CrossRef](#)]
64. Collins, D.M.; Kawakami, R.P.; Buddle, B.M.; Wards, B.J.; de Lisle, G.W. Different susceptibility of two animal species infected with isogenic mutants of *Mycobacterium bovis* identifies *phoT* as having roles in tuberculosis virulence and phosphate transport. *Microbiology* **2003**, *149*, 3203–3212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Vanzembergh, F.; Peirs, P.; Lefevre, P.; Celio, N.; Mathys, V.; Content, J.; Kalai, M. Effect of PstS sub-units or PknD deficiency on the survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* **2010**, *90*, 338–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Rifat, D.; Bishai, W.R.; Karakousis, P.C. Phosphate depletion: A novel trigger for *Mycobacterium tuberculosis* persistence. *J. Infect. Dis.* **2009**, *200*, 1126–1135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Smith, T.; Wolff, K.; Nguyen, L. Molecular Biology of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In *Pathogenesis of Mycobacterium Tuberculosis and its Interaction with the Host Organism*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2012; ISBN 978-3-642-40231-9.
68. Neyrolles, O.; Wolschendorf, F.; Mitra, A.; Niederweis, M. Mycobacteria, metals, and the macrophage. *Immunol. Rev.* **2015**, *264*, 249–263. [[CrossRef](#)]
69. Pandey, M.; Talwar, S.; Bose, S.; Pandey, A.K. Iron homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis* is essential for persistence. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–9. [[CrossRef](#)]
70. Shitharan, M. Iron Homeostasis in Mycobacterium. *J. Bacteriol.* **2016**, *198*, 2399–2409. [[CrossRef](#)]
71. Chao, A.; Sieminski, P.J.; Owens, C.P.; Goulding, C.W. Iron Acquisition in *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 1193–1220. [[CrossRef](#)]
72. Braun, V.; Herrmann, C. Docking of the periplasmic FecB binding protein to the FecCD transmembrane proteins in the ferric citrate transport system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2007**. [[CrossRef](#)]
73. Ryndak, M.B.; Wang, S.; Smith, I.; Rodriguez, G.M. The *Mycobacterium tuberculosis* high-affinity iron importer, IrtA, contains an FAD-binding domain. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 861–869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Wagner, D.; Sangari, F.J.; Parker, A.; Bermudez, L.E. *fecB*, a gene potentially involved in iron transport in *Mycobacterium avium*, is not induced within macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *247*, 185–191. [[CrossRef](#)]
75. Scheepers, G.H.; Lycklama a Nijeholt, J.A.; Poolman, B. An updated structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 4393–4401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Kavvas, E.S.; Catoiu, E.; Mih, N.; Yurkovich, J.T.; Seif, Y.; Dillon, N.; Heckmann, D.; Anand, A.; Yang, L.; Nizet, V.; et al. Machine learning and structural analysis of *Mycobacterium tuberculosis* pan-genome identifies genetic signatures of antibiotic resistance. *Nat. Commun.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Gao, F. Iron–Sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis in Cyanobacteria. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Farhana, A.; Kumar, S.; Rathore, S.S.; Ghosh, P.C.; Ehtesham, N.Z.; Tyagi, A.K.; Hasnain, S.E. Mechanistic insights into a novel exporter-importer system of *Mycobacterium tuberculosis* unravel its role in trafficking of iron. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. De Voss, J.J.; Rutter, K.; Schroeder, B.G.; Barry, C.E. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 4443–4451. [[CrossRef](#)]
80. Rodriguez, G.M.; Smith, I. Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 424–430. [[CrossRef](#)]

81. Domenech, P.; Kobayashi, H.; Levier, K.; Walker, G.C.; Barry, C.E. BacA, an ABC transporter involved in maintenance of chronic murine infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 477–485. [[CrossRef](#)]
82. Rempel, S.; Stanek, W.K.; Slotboom, D.J. Energy-Coupling Factor—Type ATP-Binding Cassette Transporters. *Annu. Rev. Biochem.* **2019**, *88*, 551–576. [[CrossRef](#)]
83. Heinkel, F.; Abraham, L.; Ko, M.; Chao, J.; Bach, H.; Hui, L.T.; Li, H.; Zhu, M.; Ling, Y.M.; Rogalski, J.C.; et al. Phase separation and clustering of an ABC transporter in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 16326–16331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Kana, B.D.; Weinstein, E.A.; Avarbock, D.; Dawes, S.S.; Rubin, H.; Mizrahi, V. Characterization of the *cydAB*-encoded cytochrome *bd* oxidase from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 7076–7086. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Be, N.A.; Lamichhane, G.; Grosset, J.; Tyagi, S.; Cheng, Q.J.; Kim, K.S.; Bishai, W.R.; Jain, S.K. Murine model to study the invasion and survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the central nervous system. *J. Infect. Dis.* **2008**, *198*, 1520–1528. [[CrossRef](#)]
86. Mir, M.A.; Arumugam, M.; Mondal, S.; Rajeswari, H.S.; Ramakumar, S.; Ajitkumar, P. *Mycobacterium tuberculosis* Cell division protein, FtsE, is an ATPase in dimeric form. *Protein J.* **2015**, *34*, 35–47. [[CrossRef](#)]
87. Kanji, A.; Hasan, R.; Ali, A.; Zaver, A.; Zhang, Y.; Imtiaz, K.; Shi, W.; Clark, T.G.; McNerney, R.; Phelan, J.; et al. Single nucleotide polymorphisms in efflux pumps genes in extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Pakistan. *Tuberculosis* **2017**, *107*, 20–30. [[CrossRef](#)]
88. Pasca, M.R.; Guglielame, P.; Arcesi, F.; Bellinzoni, M.; Rossi, E.; De Riccardi, G. *Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c*, an ABC fluoroquinolone efflux. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 3175–3178. [[CrossRef](#)]
89. Hao, P.; Shi-Liang, Z.; Ju, L.; Ya-Xin, D.; Biao, H.; Xu, W.; Min-Tao, H.; Shou-Gang, K.; Ke, W. The role of ABC efflux pump, *Rv1456c-Rv1457c-Rv1458c*, from *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in China. *Folia Microbiol.* **2011**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Narang, A.; Garima, K.; Porwal, S.; Bhandekar, A.; Shrivastava, K.; Giri, A.; Sharma, N.K.; Bose, M.; Varma-Basil, M. Potential impact of efflux pump genes in mediating rifampicin resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from India. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0223163. [[CrossRef](#)]
91. Kumar, N.; Radhakrishnan, A.; Wright, C.C.; Chou, T.H.; Lei, H.T.; Bolla, J.R.; Tringides, M.L.; Rajashankar, K.R.; Su, C.C.; Purdy, G.E.; et al. Crystal structure of the transcriptional regulator *Rv1219c* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Sci.* **2014**, *23*, 423–432. [[CrossRef](#)]
92. Murugasu-Oei, B.; Tay, A.; Dick, T. Upregulation of stress response genes and ABC transporters in anaerobic stationary-phase *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Gen. Genet.* **1999**, *262*, 677–682. [[CrossRef](#)]
93. Faksri, K.; Tan, J.H.; Disratthakit, A.; Xia, E.; Prammananan, T.; Suriyaphol, P.; Khor, C.C.; Teo, Y.Y.; Ong, R.T.H.; Chaiprasert, A. Whole-genome sequencing analysis of serially isolated multi-drug and extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* from Thai patients. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0160992. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Zhang, L.; Al-Hendy, A.; Toivanen, P.; Skumik, M. Genetic organization and sequence of the *rfb* gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3: Similarities to the dTDP-L-rhamnose biosynthesis pathway of *Salmonella* and to the bacterial polysaccharide transport systems. *Mol. Microbiol.* **1993**, *9*, 309–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Manning, P.A.; Stroehel, U.H.; Karageorgos, L.E.; Morona, R. Putative O-antigen transport genes within the *rfb* region of *Vibrio cholerae* O1 are homologous to those for capsule transport. *Gene* **1995**, *158*, 1–7. [[CrossRef](#)]
96. Vissa, V.D.; Brennan, P.J. The genome of *Mycobacterium leprae*: A minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol.* **2001**, *2*, 1–8. [[CrossRef](#)]
97. Cuthbertson, L.; Kos, V.; Whitfield, C. ABC transporters involved in export of cell surface glycoconjugates. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, *74*, 341–362. [[CrossRef](#)]
98. Trutneva, K.A.; Shleeva, M.O.; Demina, G.R.; Vostroknutova, G.N.; Kaprelyans, A.S. One-Year Old Dormant, “non-culturable” *Mycobacterium tuberculosis* preserves significantly diverse protein profile. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 1–12. [[CrossRef](#)]
99. Phong, T.Q.; Ha, D.T.T.; Volker, U.; Hammer, E. Using a label free quantitative proteomics approach to identify changes in protein abundance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J. Microbiol.* **2015**, *55*, 219–230. [[CrossRef](#)]
100. Spivey, V.L.; Molle, V.; Whalan, R.H.; Rodgers, A.; Leiba, J.; Stach, L.; Walker, K.B.; Smerdon, S.J.; Buxton, R.S. Forkhead-associated (FHA) domain containing ABC transporter Rv1747 is positively regulated by Ser/Thr phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 26198–26209. [[CrossRef](#)]

101. Spivey, V.L.; Whalan, R.H.; Hirst, E.M.A.; Smerdon, S.J.; Buxton, R.S. An attenuated mutant of the Rv1747 ATP-binding cassette transporter of *Mycobacterium tuberculosis* and a mutant of its cognate kinase, PknF, show increased expression of the efflux pump-related iniBAC operon. Cambridge, UK. *FEMS Microbiol. Lett.* **2013**, *347*, 107–115. [[CrossRef](#)]
102. Curry, J.M.; Whalan, R.; Hunt, D.M.; Gohil, K.; Strom, M.; Rickman, L.; Colston, M.J.; Smerdon, S.J.; Buxton, R.S. An ABC transporter containing a forkhead-associated domain interacts with a serine-threonine protein kinase and is required for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 4471–4477. [[CrossRef](#)]
103. Molle, V.; Soulat, D.; Jault, J.M.; Grangeasse, C.; Cozzone, A.J.; Prost, J.F. Two FHA domains on an ABC transporter, Rv1747, mediate its phosphorylation by PknF, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**. [[CrossRef](#)]
104. Gee, C.L.; Papavinasundaram, K.G.; Blair, S.R.; Baer, C.E.; Falick, A.M.; King, D.S.; Griffin, J.E.; Venghatakrishnan, H.; Zukauskas, A.; Wei, J.-R.; et al. A phosphorylated pseudokinase complex controls cell wall synthesis in Mycobacteria. *Sci. Signal.* **2012**, *5*, ra7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Glass, L.N.; Swapna, G.; Chavadi, S.S.; Tufariello, J.A.M.; Mi, K.; Drumm, J.E.; Lam, T.K.T.; Zhu, G.; Zhan, C.; Vilchéze, C.; et al. *Mycobacterium tuberculosis* universal stress protein Rv2623 interacts with the putative ATP binding cassette (APC) transporter Rv1747 to regulate mycobacterial growth. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006515. [[CrossRef](#)]
106. Drumm, J.E.; Mi, K.; Bilder, P.; Sun, M.; Lim, J.; Bielefeldt-Ohmann, H.; Basaraba, R.; So, M.; Zhu, G.; Tufariello, J.M.; et al. *Mycobacterium tuberculosis* universal stress protein Rv2623 regulates bacillary growth by ATP-Binding: Requirement for establishing chronic persistent infection. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000460. [[CrossRef](#)]
107. Berube, B.J.; Parish, T. Combinations of respiratory chain inhibitors have enhanced bactericidal activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, 1–10. [[CrossRef](#)]
108. Cruz-Ramos, H.; Cook, G.M.; Wu, G.; Cleeter, M.W.; Poole, R.K. Membrane topology and mutational analysis of *Escherichia coli* CydDC, an ABC-type cysteine exporter required for cytochrome assembly. *Microbiology* **2004**, *150*, 3415–3427. [[CrossRef](#)]
109. Saini, V.; Chinta, K.C.; Reddy, V.P.; Glasgow, J.N.; Stein, A.; Lamprecht, D.A.; Rahman, M.A.; Mackenzie, J.S.; Truebody, B.E.; Adamson, J.H.; et al. Hydrogen sulfide stimulates *Mycobacterium tuberculosis* respiration, growth and pathogenesis. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–17. [[CrossRef](#)]
110. Dhar, N.; McKinney, J.D. *Mycobacterium tuberculosis* persistence mutants identified by screening in isoniazid-treated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 12275–12280. [[CrossRef](#)]
111. Cook, G.M.; Greening, C.; Hards, K.; Berney, M. *Energetics of Pathogenic Bacteria and Opportunities for Drug Development*, 1st ed.; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, 2014; Volume 65.
112. Matthyse, A.G.; Yarnall, H.A.; Young, N. Requirement for genes with homology to ABC transport systems for attachment and virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 5302–5308. [[CrossRef](#)]
113. Wang, J.; Behr, M.A. Building a better bacillus: The emergence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 1–7. [[CrossRef](#)]
114. Pethe, K.; Swenson, D.L.; Alonso, S.; Anderson, J.; Wang, C.; Russell, D.G. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13642–13647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Balganes, M.; Dinesh, N.; Sharma, S.; Kuruppath, S.; Nair, A.V.; Sharma, U. Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Day, T.A.; Mittler, J.E.; Nixon, M.R.; Thompson, C.; Miner, M.D.; Hickey, M.J.; Liao, R.P.; Pang, J.M.; Shayakhmetov, D.M.; Sherman, D.R. *Mycobacterium tuberculosis* strains lacking surface lipid phthiocerol dimycocerosate are susceptible to killing by an early innate host response. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 5214–5222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Choudhuri, B.S.; Bhakta, S.; Barik, R.; Basu, J.; Kundu, M.; Chakrabarti, P. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drvA* and *drvB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **2002**. [[CrossRef](#)]

118. Khosravi, A.D.; Sirous, M.; Absalan, Z.; Tabandeh, M.R.; Savari, M. Comparison of *drxA* and *drxB* Efflux pump genes expression in drug-susceptible and -resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from tuberculosis patients in Iran. *Infect. Drug Resist.* **2019**, *12*, 3437–3444. [[CrossRef](#)]
119. Liu, J.; Tariff, H.E.; Nikaido, H. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 3791–3795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Raheem, T.Y.; Iwalokun, B.; Fowora, M.; Adesesan, A.; Oluwadun, A. Are drug efflux genes present among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in Lagos, Nigeria? *J. Biosci. Med.* **2020**, *8*, 86–98. [[CrossRef](#)]
121. Chatterjee, A.; Saranath, D.; Bhattar, P.; Mistry, N. Global Transcriptional Profiling of Longitudinal Clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* exhibiting rapid accumulation of drug resistance. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54717. [[CrossRef](#)]
122. Dutta, N.K.; Mehra, S.; Didier, P.J.; Roy, C.J.; Doyle, L.A.; Alvarez, X.; Ratterree, M.; Be, N.A.; Lamichhane, G.; Jain, S.K.; et al. Genetic requirements for the survival of tubercle bacilli in primates. *J. Infect. Dis.* **2010**, *201*, 1743–1752. [[CrossRef](#)]
123. Garima, K.; Pathak, R.; Tandon, R.; Rathor, N.; Sinha, R.; Bose, M.; Varma-Basil, M. Differential expression of efflux pump genes of *Mycobacterium tuberculosis* in response to varied subinhibitory concentrations of antituberculosis agents. *Tuberculosis* **2015**, *95*, 155–161. [[CrossRef](#)]
124. Lamichhane, G.; Zignol, M.; Blades, N.J.; Geiman, D.E.; Dougherty, A.; Grosset, J.; Broman, K.W.; Bishai, W.R. A postgenomic method for predicting essential genes at subsaturation levels of mutagenesis: Application to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 7213–7218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Liu, Z.; Gao, Y.; Yang, H.; Bao, H.; Qin, L.; Zhu, C.; Chen, Y.; Hu, Z. Impact of hypoxia on drug resistance and growth characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0166052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Danilchanka, O.; Mailaender, C.; Niederweis, M. Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**. [[CrossRef](#)]
127. Malinga, L.A.; Abeel, T.; Desjardins, C.A.; Dlamini, T.C.; Cassell, G.; Chapman, S.B.; Birren, B.W.; Earl, A.M.; van der Walt, M. Draft genome sequences of two extensively drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* belonging to the Euro-American S lineage. *Genome Announc.* **2016**, *4*, 2–3. [[CrossRef](#)]
128. Kanehisa, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M.; Sato, Y.; Morishima, K. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D353–D361. [[CrossRef](#)]
129. Kanehisa, M.; Sato, Y.; Kawashima, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D457–D462. [[CrossRef](#)]
130. Rodríguez, D.C.; Ocampo, M.; Varela, Y.; Curtidor, H.; Patarroyo, M.A.; Patarroyo, M.E. Mce4F *Mycobacterium tuberculosis* protein peptides can inhibit invasion of human cell lines. *Pathog. Dis.* **2015**, *73*, 1–12. [[CrossRef](#)]
131. Nazarova, E.V.; Montague, C.R.; Huang, L.; La, T.; Russell, D.; Vandervan, B.C. The genetic requirements of fatty acid import by *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Elife* **2019**, *8*, 1–12. [[CrossRef](#)]
132. Perkowski, E.F.; Miller, B.K.; Mccann, J.R.; Sullivan, J.T.; Malik, S.; Allen, I.C.; Godfrey, V.; Hayden, J.D.; Braunstein, M. An orphaned Mce-associated membrane protein of *Mycobacterium tuberculosis* is a virulence factor that stabilizes Mce transporters. *Mol. Microbiol.* **2016**, *100*, 90–107. [[CrossRef](#)]
133. Khan, S.; Islam, A.; Hassan, M.I.; Ahmad, F. Purification and structural characterization of Mce4A from *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *93*, 235–241. [[CrossRef](#)]
134. Mikhecheva, N.E.; Zaychikova, M.V.; Melerzanov, A.V.; Danilenko, V.N. A nonsynonymous SNP catalog of *Mycobacterium tuberculosis* virulence genes and its use for detecting new potentially virulent sublineages. *Genome Biol. Evol.* **2017**, *9*, 887–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

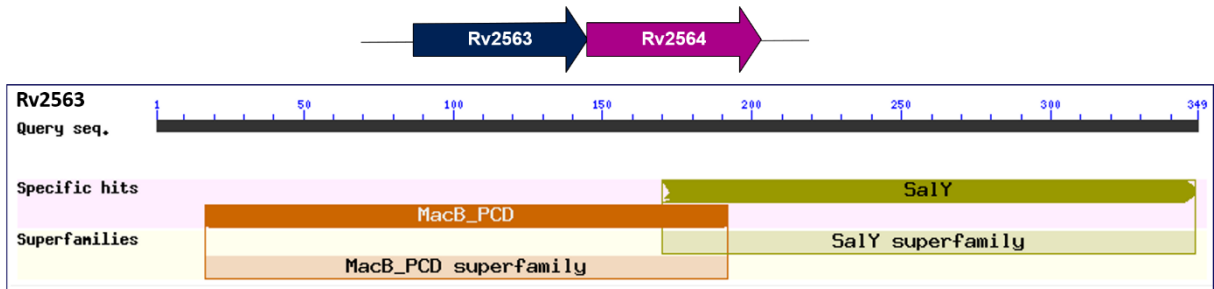
1.6 Justificativa

Em projeto prévio do nosso grupo, que previa a clonagem em larga escala e a expressão de todos os transportadores de MTB, o transportador Rv2563-2564 foi um dos expressos em células procarióticas que se mostrou promissor para a caracterização estrutural e funcional. Os genes *rv2563* e *rv2564* codificam, respectivamente uma proteína transmembrana e o domínio NBD. Segundo a primeira descrição por Braibant e colaboradores (2000), a função hipotética de Rv2563/Rv2564 estaria associada ao transporte de glutamina em MTB, devido à semelhança do domínio NDB-Rv2564 com a ATPase do importador de glutamina de *E. coli*. A busca por ortólogos das sequências no banco de dados mostraram similaridade sequencial e de domínios com proteínas relacionadas à extrusão de moléculas (Figura 8A e 8B). A superfamília MacB-PCD inclui transportadores MacB, responsáveis pela extrusão de macrolídeos em diversas enterobactérias e que participam de sistemas tripartides compostos de um transportador ABC (MacB), de uma proteína adaptadora (MacA) e uma porina de membrana externa (TolC). Adicionalmente, são membros desta superfamília, os transportadores LolCDE responsáveis pelo transporte de lipoproteínas, e a família FtsEX que atua na divisão celular e hidrólise do peptídeoglicano (Figura 8C) (MIR et al., 2015; CROW et al., 2017; GREENE et al., 2018; KAPLAN et al., 2018; ALCORLO et al., 2020; TANG et al., 2021). MTB também apresenta duas proteínas, Rv0072 e Rv0073, que dividem respectivamente, 76% e 83% de identidade com Rv2563 e Rv2564. Esta alta identidade nos chamou a atenção para uma possível redundância funcional dos sistemas, sugerindo um papel importante para o bacilo. Outras questões sobre a função/estrutura do transportador também foram levantadas, como a similaridade das proteínas com os sistemas tripartite, os quais incluem componentes periplasmáticos e de membrana externa. No caso de MTB, cujo envelope celular difere das bactérias gram positivas e gram negativas, fica a dúvida de quais seriam as proteínas parceiras de Rv2563/Rv2564 e como estas se organizariam na membrana.

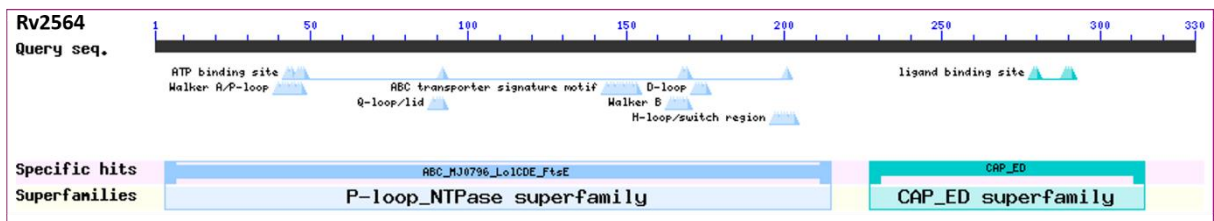
Os resultados para a busca de domínios na proteína Rv2564 mostraram os clássicos motivos de ATPases e motivo ABC na região catalítica e um domínio adicional do tipo CAP-ED (*Effector domain of CAP Family*) (Figura 8B). Este domínio está presente em fatores de transcrição e podem ligar nucleotídeos cíclicos como o cAMP ou cGMP. Exemplos de proteínas pertencentes a esta família são FNR (Fumarate and nitrate reduction) que apresenta um grupamento Fe-enxofre e a proteína CoxA que se liga monóxido de carbono (CO) através de um grupo heme (AONO et al., 2000; ROBERTS; YOUN; KERBY, 2004; IBRAHIM et al., 2015; RANGANATHAN et al., 2018). Domínios similares ainda são encontrados em proteínas

quinases dependentes de cAMP e cGMP (cAPK e cGPK) e canais iônicos controlados por nucleotídeos cíclicos em vertebrados. Em todos esses casos, a ligação do efetor promove mudanças conformacionais que permitem a proteína assumir sua forma ativa e realizar sua função (CHAN, 2000).

A



B



C

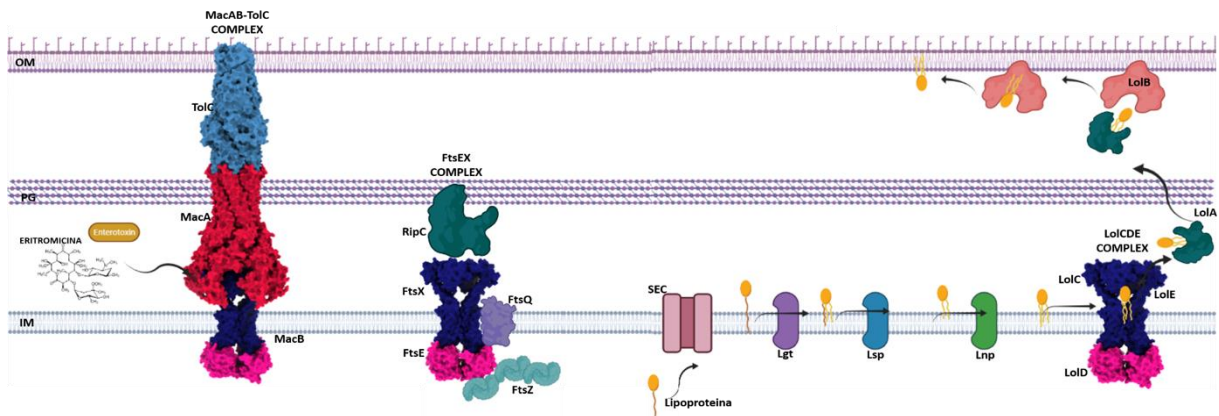


Figura 8 – As proteínas Rv2563 e Rv2564 de MTB apresentam domínios similares aos da superfamília MacB de transportadores ABC. (A) Blastp da proteína Rv2563. A avaliação das seqüências e busca por domínios conservados revelou que Rv2563 apresenta os domínios das famílias MacB-PCD e SalY. MacB-PCD estão presentes em transmembranas responsáveis pela extrusão de drogas e efetores em bactérias, lipoproteínas (LolCDE) e proteínas de regulação da divisão celular (FtsEX). A superfamília SalY contém transmembranas ligadas à extrusão de fatores de virulência diversos. **(B)** Domínios encontrados em Rv2564. Rv2564 apresenta os motivos e domínio de ATPases da família LolCDE, classicamente encontrados em lipoproteínas que interagem com LolA. Ainda, verifica-se que há a presença de um domínio de extensão no C-terminal que no caso da família CAP-ED, está relacionado a funções regulatórias e substratos hipotéticos como nucleotídeos cíclicos tipo cAMP e cGMP. **(C)** Representação das estruturas encontradas nos sistemas tripartites em Gram negativas. A superfamília MacAB-TolC responsáveis pela extrusão de antibióticos e moléculas efetoras. Transportador FtsEX que interage com proteínas do complexo de divisão celular, como FtsQ e FtsZ. Ainda nessa família

se encontra o complexo LolCDE, responsável pelo transporte de lipoproteínas sintetizadas no citoplasma e transportadas pelo sistema SEC para a membrana interna. Elaborado pelo próprio autor, baseado em CROW et al., 2017; FITZPATRICK et al., 2017; GRABOWICZ, 2018; ALCORLO et al., 2020; TANG et al., 2021.

Com base nestas análises prévias e sugestivas da participação do transportador nos processos de exclusão de drogas, reciclagem e/ou remodelagem da membrana, decidimos aprofundar a sua caracterização. É importante ressaltar a presença do sistema Rv0072/Rv0073 com alta similaridade em relação ao sistema Rv2563/Rv2564 e que a expressão de ambos não é essencial durante ensaios in vivo, mostrando que pode haver complementariedade entre eles. Outro fato interessante é a presença desses dois sistemas somente em espécies de *Mycobacterium* que pertencem ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Neste sentido, este trabalho teve o intuito de caracterizar o transportador nos seus aspectos funcionais e estruturais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral desse trabalho foi a caracterização estrutural e funcional do transportador Rv2563-2564 de MTB. Para alcançarmos esse objetivo, os processos foram divididos em objetivos específicos, conforme descrito a seguir.

Parte I – Caracterização do complexo utilizando ferramentas de bioinformática

- Bioinformática estrutural para para predição de estruturas secundária e terciária, motivos funcionais e conservação;
- Modelagem molecular do complexo e proteínas isoladas e análise comparativa com possíveis ortólogos;

Parte II – Produção do complexo Rv2563/Rv2564 e caracterização

- Expressão e purificação das proteínas Rv2563, Rv2564 e complexo Rv2563/Rv2564;
- Reconstituição do complexo Rv2563/Rv2564;
- Ensaio de cristalização e difração de raios X;
- Ensaio biofísicos para caracterização das proteínas de interesse e do complexo;
- Produção dos domínios Rv2563 e Rv2564 separadamente;

Parte III – Caracterização do domínio periplasmático da proteína Rv2563 (Rv2563per)

- Produção do domínio Rv2563per e caracterização biofísica e funcional por meio de ensaios de Dicroísmo Circular (CD), Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Gel-nativo (Native-PAGE) e pull-down;
- Produção de anticorpos policlonais contra o domínio Rv2563per;
- Avaliação da expressão do transportador em diversas condições utilizando anticorpos policlonais, PCR quantitativo;
- Avaliação do potencial de interação do domínio com células eucarióticas e potencial imunogênico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Capítulo I

3.1.1 Análises de bioinformática dos componentes do transportador Rv2563/Rv2564 e identificação de homólogos

As análises de bioinformática tiveram como foco as proteínas Rv2563, Rv2564 e os ortólogos Rv0072 e Rv0073 presentes em *M. tuberculosis*. As sequências de nucleotídeos e proteínas foram retiradas do genoma de MTB H37Rv no banco de dados Kyoto Encyclopedia of Genes e Genomes (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>). A busca de parálogos e ortólogos foi realizada utilizando os genomas de referência dos membros da família *Mycobacteriaceae*, disponíveis no banco de dados Genome (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) disponibilizado pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI). Os homólogos foram identificados e agrupados com as ferramentas MMseq (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/mmseqs2>) e Patric (<https://www.patricbrc.org/>), com parâmetros de cobertura mínima de 80%, e-value de 1×10^{-4} , similaridade de mínima de 30% para as transmembranas e mínima de 80% para o domínio NDB.

Os alinhamentos foram realizados na ferramenta ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) e as árvores filogenéticas produzidas no programa MEGA X (<https://www.megasoftware.net/>), utilizando-se o método de Neighbor-Joining Tree, com 1000 ensaios de bootstrap e *test-p* como teste estatístico. A busca de proteínas com estruturas similares foi realizada utilizando a ferramenta BlastP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) contra o banco de dados de estruturas de proteínas (RCSB-PDB, <https://www.rcsb.org/search>).

As estruturas secundárias dos componentes foram preditas através das ferramentas PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) e Jpred (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). A topologia foi avaliada com as ferramentas TOPCONS (<https://topcons.cbr.su.se/>) e TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). A presença de peptídeo sinal foi realizada com o programa SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). A avaliação da conservação dos componentes foi realizada por meio de alinhamento estrutural utilizando-se a ferramenta PROMALS3D (<http://prodata.swmed.edu/promals3d/promals3d.php>) e CONSURF (<https://consurf.tau.ac.il/>). O reconhecimento do enovelamento foi realizado através da ferramenta Muster (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/MUSTER/>) e os domínios foram identificados com a ferramenta CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/>) e PFAM

(<http://pfam.xfam.org/>). Os modelos estruturais foram produzidos por homologia utilizando as ferramentas Modeller 10.1 (<https://salilab.org/modeller/>), I-tasser (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) e SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>).

O reconhecimento de enovelamentos conservados foi realizado através da ferramenta Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) e os modelos *ab initio* foram produzidos com a ferramenta Rosetta (<https://yanglab.nankai.edu.cn/trRosetta/>). A predição de parâmetros imunológicos dos componentes foi realizada utilizando-se as ferramentas disponíveis no portal IEDB (<http://tools.iedb.org/main/>).

3.2 Capítulo II

3.2.1 Clonagem, expressão e purificação

3.2.1.1 Clonagem dos genes do transportador e domínios para expressão heteróloga em *E. coli*

Visando a obtenção das proteínas, domínios e complexos na forma solúvel/estável, foram realizadas construções que se diferenciaram no tamanho do fragmento clonado, proteína de fusão e vetor. As construções de interesse tiveram objetivo de expressar o complexo Rv2563/Rv2564, a ATPase Rv2564, o domínio periplasmático da permease (Rv2563per) e a proteína Rv0041c, uma vez que esta foi identificada nas análises de bioinformática, como proteína periplasmática ligadora de glutamina, um possível substrato do transportador. Os fragmentos correspondentes aos genes de interesse foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando a Phusion Polymerase® (ThermoFisher Scientific, EUA), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv, e os oligonucleotídeos descritos (Tabela A1, Materiais e Métodos -Anexo). Os produtos de amplificação foram purificados com o Kit PCR-Purification (Qiagen, Alemanha) conforme instruções do fabricante. Dois microgramas de produto foram digeridos com as enzimas de restrição (FastDigest, ThermoFisher Scientific, USA) apropriadas, conforme descrito (Tabela A1, Materiais e Métodos- Anexo), por 2 horas a 37°C.

Os plasmídeos foram extraídos com o kit QIAprep Spin Miniprep Kit[®] (Qiagen, Alemanha) a partir de culturas de 10 ml de *E. coli* contendo os plasmídeos de interesse, crescidas *overnight* a 37°C.

Os plasmídeos também foram digeridos com as mesmas enzimas utilizadas para os respectivos insertos e tratados por mais uma hora com 1 U/μL de fosfatase alcalina (ThermoFisher Scientific, EUA) a 37°C. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1%) em buffer TAE (Tris-acetato-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) por uma hora a 60 volts (v). Os fragmentos foram extraídos utilizando-se kit de extração QIAquick Gel Extraction Kit[®] (Qiagen, Alemanha), conforme metodologia descrita pelo fabricante. A ligação foi realizada utilizando 50 ng de inserto e 38 ng de vetor (3:1), vetor/inserto) e 1 μL T4 Ligase (NEB, Inglaterra) a 16°C, *overnight*. 5 μL da mistura de ligação foram utilizados para a transformação química de células de *E. coli* DH5α. As culturas foram centrifugadas a 5000 g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspense em 50 μL de meio LB fresco, seguido de plaqueamento em placas de LB-ágar pré-aquecidas a 37°C contendo os antibióticos específicos de seleção, de acordo com cada plasmídeo. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e os clones positivos foram verificados por PCR de colônia e análise de restrição, para posterior sequenciamento.

3.2.1.2 Expressão heteróloga e purificação dos componentes solúveis do transportador Rv2563-2564

As construções usadas para a expressão em larga escala dos genes de interesse foram descritas nos anexos (Tabela A2, Materiais e Métodos- Anexo) e as condições de purificação também são descritas nos anexos (Tabela A3, Materiais e Métodos- Anexo). No primeiro dia, as células de expressão foram transformadas com os respectivos plasmídeos e as colônias foram usadas para preparar o pré-inóculo no segundo dia em 20 ml de meio de cultura para cada 1 litro de cultura com os respectivos antibióticos. A produção foi realizada em 6 litros da cultura para cada lote, utilizando-se 1 litro de meio em erlenmeyers de 2 litros sem chanfros internos.

O meio foi pré-aquecido por 1 hora a 37°C e 100 rpm, adicionado dos respectivos antibióticos e inoculado com 20 ml de pré-inóculo/litro para crescimento a 37°C até O.D₆₀₀: 0.5. Neste momento, foram adicionados 0.4 mM de IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) e as temperaturas de expressão utilizadas conforme descritas na tabela 3. As culturas foram centrifugadas a 5.000 g por 20 minutos e os sedimentos ressuspense em 50 ml de tampão A, conforme descrito na tabela 3, na presença de inibidor de protease (EDTA-

Free), DNase, 10 mM MgCl₂ e incubados por 30 minutos a 4°C. As células foram lisadas usando sonificador Vibra -Cell® (Sonic & Materials Inc., USA), com sonda 21 por 15 minutos (30 segundos on e 30 segundos off, amplitude 40%) e centrifugadas a 30.000 rcf por 30 minutos.

A purificação das proteínas com cauda de seis histidinas (His₆-tag) foi realizada utilizando-se 1 ml de resina Ni-NTA (níquel-ácido nitrilotriacético acoplado a *beads* de agarose) (Cube-Biotech, USA), pré-equilibradas em coluna de gravidade de 10 ml (Bio-rad, França). A resina foi lavada com 50 ml de tampão A (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) contendo respectivamente 10, 20 e 30 mM de imidazol e eluídas em 6 frações de 1 ml cada em tampão de eluição contendo 250 mM de imidazol.

Amostras das frações foram aplicadas em SDS-PAGE 15% e aquelas contendo a proteína de interesse foram concentradas em filtros do tipo Amicon® (Millipore, Alemanha) com *cut-off* correspondente à cada proteína, conforme a tabela 2. As proteínas foram aplicadas em um volume de 2.5 ml em coluna de *desalting* PD-10® (Cytiva, USA) para troca por tampão A sem imidazol, e eluídas em um volume de 3.5 ml. As amostras de eluição foram submetidas à clivagem com as respectivas proteases, para remoção da proteína de fusão, por 12 horas a 12°C. Após a clivagem, as proteínas foram incubadas com 2 ml de Ni-NTA por uma hora, para ligação da fusão e da protease.

O eluato contendo as proteínas de interesse foi concentrado a 4500 g, em intervalo de 5 minutos e aplicados em cromatografia de exclusão molecular (SEC), utilizando-se a coluna Hi-Prep Sephacryl S-200 HR® (Cytiva, USA) utilizando-se o sistema Äkta® (Cytiva, USA), com frações de eluição de 2ml cada. Proteínas com fusão de glutathione S-transferase (GST) foram purificadas utilizando-se 1 ml de resina de glutathione imobilizada em *beads* de agarose, e eluídas em tampão contendo 10 mM de glutathione reduzida.

3.2.1.3 Expressão heteróloga e purificação da proteína de membrana Rv2563

O plasmídeo pOPINE-Rv2563-GFP foi utilizado para a transformação de células *E. coli* Lemo21(DE3), usando o protocolo de choque térmico. As colônias frescas foram usadas para preparar o pré-inóculo em 20 ml de meio LB ou ZYM5052 para cada 1 litro de cultura, com os antibióticos (cloranfenicol e ampicilina) em erlenmeyers de 2 litros sem chanfros. No total, 12 litros da cultura foram inoculados e mantidos a 37°C até O.D₆₀₀: 0.5, quando foram adicionados 0.4 mM de IPTG para indução das proteínas *overnight* a 25°C. As culturas foram centrifugadas a 5.000 rcf por 20 minutos, o pellet foi ressuspensão em 125 ml de 1x PBS na presença de

inibidor de protease, DNase e 10 mM MgCl₂ e incubados por 30 minutos a 4°C. As células foram lisadas usando disruptor celular a 25 KPsi por duas vezes e centrifugadas a 30.000 rcf por 15 minutos. O sobrenadante foi ultracentrifugado a 195.426 g por 2 horas e a membrana foi misturada a partir do sedimento em 60 ml de 1x PBS usando o homogenizador de 21 gauge. As membranas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para posterior purificação. Para solubilização, as membranas foram ressuspensas em tampão PBS, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10% de glicerol e 1% de decilmaltoside (DM) por 2 horas e submetidas à ultracentrifugação por 1 hora a 195.426 g. O sobrenadante foi incubado com 1 ml de resina Ni-NTA por uma hora e a resina foi lavada com 50 ml dos tampões contendo PBS, 150 mM NaCl, 10% glicerol e imidazol nas concentrações de 10 mM, 20 mM e 30 mM. A eluição foi realizada com 250 mM imidazol. A proteína foi eluída em sete frações de 1 ml cada, que foram aplicadas em gel de SDS 12% e monitoradas pela fluorescência da GFP (*Green Fluorescent Protein*) e coloração de *Comassie Blue* (DREW et al., 2008). Paralelamente, as concentrações das frações com Rv2563-GFP foram medidas como descrito por DREW e colaboradores (2008). As frações foram reunidas em sacos de diálise de 3 KDa *cut-off* com protease 3C 1:1 contendo o tampão usado para cromatografia de exclusão molecular (20 mM de Tris pH 7.5, 150 mM de NaCl, 10% de glicerol e 0.26% de DM).

Após diálise *overnight*, a amostra de proteína foi incubada por 1 hora com 5 ml de resina Ni-NTA pré-calibrada com tampão SEC. O lavado contendo Rv2563 foi coletado e as proteínas GFP e 3C foram eluídas com 1M imidazol. As amostras de Rv2563 foram filtradas em filtro de 0.22 µm e concentradas com amicon de 50 KDa *cut-off* e submetidas à purificação por exclusão molecular. A SEC foi realizada no Äkta[®] usando a coluna Superdex 200 10/30[®] (Cytiva, USA), com fluxo de 0.3 ml por minuto e frações coletadas de 200 µL.

3.2.1.4 Microscopia de fluorescência para avaliação da expressão heteróloga de Rv2563-GFP em *E. coli*

Precipitados celulares de culturas de *E. coli* que expressaram a proteína Rv2563 foram ressuspensos em 1 ml de tampão PBS e transferido para placas de cultura celular de 8 poços. A microscopia foi realizada no microscópio EVOS M500 (ThermoFischer Scientific, USA), utilizando-se aumento de 100X e filtro para GFP.

3.2.1.5 Quantificação de fluorescência de células de *E. coli* após expressão da Rv2563-GFP

As culturas de *E. coli* contendo a proteína Rv2563 foram ressuspensas em PBS e transferidas para tubos de 200 µL transparentes. A medição foi realizada no aparelho QuBit4® (ThermoFischer Scientific, USA) utilizando os parâmetros de excitação e emissão da GFP (488-509). A fluorescência das culturas que expressaram a proteína foi analisada em conjunto com a fluorescência de culturas que não expressaram a proteína, conforme descrito por DREW e colaboradores (2008).

3.2.1.6 Cromatografia de exclusão molecular com detecção de fluorescência (F-SEC) para identificação dos melhores detergentes para purificação e estabilização da proteína Rv2563

A solubilidade da proteína Rv2563 em diferentes detergentes foi medida utilizando-se cromatografia de exclusão molecular acoplada à medida de fluorescência (F-SEC). A proteína Rv2563 foi produzida em 1 litro de meio LB como descrito acima. As células foram sedimentadas e ressuspensas em 10 ml de 1x PBS, DNase, 10 mM MgCl₂ e incubadas por 30 minutos a 4°C sob agitação. As células foram lisadas usando o ultrasonicator (Ultrasonic, Sigma Alderich), com 50% de amplitude, 12 vezes com 15 segundos de trabalho e 45 de repouso no gelo.

Os detergentes testados foram n-Decyl-β-D-Maltopyranoside (DM), 5-Cyclohexyl-1-Pentyl-β-D-Maltoside (CYMAL-5), n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM), Dodecyl dimethyl aminoxid (LDAO), Lauryl maltose neopentyl glycol (LMNG), n-Undecyl-β-D-malto pyranoside (UDM), n-Octyl-β-DGluco pyranoside (OG), 3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propane Sulfonate] (CHAPS), 3-[(3-cholamidopropyl) dimethyl ammonio] -2- Hydroxy-1- Propanesulfonate (CHAPSO) e Octaethylene Glycol Monododecyl Ether (C12E8). A adição de 360 µL do lisado em 40 µL de 10% de detergentes, exceto LMNG para o qual foram utilizados 5%, resultou em 1% de concentração para todos os detergentes. As amostras com detergente foram incubadas por 2 horas a 4°C e ultracentrifugadas a 192.000 g por 1 hora. Amostras de 120 µL foram transferidas para dispositivos e aplicadas no Proeminence HPLC System® (Shimadzu, Kyoto, Japão) usando uma coluna Sepharose 6 Increase 10/30® (Cytiva, USA). A fluorescência da GFP foi medida no detector de fluorescência com comprimento de onda de 488 nm de excitação e 509 nm de emissão.

3.2.1.7 Gel de fluorescência para avaliação da expressão e purificação da Rv2563-GFP

Culturas de *E. coli* expressando a proteína Rv2563 foram centrifugadas 6000 g por 10 minutos. O pellet foi ressuspensionado em 1 ml de tampão PBS. Em 15 µL do material ressuspensionado foi adicionado 15 µL de tampão Laemli, sendo importante não ferver as amostras para evitar agregação das proteínas de membrana e perda da estrutura da GFP. As amostras foram aplicadas diretamente em SDS-Page de 15% e a corrida feita a 120v por 60 minutos. A fluorescência foi detectada no aparelho ChemiDoc System (Bio-Rad, França®) e revelada utilizando filtro para GFP (530 de excitação e 605 de emissão). A mesma metodologia foi realizada com a proteína purificada.

3.2.1.8 Quantificação das proteínas de interesse pelo método de Bradford

A quantificação das proteínas foi realizada com base no método de Bradford (BRADFORD, 1976). Utilizando-se placa de 96 poços de fundo chato, foram adicionados 200 µL do reagente de Bradford 1X por poço e a curva padrão foi produzida com ampolas de albumina padrão (ThermoFisher Scientific, USA) nas diluições de 200 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2.5 µg/ml, 1 µg/ml, 0.5 µg/ml e 0 µg/ml. As curvas e amostras foram analisadas em triplicata adicionando-se 10 µL de amostra por poço. A reação foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente e medida em leitor de placas no comprimento de onda de 595 nm. Os resultados da curva padrão foram utilizados para obtenção da equação da reta e, posteriormente, a regressão linear utilizada para o cálculo das amostras.

3.2.2 Ensaios biofísicos e ensaios cristalográficos

3.2.2.1 Análise da polidispersividade da Rv2563 e Rv2563per em diferentes condições empregando-se espalhamento dinâmico de luz (DLS)

As amostras da região periplasmática da Rv2563per na concentração de 1 mg/ml foram realizadas no equipamento DynaPro Plate ReaderIII® (Wyatt Technology, USA), utilizando-se placa de 96 poços Microplaca UV-STAR® (Greiner Bio-One, Alemanha), com um total de 30 aquisições de 10 segundos cada, em triplicata à temperatura de 25°C. O domínio purificado foi

diluído em diferentes tampões com faixa de pH entre 3 e 10. Os resultados foram tratados utilizando-se o software Dynamics[®] (Wyatt Technology, USA).

Para a proteína Rv2563, as medidas foram realizadas no SpectroLight 600 (Xtal Concepts GmbH, Alemanha), utilizando uma placa de *microbatch* (Greiner Bio-One, Alemanha). A placa foi coberta com óleo mineral para evitar a secagem da amostra. As amostras foram analisadas a 2 mg/ml em gotas de 1 µL. As medições das amostras em triplicatas foram realizadas em temperatura ambiente por 48 horas.

3.2.2.2 Ensaios de Dicroísmo Circular (CD) do domínio Rv2563per para avaliação do enovelamento e conteúdo de estruturas secundárias em diferentes condições

Para os ensaios de CD foram utilizados os domínios produzidos a partir de duas construções diferentes, Rv2563per8 e Rv2563per1BP, na ausência e presença de aminoácidos e antibióticos. Tais moléculas foram usadas nos ensaios porque gostaríamos de avaliar se o domínio periplasmático poderia interagir com alguns possíveis ligantes do transportador, e se ao interagir, haveria alterações estruturais. As análises do domínio Rv2563per8 foram realizadas em tampão fosfato 20 mM pH 8.0 com 10 mM de NaCl na concentração de 5 µM de proteína e 3 mM dos ligantes putativos (asparagina, glutamina, ácido glutâmico, eritromicina, canamicina e rifampicina). As análises de dicroísmo circular do domínio Rv2563per1BP foram realizadas tampão fosfato 20 mM em diferentes pH (6.0, 7.0, 7.5 e 8.0) e 10 mM de NaCl na concentração de 5 µM de proteína. As análises foram realizadas em temperatura ambiente, com 20 acumulações a 50 nm/min, no instrumento Jasco J-180 (Jasco, Easton, MD USA), utilizando-se cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 mm (Helma Analytics, USA). Para obtenção dos dados exclusivos do domínio, os resultados foram subtraídos pelos resultados obtidos para o tampão e os ligantes. A elipsidade molar final foi calculada de acordo com a fórmula descrita por SHARPE, 2012.

$$\theta(deg.cm^2.dmol^{-1}) = \frac{Ellipticity(mdeg).10^6}{Pathlength(mm).[Protein](\mu M).n}$$

A ferramenta CAPITO (<https://data.nmr.uni-jena.de/capito/index.php>) e Bestsel (<https://bestsel.elte.hu/sexamin.php>) foram utilizadas para análise e deconvolução dos espectros obtidos.

3.2.2.3 Análise dos estados oligoméricos da Rv2563per por cromatografia de exclusão molecular analítica e gel nativo (Native Page)

A proteína Rv2563per foi submetida à uma purificação de exclusão molecular analítica visando a determinação de seu estado oligomérico em solução. Para tal, a proteína após a purificação através da IMAC, R-IMAC e SEC foi concentrada em concentrador Amicon de 3 kDa *cut-off* e aplicada na SEC analítica num volume de 1 ml na concentração de 1 mg/ml. As proteínas do padrão foram aplicadas no mesmo volume e concentração. A purificação foi realizada em tampão 50 mM Tris pH 7.5, mM NaCl em fluxo de 0.7 ml/minuto. Blue Dextran foi utilizado para identificação do *void* da coluna. A curva de calibração foi determinada utilizando-se a fórmula:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

Onde:

V_e : volume de eluição

V_o : volume do *void* da coluna

V_c : volume geométrico da coluna.

A partir dos valores de K_{av} obtidos para a proteínas Rv2563per foram calculados a massa molecular teórica e o estado oligomérico teórico. Para identificação da massa molecular proteica em condições não desnaturantes a proteína Rv2563per foi submetida à eletroforese em gel nativo. O ensaio foi realizado em condições não desnaturantes, que excluíram a SDS dos componentes do gel e do buffer de amostra e corrida e sem aquecimento das amostras antes da aplicação. O ensaio foi realizado em gel de 10% com eletroforese a 120V por uma hora.

3.2.2.4 Cristalização do domínio Rv2563per pelo método de difusão de vapor

Amostras de Rv2563per concentradas até 10 mg/ml e 6 mg/ml foram usadas para a cristalização nos kits Crystal Screen 1 & 2® (Hampton Research, CA USA) e SaltRx 1 & 2® (Hampton Research, CA USA), Crystal Screen HT® (Hampton Research, CA USA), PEG Ion® (Hampton Research, CA USA), JBScreen Classic® (Jena Bioscience, Germany), JBScreen® (Jena Bioscience, Germany), Basic JBScreen® (Jena Bioscience, Germany), PEG/Salt® (Jena Bioscience, Germany) e JBScreen Wizard® (Jena Bioscience, Germany).

Duas condições foram preparadas por gota, sendo a primeira com 200 nL de proteína + 200 nL de solução reservatória (1:1) e a segunda gota 300 nL de proteína + 150 nL de solução reservatória (2:1) e 300 µL de solução no reservatório. As placas foram incubadas e mantidas a 20°C. Foram utilizadas as metodologias de *sitting-drop* e *hanging-drop*.

3.2.2.5 Reconstituição do transportador Rv2563-2564 para ensaios biofísicos, estruturais e funcionais

As proteínas Rv2563 e Rv2564 foram purificadas separadamente de acordo com os protocolos estabelecidos anteriormente. As proteínas foram misturadas (115 µM cada) e incubadas overnight a 4°C em rotação, o complexo foi purificado por SEC usando a coluna Superdex Increase 200 10/30[®] (Cytiva, USA) em 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 5 mM MgCl₂ e 0.26% de DM. Os picos foram avaliados em gel de SDS.

3.2.2.6 Ensaios de cristalização da proteína de membrana Rv2563

A proteína Rv2563 foi concentrada em concentrador de 50 kDa *cut-off* em três concentrações: 12 mg/ml, 13 mg/ml e 16 mg/ml. Antes de iniciar os ensaios de cristalização, as amostras foram centrifugadas a 16000 g por 10 minutos para remover os agregados. Placas de 96 poços Crystal Quick Hydrophobic[®] (Greiner Bio-One, Alemanha) foram preparadas com 50 nL de proteína e 50 nL de precipitante usando o robô Mosquito[®] (TTP Labtech, Reino Unido) para cristalização e 30 µL de solução do poço. Os kits de triagem utilizados foram MemGold 1[®] e 2[®], MemStart + MemSys[®] e MemMeso[®] (Molecular Dimensions, Reino Unido), e incubadas a temperatura de 20°C.

3.2.2.7 Cristalização em Mesofase Lípidica (LCP) da proteína Rv2563

A proteína Rv2563 foi concentrada a 20 mg/ml para realizar a cristalização utilizando-se a mesofase lipídica. Foram utilizados lipídio 9.9 monooleína (MAG) e os screenings MemGold[®] 1 e 2, MemStart + MemSys[®] e MemMeso[®]. O lipídio foi incubado a 3°C e colocado em uma seringa de vidro de 100 µL com a ajuda da pipeta para evitar bolhas. Adicionou-se lipídio monooleína (9.9 MAG) na proporção de 2:3 (proteína:lipídio) em outra seringa. O 9.9 MAG foi misturado com a proteína até obter uma mistura homogênea e clara. Uma gota com 30 nL de proteína + lipídio e 540 nL de precipitante foi montada com a ajuda do sistema Mosquito[®] (TTP Labtech, Reino Unido). As placas foram cobertas com placa de vidro e incubadas a 20°C para o crescimento de cristais.

3.2.2.8 Reconstituição da proteína Rv2563 em nanodiscos para ensaios estruturais e funcionais

A Rv2563 foi reconstituída em nanodiscos para futuros estudos biofísicos. Utilizamos a proteína MSP1 (membrane scaffold protein 1) pré-purificada pela Dra. Rosana Thevenot (Research Complex, Diamond Light Source, Oxfordshire, Inglaterra) e os lipídios POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina) e POPG (1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol) na relação 1:1 com 4 nM de Rv2563 purificada em DM.

A proteína MSP1 foi produzida em células de *E. coli* Rosetta (DE3) em 2 litros de meio Terrific-Broth dispensados em frasco de 2 L contendo 500 ml de meio cada e indução por 3 horas a 37°C. A purificação foi realizada por afinidade a metal utilizando os tampões descritos na tabela 4, seguida de SEC com o tampão 20 mM Tris/HCl, 0.1 M NaCl, 0.5 mM EDTA, pH 7.4, em coluna Superdex 200 10/30[®] (Cytiva, USA). Para estoque, foi adicionado à proteína 0.01% de NaN₃.

Para a reconstituição do nanodisco, as concentrações finais dos componentes devem ser 4 mM de lipídios, 12-40 mM de colato de sódio presente no lipídio, até 3% de glicerol e 3 mg/ml de MSP1 e proporção de MSP1:lipídio de 1:60. Cerca de 2 g de Bio-Beads SM-2[®] (Bio-Rad, França) foram lavados 3 vezes com metanol a 100%, 3 vezes com etanol a 95%, 3 vezes em água milliQ e 3 vezes com tampão 50 mM Tris HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂.

Em seguida, 6 µL de Rv2563 (final: 5 mg/ml), 897 µL de MSP1 (final:3mg/ml) e 375 µL de lipídios (final:4 mM) foram misturados em 1 g de Bio-Beads e incubados sob rotação durante a noite a 4°C. As amostras foram separadas das Bio-Beads com a ajuda de uma pipeta e incubadas por mais 2 horas em mais 1 g de Bio-Beads, posteriormente filtradas em filtro de 0.22 µm, concentradas em concentrador de 10 kDa *cut-off* e aplicadas na SEC. Utilizou-se a coluna Superdex 200 10/30[®] (Cytiva, USA) no mesmo tampão usado para equilibrar as Bio-Beads. As frações dos picos foram aplicadas em um gel de SDS.

3.3 Capítulo III

3.3.1 Ensaios funcionais e imunológicos

3.3.1.1 Avaliação dos títulos de anticorpo Anti-Rv2563 gerados na imunização de camundongos C57BL/6 por ELISA indireto

Para avaliar as concentrações de anticorpos gerados durante as imunizações utilizamos a técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indireto. Primeiramente, placas de 96 poços do tipo Costar High Binding® (Corning, USA) foram imobilizadas com 200 ng de proteína diluída em 200 µl de tampão carbonato pH 9.6. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com tampão PBST [1X PBS+ 0.05% Tween-200® (Sigma-Aldrich, Alemanha)] e então bloqueados por uma hora a 37°C com tampão TBST acrescido de 3% de leite desnatado e 0.5% de albumina bovina. Após 3 lavagens com PBST, foram aplicados de 100 µL de amostras em diluição seriada (1:25 até a diluição de 102.400) do soro gerado nos camundongos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e nos poços correspondentes ao branco não foi adicionado soro. A placa foi incubada por uma hora a 37°C, e lavada mais três vezes com TBST.

100 µL dos anticorpos anti-IgG conjugados com peroxidase na diluição de 1:10000 foram adicionados aos poços e a placa incubada por mais 1 hora a 37°C. Seguiu-se a lavagem com TBST e aplicação do substrato TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), o qual foi incubado por 15 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz. A reação foi parada com 100 µL de 0.16 M de ácido sulfúrico e a placa analisada em leitor de placas a 450 nm.

3.3.1.2 Crescimento de *M. tuberculosis var bovis* BCG em diferentes condições de cultivo

Culturas de *M. tuberculosis var. bovis* BCG foram realizadas em erlenmeyers de 100 ml contendo 50 ml de meio líquido Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (ácido oleico, catalase, dextrose e albumina fração V) e 50 mM piruvato. As culturas foram incubadas a 37°C por 25 dias em média. Após o crescimento dos pré-inóculos, estes foram centrifugados e ressuspensos em 10 ml de meio fresco e as células homogeneizadas com seringas de 27.5, 27, 26 e 25 gauges (10 homogeneizações por seringa) para dissolução dos grumos característicos formados por bactérias do complexo MTB devido ao fator corda. Uma vez dissolvidos os grumos, as culturas foram diluídas até uma O.D₆₀₀:0.3 e usados 1 ml de cultura para inoculação dos meios. A cada 7 dias foram retirados 2 mL da cultura (total de 5 pontos) para avaliação da densidade ótica.

3.3.1.3 Identificação de concentrações sub-inibitórias de antibióticos por meio do ensaio de Microtitulação com Resazurina (REMA)

Para identificar as concentrações sub-inibitórias de antibióticas a serem utilizadas nas cruvas de crescimento, realizamos o teste de microtitulação com resazurina, onde após a

diluição seriada com o antibióticos e o crescimento do bacilo por 7 dias, adiciona-se a resazurina que em caso de crescimento positivo é oxidada, alterando sua cor de azul para rosa.

Para estes ensaios, utilizaram-se os pré-inóculos produzidos conforme descrito em 3.4.5. Na placas de 96 poços estéril (Costar, USA) foram adicionados os controles negativos (meio 7H9 suplementado) e positivo de crescimento (7H9 sem antibióticos) e as diluições seriadas do antibióticos na ordem de 1:2.

Os antibióticos testados e os estoques iniciais foram: ampicilina (100 mg/ml), canamicina (50 mg/ml), eritromicina (250 mg/ml), levofloxacina (30 mg/ml), gentamicina (20 mg/ml), espectinomicina (75 mg/ml), tetraciclina (5 mg/ml), estreptomicina (100 mg/ml), ácido nalidíxico (30 mg/ml), vancomicina (100 mg/ml), cloranfenicol (35 mg/ml) e rifampicina (50 mg/ml).

Na próxima etapa, 50 µL do pré-inóculo homogeneizado em uma OD₆₀₀: 0.3 foram adicionados em todos os poços. A placa foi selada e cultivada em *shaker* a 37°C por 5 dias. Após os cinco dias foram adicionados 30 µL de solução de resazurina 0,02% seguida de incubação por 24 horas a 37°C. A concentração inibitória (MIC) foi definida como a menor diluição em que não houve alteração da cor do ensaio.

3.3.1.4 Produção de anticorpos policlonais contra o domínio Rv2563per

Foram produzidos anticorpos policlonais contra o domínio Rv2563per em colaboração com a Dra. Ana Carolina Ramos, no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Para a produção dos anticorpos o domínio foi expresso e purificado como descrito anteriormente. Após a SEC, as frações contendo o domínio de interesse foram concentradas em concentrador de 3 kDa *cut-off* até a concentração de 2 mg/ml e então filtradas em filtro de seringa com *cut-off* de 0.22 µm.

Os anticorpos foram produzidos em camundongos fêmeas C57BL/6 com 10 semanas de idade, sendo que o regime de imunização adotado foi de três doses subcutâneas no intervalo de 15 dias, cada uma com 10 µg da proteína Rv2563per e 1 µg da toxina LT1 de *E. coli* enterogênica como adjuvante. Após quinze dias da última imunização foi coletado o sangue total periférico através do plexo submandibular. O sangue foi incubado por uma hora em gelo para obtermos a coagulação completa, e em seguida centrifugado a 5000 g por 30 minutos a 4°C. O soro foi alíquotado e transferido para tubos estéreis acondicionado a -20°C.

3.3.1.5 Identificação da produção da proteína Rv2563 em extratos de *M. tuberculosis var bovis* BCG pela técnica de Western Blot

Ensaio de Western blot foram realizados com anticorpos monoclonais anti-histag produzidos em camundongo (Sigma-Aldrich, Alemanha) (anticorpo primário) para identificação das proteínas purificadas e anticorpos anti-Rv2563per para identificação de Rv2563 em extratos de espécies de *Mycobacterium*. A transferência foi realizada em membrana de PVDF (Immobilon-P® – Merck Millipore, Alemanha), primeiramente ativada por em metanol 100% (1 min), seguido da retirada do metanol com lavagem em água ultrapura por dois minutos. Em seguida, o gel de SDS-PAGE, membrana, papel filtro e esponjas foram incubados em tampão Towbin de transferência (25 mM Tris-Base, 190 mM glicina e 20% metanol). A transferência foi realizada à 100 V por 40 minutos e ao término, a membrana foi incubada por 18 horas em TBST Buffer (20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl e 0.05% Tween20). Após o bloqueio, a membrana foi incubada por uma hora com o anticorpo primário na diluição de 1:10000 em TBST à temperatura ambiente, segundo protocolo padrão descrito por TURNER, 1983. Utilizou-se anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina na diluição de 1:30.000. Para a revelação foi adicionado o substrato BCIP/NTA [5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate-nitro blue tetrazolium (Sigma-Aldrich, Alemanha)]. A revelação foi realizada em câmara escura por 10 minutos e bloqueada com adição de 0.5 mM de EDTA e lavagem sucessivas com água ultrapura.

3.3.1.6 Identificação de possíveis ligantes Rv2563 utilizando-se ensaios de pull-down seguidos de análises por espectrometria de massas

Ensaio de *pull-down* foram realizados utilizando-se o domínio Rv2563per em fusão com GB1 como isca para proteínas presentes em extratos de *M. tuberculosis var. bovis* BCG. Um total de 200 µL de resina de níquel foram adicionadas de 1 mg de domínio Rv2563per para imobilização e, após a lavagem, submetidas à incubação com 1 mL de extratos de *M. tuberculosis var. bovis* BCG. Após o período de 3 h, procedeu-se a eluição em duas frações de 500 µL cada, em tampão fosfato pH 7.5 contendo 500 mM imidazol. Como controle, o extrato de BCG foi submetido ao mesmo processo em resina, sem o domínio Rv2563per de forma a identificar possíveis interações inespecíficas. As amostras foram aplicadas em SDS-PAGE e gel nativo corados com comassie. As regiões do gel contendo as bandas de interesse foram enviadas para identificação por espectrometria de massas no Laboratório Central de

Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), parte da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

3.3.1.7 Determinação da capacidade de reconhecimento da proteína Rv2563 pelos anticorpos anti-Rv2563per na membrana interna de *M. tuberculosis var bovis* BCG por Whole-cell ELISA

Para avaliar a capacidade dos anticorpos anti-Rv2563per em se ligar ao transportador presente em células intactas de BCG, realizamos ensaio de *whole-cell* ELISA. Foram utilizadas culturas de BCG (vide MM 3.4.5) (DO_{600} :0.6) ressuspensas em 10 ml de PBS. Para identificar se a micomembrana teria efeito sobre a passagem do anticorpo e reconhecimento do transportador, realizamos três ensaios: (i) células sem tratamento, (ii) células tratadas com 1% Tween-80[®] por 1 hora sob agitação e, (iii) células tratadas com hexano. Amostras de 100 μ L das culturas foram imobilizadas em placas de ELISA Costar High Binding[®] (Corning, USA), sensibilizadas por 18 horas a 4°C, lavadas com tampão PBS por três vezes e bloqueadas com tampão TBS acrescido de 3% de leite desnatado e 0.5% de albumina bovina por uma hora a 37°C. Após lavagem, foram aplicados 100 μ L do soro anti-Rv2563per na concentração de 1:4000 e após uma hora a 37°C, 100 μ L de anticorpos anti-IgG conjugados com peroxidase na diluição de 1:10000, utilizando-se TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) como substrato e ácido sulfúrico para parar a reação (100 μ L a 0.16 M). A placa foi analisada em leitor de placas a 450 nm.

3.3.1.8 Avaliação da capacidade de reconhecimento da permease Rv2563 pelos anticorpos anti-Rv2563per em células de *M. tuberculosis var bovis* BCG utilizando-se microscopia de fluorescência

Adicionalmente aos ensaios de *whole-cell* ELISA, o reconhecimento do transportador pelos anticorpos anti-Rv2563per foram avaliados por microscopia de fluorescência. Os procedimentos de cultura e preparação das células foram idênticos aos realizados para o *whole-cell* ELISA, com exceção de que não foi preparado o tratamento com hexano uma vez que este se mostrou muito agressivo para as células. 100 μ L das culturas foram aplicados em placa de 96 poços e fixados com 4% de formol por 10 minutos a 4°C. Após centrifugação da placa a

2000g por 10 minutos, as células foram lavadas com 100 µL de PBS e bloqueadas com 3% de albumina em PBS durante uma noite a 4°C. Após o bloqueio, seguiu-se a incubação com o anticorpo anti-Rv2563per na concentração de 1:2000 por uma hora a 37°C, e o anticorpo secundário anti-IgG mouse conjugado com Alexafluor 488 (ThermoScientific, USA) na concentração de 1:1000, segundo protocolo definido pelos fabricantes.

Após a incubação a placa foi lavada 3 vezes com PBS por 10 minutos para retirada dos anticorpos que não interagiram. As células foram analisadas em microscópio de fluorescência EVO® (ThermoScientific, USA) utilizando-se luz branca e o filtro para GFP. Como controles foram preparadas (i) as células sem adição de anticorpos, (ii) somente com anticorpo primário e (iii) somente com anticorpo secundário.

3.3.1.9 Determinação da capacidade de interação do domínio Rv2563per com células mamíferas empregando-se citometria de fluxo

Como a permease Rv2563 está embebida na membrana do *M. tuberculosis* expondo o domínio periplasmático, testamos a capacidade deste interagir com células pulmonares, TC-1 (murina) e Calu-3 (humana), e célula de monócito humano THP-1. Primeiramente, 4×10^5 células/poço foram incubadas com 5% de albumina por 15 minutos em gelo, acrescidas de 10 µg/mL dos domínios Rv2563per-BP (fusionados com GB1) ou somente a proteína GB1 sozinha. Após incubação, as células foram lavadas 3 vezes com tampão MACS [1x PBS pH 7.2, 0.5% albumina sérica bovina (BSA) e 2 mM EDTA] e incubadas primeiramente com anticorpo anti-His-tag IgG monoclonal (ThermoScientific, USA) na diluição de 1:4000, e depois com o anticorpo monoclonal anti-IgG de camundongo marcado com Alexa fluor 488 (Invitrogen, USA) na concentração de 1:10000.

As células foram novamente lavadas e ressuspensas em tampão MACS e analisadas em citômetro de fluxo LSR Fortessa® (BD Bioscience, USA). Os dados foram analisados no software FlowJo (BD Bioscience, USA). Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e técnica, realizadas em dias alternados.

3.3.1.10 Avaliação da capacidade do domínio Rv2563per na ativação de macrófagos

Uma vez que proteínas ligadas à membrana de patógenos podem desempenhar papel importante na ativação de macrófagos, avaliamos o potencial do domínio Rv2563per frente à

células THP-1. Amostras de 4×10^5 células/mL previamente cultivadas em meio RPMI suplementado com piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino foram inoculadas em tubos cônicos de 15 ml e adicionadas de 10 µg/ml de Rv2563per-BD (previamente tratado com polimixina a 37°C por uma hora para inativação de lipopolissacarídeos) para incubação por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células foram então lavadas três vezes com tampão MACS (1X PBS + 2% soro fetal bovino) e transferidas para placa de 96 poços com fundo em U para marcação com os anticorpos monoclonais anti-HLA-DR-APC-Cy7 (Biolegend, USA), anti-CD83-PE (Biolegend, USA) e anti-CD86-BV (BD, Bioscience) por uma hora a 4°C. A coleta dos dados e análises foram realizadas conforme descrito no item acima. Como controle foram utilizados LPS, a proteína GB1 e polimixina, sendo os ensaios realizados em triplicatas biológicas e técnicas independentes.

3.3.1.1 Avaliação do tipo de resposta imune gerado pelo domínio Rv2563per em modelo murino

A identificação do tipo de resposta imune gerado nos camundongos imunizados com o domínio Rv2563per foi avaliada por meio de ensaio de ELISA indireto utilizando os anticorpos secundários anti-IgG1 e anti-IgG2c. Duzentos nanogramas de Rv2563per foram imobilizados em 200 µL de tampão carbonato pH 9.6 (por poço) em duas placas do tipo Costar High Binding® (Corning, USA). Após a sensibilização por 18 horas a 4°C, a mistura dos poços foi lavada três vezes com tampão PBST (1X PBS+ 0,05% Tween-200® (Sigma-Aldrich, Alemanha) e adicionada de tampão TBST acrescido de 3% de leite desnatado e 0,5% de albumina bovina para bloqueio durante uma hora a 37°C. Seguiu-se nova série de três lavagens com PBST e aplicação de 100 µL do soro gerado nos camundongos previamente imunizados, em diluição seriada iniciada em 1:25. O soro não foi adicionado nos poços correspondentes ao branco. O ensaio foi realizado em triplicata. Em seguida, foram aplicados 100 µL de anticorpos anti-IgG1 conjugados com peroxidase na diluição de 1:10000 em uma das placas e o anti-IgG2c também conjugado com peroxidase na segunda placa, para incubação por mais 1 hora a 37°C. Após as lavagens com TBST, foi aplicado o substrato TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) e as placas incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente protegidas da luz. Adicionou-se 100 µL de 0.16 M de ácido sulfúrico para parar a reação. As placas foram analisadas em leitor de placas a 450 nm.

3.3.1.12 Avaliação da expressão dos transportadores *Rv2563-2564* e *Rv0072-0073* em diferentes condições de cultivo pela técnica de qPCR

As culturas de BCG crescidas em diferentes condições de cultivo foram transferidas para tubo cônico, centrifugadas a 6000 g por meia hora e lavadas com 5 ml de PBS. O precipitado celular foi ressuspenso em 1 ml de TRIzol™ (ThermoFisher Scientific, USA), 4 µL de β-mercaptoetanol, e o homogeneizado transferido para tubo de 2 ml com adição de 0.5 ml de *beads* de zircônio (0.1 mm diâmetro). As amostras foram submetidas ao aparelho TissueLyzer LT® (Qiagen, Alemanha) por 5 minutos a 30 Hz de oscilação. Após a lise, foram adicionados 0.2 ml de clorofórmio por tubo e a mistura homogeneizada vigorosamente em vórtex por 15 segundos. As amostras foram incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo de 2 ml e 0.5 ml de isopropanol foram adicionados em cada tubo seguida de precipitação *overnight* a -20°C. As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante retirado e o pellet lavado com 1 ml de etanol 75%, também a 4°C.

As amostras foram novamente centrifugadas a 7500 g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi seco a temperatura ambiente por 10 minutos e as amostras dissolvidas em 10 µL de água milliQ RNase Free. Posteriormente o RNA foi limpo utilizando-se o kit RNeasy (Quiagen, Alemanha) conforme protocolo do fabricante.

Antes da produção do cDNA, o RNA extraído das culturas de *M. tuberculosis* var *bovis* BCG com e sem antibióticos foi tratado com DNase I. Para tanto, 8 µL de RNA foram adicionados em tubos de 200 µL, e adicionou-se 1 µL de tampão de reação 10X e 1 µL de DNase I – Amplification grade – 1unit/µL (SigmaAldrich, Alemanha) e incubada por uma hora a 37°C. Em seguida foi adicionado 1 µL de tampão de parada (50 mM EDTA) e a reação aquecida por 10 minutos a 70°C para desnaturação da DNase I. Para verificar se a digestão foi obtida com sucesso, foi realizado PCR utilizando o RNA como template, cuja amplificação deve ser negativa.

Para produção do cDNA foi utilizado o kit GoScript Reverse Transcriptase® (Promega, USA), com 5 µg de RNA incubados com 0.5 µg/reação com oligonucleotídeos aleatórios em um volume final de 5 µL. A reação foi incubada a 70°C por 5 minutos e imediatamente mantida em gelo por cinco minutos. A reação de síntese do cDNA foi realizada com 5 µl do RNA do passo anterior, 4 µL de GoScript 5X reaction buffer, 1.2 µL de MgCl₂, 1 µL PCR Nucleotide Mix, 1 µL de GoScript Reverse Transcriptase e água suficiente para volume final de 20 µL por

reação. A reação foi realizada em termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems, USA) com 5 minutos a 25°C de hibridização e 60 minutos a 42°C para a extensão e inativação a enzima a 70°C por 15 minutos.

O ensaio de qPCR foi utilizado para avaliação da influência de antibióticos na transcrição dos componentes do transportador Rv2563-2564 e Rv0072-0073. Para os ensaios foram utilizados os oligonucleotídeos descritos nos anexos (Tabela A4, Materiais e Métodos -Anexo). A metodologia de intercalante de DNA foi utilizada para identificação dos amplicons por fluorescência, a partir do kit DyNAmo Flash SYBR Green qPCR (ThermoFisher Scientific, USA). Primeiramente 40 µL de 50X ROX reference dye foi adicionado ao Master Mix para melhor resultados da fluorescência utilizando-se o sistema Step One Plus (Applied Biosystem, USA), conforme descrito pelo fabricante.

A reação de qPCR foi realizada em um volume de 20 µL, contendo 2 µL de cDNA, 10 µL de 2X Master Mix, 0.25 µM de cada um dos oligonucleotídeos e quantidade suficiente de água para completar. A reação foi realizada no termociclador Step One Plus (Applied Biosystem, USA), com temperatura de desnaturação inicial de 95°C por 7 minutos, seguido de 40 repetições de 95°C por 10 segundos, 30 segundos de hibridização a 60°C, extensão a 72°C por 30 segundos seguida de aquisição da fluorescência e extensão final a 72°C por 10 minutos. Seguido de curva de *melting* de 60°C a 98°C.

Os dados foram analisados pela metodologia de expressão relativa ($\Delta\Delta C_t$), utilizando-se o gene 16s de MTB como gene normalizador e calculando-se o *fold change* da expressão das condições de crescimento com antibióticos com as mesmas condições na ausência dos antibióticos. Para identificação da eficiência da reação e o C_t (“Cycle threshold” – quantidade mínima de ciclo para detecção da amplificação) de amplificação foi utilizado a ferramenta Miner (<http://miner.ewindup.info/>) e as análises comparativas e estatísticas realizadas no programa REST 2009 (Qiagen, USA).

3.4 Capítulo IV

3.4.1 Ensaio Complementares

3.4.1.1 Obtenção das construções da proteína Rad1 apresentando hélices de associação da proteína Rv2563

Sequências codificadoras das hélices de associação da proteína Rv2563 foram clonadas em fusão com a proteína âncora Rad1 de *Pyrococcus furiosus*, de acordo com o sistema *RAD display* desenvolvido por Rossmann e colaboradores (2017) por meio da metodologia de ligação independente de ligase (LIC) (KWON; PETERSON, 2014). A identificação da região correspondente à hélice de associação da Rv2563 foi feita a partir de alinhamento de sequência de aminoácidos e alinhamentos estruturais com ortólogos putativos com estrutura tridimensional disponível. A sequência identificada foi submetida na ferramenta DNABLOCKS (<https://hpcwebapps.cit.nih.gov/dnaworks/>) para construção de oligonucleotídeos sobrepostos e com os códons otimizados para a expressão em *E. coli*. Os oligonucleotídeos utilizados para estas construções são descritos nos anexos (Tabela A5, Materiais e Métodos -Anexo).

Amostras de 3 µg de vetor pRAD foram tratadas com 1 µL de enzima de digestão *AflIII* (NEB, Inglaterra) em tampão NEB4[®] (NEB, Inglaterra) por duas horas a 37°C. Em seguida, foram adicionados 0.5 mM de dATP e 3 unidades de T4 polimerase seguidos por nova incubação por 30 minutos a 37°C e inativação da enzima a 60°C por 30 minutos. O fragmento foi purificado e extraído por extração em gel, utilizando-se o mesmo kit comercial utilizado nas clonagens por restrição.

Em paralelo, o inserto foi preparado incubando-se 10 µM de cada um dos oligonucleotídeos em tampão NEB4[®] (NEB, Inglaterra), seguido de aquecimento a 95°C por 5 minutos e resfriamento até a temperatura ambiente. Em seguida, o inserto gerado foi diluído 1000X e misturado ao vetor na razão 1:1; aquecidos a 60°C por 5 minutos e lentamente resfriados até 40°C e em seguida colocados em gelo. O produto foi transformado em células de *E. coli* DH5α, conforme metodologia descrita acima. Os clones positivos foram confirmados por digestão utilizando enzima de restrição *BamHI* (ThermoFisher Scientific, USA) e, posteriormente, sequenciados.

3.4.1.2 Expressão heteróloga da proteína RadA apresentando a hélice de associação da Rv2563 para ensaio de interação com ATPases

Para a expressão da proteína Rad1 com a hélice de associação da Rv2563 (Rv2563-ch) foram utilizadas células de *E. coli* BL21(DE3) portadoras do plasmídeo pUBS520 que transcreve um códon raro de arginina necessário para a produção da proteína Rad1. Foram realizados testes de expressão da Rad-Rv2563ch a 37°C por três horas e 25°C por 16 horas, sendo que os melhores resultados foram obtidos a 25°C. Para a produção da ATPase Rv2564 foi utilizada a cepa de *E. coli* BL21(DE3) portadora do plasmídeo pOP3-Rv2564Sumo-Full.

Após a expressão da proteína Rad1 apresentando as hélices de associação foi realizada a purificação destas por troca iônica em coluna HiTrap SPHP® de 5 ml (Cytiva, USA), nas condições descritas nos anexos (Tabela A3, Materiais e Métodos -Anexo). As frações dos picos correspondentes à proteína de interesse foram misturadas e concentradas até 2 ml em concentrador do tipo Amicon com *cut-off* de 10 kDa. As amostras foram aplicadas em coluna de exclusão molecular Superdex 200 10/30® (Cytiva, USA), pré-equilibrada com tampão C (20 mM MES pH 6,0; 100 mM NaCl). Foram coletadas frações de 0.2 ml e as frações correspondentes aos picos referentes à proteína de interesse foram aplicadas em SDS-PAGE 12%.

3.4.1.3 Avaliação da atividade de ATPase da Rv2564-Bla

Os ensaios de atividade de ATPase foram realizados empregando-se o método do verde malaquita, onde o fosfato gerado pela atividade de ATPase da proteína forma um precipitado estável com o corante que é então mensurado a 620 nm. O ensaio foi realizado com kit ATPase/GTPase Activity Assay Kit® (Sigma-Aldrich, Alemanha), de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante.

Todo o ensaio foi realizado em plástico estéril para evitar a contaminação por fosfato livre. A curva padrão foi produzida diluindo-se 25 µL do padrão de 1 mM de fosfato em 475 µL de água ultrapura para produzir um padrão de 50 mM de fosfato, que foram adicionados em placa de 96 poços de fundo chato nos volumes de 0, 10, 20, 25, 30 e 40 µL por poço e corrigindo os volumes finais por 40 µL por poço com água ultrapura, gerando uma curva com 0, 12.5, 25, 31.25, 37,5 e 50 µM de fosfato. Para as amostras 5 µL de amostra foram adicionadas por poço e 5 µL do tampão de ensaio. Os controles negativos foram produzidos com 10 µL de tampão de ensaio e o branco foi obtido com 10 µL do tampão de purificação da proteína.

A reação foi realizada com 20 µL de tampão de ensaio e 10 µL de ATP a 4 mM, 30 µL do tampão de reação foram adicionados nos poços contendo as amostras, os controles negativos e os brancos. A placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Adicionou-se 200 µL do reagente de leitura em todos os poços e incubado em temperatura ambiente por 30 minutos adicionais. A leitura foi realizada e a leitura dos brancos utilizada para correção da linha de base.

Para o cálculo da atividade da enzima foi utilizada a fórmula:

$$\text{Enzyme activity} = \frac{S_a \times R_v}{S_v \times T}$$

Onde,

Sa: concentração de fosfato gerado (μM)

Rv: volume de reação (μL)

Sv: volume de amostra adicionada por poço (μL)

T: tempo de reação

Uma unidade de enzima é definida pela concentração de enzima que catalisa 1 μM de fosfato livre por minuto.

3.4.1.4 Análise de interação entre a ATPase Rv2564 e a hélice de associação da proteína Rv2563 por Biointerferometria de Biocamada (BLI)

A proteína Rv2564 também foi utilizada para estudos de interação com outras proteínas baseados em ensaios de BLI. Nestes ensaios, avaliamos se hélices de associação de permeases de transportadores ABC quando apresentadas em uma proteína âncora (denominada RAD-display), poderiam interagir com o domínio ATPase, de forma a simular o que acontece in vivo. Para os ensaios foram usadas as proteínas Rv2564Sumo, Rad1-Rv2563ch (proteína RadA apresentando as hélices de associação de Rv2563), Rad1-BtuCch (proteína RadA apresentando as hélices de associação de BtuC, permease do transportador de vitamina B12 de *E. coli*), Rad1-MalFch e Rad1-MalGch (proteína RadA apresentando as hélices de associação de MalF e MalG, permeases do transportador de vitamina maltose de *E. coli*).

A proteína Rv2564 foi imobilizada aos sensores de histidina por meio de interação com anticorpos anti-his-tag, enquanto as hélices de associação permaneceram em solução em placas de 96 poços. Nessa abordagem os sensores foram neutralizados por 10 minutos em tampão de cinética (10 mM fosfato pH 7.4; 140 mM NaCl; 0.01% BSA e 0.02% Tween-20) (coluna 1 da placa) e as amostras da proteína Rv2564 (coluna 4 da placa) foram imobilizadas por 200 segundos. Para formação da linha de base, os sensores foram incubados em tampão de cinética por 120 segundos, e então incubados contra os analitos (colunas 7, 8, 9, 10 e 11) por 120 segundos, para a fase de associação. A fase de dissociação foi induzida pela incubação do sensor em tampão de cinética (coluna 5). A regeneração dos sensores anti-his foi realizada em 3 ciclos de lavagem em tampão 10 mM glicina pH 1.7 por 5 segundos (coluna 2) seguida de lavagem em tampão de cinética por 1 minuto (coluna 6).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante esse projeto serão apresentados em 4 capítulos distintos, conforme descrito a seguir.

O **Capítulo I** consiste nas análises de bioinformática estrutural realizadas para o transportador Rv2563/Rv2564 e seu homólogo putativo Rv0072/Rv0073. As sequências das proteínas foram submetidas a comparações, alinhamentos, análise filogenética, predição de domínios e funções, além da construção de modelos tri-dimensionais. Os resultados de cada componente foram avaliados individualmente e no contexto dos demais transportadores. Os sistemas se mostraram similares a proteínas pertencentes à superfamília MacB, mas não apresentaram conservação de sequências, além de não serem agrupadas conjuntamente nas análises filogenéticas. Os dados obtidos nessas análises nos permitiram formular uma série de questões em relação ao transportador, que se estendem desde a sua função de transporte até a sua estrutura e possível interação com demais componentes do MTB.

No **Capítulo II** são apresentados dados de expressão, purificação e obtenção do complexo Rv2563/Rv2564, bem como domínios do transportador separadamente, e ensaios biofísicos e estruturais de caracterização preliminar da estrutura destas proteínas. Ainda, mostramos a obtenção de cristais do complexo e experimentos de difração. Ressalta-se a relevância da obtenção destes resultados, uma vez que não há até o momento, estruturas de transportadores completos de MTB resolvidas.

O **Capítulo III** compreende ensaios funcionais que visaram a identificação de condições de ativação do transportador, por meio do monitoramento da transcrição e expressão dos genes *rv2563* e *rv2564*. Adicionalmente, foram realizados ensaios de Western Blot e ELISA ao longo do crescimento do bacilo.

Por fim, o **Capítulo IV** apresenta uma compilação de outros ensaios, e análises realizadas no contexto do transportador, incluindo a análise de especificidade de interação entre a hélice de associação presente na transmembrana Rv2563 e a ATPase Rv2564, estudos realizados como parte de estágio no Departamento de Bioquímica da Universidade de Cambridge, sob supervisão do Dr. Marko Hyvonen.

CAPÍTULO I

Análises de Bioinformática do Transportador Rv2563-Rv2564

A predição de domínios realizada para os componentes do transportador Rv2563-Rv2564 indica maior similaridade com proteínas de transportadores do tipo MacB

A busca de proteínas com similaridade sequencial e estrutural com Rv2563 e Rv2564 foi realizada por meio de diferentes ferramentas de bioinformática. Primeiramente, buscamos ortólogos em espécies do gênero *Mycobacterium* utilizando a ferramenta Blastp contra o banco de dados de sequências (*nr*) de *Mycobacteriaceae*. O resultado mostrou que MTB tem duas outras proteínas, Rv0072 e Rv0073, que compartilham alta identidade de sequências com Rv2563 e Rv2564, respectivamente (ao redor de 70%), sugerindo a presença de dois transportadores muito similares nesta linhagem.

O Blastp ainda revelou que as sequências de Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073 e seus putativos ortólogos apresentam domínios característicos de proteínas da família MacB e da superfamília LolE, respectivamente (figura 9).

A superfamília MacB apresenta proteínas transmembranares responsáveis pela extrusão de drogas e efetores em bactérias, além de membros responsáveis pelo transporte de lipoproteínas (LolCDE) e regulação da divisão celular (FtsEX). A superfamília SalY, cujo domínio também foi identificado em Rv2563, contém transmembranas ligadas à extrusão de fatores de virulência diversos. Os sistemas presentes na família MacB são denominados tripartite por apresentarem, além do transportador na membrana interna, uma proteína que se localiza na região periplasmática (MacA) e que conecta o transportador à porina de membrana externa (TolC). Em relação aos domínios encontrados em Rv2564, observa-se a presença do domínio catalítico presente em todas as ATPases da família LolCDE, que em bactérias Gram negativas agem como transportadores de lipoproteínas da membrana interna para a membrana externa através da interação com a proteína LolA. Além do domínio catalítico, Rv2564 apresenta na região C-terminal, um domínio regulatório conservado em membros da família CAP-ED, cujos substratos hipotéticos são nucleotídeos cíclicos, como cAMP e cGMP (MIR et al., 2015; CROW et al., 2017; GREENE et al., 2018; KAPLAN et al., 2018; ALCORLO et al., 2020; TANG et al., 2021).

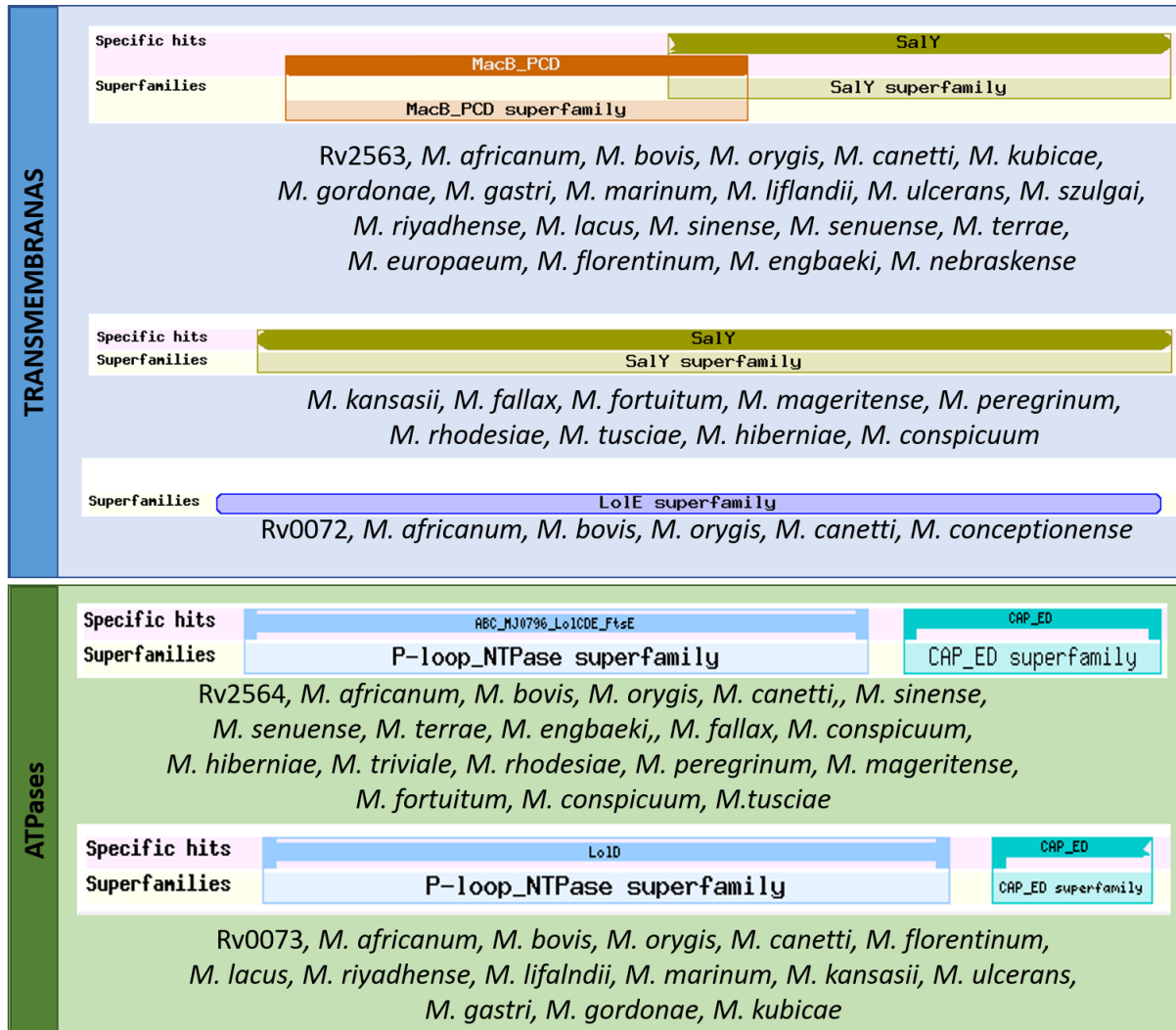


Figura 9 – Caracterização dos domínios presentes nas proteínas Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073. Os transportadores Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073 e seus putativos ortólogos foram analisados pela ferramenta CDD para identificação de domínios conservados. Os resultados indicam que as proteínas próximas ao sistema Rv2563/Rv2564 apresentam domínios característicos da família MacB de transportadores ABC e que as proteínas próximas ao sistema Rv0072/Rv0073 apresentam domínios característicos da superfamília Lol. Ainda, nota-se nas permeases, a presença de um domínio da família SalY. Em comum, todas estas famílias estão relacionadas ao efluxo de drogas e efetores, sistemas de transporte de lipoproteínas e reguladores da divisão celular bacteriana.

É interessante notar que na árvore filogenética dessas proteínas, as espécies que apresentam ortólogos ancestrais de Rv2563 e Rv0072, são as que apresentam proteínas com o domínio da superfamília SalY, domínio mais genérico caracterizado pela presença de transmembranas relacionadas à extrusão de moléculas. De maneira geral, a topologia destas permeases possui 4 hélices transmembrana e uma extensa região periplasmática entre as hélices 1-2 com enovelamento alfa-beta. Outra característica importante, é a presença na porção citoplasmática destas proteínas, de duas hélices das quais, uma interage diretamente com o

domínio ATPase como forma de “gatilho” para o transporte e outra auxilia no processo de acomodação da ATPase durante a formação do complexo.

Embora os dados indiquem que ambos os sistemas pertençam à uma mesma superfamília, a separação de Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv003 em dois grupos distintos, além das características mais específicas de domínios, sugerem que os transportadores podem ter divergido de função durante a evolução do MTB.

Os modelos das estruturas tridimensionais de Rv2563 e Rv2564 se ajustam às estruturas de proteínas MacB

Dando continuidade às análises anteriores de caracterização de domínios, submetemos as sequências de aminoácidos de Rv2563 e Rv2564 ao programa Blastp (DeltaBlast- Domain Enhanced Lookup Time Accelerated BLAST) contra o banco de dados de proteínas (PDB). Esta busca teve o intuito de identificar proteínas com estrutura tridimensional resolvida que apresentassem similaridade com as proteínas de MTB. Os resultados confirmaram as análises prévias e apontaram para proteínas pertencentes aos sistemas MacB e Lol (Figura 10).

Foram identificadas proteínas MacB similares à Rv2563 em oito espécies diferentes, sendo quatro com cobertura de 99%. As demais proteínas identificadas são domínios periplasmáticos de MacB e das proteínas Lol de *Escherichia coli*. De forma similar ao apresentado nas análises de domínios, Rv2564 apresenta similaridade estrutural com ATPases do tipo Lol e MacB. Estes dados sugerem a função do transportador como um sistema de efluxo, embora sem substrato definido. Como descrito anteriormente, a superfamília MacB é formada por três tipos de transportadores: MacB, LolCDE e FtsEX, descritos como responsáveis pela extrusão de macrolídeos macrolídeos com anéis de lactona de 14 a 15 membros (KOBAYASHI et al., 2003), e toxinas como a enterotoxina termolábil II de *E. coli* (YAMANAKA et al., 2008).

Em *E. coli* e *S. enterica* ser. Typhimurium existem evidências que o sistema MacABToIC é essencial e atua na formação da parede celular bacteriana (LU; ZGURSKAYA, 2013) e na detoxicação da protoporfirina IX durante o processo de invasão do hospedeiro e sobrevivência no interior do macrófago (TURLIN et al., 2014). Outros sistemas tripartites tipo MacB também são importantes para extrusão de fatores de virulência (NISHI et al., 2003; RIVAS et al., 2020). Em *Pseudomonas aeruginosa* o complexo PvdRT-OpmQ é responsável pelo efluxo do sideróforo fluorescente pioverdina, um importante fator de virulência (IMPERI; TIBURZI; VISCA, 2009; HANNAUER et al., 2010).

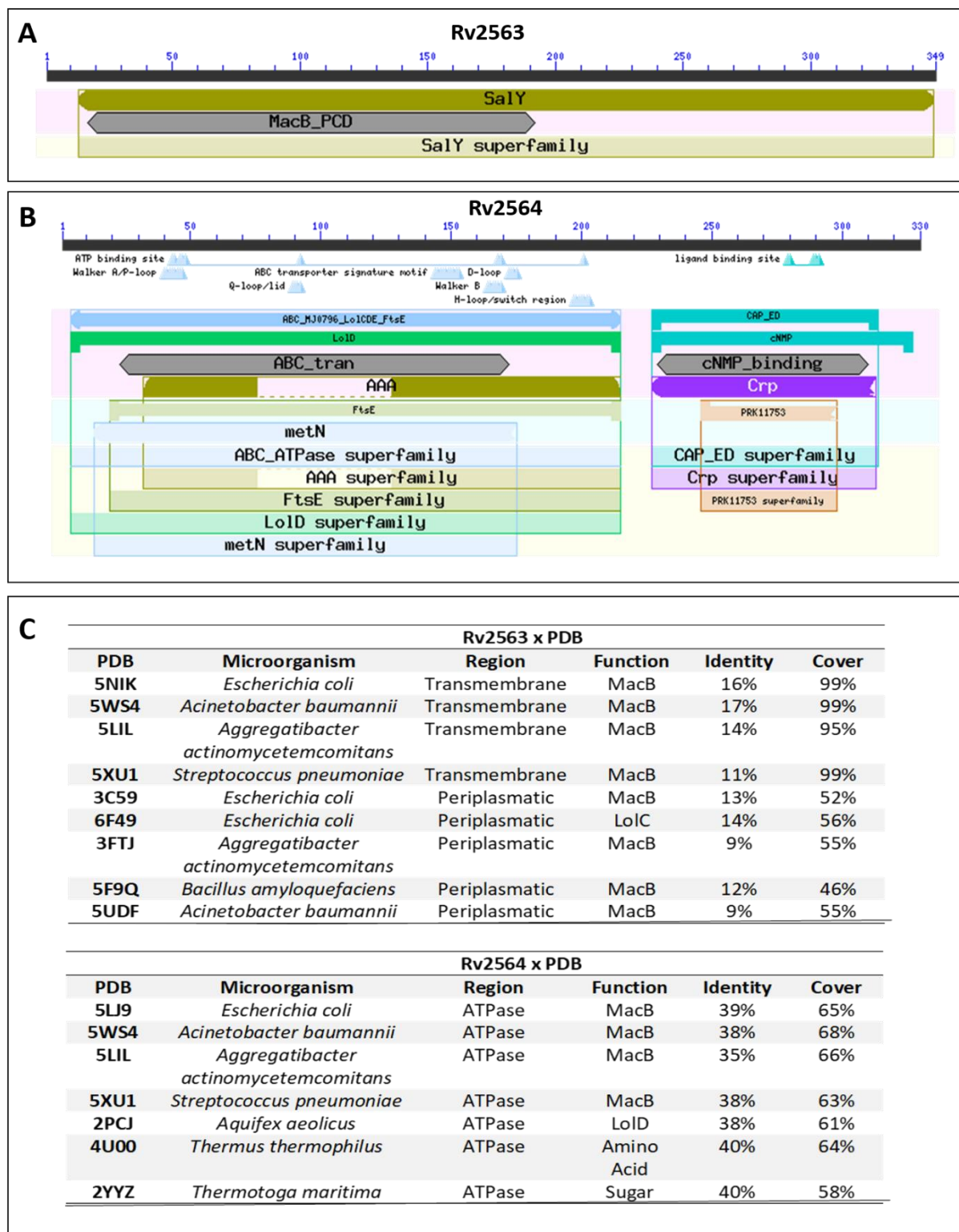


Figura 10 – Busca de proteínas no PDB com características estruturais semelhantes à Rv2563 e Rv2564. (A) Domínios encontrados nas proteínas similares à Rv2563 e (B) à Rv2564. (C) Lista das proteínas com estrutura resolvida indicadas pela análise. A baixa porcentagem de identidade das proteínas em relação à Rv2563 é característica deste grupo de proteínas transmembranares. Por outro lado, a cobertura das sequências das proteínas identificadas para Rv2564 (em torno de 58-68%) é relacionada apenas ao domínio catalítico, com exceção das ATPases de *Thermus thermophilus* e *Thermotoga marítima*, que apresentam domínios regulatórios.

Os transportadores do sistema Lol são conservados em bactérias Gram negativas e estão envolvidos na síntese de membrana externa (YAKUSHI et al., 2000; NARITA; TOKUDA, 2017). Os sistemas FtsEX, diferente de transportadores ABC que atuam promovendo o transporte de moléculas, atuam na regulação da formação do divisoma através da interação com a proteína FtsA (DU; PICHOFF; LUTKENHAUS, 2016) e na ativação de amidases responsáveis pela separação das células durante a citocinese (YANG et al., 2011).

A baixa similaridade sequencial entre as proteínas de membrana (entre 10 e 25%) é característica destes sistemas (OLIVELLA et al., 2013) e os resultados devem ser avaliados em contexto com um modelo estrutural, no qual deve-se identificar a localização dos resíduos hidrofóbicos (que devem se localizar nas transmembranas), a formação da hélice de associação e sua localização voltada para o citoplasma, e a função.

As estruturas similares a ATPase Rv2564 incluíram a família MacB de transportadores (identidade de 38% e cobertura de 68%) e transportadores de açúcar e aminoácidos (40% de identidade e 64% de cobertura). Novamente, membros da superfamília MacB foram identificados com considerável taxa de similaridade, embora nenhuma das estruturas identificadas possuam a região correspondente ao domínio regulatório da Rv2564. De fato, ao analisarmos os alinhamentos das sequências identificadas, notamos que a região de cobertura se restringe ao domínio catalítico com motivos das ATPases de transportadores do tipo ABC. Nenhum dos hits identificados conseguiu cobrir a região C-terminal da proteína, onde se localiza o domínio regulatório da proteína. Domínios regulatórios em transportadores ABC estão presentes em sistemas de transporte de açúcares (BIEMANS-OLDEHINKEL; DOEVEN; POOLMAN, 2006; CHEN et al., 2013) e de íons (HOLLENSTEIN; FREI; LOCHER, 2007; RICE et al., 2014), mas não têm sido relatados em sistemas tripartites. Estes resultados sugerem que a regulação do sistema Rv2563/Rv2564 é diferente dos sistemas descritos até o momento.

Modelo da estrutura do transportador e características funcionais

A partir dos resultados anteriores que apontaram a similaridade das proteínas Rv2563 e Rv2564 com estruturas de proteínas disponíveis no PDB, construímos um modelo do transportador Rv2563/Rv2564 utilizando as coordenadas estruturais da proteína MacB de *Acinetobacter baumannii* (PDB:5WS4) para modelagem da Rv2563 e da ATPase e a estrutura da proteína quinase com domínio ligador de cAMP de *Toxoplasma gondii* (PDB:5J3U) para modelagem do domínio regulatório. O modelo foi construído utilizando-se o programa Robetta

através da do algoritmo RoseTTAFold e TrRosetta, as proteínas Rv2563 e Rv2564 foram modeladas separadamente e depois reconstituídas a partir da estrutura de *A. baumannii*. A qualidade dos modelos gerados foi avaliada pela ferramenta Molprobit, seguidas pela minimização dos resíduos individualmente através do programa Chimera.

O modelo gerado foi consistente com os transportadores do tipo VII, nos quais a permease apresenta 4 hélices transmembranas e uma extensão na região periplasmática (Figura 11A e 11B em verde escuro e claro, respectivamente). Na Rv2563, entre a primeira e segunda hélice, encontra-se o extenso domínio de 200 aminoácidos formado por duas folha-beta, cinco alfa-hélices curtas, conectados por estruturas não enoveladas. O N-terminal da proteína se localiza na região citoplasmática formando uma pequena hélice anfipática (*elbow helix*) que se posiciona inserida na membrana e parcialmente exposta ao citoplasma. Entre as transmembranas TM2 e TM3, encontra-se a hélice de associação (Figura, em rosa), essencial para a interação entre permease e ATPase e responsável pelas mudanças conformacionais que ocorrem durante a quebra do ATP, o que permitem o transporte do substrato em todos os tipos de transportadores ABC.

Cada hélice de associação interage diretamente com apenas um dos monômeros da ATPase, não se observando uma interação cruzada com o segundo monômero da ATPase como se observa em transportadores ABC do tipo IV (DAWSON; LOCHER, 2006; THOMAS et al., 2020; THOMAS; TAMPÉ, 2020). Ainda, pode-se verificar a presença de uma segunda hélice na interface do citoplasma, responsável por acomodar a ATPase no complexo, mas que interage com apenas um dos monômeros de ATPase.

As ATPases, apresentaram uma organização similar a de transportadores com NBDs que apresentam além dos domínios catalíticos, os regulatórios (em azul claro e escuro, respectivamente). Com a estrutura do transportador completo, também foi possível verificar o potencial eletrostático do sistema com os resíduos apolares localizados na região transmembrana e um conjunto de resíduos carregados positivamente na interface voltada para o periplasma, comum aos transportadores ABC (Figura 11C).

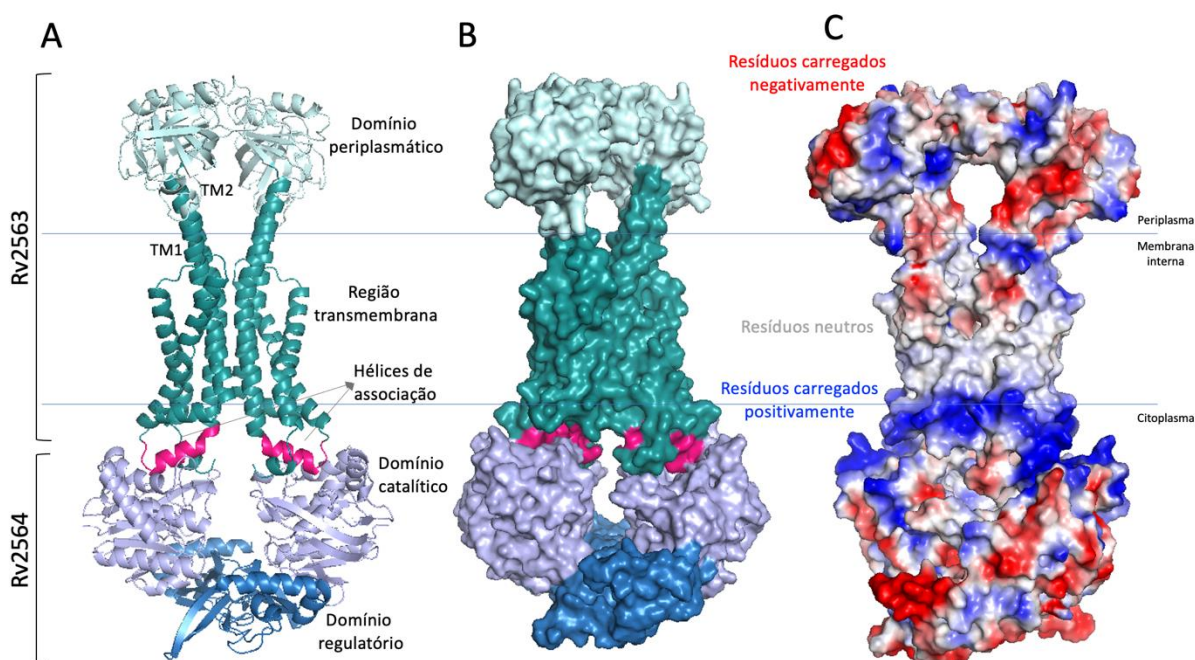


Figura 11 – O modelo do transportador Rv2563/Rv2564 de MTB apresenta características de transportadores ABC do tipo VII. (A) Estrutura do sistema Rv2563/Rv2564 em cartoon, representando os principais domínios estruturais em cores. O modelo apresenta quatro hélices transmembranas e o domínio periplasmático (aprox. 200 aminoácidos) entre as hélices TM1 e TM22. O dímero das ATPases está em contato direto com as hélices de associação da permease (em rosa). (B) modelo representado em superfície. (C) representação do potencial eletrostático de superfície do transportador completo. Resíduos carregados positivamente, negativamente e neutros são coloridos em vermelho, azul e azul claro, respectivamente. O modelo foi gerado no programa Robetta através do algoritmo RoseTTAFold e TrRosetta, as proteínas Rv2563 e Rv2564 foram modeladas separadamente e depois reconstituídas a partir da estrutura de *A. baumannii*.

A comparação da Rv2563 com as estruturas de sistemas disponíveis, revela similaridade com as transmembranas de transportadores da família MacB

A partir da disponibilidade de cinco estruturas de sistemas de efluxo no banco de dados de proteínas, o modelo de Rv2563/Rv2564 e um modelo construído para o transportador Rv0072/Rv0073 foram utilizados para comparação. Além da modelagem por homologia, submetemos as proteínas para modelagem por Fold Recognition utilizando as ferramentas Phyre2, I-tasser, Swiss-Model e, baseado em inteligência artificial, o banco de dados AlphaFold. Todas as ferramentas identificaram como melhores moldes, estruturas de transportadores da família MacB (Figura 12A-F).

Primeiramente, a organização dos genes que codificam os sistemas caracterizados apresenta diferenças. Os sistemas MacB de *E. coli*, *A. baumannii* e *A. actinomycetemcomitans* são

considerados transportadores ABC não canônicos, codificados por um óperon em conjunto com o gene que codifica a proteína adaptadora MacA. O início do gene *macB* codifica o domínio ATPase e o final, o domínio transmembranar ou permease (CROW et al., 2017; FITZPATRICK et al., 2017; OKADA et al., 2017). Diferentemente, o transportador MacB caracterizado em *S. pneumoniae* é codificado a partir de um óperon, no qual o primeiro gene é responsável pela proteína adaptadora MacA, o segundo para o domínio ATPase do transportador, e o terceiro gene para o domínio transmembrana. Ainda, nos transportadores do tipo Lol, a organização gênica mais comum é definida pelo primeiro gene codificando para a ATPase e o segundo e terceiro genes para domínios transmembrana, formando assim um heterodímero. Nos transportadores FtsEX, o óperon em geral, apresenta-se com o primeiro gene responsável pela ATPase e o segundo gene pelo domínio TMD. Por esse motivo, para as comparações estruturais entre os domínios transmembrana com a Rv2563, as sequências correspondentes ao domínio ATPase foram retiradas.

O modelo da proteína Rv2563 apresenta 4 hélices transmembranas, com um extenso domínio de 200 aminoácidos entre a primeira e a segunda hélice. No domínio periplasmático encontram-se duas folhas-beta e cinco alfa-hélices conectadas por estruturas não enoveladas (Figura 12M). O N-terminal da proteína se localiza na região citoplasmática formando uma pequena hélice anfipática inserida na membrana e parcialmente exposta ao citoplasma (Figura 12J). Entre as transmembranas TM2 e TM3, localiza-se a hélice de associação responsável pela interação com o domínio ATPase (Figura 12K).

Essa região é essencial para a interação entre esses dois domínios e responsável pelas mudanças conformacionais que ocorrem durante a quebra do ATP, o que permitem o transporte do substrato em todos os tipos de transportadores ABC. Uma segunda hélice, responsável por acomodar a ATPase no complexo é aparente no modelo, interagindo apenas com um dos monômeros de ATPase.

Os modelos de Rv2563 e Rv0072, embora similares, apresentam diferenças significativas em relação à superfície eletrostática. Destacam-se as regiões de TM1 e TM2, que em Rv2563 são majoritariamente eletronegativas enquanto em Rv0072 apresentam-se mais positivas, e a região periplasmática bem variada.

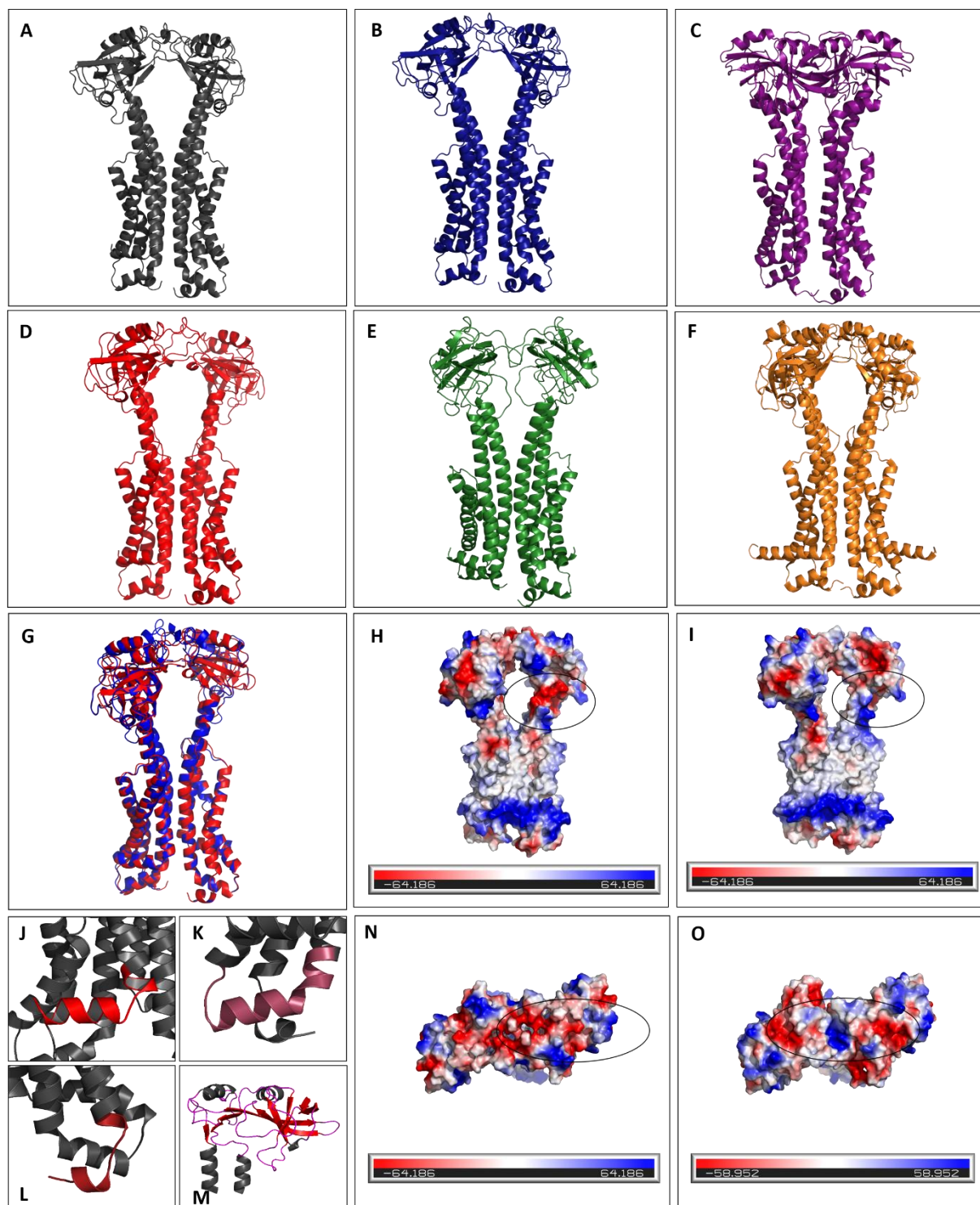


Figura 12 – Comparação do modelo da transmembrana Rv2563 com demais proteínas de sistemas tripartites e conservação. (A) Estruturas de Rv2563 modeladas em diferentes programas. Modelo por homologia a partir da estrutura de *A. baumannii* (PDB:5WS4) (preto). (B) Modelo a partir de reconhecimento de enovelamento pela ferramentas I-tasser (azul). (C) Modelo gerado pelo programa AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>), baseado em inteligência artificial (roxo). (D) Modelos da proteína Rv0072 (vermelho) modelada a partir da estrutura de MacB de *A. baumannii* (PDB:5WS4) (vermelho). (E) Modelo da Rv0072 a partir do reconhecimento de fold pelo algoritmo I-tasser (verde). (F) Modelo pelo programa AlphaFold (laranja). (G) Sobreposição dos modelos de Rv2563 e Rv0072 produzido no

Modeller 10.1 com a estrutura de *A. baumannii* (PDB:5WS4), mostrando que ambas apresentam alta conservação estrutural. Os programas definem bem a região transmembrana, mas apresentam divergências na região periplasmática. **(H e I)** Comparação do potencial eletrostático das proteínas Rv2563 e Rv0072, respectivamente. **(J)** O N-terminal da Rv2563 localiza-se voltado para o citoplasma celular, formando uma hélice anfipática que interage com a membrana citoplasmática e mantém-se exposta ao citoplasma. **(K)** Detalhe da hélice de associação, extensão entre as transmembranas TM2 e TM3, que se localiza no citoplasma em contato com a ATPase. **(L)** Detalhe da segunda hélice de associação, presente em transportadores do tipo VII, localizada no C-terminal da proteína e responsável por acomodar a ATPase no complexo transportador. **(M)** A região periplasmática de Rv2563 evidenciando o enovelamento formado por fitas-beta (vermelho) e alfa-hélices (preto) conectadas por regiões não enoveladas. **(N e O)** Comparação do potencial das regiões periplasmáticas expostas ao periplasma de Rv2563 e Rv0072, vistas superiormente.

Como estas regiões são importantes para a função do transportador e reconhecimento dos substratos, é possível que os transportadores Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073 tenham funções diferentes. Em transportadores ABC do tipo exportadores, o acesso do substrato ao transportador pode ocorrer lateralmente através da membrana plasmática, como se propõe para o tipo IV (DAWSON; LOCHER, 2006, 2007; SEEGER; VAN VEEN, 2009), no periplasma, através da transmembrana e proteína adaptadora como observado nos transportadores MacB (CROW et al., 2017; FITZPATRICK et al., 2017), ou ainda, lateralmente, como observado para o transportador de lipoproteínas LolCDE (KAPLAN et al., 2018; TANG et al., 2021). As diferenças na região periplasmática das proteínas também é observada na face voltada para o periplasma e meio extracelular (Figura 12N e O).

A comparação das duas proteínas com as transmembranas de sistemas tripartite com estruturas resolvidas, confirma o enovelamento característico dos transportadores ABC do tipo VII (Figura 13A). Tanto nos modelos da Rv2563 e Rv0072 como nas proteínas da família MacB, identificamos que a região das hélices transmembrana embebida na membrana forma um poro de passagem reduzido, mas na região periplasmática, as TMs se afastam (deslocadas pela interação dos domínios periplasmáticos globulares) e formam um bolsão em forma de V. Nos transportadores da família VII, a mecânica de transporte é mediada por mecanotransmissão.

Nesse sistema, o substrato acomoda-se na restrita região presente no periplasma e uma vez ocorrida à quebra do ATP, procede-se a constrição dessa região forçando a expulsão do substrato de modo mecânico, semelhante ao mecanismo de um fole de lareira (CROW et al., 2017; KAPLAN et al., 2018; TANG et al., 2021). Nos sistemas Lol, a lipoproteína se acomoda nessa mesma realizando interações com a transmembrana LolE, mas com a quebra do ATP é transferida para LolC, e depois para LolA no periplasma (TANG et al., 2021). A estrutura de

MacB de *A. actinomycetemcomitans* (PDB: 5LIL) foi resolvida em um estado de ativação do transportador com as ATPases próximas e ligadas ao ATP, mostrando um estado conformacional diferente das demais estruturas de MacB, onde se verifica a diminuição do bolsão em V (Figura 13F).

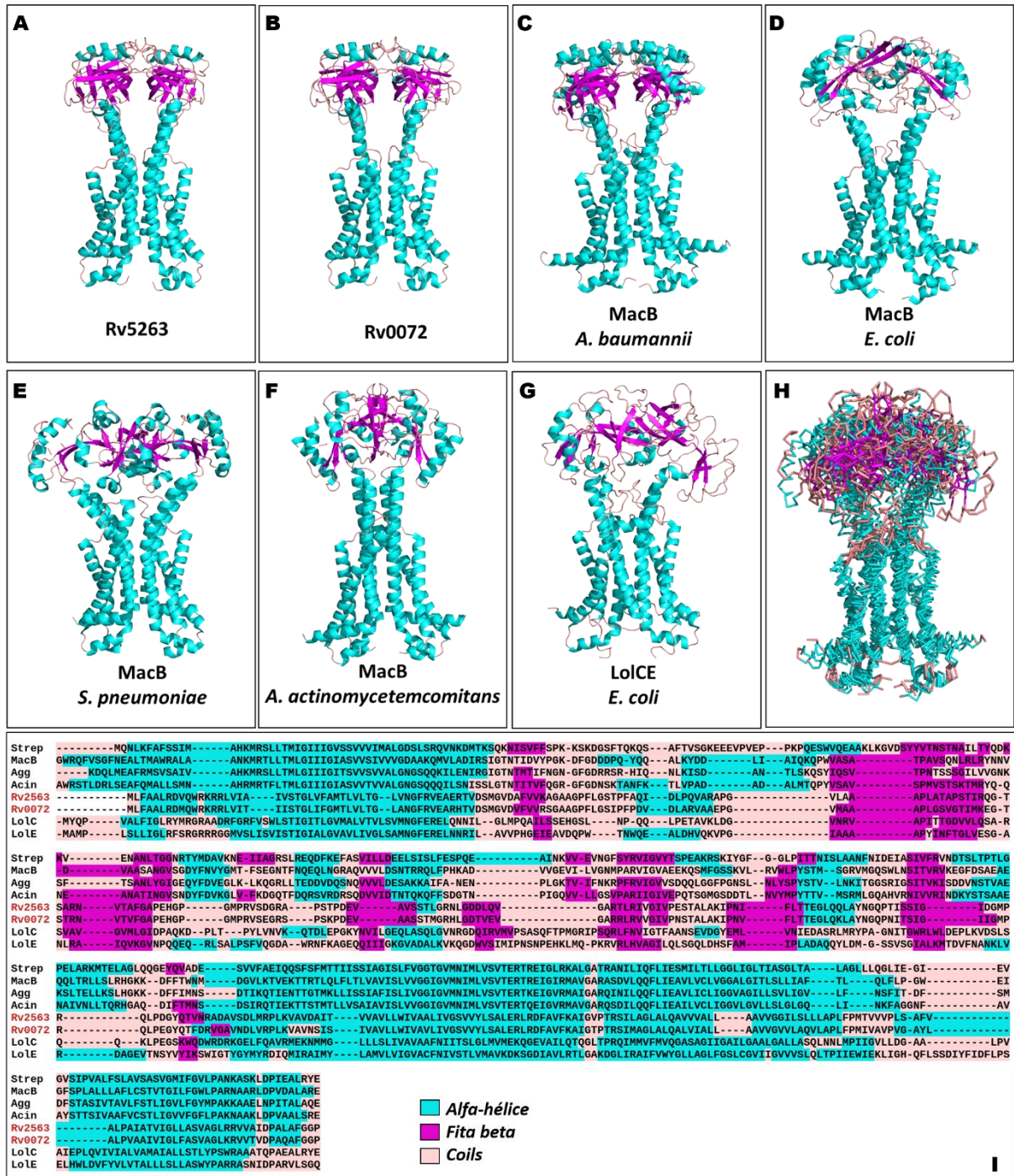


Figura 13 – Comparação da Rv2563 com proteínas transmembrana da superfamília MacB revela similaridade estrutural, mas não sequencial. Comparação das estruturas de proteínas MacB e Lol com os modelos de Rv2563 e Rv0072 (B). As estruturas apresentadas

são: MacB de *S. pneumoniae* (E, PDB:5XU1), *A. actinomycetemcomitans* (F, PDB:5LIL), MacB de *A. baumannii* (C, PDB:5WS4), MacB de *E. coli* (D, PDB: 5NIK) e LolEC de *E. coli* (G, PDB:7ARH). **(H)** Sobreposição dos modelos e estruturas realizado no programa PyMol. Observa-se maior conservação na região transmembranar. **(I)** Alinhamento estrutural baseado nas informações de sequências. O alinhamento mostra que não há similaridade sequencial entre as proteínas, mas conservação de estruturas secundárias que caracterizam os sistemas MacB. As regiões em ciano representam alfa-hélices, em magenta regiões de fita-beta e regiões em salmão correspondem a coils.

O alinhamento da sequência da Rv2563 com as transmembranas dos transportadores em análise, mostra que não houve conservação de resíduos, embora conservação de estrutura secundária, principalmente relacionadas à formação das transmembranas. Embora mais próxima das proteínas MacB do que LolC e LolE, não foi possível definir se a Rv2563 de MTB compartilha uma mesma função com estas.

Em vista destes resultados, utilizamos um alinhamento de diversas sequências de proteínas MacB, FtsX, Lol e HrtB, além de Rv2563 e Rv0072 (Tabela A2, Capítulo I- Anexo), para a construção de uma árvore filogenética. A árvore originada foi bastante consistente com os dados esperados, separando os as sequências das respectivas famílias, em clados bem distintos e robustos. No entanto, as proteínas de MTB não foram classificadas em nenhum deles, corroborando os resultados obtidos até o momento, que sugerem conservação estrutural, mas não sequencial (Figura 14).

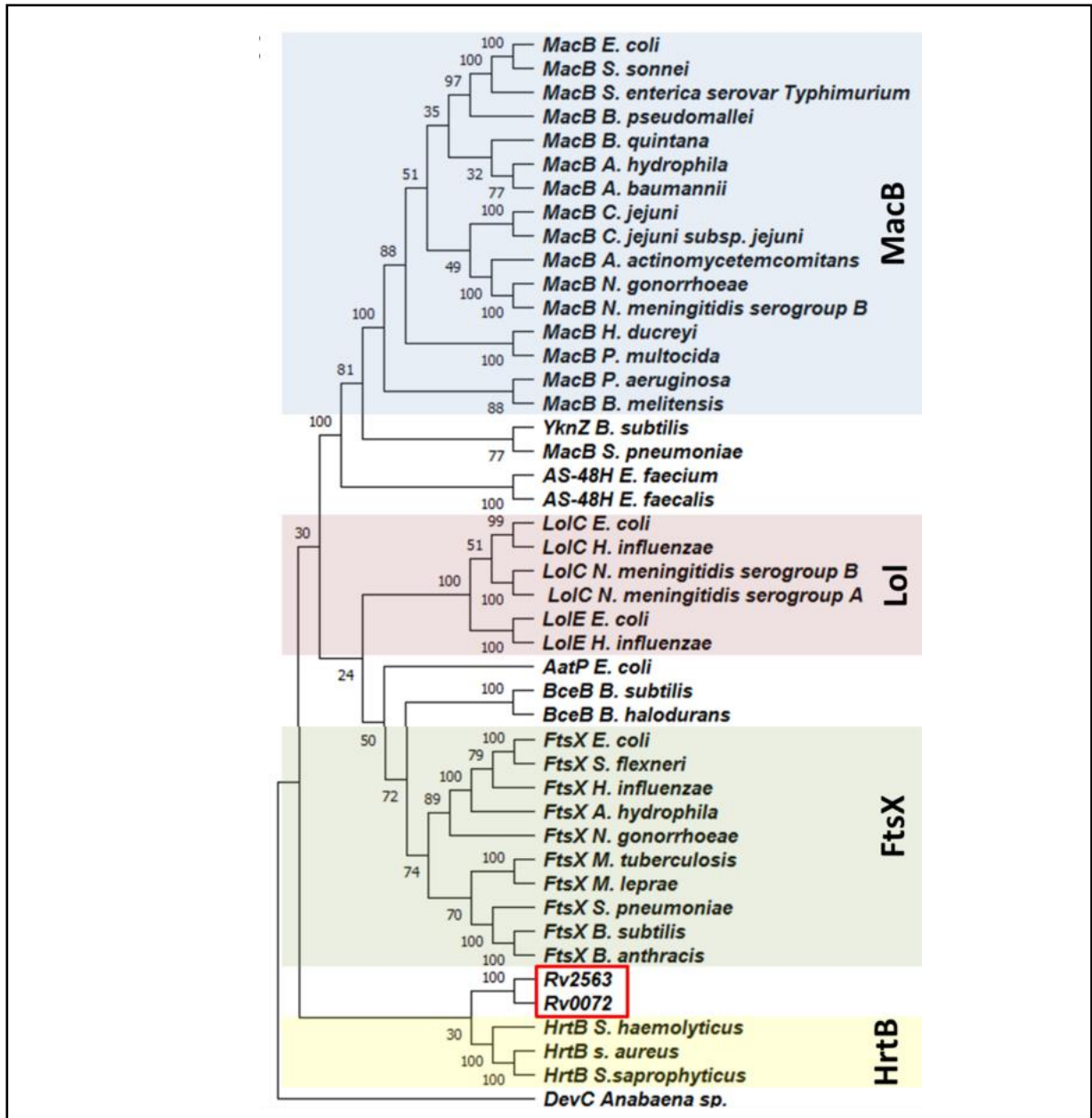


Figura 14 - Análise filogenética de diferentes proteínas pertencentes a sistemas tripartites, MacB, FtsX, Lol e HrtB. As proteínas foram classificadas em clados funcionais, onde os sistemas MacB são mais distantes dos sistemas Lol e FtsX, originados de um ancestral comum. Rv2563 e Rv0072 não correspondem a nenhum dos clados verificados. A árvore foi produzida no programa Mega11, primeiramente as sequências curadas das transmembranas da família MacB de diferentes microrganismos foram obtidas no banco Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), elas foram então alinhadas através do algoritmo Muscle e a história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A árvore consenso foi inferida por bootstrap com 1000. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método p-distance. Esta análise envolveu 45 sequências de aminoácidos e a sequência de DevC de *Anabaena sp.* foi utilizada como outliar.

O domínio periplasmático da Rv2563 (Rv2563per) não é conservado e pode indicar divergência de função do transportador

As análises dos modelos mostraram que as maiores diferenças entre os transportadores estão localizadas na região periplasmática da Rv2563 e no domínio regulatório de Rv2564. Ainda, a análise de filogenia revelou que as proteínas de MTB não se agrupam com membros das demais famílias, indicando que pode haver conservação da estrutura para função de “exportação” sem haver conservação de função específica. Ao compararmos a região periplasmática da Rv2563 e os representantes de MacB, Lol e FtsX, evidenciamos as principais diferenças entre os membros dessa família (Figura 15).

Regiões periplasmáticas de proteínas MacB apresentam dois subdomínios, subdomínio Sabre (Small alpha/beta rich extracytoplasmic) e subdomínios Porter (caracterizados por dois motivos β - α - β). No sistema FtsEX, a região periplasmática é menor quando comparada com a Rv2563per e com os demais membros da família MacB, uma vez que seu domínio periplasmático não apresenta o subdomínio Sabre. Nas proteínas Lol, identifica-se a presença dos subdomínios Sabre e Porter, e adicionalmente às demais, um pequeno loop, denominado de *Hook* (Figura 15, círculo vermelho), responsável pela interação com proteína LolA.

O alinhamento das sequências mostra conservação de estruturas secundárias em Rv2563per que justificam a formação dos subdomínios Porter e Sabre, como nas proteínas MacB e LolC, mas não mostra a presença do *hook*. No modelo da Rv2563per observa-se maior quantidade de regiões não enoveladas do que na estrutura de MacB de *A. baumannii*, o que pode ser resultado da modelagem por homologia, mas não podemos destacar a possibilidade de formação de estruturas diferenciadas. Os resultados apontam para funções diferentes de Rv2563 e as demais proteínas. Ainda, deve-se destacar que procuramos um ortólogo de MacA em *M. tuberculosis*, mas não obtivemos resultados conclusivos, o que sugere que o sistema Rv2563/Rv2564 pode atuar como uma bomba de efluxo não dependente de proteínas tipo MacA, ou utilizando outros parceiros e outra mecânica, ainda não identificada em transportadores ABC.

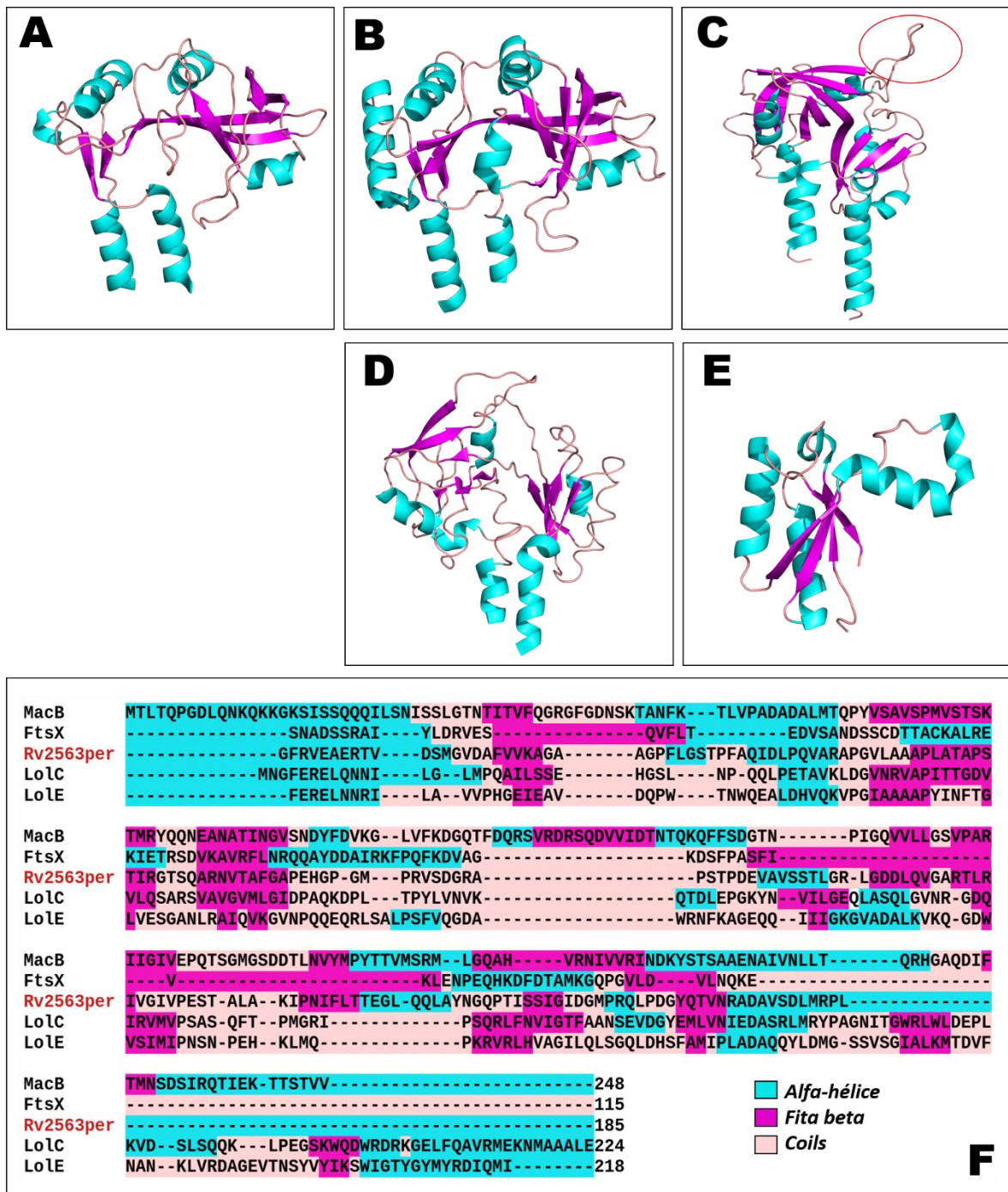


Figura 15 – A comparação dos domínios periplasmáticos mostra que a região periplasmática da Rv2563 apresenta os subdomínios Porter e Sabre, presentes em proteínas do sistema MacB. (A) Comparação do modelo da estrutura de Rv2563per obtido a partir da transmembrana da *A. baumannii* (PDB:5WS4), com as demais regiões periplasmáticas das proteínas estudadas. O modelo se adequa às estruturas de proteínas MacB, as quais possuem dois domínios Porter, formados por um motivo β - α - β e um domínio Sabre, caracterizado por um pequeno domínio $\alpha\beta$. (B) Região periplasmática do transportador MacB de *A. baumannii* (PDB:5WS4). (C) A estrutura da região periplasmática da LolC (PDB:7ARK) de *E. coli* apresenta domínios similares com a presença de uma pequena alça responsável pela sua interação com proteína LolA (círculo vermelho). (D) Região periplasmática de LolE

(PDB:7ARL). (E) Por sua vez a região periplasmática das proteínas FtsX (PDB:4N8N) se caracterizam por serem menores quando comparadas aos demais membros da família MacB, devido à ausência do subdomínio Sabre.

O modelo da Rv2564 conserva motivos funcionais no domínio catalítico e apresenta um domínio regulatório adicional em comparação com ATPases da família MacB

O domínio catalítico da ATPase apresentou a conservação de todos os domínios característicos de uma ATPase de transportadores ABC, incluindo o motivo ABC, e a estrutura necessária para a dimerização e função de hidrólise. O modelo apresenta uma proteína com dois domínios, um catalítico alfa/beta e um regulatório, com duas folhas beta e três alfa-hélices. A predição do domínio regulatório, como avaliada anteriormente, mostra similaridade com domínios CAP (Figura 16).

A arquitetura do domínio catalítico é similar ao de domínios RecA que apresentam um enovelamento tipo Rossmann, caracterizado pela presença de seis fitas-beta formando uma extensa folha-beta que é alternada por alfa-hélices. Na dimerização das ATPases são formados dois bolsões, cada um com um sítio para interação e hidrólise de ATP que só ocorre após a dimerização (LICHT; SCHNEIDER, 2011; WILKENS, 2015).

A busca de proteínas com regiões similares à regulatória de Rv2564 mostrou proteínas que atuam como quinases e fatores de transcrição que interagem com cAMP. A possibilidade do transportador Rv2563/Rv2564 interagir com cAMP por meio de sua ATPase é interessante. Ao contrário de outras micobactérias patogênicas como *M. avium* e *M. marinum* que apresentam doze e treze adenilato ciclases, respectivamente, MTB apresenta dezessete adenilato ciclases da classe III. Em comparação, com *E. coli*, *C. glutamicum*, *S. coelicolor* e *P. aeruginosa* que apresentam apenas uma adenilato ciclase do tipo II, essa diferença fica ainda maior. Níveis de cAMP no interior do MTB são 100 a 200 vezes maior em comparação a concentração encontrada no interior de *E. coli*, e ainda podem ser encontrados no filtrado de culturas de MTB, sugerindo que o bacilo pode secretar a molécula (AGARWAL et al., 2009; CHAKRABORTI et al., 2011).

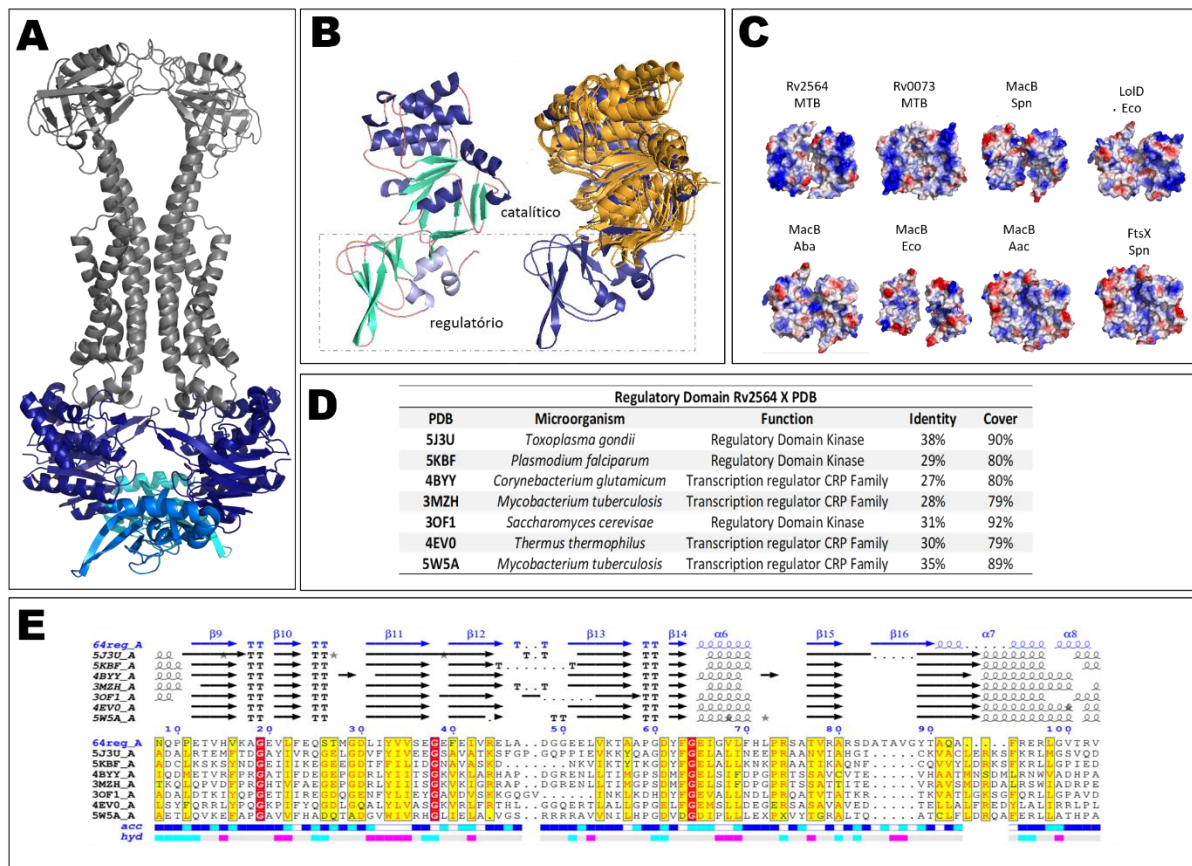


Figura 16 - Características estruturais do domínio Rv2564 de MTB. (A) Modelo do transportador Rv2563/Rv2564 com destaque para o dímero formado pelo domínio Rv2564. A estrutura é apresentada em cartoon com o domínio catalítico em azul escuro e os domínios regulatórios em ciano e azul claro. (B) Detalhe da estrutura de Rv2564 evidenciando as estruturas secundárias em forma de alfa-hélices (azul escuro no domínio catalítico e claro do regulatório) e as folhas beta (em ciano). A sobreposição de Rv2564 com os demais domínios NBD de transportadores da superfamília MacB. Nota-se que somente Rv2564 apresenta a região regulatória. (C) Comparação do potencial eletrostático de Rv2564 com os demais NBDs. Embora a presença de resíduos apolares (em cinza claro) e resíduos positivos (azul escuro) seja uma característica das NBDs, Rv2564 apresenta similaridade apenas com Rv0073. (D) Proteínas que apresentam domínios regulatórios similares ao domínio de Rv2564. A lista revela similaridades com domínios presentes em fatores de transcrição e quinases. (E) Alinhamento estrutural da sequência de aminoácidos de Rv2564reg com as sequências das proteínas que apresentam domínios regulatórios.

Níveis variados de cAMP foram relacionados aos estados dormente e de ressuscitação que o bacilo apresenta durante a infecção, onde em bactérias dormentes os níveis de cAMP foram diminuídos, enquanto aumentam nas bactérias em processo de ressuscitação. Além disso, estudos baseados em proteoma de células presentes na última fase de dormência revelaram, em geral, a diminuição da expressão de genes que codificam transportadores (TRUTNEVA et al., 2020).

Muitas adenilato ciclasas foram observadas sendo expressas na membrana do MTB, além de terem sido estimuladas por estresse na membrana, como por exemplo, na presença de detergentes. Esses dados sugerem que o cAMP pode estar envolvido na regulação da síntese e degradação da parede celular do MTB (CHAKRABORTI et al., 2011).

Estudos têm demonstrado que o MTB é capaz de intoxicar o macrófago com cAMP, promovendo o aumento de TNF- α através da quinase A e da proteína de resposta ligadora de cAMP, o que culmina em modificações no interior do macrófago e no ambiente tecidual (AGARWAL et al., 2009). Como o cAMP é secretado para o macrófago ou como essa ação é regulada são processos ainda desconhecidos. Adicionalmente, foi demonstrado que a proteína Rv3676 que pertence à família ligadora de cAMP, é importante para a virulência do bacilo em ratos e controla a transcrição do gene *rpfA*, que codifica para um fator de ativação da ressuscitação (RICKMAN et al., 2005).

Em conjunto, as análises de bioinformática realizadas para o domínio regulatório trouxeram características importantes exclusivas do transportador de MTB que podem sugerir sua relação direta com os níveis de cAMP do bacilo e do hospedeiro.

A filogenia do transportador Rv2563/Rv2564 e comparação com Rv0072/Rv0073

Os resultados anteriores mostraram que o sistema Rv2563/Rv2564 apresenta diferenças significativas em comparação com os demais da superfamília MacB, sugerindo que apesar da conservação estrutural geral, tal sistema poderia ter função diferenciada. Ainda, Rv2563/Rv2564 é muito similar ao sistema Rv0072/Rv0073 (Figura 17), e isso nos fez levantar questionamentos sobre a possibilidade de serem sistemas duplicados com redundância de função, o que apontaria para um papel relevante no bacilo. Os estudos com mutantes de MTB realizados até o momento avaliaram o papel de deleção de apenas um dos transportadores, ou Rv2563-2564 ou Rv0072-0073, e neste caso, classificaram ambos como transportadores não essenciais para o crescimento do MTB, pelo menos nas condições testadas (SASSETTI; BOYD; RUBIN, 2003; SASSETTI; RUBIN, 2003; GRIFFIN et al., 2011; DEJESUS et al., 2017a, 2017b).

	Rv2563	MLFAALRDVQWRKRLVIAIVSTGLVFAMTLVLTGLVNGFRVEAERTVDSMGVDAFVVKAGAAGPFLGSTPFAQIDLPQVARAPGVLAAAPL
	Rv0072	MLFAALRDMQWRKRLVITIIISTGLIFGMLTGLVLTGLANGFRVEARHTVDSMGVDVFFVRSAGAAGPFLGSIPFPDVLARVAAEPGVMAAAPL
TMD	Rv2563	ATAPSTIRQGTSAARNVTAFGAPEHGPGMPRVSDGRAPSTPDEVAVSSTLGRNLDGDLQVGARTLRIVGIVPESTALAKIPNIFLTTEGLQQL
	Rv0072	GSVGTIMKEGTSTRNVTVFGAPEHGPGMPRVSEGRSPKSPKDEVAASSTMGRHLGDTVEVVGARRLRVVGIVPNSTALAKIPNVFLTTEGLQKL
	Rv2563	AYNGQPTISSIGIDGMPRQLPDGYQTVNRADAVSDLRMLKVAVDATVAVALLWIVAALIVGSVVYLSALERLRDFAVFKAIGVPTRSILA
	Rv0072	AYNGQPNITSIGIIGMPRQLPEGYQTFDRVGA VNDLVRPLKVAVNSISIVAVLLWIVAVLIVGSVVYLSALERLRDFAVFKAIGVPTRSIMA
	Rv2563	GLALQAVVVALLAAVVGGILSLLLAPLFPMTVVVPLSAFVALPAIATVIGLLASVAGLRRVVAIDPALAFGGP
	Rv0072	GLALQALVIALLAAVVGVLAQVLAPLFPMTVVVPLSAFVALPAIATVIGLLASVAGLRRVTVDPAAQAFGGP
NBD	Rv2564	MGGLTISDLVVEYSSGGYAVRPIDGLSLDVAPGSLVILLGPGSGCKTLLSCLGGILRPKSGSIKFDDVDITTLGAALAKYRRDKVGVFQ
	Rv0073	MGDLSTIQNLVVEYSSGGYALRPINGLNDVAAGSLVMLLGPSPGCKTLLSCLGGILRPKSGAIFKDFEVDITTLQGAELANYRRNKVGVFQ
	Rv2564	AFNLVSSLTALENVMPLRAAGVSRAAARKRAEDLLIRVNLGERMKHRPQDMSGGQQRVAVARAIALDPQLILADEPTAHLDFIQVEEVL
	Rv0073	AFNLVPSLTAVENVMPLRSAGMSRRASRRRAEELLARVNLAEEMNHRPGLSGGQQRVAVARAIALDPPLILADEPTAHLDFIQVEEVL
	Rv2564	LIRSLAQGDRVVVATHDSRMLPLADRVLELMPAQVSPNQPPETVHVKAGEVLEFQSTMGDLIYVSEGEFEIVRELADGGEELVKTAAPGD
	Rv0073	LIRELADGERVVVATHDSRMLPMADRVVELTPDFAETNRPPETVHLQAGEVLEFQSTMGDLIYVSEGEFEIVHELADGGEELVKVAGPGD
	Rv2564	YFGEIGVLFHLP RSATVRARS DATAVGYTAQAFRERLGVTRVADLIEHRELA SE
	Rv0073	YFGEIGVLFHLP RSATVRARS DATAVGYTVQAFRERLGVGGLRDLIEHRELA ND

Figura 17 – Comparação das sequências de aminoácidos das proteínas dos sistemas Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073. O alinhamento entre as transmembranas Rv2563 e Rv0072 revela 76% de similaridade de sequência com mudanças pontuais de aminoácidos, sendo quase todas as alterações conservativas. O mesmo padrão ocorre quando comparamos as NBDs Rv2564 e Rv0073 que apresentam mais de 85% de similaridade de sequência, com a maior quantidade de alterações presente no C-terminal das proteínas, ou na região regulatória. O alinhamento foi realizado no programa ClustalW. As regiões em vermelho indicam as regiões com 100% de similaridade entre as sequências e as regiões em amarelo aminoácidos com mesmas características.

Para avaliar a distribuição de ortólogos das proteínas Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073 no contexto da evolução de diferentes espécies de micobactérias, construímos uma árvore filogenética a partir de sequências do RNA ribossomal 16S de 70 espécies e verificamos a presença ou ausência de proteínas similares, como também a identidade destas em relação às proteínas de MTB (Figura 18).

A árvore mostrou a distribuição das espécies em grupos que definem diferentes complexos (caixas coloridas) como *M. avium* (MAC), complexo *M. abscessus-chelonae* (MAB), e outros, além de espécies patogênicas e ambientais, mas, principalmente, revelou que a presença dos dois transportadores completos e com alta identidade, só ocorre no grupo de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) e *M. canettii*, uma das espécies de micobactérias filogeneticamente mais próxima dos membros do complexo MTBC.

Segundo a filogenia das espécies, ortólogos de Rv2563/Rv2564, estão em espécies mais distantes do complexo e mais antigas na filogenia como as dos grupos *M. terrae* e *M. fortuitum*. Por outro lado, os ortólogos de Rv0072/Rv0073 são encontrados em espécies evolutivamente mais recentes, principalmente não associadas a grupos, com exceção de *M. kansasii* do complexo *M. avium* e os dois representantes do grupo *M. kansasii*.

Como as bactérias do MTBC são as únicas causadoras de tuberculose em humanos, é possível que neste grupo, tais proteínas estejam relacionadas a algum processo fisiológico dependente do hospedeiro, podendo apresentar funções complementares ou mesmo redundância de função.

Para analisarmos a filogenia dos transportadores Rv2563-2564 e Rv0072/Rv0073 realizamos um alinhamento das sequências correspondentes aos sistemas e seus ortólogos putativos utilizando o programa Muscle e construímos uma árvore filogenética utilizando-se o algoritmo Neighbor joining. A análise das permeases e ATPases foi realizada separadamente.

Os resultados demonstram que os transportadores Rv2563-2564 e Rv0072-0073 apresentam uma origem em um ancestral comum, mas são distintos e não produto de duplicação gênica (Figura 19A e C). Ao observamos o processo evolutivo da Rv2563 observamos que houve divergência a partir de um ancestral originando os ortólogos presentes nas espécies *M. tusciae* e *M. rhodesiae*. A partir deste ramo, surge um novo clado que contém a Rv2563 no complexo *M. tuberculosis* (MTBC), *M. canetti* e *M. florentinum*. Um segundo clado pode ser observado que deu origem a transmembrana Rv0072 e seus homólogos mais similares. O mesmo padrão de divergência é observado ao longo da árvore das ATPases Rv2564 e Rv0073.

Notamos que as sequências mais próximas da Rv2563/Rv2564 se apresentam em um clado independente que foi formado a partir do ancestral mais antigo. E que os clados que apresentam a Rv2563 e Rv2564 apresentam o maior número de repetições do bootstrap do que o clado formado pela Rv0072 e Rv0073. Ao compararmos a árvore construída a partir das sequências de RNA 16s de membros da família *Mycobacteriaceae* com as árvores geradas para os componentes TMDs e NBDs observa-se um padrão semelhante. Os homólogos mais próximos do transportador Rv2563-Rv2564 correspondem aos grupos *M. fortuitum* e complexo *M. terrae*, além de *M. florentinum* e *M. europaeum* que na árvore baseada no RNA 16s divergem anteriormente aos membros do MTBC. Por outro lado, o grupo intermediário formado pelas micobactérias *M. szulgai*, *M. gastri*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. conspicuum*, *M. gordonae* e *M. kansasii* apresentam ortólogos mais próximos ao transportador Rv0072-Rv0073.

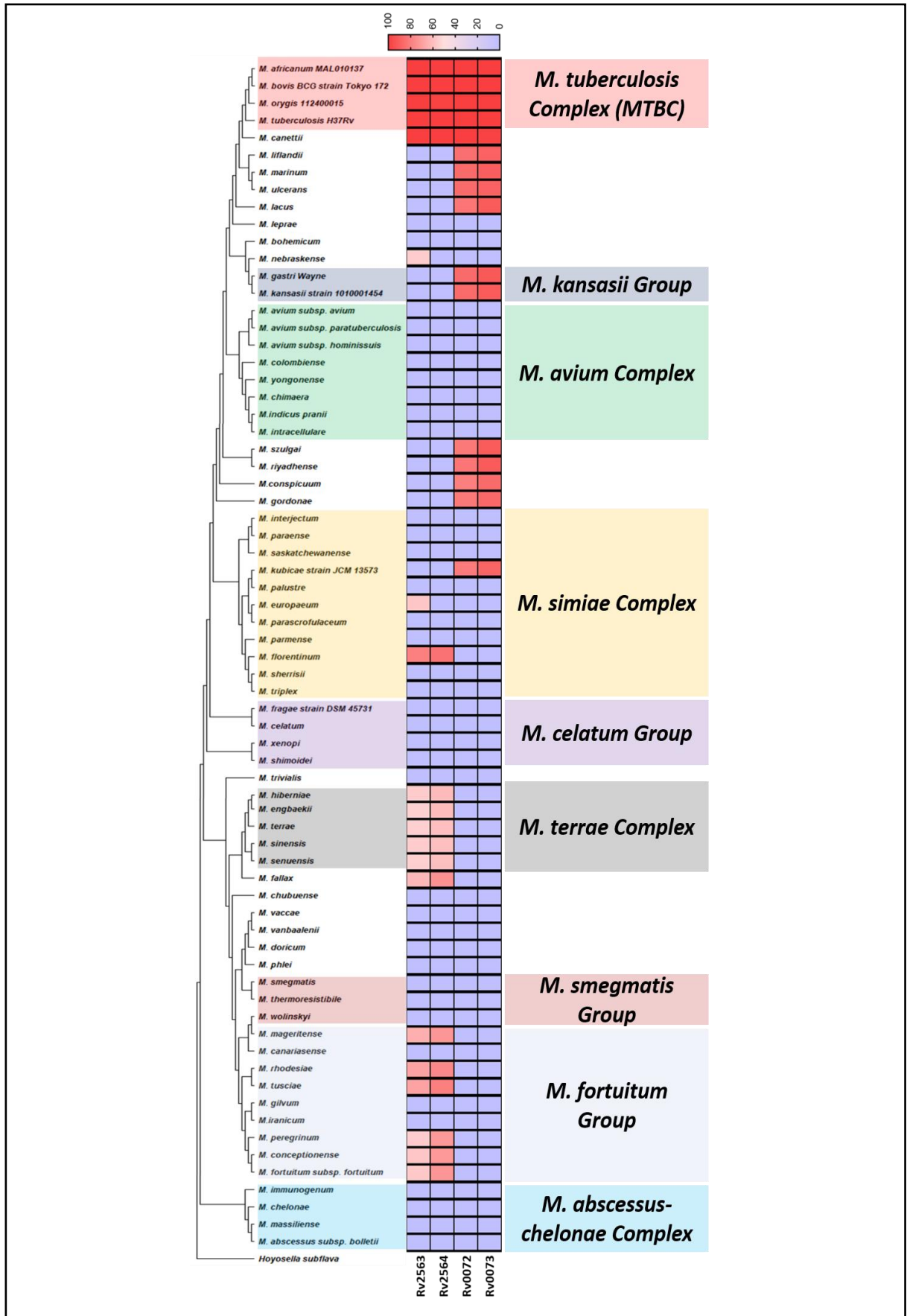


Figura 18 – Distribuição dos componentes Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073 em diferentes espécies de *Mycobacterium*. Árvore filogenética baseada na sequência 16s de

micobactérias produzida no programa MEGA 11 a partir do alinhamento com o programa Muscle e o algoritmo de Neighbor joining com 1000 bootstraps e análise estatística por *p-test*. Os componentes dos transportadores foram pesquisados na plataforma Patric através de BlastP com *cutoff* de e-value de 10^{-4} . Os resultados evidenciam que apenas espécies do MTBC e *M. canettii* apresentam os componentes dos dois transportadores, enquanto nas demais, há predominância de proteínas similares a um único transportador. A porcentagem de identidade das sequências é representada nas caixas coloridas, sendo vermelho as mais altas e azul as mais baixas.

Para analisar regiões funcionais das proteínas a partir da conservação de resíduos, utilizamos o programa CONSURF. Os resultados, apresentados para as TMDs e NBDs é mostrado na Figura 19C e 19D. A região com a maior variabilidade nas transmembranas corresponde aos resíduos 101 ao 150, ou a região periplasmática. Esta região nos sistemas tripartites, faz interação com os substratos e com a proteínas periplasmática adaptadora, MacA, que conecta o sistema de membrana interna com o sistema de membrana externa.

A variabilidade apresentada nas regiões periplasmáticas das proteínas indica que, se em micobactérias estes sistemas são funcionalmente similares, ou seja, transportam moléculas para o exterior celular, não há conservação entre as proteínas adaptadoras (putativas MacA, embora em MTB não identificamos nenhum ortólogo). É importante lembrar que o envelope de micobactérias é diferente daqueles caracterizados em gram positivas e gram negativas e pode refletir diferentes parceiros. Neste caso, os resultados sugerem que a estrutura do sistema é importante para a função de exportador, mas os tipos de moléculas a serem transportadas variam. O resultado da análise dos NBDs não foi surpreendente uma vez que mostrou a alta conservação do domínio catalítico e maior variabilidade no domínio regulatório entre os resíduos 219 a 330 (Figura 11D). Segundo os programas de predição de resíduos e bolsão de interação com moléculas, os resíduos Gly, Arg, Ser e Ala são conservados em todas as regiões regulatórias das proteínas avaliadas, com exceção das ATPases de *M. kansasii* e *M. szulgai*, as quais têm um C-terminal menor que as demais.

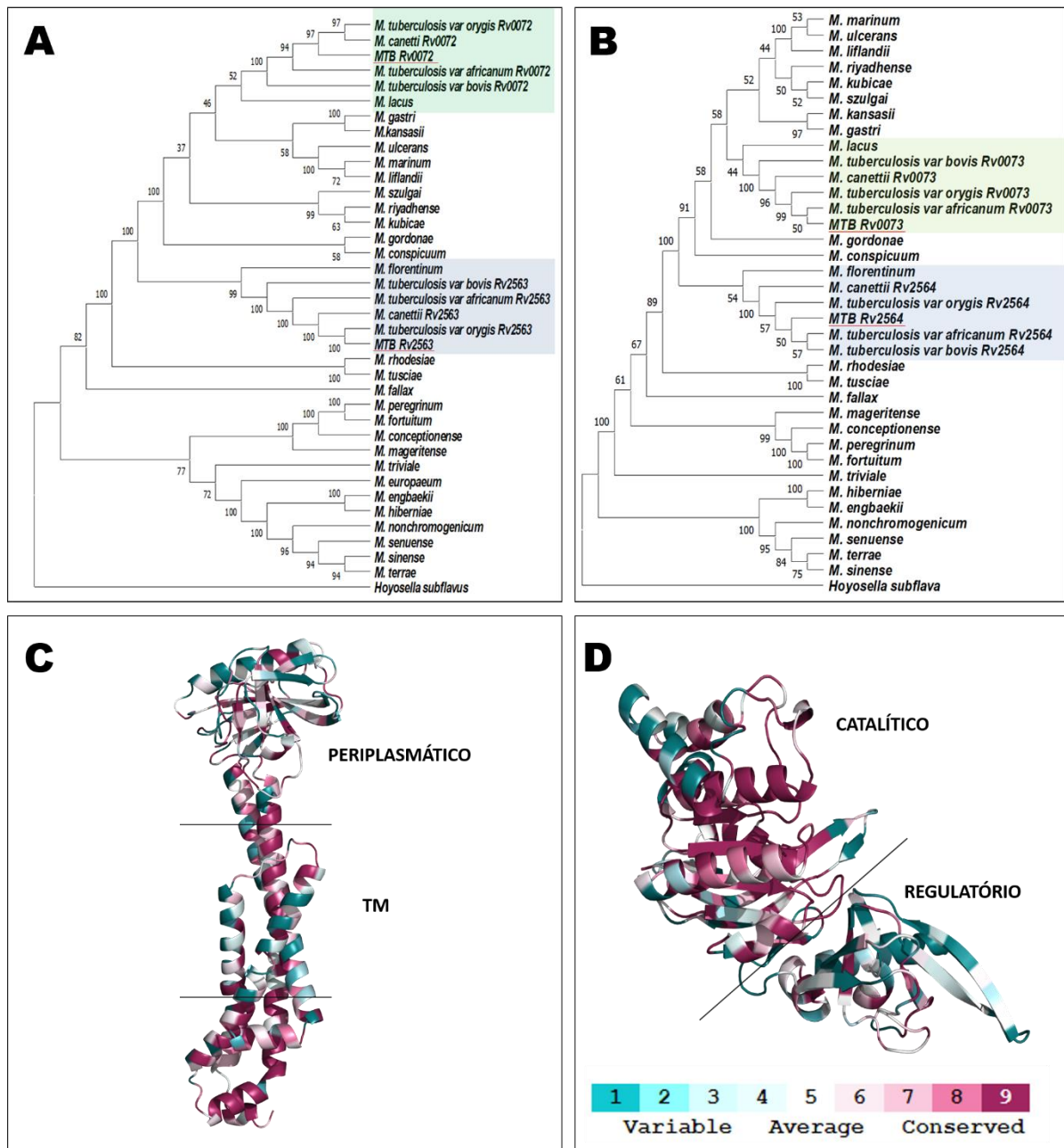


Figura 19 – Filogenia das permeases e ATPases dos sistemas Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073 de MTB. (A e B) Árvores filogenéticas dos componentes de membrana (TMDs) dos transportadores baseada em ortólogos de micobactérias. As árvores foram produzidas no programa MEGA 11 a partir do alinhamento realizado no Muscle com o algoritmo Neighbor-joining, 1000 bootstraps e *p-test* como teste estatístico. Os ortólogos correspondentes de *Hoyosella subflavus* foram utilizados como grupo externo. Rv2563 e Rv0072 como Rv2564 e Rv0073 são classificadas em grupos diferentes de membros do complexo. **(C e D)** Resultado da análise de conservação de resíduos utilizando o programa CONSURF para as TMDs e NBDs, respectivamente. Nas TMDs, a menor conservação encontra-se na região periplasmática que define parceiros de interação e, nas NBDs, a menor conservação está localizada no domínio regulatório. O padrão de conservação é indicado pela barra de cores do ciano (menos conservado) ao magenta (mais conservado).

O contexto genômico dos operons *Rv2563/Rv2564* e *Rv0072/Rv0073* revela regiões passíveis de recombinação e presença de genes relacionados à síntese de compostos essenciais de membrana

Ao analisarmos as regiões gênicas vizinhas do transportador operon *Rv2563/Rv2564* identificamos que a região à montante do gene *Rv2563* apresenta um ncRNA de função desconhecida (*mpr12* - 92bp), esse pequeno RNA não codificante foi identificado como sendo co-transcrito com o óperon *Rv2563-2564* (DICHIARA et al., 2010). Em um outro estudo com duas cepas colombianas isoladas e caracterizadas como hipervirulentas, em uma das cepas esse ncRNA se encontrou *downregulated* no cultivo em meio pobre em fonte de carbono (BAENA et al., 2019). À Jusante a *Rv2563* ainda encontramos gene que codifica uma proteína hipotética (*Rv2561*) e um gene que codifica uma transmembrana rica em prolina e glicina (*Rv2560*), cujo homólogo em *M. marium* se mostrou importante para a invasão em células THP-1 (Figura 20) (PLAZA et al., 2007).

Devido à sequência nucleotídica rica em repetições, as regiões com esses genes podem ser pontos de recombinação em MTB, que por ser um microrganismo intracelular não apresenta a entrada horizontal de genes como ferramenta para variabilidade genômica. Curiosamente entre o gene *Rv2560* e *Rv2561* encontramos um segundo ncRNA (*mpr11* - 69bp) À jusante do operon encontra-se outras duas proteínas hipotéticas, de função desconhecida.

O operon *Rv0072/Rv0073* apresenta em sua região à montante, um ncRNA (*ncRv10071* - 201bp) (DEJESUS et al., 2017b) de função desconhecida e a polimerase de transcrição reversa (*Rv0071*). Esse tipo de polimerase, em geral, é relacionada à presença de elementos genéticos móveis, como retrotransposons, que no caso, poderiam ser responsáveis por trocas gênicas do tipo inserções. À jusante do operon, encontram-se os genes responsáveis pela codificação das proteínas Xaa-pro dipeptidase (*Rv0074*) e cistationa beta-liase (*Rv0075*). A primeira proteína atua na hidrólise de ligações peptídicas (ARE et al., 2017) e a segunda, tem como substrato a cistationa, para produção de homocisteína, piruvato e amônia (EJIM et al., 2004, 2007).

A cistationa beta-liase é uma enzima essencial na via de síntese da metionina, uma vez que a homocisteína pode ser convertida diretamente em metionina pela metionina sintetase. A via de síntese de metionina está relacionada ao sistema de captação de sulfato em MTB, que tem como um dos produtos, compostos tiol utilizados na constituição da micomembrana.

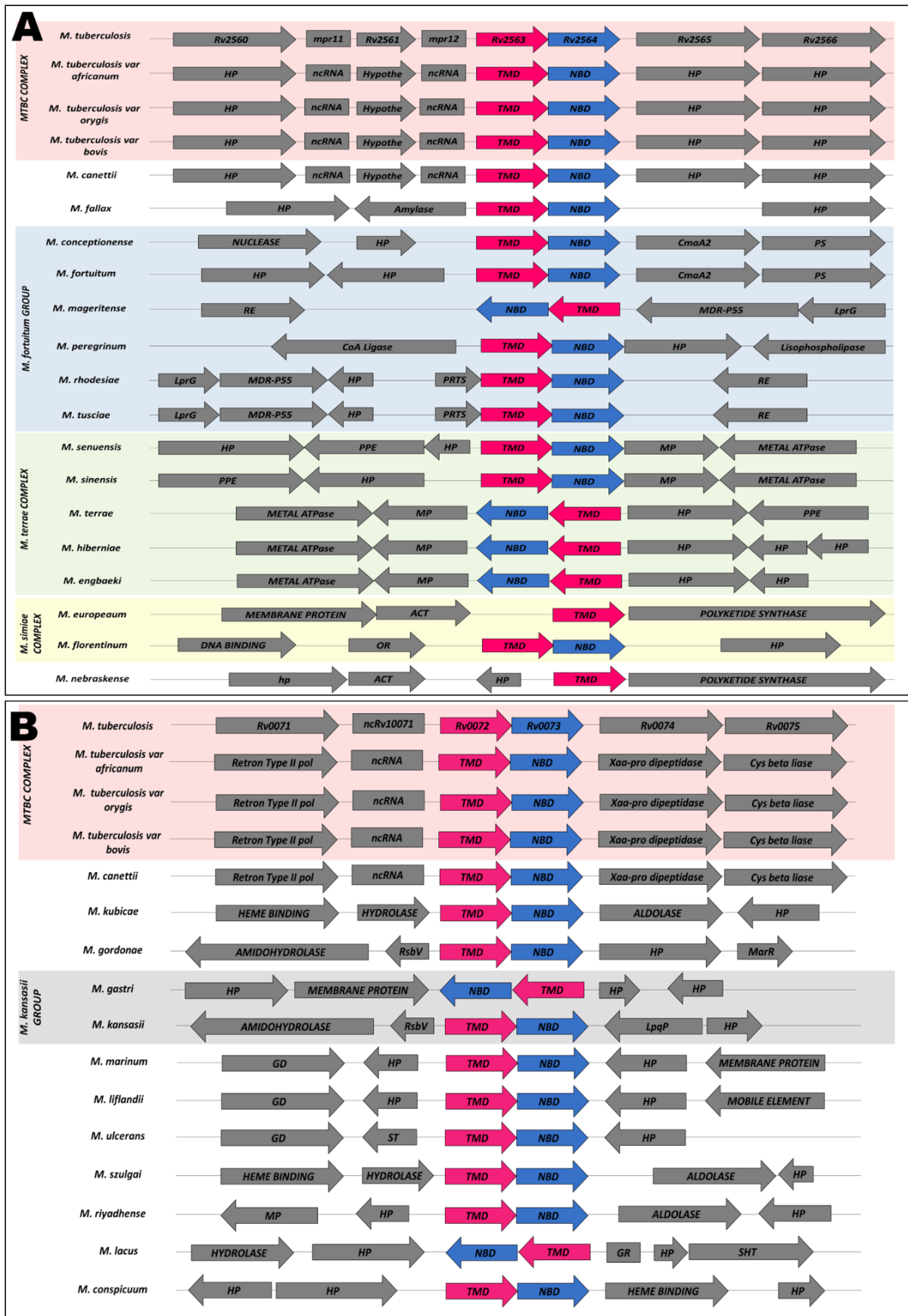


Figura 20 – Contexto genômico dos operons *Rv2563/Rv2564* e *Rv0072/Rv0073* de MTB.

(A) As regiões à montante e à jusante dos operons de MTB foram analisadas nas espécies do complexo *M. tuberculosis*, como em outras micobactérias (Tabela A1 – Capítulo I - Anexo). A organização genômica dos genes que codificam os transportadores e os genes adjacentes é conservada no MTBC, mas não nas demais espécies. Próximo ao operon *Rv2563/Rv2564* foram identificados genes que codificam proteínas de função hipotética e ncRNA próximo à uma proteína transmembrana rica em PG e de função desconhecida. (B) O operon *Rv0072/Rv0073* apresenta em suas proximidades um elemento de replicação de elementos móveis, além de genes que codificam enzimas ligadas à hidrólise de dipeptídeos e conversão de cistationa em homocisteína, piruvato e amônia. HP: proteína hipotética; PS: fosfolipase sintase; RE: ribulose epimerase; PRTS: Protease; ACT: acetiltransferase; OR: oxido redutase; GD: glutamato deacilase; ST: stats domain; MP: proteína de membrana; GR: glicina riboswicth; SHT: serina hidroximetil transferase.

O contexto genômico dos operons *Rv2563/Rv2564* e *Rv0072/Rv0073* revelou genes interessantes que podem estar relacionados tanto à função dos transportadores, como reciclagem de compostos da membrana ou síntese, como à origem dos sistemas.

Conclusão do capítulo

Nossas análises apontam para vários resultados convergentes: (i) similaridade estrutural com componentes da superfamília de sistemas de exclusão, mas sem apresentar conservação de resíduos funcionais, indicando que a função não necessariamente esteja relacionada à extrusão de drogas; (ii) presença de um domínio regulatório não presente em sistemas tripartites e que desta maneira, em MTB, poderia funcionar como um sensor para regulação da atividade de transporte; (iii) similaridade do domínio regulatório com domínios que interagem com cAMP, sendo esta molécula um possível substrato (a ser avaliado); (iv) contexto genômico com a presença de genes relacionados à síntese de compostos essenciais para o bacilo como para a constituição da membrana, (v) transportadores apresentam uma origem filogenética que sugere um antepassado que divergiu dando origem aos dois transportadores.

Os dados gerados nos ensaios de bioinformática nortearam os experimentos realizados e serviram como base para as estratégias da parte experimental do trabalho.

CAPÍTULO II

Caracterização estrutural e biofísica do transportador Rv2563-Rv2564

Como descrito anteriormente o transportador Rv2563-Rv2564 é composto por dois domínios funcionais: o domínio transmembrana Rv2563, responsável pela formação do poro de passagem do substrato na membrana; e o domínio ATPase, responsável pela hidrólise do ATP e fornecimento de energia ao sistema, o que culmina com as mudanças conformacionais necessárias para o transporte. Visando a caracterização estrutural e funcional do transportador foram planejadas duas abordagens distintas para a obtenção do complexo: (i) expressão e purificação dos componentes do transportador de forma independente, seguida da reconstituição *in vitro*; (ii) co-expressão e purificação do complexo.

Para a primeira abordagem, os genes *Rv2563* e *Rv2564* foram previamente clonados em vetores da linha pOPINE (https://www.addgene.org/Ray_Owens/) (BERROW et al., 2007), pela Dra. Andrea Balan, e realizados testes de expressão e purificação, conforme será discutido adiante. Para a segunda abordagem, os genes foram clonados em vetor multicistrônico e sua expressão e purificação também foram alvo de padronização.

Discutiremos primeiramente os resultados obtidos com a primeira abordagem que resultaram na obtenção de cristais para a proteína Rv2563 de maneira independente ao complexo.

A expressão da Rv2563 foi otimizada para os ensaios de caracterização estrutural e biofísica

Como comentado anteriormente o gene *Rv2563* havia sido previamente clonado pela Profa. Andrea Balan no Laboratório de Proteínas de Membrana (MPL) do Research Complex, Diamond Light Source, Inglaterra, nos vetores de expressão da linha pOPINE (https://www.addgene.org/Ray_Owens/) (BERROW et al., 2007). O gene da permease foi clonado com a fusão eGFP no C-terminal (pOPINE-3C-eGFP) com massa molecular esperada de 66 kDa (incluindo a fusão GFP). Primeiramente realizamos testes de expressão utilizando as cepas de *E. coli* C41(DE3), C43(DE3), BL21(DE3) e Lemo21(DE3) nos meios O/N Express[®] (Merck, Germany), Powerbroth[®] (AthenaES, USA), MemSTAR (LEE et al., 2014), Luria-Bertani e ZYM-5052 (STUDIER, 2005). Para a expressão nas células de *E. coli* Lemo21(DE3) diferentes concentrações de L-raminose (0 μ M, 250 μ M e 750 μ M) na ausência e presença de 0.4 mM de IPTG foram testadas para verificar as melhores condições para a produção da proteína.

Os testes de expressão da permease evidenciaram a banda de 66 kDa correspondente à proteína de interesse nas culturas das células C41(DE3) e C43(DE3) em meio O/N Express[®] sem adição de IPTG, Lemo21(DE3) induzidas com IPTG e sem L-raminose nos meios LB, ZYM-5052, Powerbroth[®], MemStar e O/N Express[®]. A cepa BL21(DE3) não apresentou expressão da proteína em nenhuma das condições testadas.

Além de observar a presença da proteína através do SDS-PAGE, a intensidade de fluorescência e a microscopia de fluorescência confirmaram a expressão da proteína nessas condições (Figura 21), sendo o melhor resultado obtido com a cepa Lemo21(DE3) cultivada no meio MemStar. O SDS-PAGE apresenta uma banda de 66 kDa que corresponde a Rv2563-GFP, essa banda não é observada na cepa sem indução, a banda foi mais intensa nas células Lemo21(DE3), sobretudo nos meios auto indutores com estímulo adicional de 0.4 mM de IPTG, conforme a figura 1A. Curiosamente no Brasil, a proteína foi expressa somente com a utilização da cepa Lemo21(DE3) nos meios auto indutores ZYM-5052 e MemStar. O maior controle da expressão obtida nesses meios permite uma obtenção de biomassa antes que os efeitos tóxicos da expressão da proteína de membrana causem a morte célula, o que resulta em um maior número de células expressando a proteína de interesse.

A fluorescência foi avaliada por espectrofotometria em placa de 96 poços, utilizando o comprimento de onda de 488 nm para excitação e 508 nm para emissão. As células foram lavadas e ressuspensas em PBS e células cultivadas sem indução da proteína foram utilizadas como branco. Os resultados corroboraram o que foi observado no gel de SDS-PAGE, mostrando que as células Lemo21(DE3) nos meios auto indutores sem a presença de L-raminose com adição de 0.4 mM de IPTG foram as melhores condições de expressão da Rv2563-GFP. A mesma célula apresentou comportamento completamente diferente em condições de cultivo distintas, onde a melhor expressão foi obtida em meio Memstar + IPTG (cerca de 8000 RFU) e a cultura de Lemo21(DE3) em Powerbroth[®] foi cerca de 2 vezes menor (cerca de 3800 RFU) (figura 21B). O meio MemStar já havia sido descrito como uma excelente alternativa para aumentar a expressão de proteínas de membrana, e em alguns casos, a produção foi 8 vezes maior que nos meios mais tradicionais para expressão de proteína em bactéria (LEE et al., 2014). As expressões em C41(DE3) e C43(DE3) apresentaram melhores resultados em meio O/N Express[®], e podem ser consideradas como uma alternativa para a expressão da Rv2563. Os valores para a cepa BL21(DE3) foram todos iguais ao controle não induzido, mostrando que não houve expressão nessa cepa.

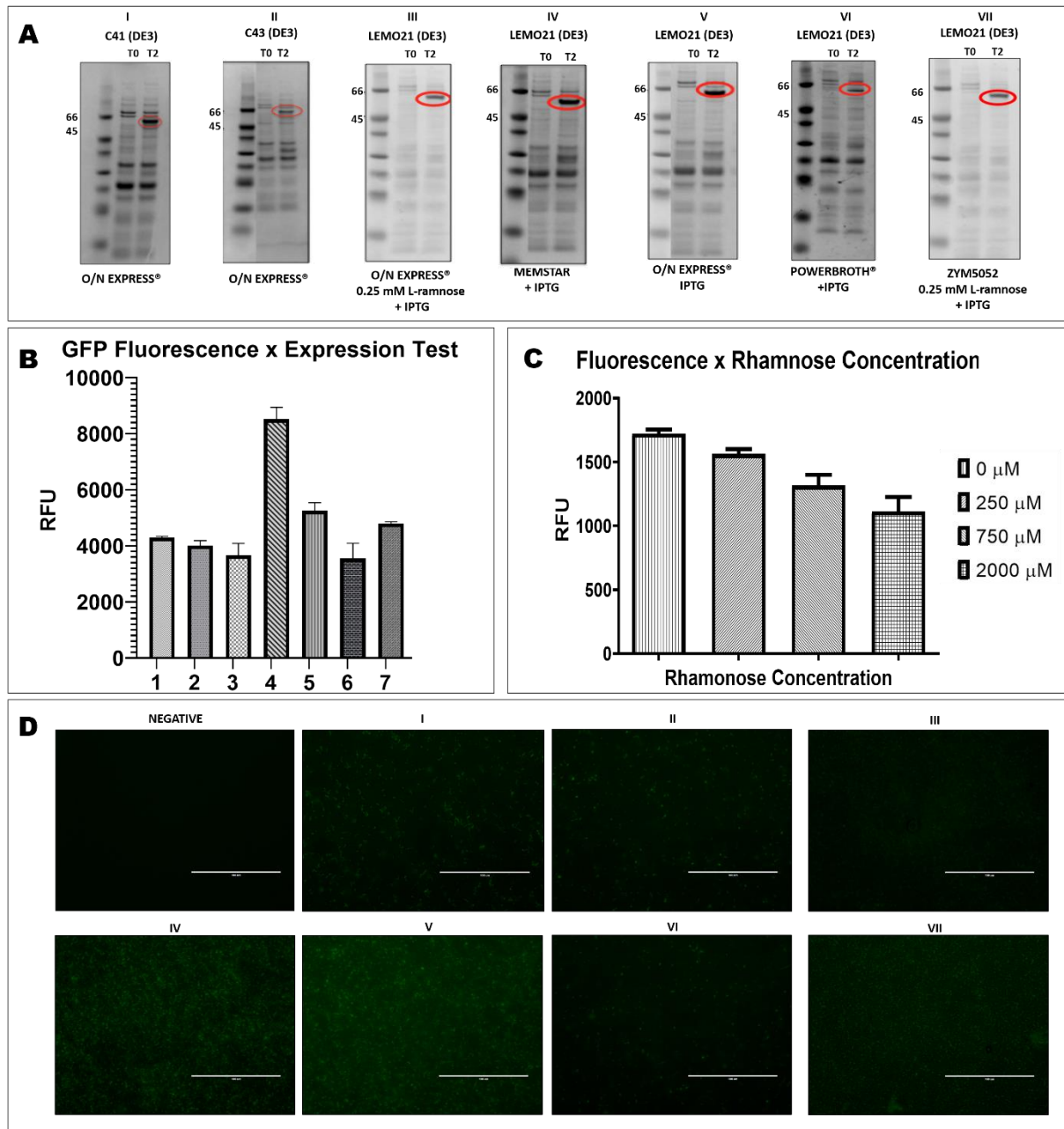


Figura 21 – Os testes de expressão da Rv2563-GFP mostram que a expressão em células Lemo21(DE3) em meios auto-indutores são mais eficientes. (A) Testes de expressão da Rv2563-GFP em diferentes condições de cultivo. SDS-PAGE com o controle não induzido (T0) e induzido (T2). Proteína Rv2563-GFP com 66 kDa I- C41(DE3) em meio O/N Express® sem adição de IPTG; II- C43(DE3) em meio O/N Express® sem adição de IPTG; III- Lemo21(DE3) em meio O/N Express® com 0.25 mM de L-raminose e 0.4 mM IPTG; IV- Lemo21(DE3) em meio MemStar com 0.4 mM IPTG; V- Lemo21(DE3) em meio O/N Express® com 0.4 mM IPTG. VI- Lemo21(DE3) em meio Powerbroth com 0.4 mM IPTG; VII- Lemo21(DE3) em meio ZYM-5052 com 0.25 mM de L-raminose e 0.4 mM IPTG. **(B)** Fluorescência relativa das células após a produção da Rv2563-GFP medida usando o equipamento SpectraMax M (Molecular Dimensions, UK) na placa de 96 poços. As condições de 1 a 7 correspondem às mesmas demonstradas para o SDS-PAGE. **(C)** Influência das concentrações de raminose na produção de Rv2563-GFP. A fluorescência das amostras com diferentes concentrações de raminose foi diminuída e o melhor resultado de expressão foi obtido sem adição do açúcar. **(D)**

Microscopia de fluorescência mostrando a expressão da GFP nas condições descritas no item A.

Um das vantagens da expressão em Lemo21(DE3) é que essa cepa alberga um plasmídeo resistente a cloranfenicol e que a adição de L-raminose induz a expressão da lisozima. A lisozima é um inibidor da T7 polimerase e permite um controle mais fino da expressão, indicado para proteínas de membrana, que em excesso, podem ser tóxicas a célula (SCHLEGEL et al., 2012). Ao realizarmos os testes em diferentes concentrações de raminose, identificamos que a melhor expressão foi na ausência do açúcar.

A expressão da Rv2563 em fusão com GFP foi visualizada por microscopia de fluorescência utilizando o filtro para a fluorescência da GFP (Figura 21D). A fluorescência da GFP está diretamente relacionada ao correto enovelamento da permease, uma vez que a proteína de fusão é localizada no C-terminal da permease.

Os detergentes DM e DDM apresentaram a melhor solubilização da proteína Rv2563, sendo que o DM foi padronizado para a purificação

Uma vez definido o protocolo de expressão, o próximo passo foi identificar o melhor detergente para a solubilização e estabilização da proteína Rv2563. Seguimos com ensaios de expressão da Rv2563-GFP em meio Memstar. Primeiramente, a membrana foi solubilizada com 1% de detergente (DM, DDM, UDM, LMNG, OG, CHAPS, CHAPSO, C12E8, CYMAL-5 e LDAO), incubados por 2 horas sob agitação, e depois ultracentrifugados por 2 horas a 41.000 rpm. As frações solúveis foram aplicadas no sistema F-SEC (Shimadzu Proeminence, Kyoto), portador de um detector de fluorescência conectado à coluna Sepharose 6 200 10/30, e a fluorescência avaliada em leitor de placa. Os resultados mostraram que os melhores detergentes para a solubilização do Rv2563 foram DM (n-Decil- β -D-Maltopyranoside), DDM (n-Dodecil- β -D-Maltopyranoside) e LMNG (Lauryl Maltose Neopentyl Glycol), nos quais a proteína apresentou maior homogeneidade e altos níveis de fluorescência em comparação com outros detergentes (Figura 22A e B).

Em placa, LDAO, UDM e OG também mostraram alta fluorescência, porém com comprometimento da homogeneidade da amostra, conforme visualizado pela presença de um número maior de picos no cromatograma.

O protocolo para solubilização das membranas e obtenção da proteína alvo foi seguido conforme apresentado em Materiais e métodos, mas foram necessárias alterações essenciais. O primeiro teste de purificação foi realizado com 0,3% de DM no tampão de lavagem e eluição,

mas os ensaios de cristalização mostraram separação de fases do detergente. Nesse caso, a melhor concentração de DM na purificação foi 0,26% e na solubilização, 1% do detergente.

O primeiro passo para purificação após a solubilização foi realizado por IMAC. Após a lavagem com três concentrações de imidazol (10, 20 e 30 mM) a proteína foi eluída em 6 frações de 3 ml cada, com 63 kDa e maior concentração nas frações 1 e 2. Um pouco de proteína foi eluída da resina na lavagem com 30 mM de imidazol, conforme a figura 22C.

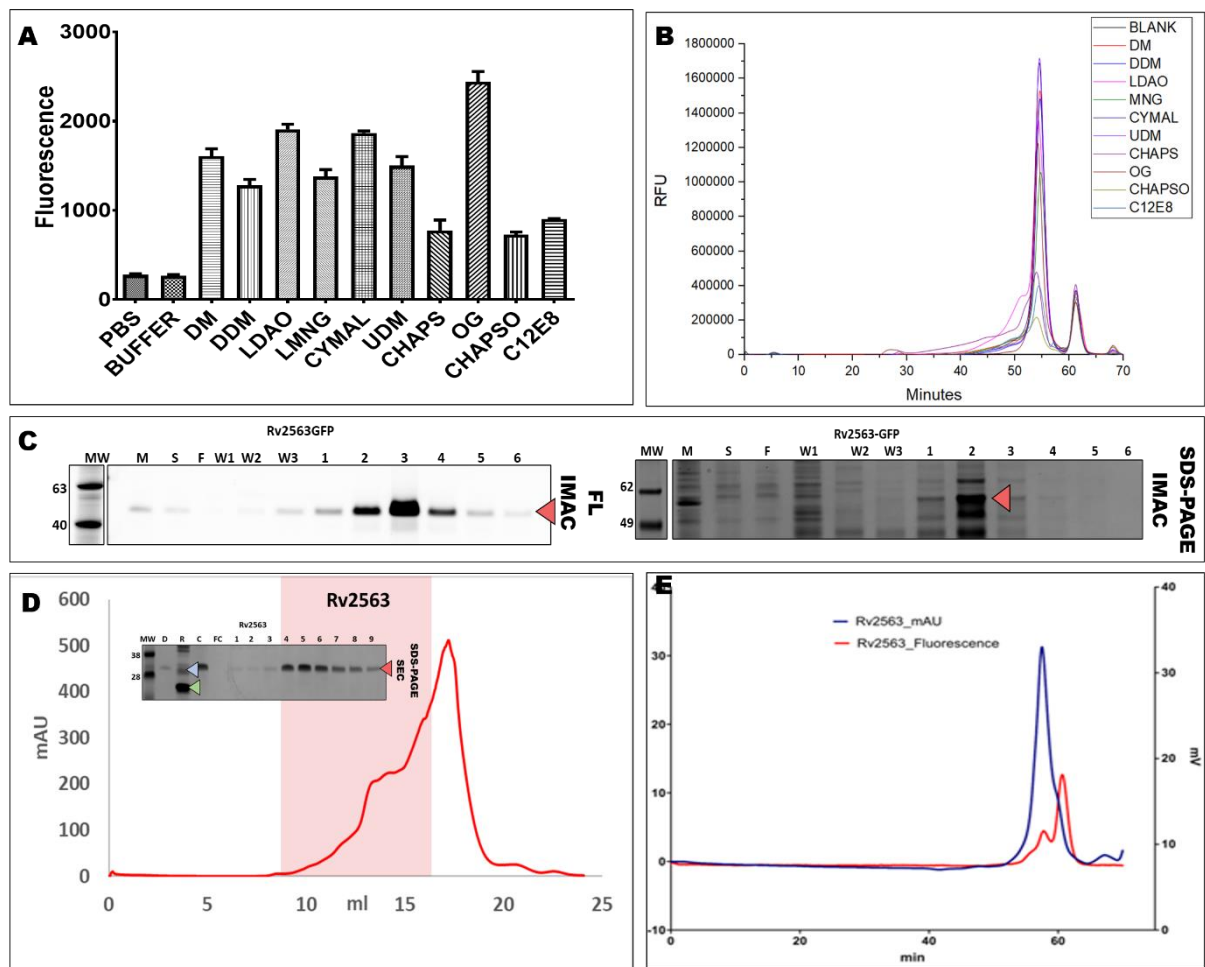


Figura 22 – O DM mostrou-se como o melhor detergente para a solubilização e purificação da Rv2563. (A) Análise da fluorescência em placa após a solubilização da Rv2563 em diversos detergentes, mostrando que o OG foi o melhor detergente em termos de solubilização total, sendo os níveis mais baixos de fluorescência obtidos para o CHAPS e CHAPSO. O DM e DDM mostram ótimos níveis de solubilização. (B) Triagem dos detergentes usando F-SEC. A purificação foi realizada em um Proeminence Shimadzu (Shimadzu, Kyoto) usando a coluna Sepharose 6 200 10/30 e detector de fluorescência 488/509 nm. Os melhores picos que apresentaram alta intensidade e homogeneidade foram obtidos com os detergentes DM e DDM. (C) Géis de fluorescência e SDS-PAGE da IMAC para a proteína Rv2563-GFP. A proteína Rv2563-GFP foi purificada por afinidade por níquel usando a cauda de 6 histidinas presente no C-terminal da GFP. O gel de fluorescência mostra a proteína com aproximadamente 60 kDa nas frações 1 a 6 da eluição com 250 mM de imidazol e 0.26% de DM. O gel corado com Comassie blue mostra uma concentração mais alta da proteína nas frações 2, 3 e 4. As amostras

eluídas, contudo, apresentam contaminantes. A seta vermelha indica a Rv2563. M- Membranas; S- solubilização; F- Flow through; W1- lavagem com 10 mM imidazol; W2- lavagem com 20 mM imidazol; W3- lavagem com 30 mM de imidazol; 1-6: frações de eluição. **(D)** Purificação por exclusão molecular após clivagem da GFP com 3C protease. O gel de fluorescência no comprimento de onda 488/509 mostra a GFP, indicada pela seta verde, com 25 kDa. Este resultado mostra que a clivagem com 3C foi realizada satisfatoriamente. No gel corado com Comassie Blue a proteína Rv2563 apresenta 36 kDa, nas frações 4 a 9 (12 a 15 ml da coluna). A seta vermelha corresponde a Rv2563 após a SEC, a seta azul a 3C protease e a seta verde a GFP após clivagem por 3C. R: R-Imac, C: concentrador, FC: Flow concentrador. O perfil da SEC mostra um pico largo para a Rv2563 (região demarcada em vermelho). O pico mais alto evidenciado após o pico da Rv2563 corresponde à 3C protease residual. **(E)** F-SEC da amostra Rv2563 purificada em coluna Sepharose 6 200 10/30. A proteína Rv2563 detectada em comprimento de onda de 280 nm apresentou-se homogênea (linha azul).

A cauda GFP foi retirada através da diálise com 3C protease realizada a 4°C por 16 horas seguida de R-IMAC. Após a concentração da Rv2563 sem cauda, a amostra foi submetida à SEC e a proteína eluída nas frações de 12 a 15 ml da coluna (pico maior). Outros picos são visualizados no cromatograma da SEC, o que é comum em perfis de proteínas de membrana. A proteína Rv2563 (36 kDa) estava presente nas frações D12 até E2 (caixa vermelha) com alto grau de pureza, propício para a realização dos ensaios de cristalização. Curiosamente, nas frações correspondentes ao ponto máximo do pico não observamos a proteína Rv2563, mas uma banda de massa molecular menor que poderia ser a 3C protease ou a GFP. Uma segunda F-SEC foi realizada com a amostra purificada para avaliar a homogeneidade da Rv2563. O perfil resultante mostra um pico de Rv2563 a 280 nm homogêneo, com um desvio no final correspondente a fluorescência da 3C e GFP residuais (figura 22E).

A Rv2563 se apresentou mais estável e homogênea na presença dos detergentes DM e LMNG

A estabilidade das amostras da proteína Rv2563 foi avaliada em ensaios de espalhamento dinâmico de luz (DLS) com diferentes detergentes na presença e ausência de glicerol. As medições foram feitas durante 48 horas à temperatura ambiente e os resultados de todas as condições testadas estão disponíveis nos anexos (Figura A1, Capítulo II – Anexo). Os resultados são apresentados como mapas de calor, onde quanto mais definida a linha, maior a estabilidade e homogeneidade da amostra. Os melhores detergentes foram DM e LMNG. Nestas condições, contudo, as amostras apresentaram uma população com massa molecular estimada em 22 kDa, que seria menor que o monômero da Rv2563 (massa esperada de 35 kDa).

É possível que por apresentar um envelope mais alongado do que o esperado para proteínas globulares, as medidas tenham sido distorcidas no espalhamento dinâmico de luz. Além disso, todas as estruturas de MacB resolvidas até o momento foram resolvidas em complexo com a ATPase que tem um papel importante na dimerização do complexo. Como nas nossas amostras temos apenas a Rv2563, é possível que a formação do dímero não seja favorecida, conforme a figura 23.

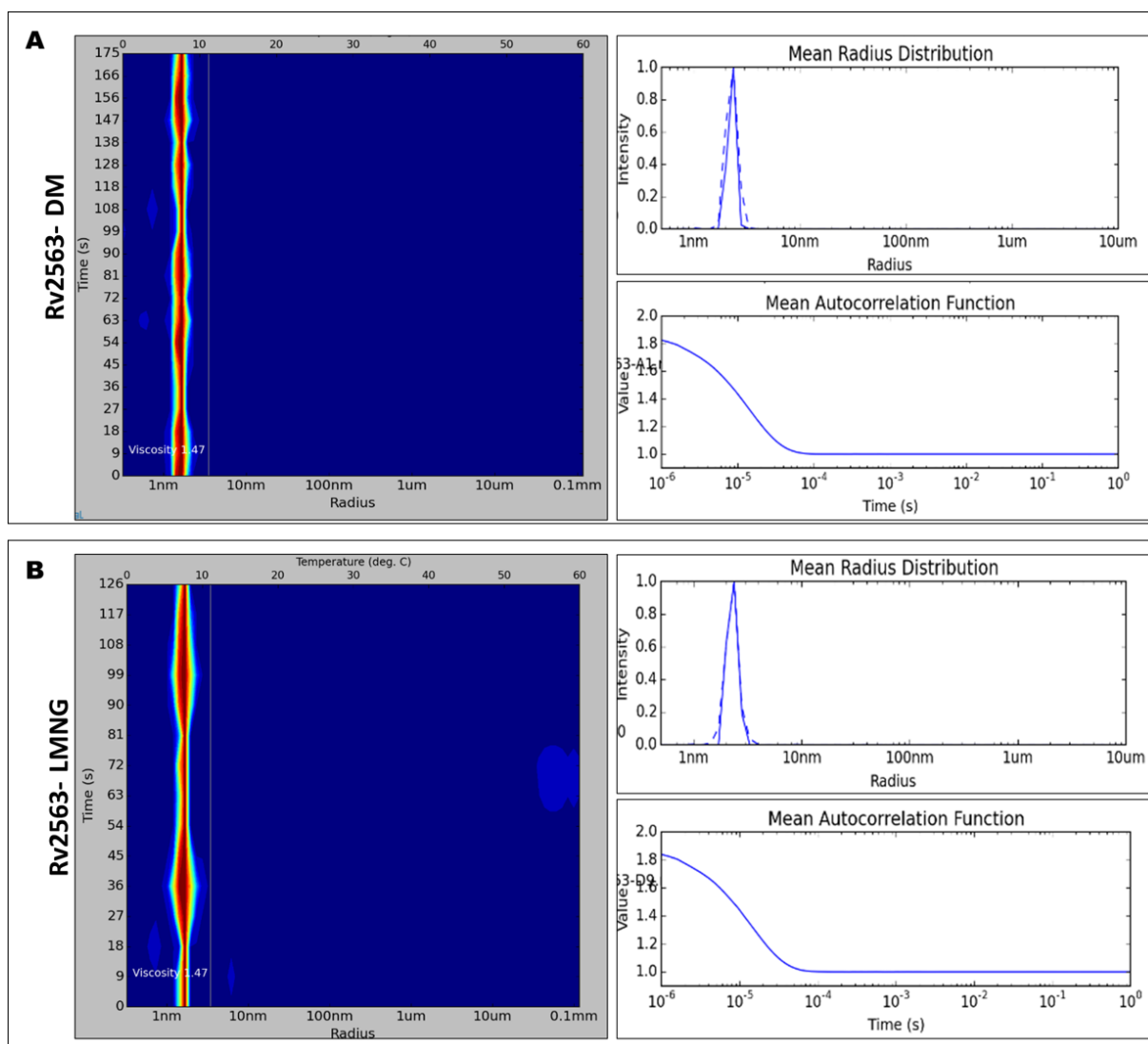


Figura 23 – DLS das amostras de Rv2563 na presença de DM (A) e LMNG (B). As amostras apresentaram um perfil estável e homogêneo ao longo de toda a análise, evidenciando um único pico correspondente a massa molecular de 22 kDa, que embora não corresponda à massa esperada (35 kDa), poderia corresponder a um estado monomérico da proteína.

A Rv2563 foi cristalizada pelo método de difusão de vapor que resultaram em cristais com difração a 4.9 Å

Como nenhum dos componentes do transportador Rv2563-Rv2564 foi caracterizado até o momento, decidimos realizar alguns ensaios de cristalização com a Rv2563 que foi produzida em purificada em condições ideais para a cristalização. Após as primeiras purificações, usamos a proteína para fazer os primeiros ensaios de cristalização usando a técnica sitting-drop no robô Mosquito. A proteína foi concentrada usando o concentrador de 50 kDa cutt-off. O volume final foi de 20 µL com 12 mg/ml. As gotas foram ajustadas para 50 nL de proteína + 50 nL de precipitante usando o kit MEMGOLD 1 e 2 e 30 µL de solução mãe no reservatório. As placas foram incubadas a 20 °C e a formação de cristais foi verificada em diferentes intervalos de tempo. Alguns poços mostram uma forte separação de fases do detergente e, por isso, decidimos usar 0.26% do DM para a próxima purificação, uma vez que o concentrador com corte de 50 kDa aumenta a concentração de detergente e o de 100 kDa permite a passagem e manutenção da proteína no filtrado.

Nas próximas purificações de Rv2563 usando o DM, os resultados foram semelhantes à purificação anterior e testamos a cristalização pela técnica de *sitting-drop*, com amostras concentradas a 5 mg/ml, 10 mg/ml e 12 mg/ml. Os *screenings* utilizados foram MemGold 1 e 2, MemStart, MemSys, MemPlus e MemMeso (Molecular Dimensions, UK).

Dados de difração dos cristais foram coletados na linha microfocos do Diamond Light Source, Inglaterra. Esses cristais inicialmente não apresentaram difração suficiente, sendo a condição E9 do screening MemGold (0,1 M Tris pH 8.0; 0,1M NaCl, 0,1 M CdCl₂, 33% PEG400) a mais promissora. De fato, novas triagens com amostras concentradas a 15 mg/ml originaram múltiplos cristais que difrataram a 7 Å. A partir desses resultados foram realizados ensaios de refinamento das condições de cristalização. A partir da condição original de cristalização, variou-se o pH (7.0, 7.5, 8.0 e 8.5), a concentração de NaCl (0.075 M, 0.1 M, 0.125 M e 0.15 M) e a concentração de PEG 400 (31% a 36%). Muitas das condições formaram cristais em 48 horas, mas somente nas condições com 34% PEG, 0.1 M Tris pH 8.0; 0.15 M cloreto de sódio e 0.1M cloreto de cádmio e 35% PEG, 0.1 M Tris pH 8, 0.15 M cloreto de sódio e 0.1 M cloreto de cádmio, foi possível obter cristais que difrataram a 4.95 Å (Figura 24B). Apesar do aumento da resolução, os cristais obtidos tinham a forma de barras muito finas que apresentaram alto grau de anisotropia, prejudicando a indexação dos dados para resolução da estrutura.

Paralelamente ao método de difusão de vapor, realizamos um teste de cristalização usando a metodologia de fase cúbica de lipídios (Lipid Cubic Phase, LCP). Amostras de Rv2563 purificada em 0.26% de DM foram misturadas com MAG em seringa até a obtenção da mesofase. Foram testadas 384 condições mas nenhuma originou cristais.

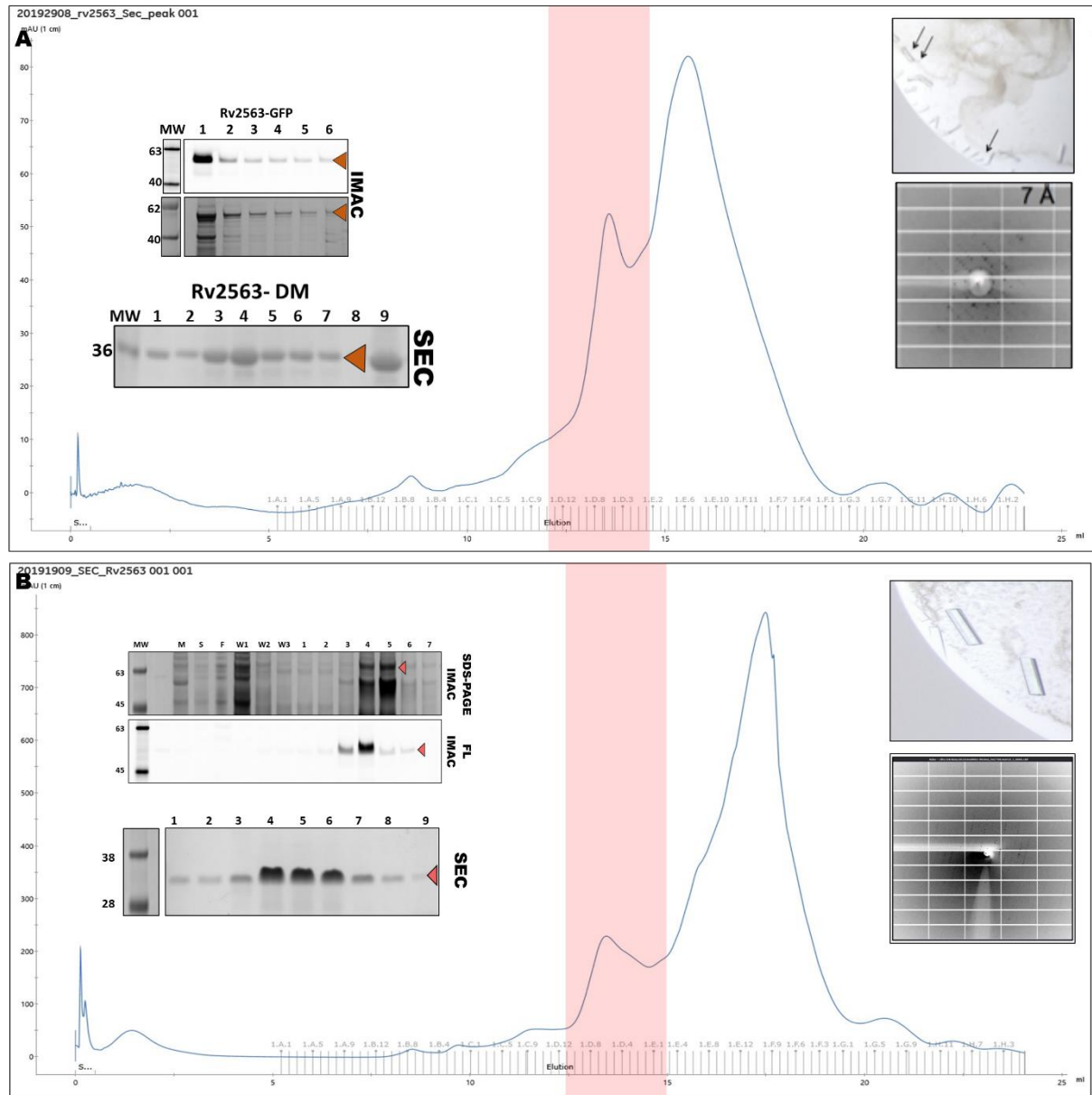


Figura 24 – Purificação e cristalização da Rv2563. (A) Purificação de Rv2563 em DM utilizando IMAC e F-SEC resultou em cristais que difrataram a 7 Å. IMAC da Rv2563-GFP mostrando a banda da proteína a 63 kDa. O cromatograma após a clivagem da Rv2563 com 3C protease apresentou dois picos, sendo que a proteína Rv2563 estava presente primeiro pico (caixa vermelha, total de 9 frações). SDS-PAGE das frações presentes no pico 1 evidenciando a banda de 36 kDa correspondente à Rv2563. Cristais da Rv2563 obtidos em 0.1 M Tris pH 8.0, 0.1M NaCl, 0.1 M CdCl₂ e 33% PEG400 difrataram a 7 Å de resolução. (B) Purificação e cristalização da Rv2563 após refinamento de pH e concentração do precipitante. IMAC de Rv2563-GFP. M- Membranas; S- solubilização; F- Lavado; W1- lavagem com 10 mM

imidazol; W2- lavagem com 20 mM imidazol; W3- lavagem com 30 mM de imidazol; 1-9: frações de eluição. Cromatograma da SEC evidenciando a presença da Rv2563 no primeiro pico (caixa vermelha). Cristais obtidos em 0.1 M Tris pH 8.0; 0.1M NaCl, 0.1 M CdCl₂ e 35% PEG400 difrataram a 4.95 Å as apresentaram-se anisotrópicos de forma a impedir a determinação do grupo espacial.

A Rv2563 foi inserida com sucesso em nanodiscos lipídicos

Os nanodiscos constituem uma metodologia de reconstituição de proteínas de membrana baseada na substituição dos detergentes usados na purificação, por uma proteína de sustentação (*scaffold*), que forma um complexo ao redor das regiões hidrofóbicas e transmembranares das proteínas. Neste caso, forma-se um complexo onde a proteína de membrana envolvida pela proteína *scaffold* assume uma organização similar a que apresenta na membrana. Utilizamos como *scaffold* a proteína MSP1 (VIEGAS; VIENNET; ETZKORN, 2016), de acordo com o protocolo descrito em Material e Métodos. O aspecto da proteína após o tratamento com Bio-Beads era claro e nenhum sinal de precipitação foi observado. O perfil da SEC mostrou um pico entre 8-12 ml da coluna, no qual a fração até 8 ml corresponderia ao volume morto da coluna e aos agregados de proteínas. A análise das amostras correspondentes ao centro do pico (excluindo o ombro inicial) revelaram a presença da proteína MSP1 entre 29-17 kDa e a Rv2563 entre 38-28 kDa (Figura 25).

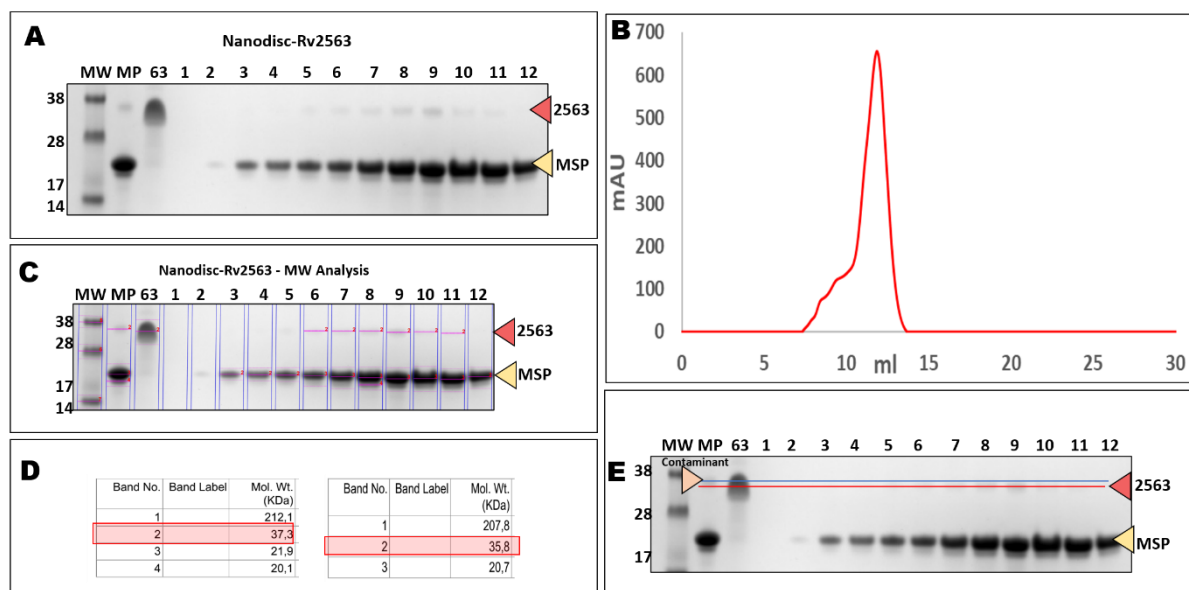


Figura 25 – Reconstrução da Rv2563 em nanodiscos contendo lipídios e a proteína MSP1 como *scaffold*. (A) SDS-PAGE 15% mostrando a banda correspondente à proteína MSP1 com 20 kDa (seta amarela) e a banda de 36 kDa correspondente à Rv2563 (seta vermelha). (B) Perfil da SEC dos nanodiscos de Rv2563. (C) Análise pelo software Image lab para avaliação da

massa molecular dos componentes do nanodisco. **(D)** A estimativa de massa molecular da proteína nas frações da SEC é correspondente a 36 kDa, indicando a reconstituição da Rv2563 nos nanodiscos. **(E)** Presença de uma terceira banda contaminante em torno de 38 kDa (linha azul).

Os resultados sugerem a presença de Rv2563 reconstituída nos nanodiscos, o que será confirmado por espectrometria de massas para futuras análises de interação com Rv2564 e estruturais por SAXS.

A Rv2564 foi expressa e purificada a partir da construção Rv2564-Halo

A Rv2564 foi um dos principais desafios para a obtenção do complexo. A primeira construção testada para a Rv2564 foi com o plasmídeo pOPINE-RSE contendo a Rv2564 (Can^r) que resulta em uma proteína de 36 kDa sem fusão. As condições testadas consistiram nas mesmas testadas para a proteína Rv2563 inicialmente com as cepas *E. coli* C41(DE3), C43(DE3), BL21(DE3) e Lemo21(DE3) nos meios O/N Express[®], Powerbroth, MemSTAR, Luria-Bertani e ZYM-5052(STUDIER, 2005)(STUDIER, 2005)(STUDIER, 2005)(STUDIER, 2005)(STUDIER, 2005)(STUDIER, 2005)(STUDIER, 2005)(STUDIER, 2005)(STUDIER, 2005)(STUDIER, 2005). A expressão não foi detectada em nenhuma das condições testadas, incluindo a expressão a 37 °C.

Para novos testes de produção desta proteína, escolhemos a construção no vetor pOPINE com cauda Halo no C-terminal da proteína e resistência à canamicina. Foram realizados testes de expressão nas células *E. coli* BL21(DE3) e Rosetta2 pLys a 37°C e 25°C, indução por 4 horas e overnight, respectivamente, após a adição de duas concentrações de IPTG (0.4 e 1 mM) em meio LB. A proteína foi expressa nas duas células a 37°C com massa molecular de 69 kDa (proteína + fusão) e não houve diferença na produtividade em relação à quantidade de IPTG.

A purificação foi realizada, primeiramente, por cromatografia de afinidade e resultou na eluição da Rv2564 com 120 mM de imidazol, a qual foi submetida à clivagem da cauda Halo com protease 3C, em membrana de diálise com corte de 3 kDa. Infelizmente, após a clivagem da cauda, houve precipitação da Rv2564, explicada principalmente pela presença de regiões hidrofóbicas expostas que interagem com a hélice de associação das permeases. Desta forma, visando aumentar a estabilidade da proteína, procedeu-se nova purificação no mesmo tampão mas com a adição de 5 mM de MgCl₂ e 1 mM de ATP. O MgCl₂ e o ATP são, respectivamente, co-fator e substrato para as ATPases e podem ajudar a estabilizar e solubilizar a proteína com maior proficiência.

A proteína foi purificada por afinidade a metal e o SDS-PAGE mostra a presença de duas bandas de 69 e 62 kDa nas 14 frações obtidas, correspondentes a Rv2564-Halo. A proteína foi então submetida à clivagem da cauda Halo pela protease 3C através de diálise para troca de buffer sem imidazol e retirada do ATP que influencia na absorção da UV para a cromatografia de exclusão molecular. A Halo-tag e a 3C protease foram então capturadas pela R-IMAC e a Rv2564 concentrada e purificada em cromatografia de exclusão molecular.

A exclusão molecular evidenciou dois picos, sendo que o primeiro pico foi identificado com 17 ml de coluna, enquanto o segundo obteve sua máxima com cerca de 22 ml de corrida. Os volumes de eluição sugerem o primeiro pico com uma massa próxima a 70 kDa que corresponderia ao estado dimérico da Rv2564, enquanto o volume de eluição do segundo pico sugere a presença de um monômero com 36 kDa (Figura 26). O SDS-PAGE mostrou uma proteína correspondente a 36 kDa em ambos os picos o que corresponde a Rv2564.

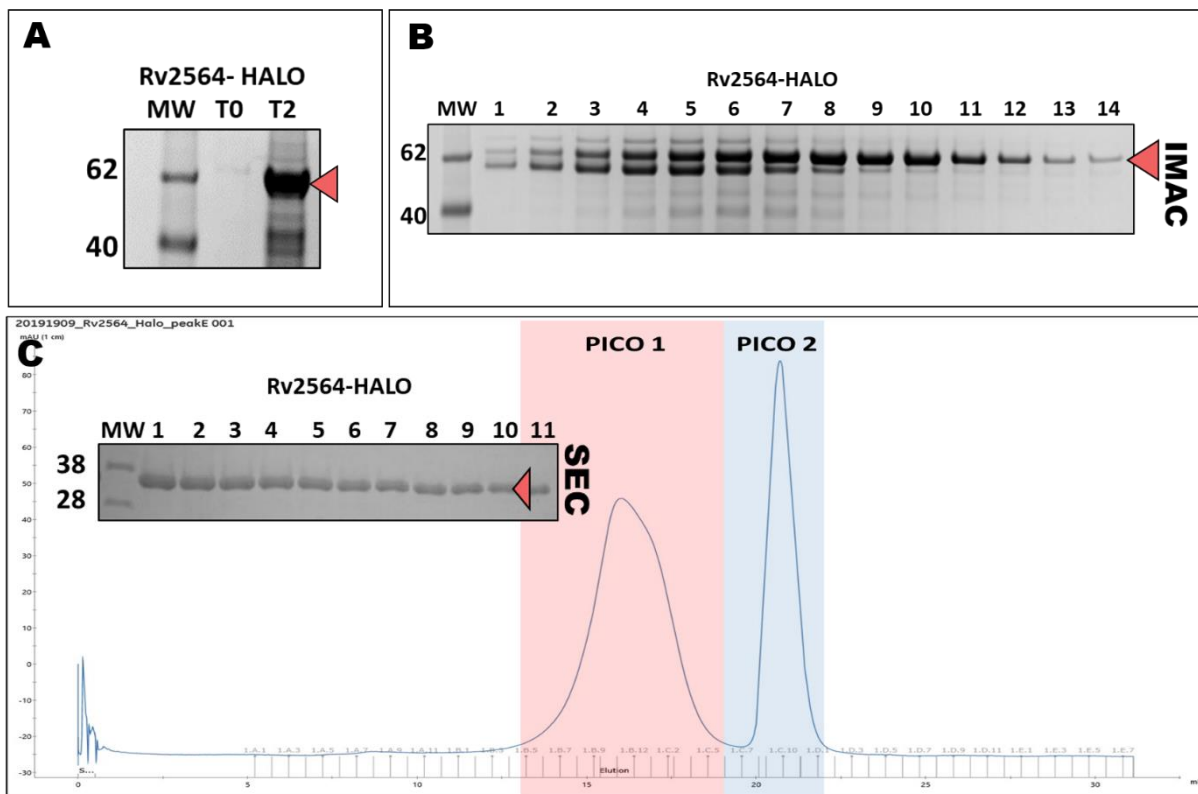


Figura 26 – A proteína Rv2564 foi expressa e purificada na presença de ATP e cloreto de magnésio. (A) SDS-PAGE com as células antes e após a indução com 0.4 mM IPTG. A proteína Rv2564-Halo foi expressa em células BL21(DE3), as melhores condições foram 37 °C, IPTG 0,4 mM e 4 horas da expressão. A banda da Rv2564-Halo com 62kDa, indicada pela seta vermelha. **(B)** SDS-PAGE com as frações da IMAC. A banda da proteína Rv2564 foi identificada com 62 kDa, seta vermelha. A proteína estava presente nas frações eluídas com 14-36% do tampão. Nas mesmas frações é possível ver uma segunda banda mais próxima do Rv2564-Halo. **(C)** Purificação por exclusão molecular mostra a Rv2564 com 36 kDa. O perfil

SEC apresenta dois picos, o primeiro pico destacado pela caixa em vermelho e o segundo pico destacado em azul. O SDS-PAGE mostrou que ambos os picos contêm a proteína Rv2564. As frações de 1 a 7 correspondem ao primeiro pico e as frações 8 a 11 ao segundo pico.

As tentativas de formação do complexo Rv2563-Rv2564 com as proteínas purificadas mostraram que as proteínas são eluídas independentemente

Decidimos testar a formação do complexo utilizando as proteínas purificadas Rv2563 e Rv2564 a partir das construções GFP e Halo, respectivamente, misturadas em concentrações equimolares de 120 μ M, incubadas *overnight* a 4°C e em seguida aplicadas na SEC. A avaliação da formação do complexo foi realizada na coluna Superose 6 3.2/300 mais indicada para procedimentos analíticos de complexos. O perfil de SEC das proteínas separadas foi utilizado para comparação com o pico do complexo. Como a Rv2564 apresentou dois picos na SEC, realizamos os testes de formação do complexo com Rv2563 com os dois picos separadamente.

O perfil da SEC revelou que não houve formação do complexo pois as proteínas foram co-eluídas com o mesmo padrão das amostras isoladas (Figura 27). Rv2563 e Rv2564 apresentam massas moleculares próximas a 36 kDa (monômero) e 72 kDa (dímero) e são eluídas conjuntamente. No caso de formação dos complexos funcionais, como esperados na membrana, deveríamos observar um pico deslocado no cromatograma correspondente a 144 kDa, o que não foi identificado.

Considerando esses resultados, especulamos que a co-expressão dos componentes do transportador poderia ser mais eficiente para a formação do complexo ou aplicação de outras estratégias que tenham como objetivo forçar a manutenção deste, como *crosslink*, obtenção de mutantes, purificação da ATPase na presença de análogos de substratos e variações nas condições dos ensaios do complexo.

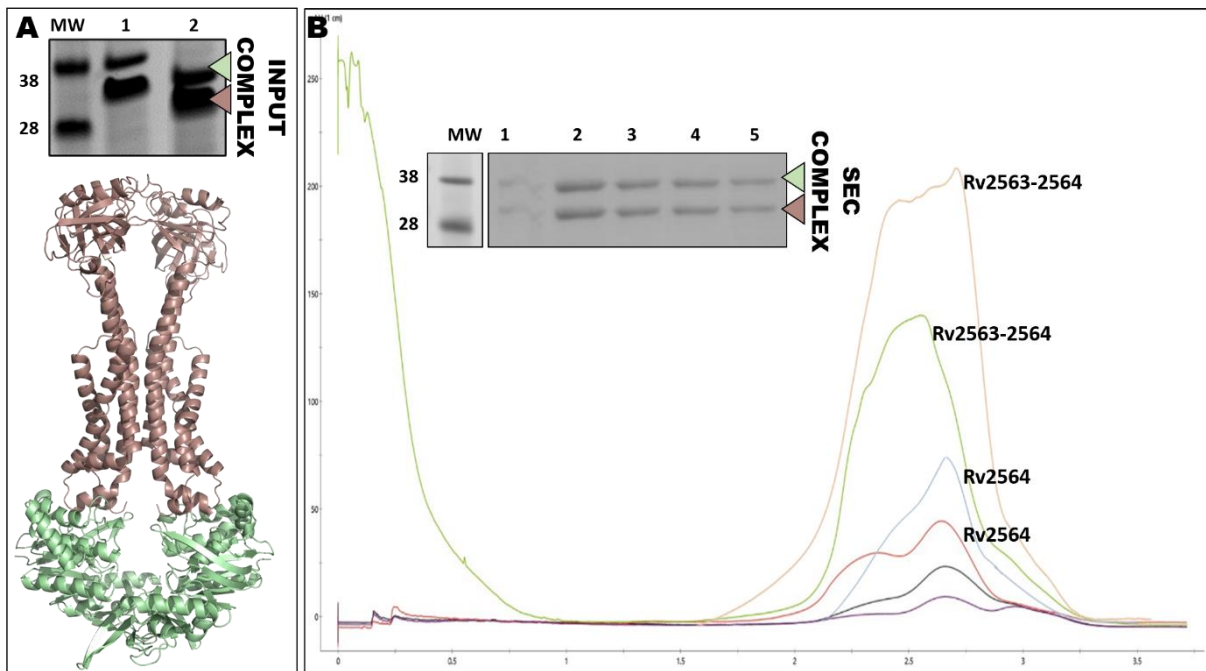


Figura 27 – O ensaio de reconstituição do transportador Rv2563-Rv2564 mostra proteínas co-eluindo sem formação do transportador completo. (A) SDS-PAGE do ensaio de reconstituição do transportador. 120 μ M de cada uma das proteínas foram incubadas em 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl e 5% de glicerol a temperatura de 4°C por 16 horas. (B) Cromatograma da exclusão molecular dos componentes do transportador e do complexo Rv2563-Rv2564. Embora tenha sido observado um pequeno deslocamento da curva no complexo, o deslocamento não corresponde ao que se espera para a formação do transportador com 144 kDa. A seta vermelha mostra a Rv2563 e a seta verde a Rv2564. O SDS-PAGE mostra que as proteínas co-eluíram juntas com 2,8 ml de coluna, não observamos, portanto, um deslocamento da eluição como se esperava na formação do complexo.

Produção do transportador a partir da co-expressão dos genes clonados em vetor pRSF

Considerando que a reconstituição do transportador é um importante ponto para a caracterização estrutural e funcional deste, fizemos uma clonagem dos genes *Rv2563* e *Rv2564* no vetor pRSF-Duet visando a co-expressão e, desta forma, tentamos obter quantidades equivalentes de permease e ATPase. Os genes foram clonados como descrito no Material e Métodos, primeiramente a *Rv2563*, e após confirmação dos clones positivos, *Rv2564* no segundo sítio múltiplo de clonagem (Figura 28A).

Testamos as condições de expressão em células de *E. coli* Lemo21(DE3), BL21(DE3) e Rosetta2 pLys nas temperaturas de 25°C e 18°C com adição de 0.4 mM de IPTG no momento que as células atingiram a O.D.₆₀₀ de 0.5 e expressão por 16 horas. A massa molecular teórica para *Rv2563* e *Rv2564* são de 37.63 kDa e 35.42, respectivamente, figura 28B.

A produção da Rv2563 foi verificada em ensaios de Western blot com anticorpos contra a cauda de histidina (anti-his6). Como a Rv2564 foi clonada sem nenhuma cauda, não foi possível confirmar sua produção neste ensaio, mas esperávamos co-purificar o complexo a partir da cauda de his6-tag presente na Rv2563. A proteína Rv2563 foi identificada em todas as condições testadas, mas foi produzida em maior quantidade na célula Rosetta2 pLys, conforme observado no ensaio de Western blot.

A partir desse resultado realizamos uma expressão piloto de 2 litros para posterior padronização da purificação visando a obtenção do complexo. Após a expressão realizamos a purificação inicial conforme o protocolo anteriormente estabelecido para a Rv2563, utilizando a solubilização com 1% de DM.

Os resultados da purificação por afinidade revelaram uma banda de aproximadamente 36 kDa, que corresponderia a Rv2563 ou ambas as proteínas sobrepostas (Figura 28D), uma vez que ambas as proteínas apresentam uma massa molecular teórica muito similar. Uma segunda banda com cerca de 49 kDa mais fraca pode ser observada em todas as frações, além de duas bandas de cerca de 90 kDa, conforme a figura 28D.

As frações da IMAC foram concentradas em concentrador Amikon com corte de 100 kDa e submetidas à SEC em coluna Superdex Increase 200 10/30, que apresentou um cromatograma com 4 picos, conforme a figura 8E. O gel de SDS-PAGE dos picos apresentou um resultado interessante, as frações de 2 e 3 correspondem ao primeiro pico, cujo volume de eluição sugere a presença de agregados, as frações 5 e 6 correspondem ao segundo pico, as frações de 7 a 10 correspondem ao terceiro pico e as frações 11 a 14 correspondem ao quarto pico.

É interessante notar que os três conjuntos de bandas (36 kDa, 49 kDa e 90 kDa estavam presentes em todas as frações, mas em concentrações diferentes. No primeiro pico observamos fracamente a banda de 36 e 49 kDa e praticamente nada da banda de 90 kDa, para o segundo pico observamos que a banda mais baixa próxima de 90 kDa encontra-se em maior concentração, enquanto houve diminuição na concentração das bandas de massa menor. A somatória das massas moleculares de 49 kDa e 36 kDa resulta em 85 kDa, o que seria próximo ao valor esperado para a associação dos monômeros da Rv2563 e Rv2564.

No terceiro pico há distribuição homogênea das três bandas mas no quarto observa-se um aumento da banda de 36 kDa. Diante desses resultados, o Western blot das amostras mostrou que todas as bandas de 36 kDa e de 90 kDa foram identificadas pelo anticorpo anti-histag, indicando a presença da Rv2563, mas não da banda de 49 kDa.

Esses dados sugerem que a proteína Rv2563 consiste na proteína de 36 kDa, enquanto a Rv2564 se apresenta como a proteína de 49 kDa, sendo essa menos expressa que a transmembrana Rv2563. Esse mesmo comportamento foi observado anteriormente, nas construções pOPINE, onde os níveis de expressão da Rv2563 sempre foram mais altos em comparação com os da ATPase. É possível que a diferença de concentração das duas proteínas esteja relacionada à menor estabilidade da Rv2564. Como mencionado, a Rv2564 apresenta o domínio catalítico com regiões não enoveladas, que podem ser alvos para as proteases da *E. coli*, como também, a presença de resíduos hidrofóbicos na região de interação com a hélice transmembrana.

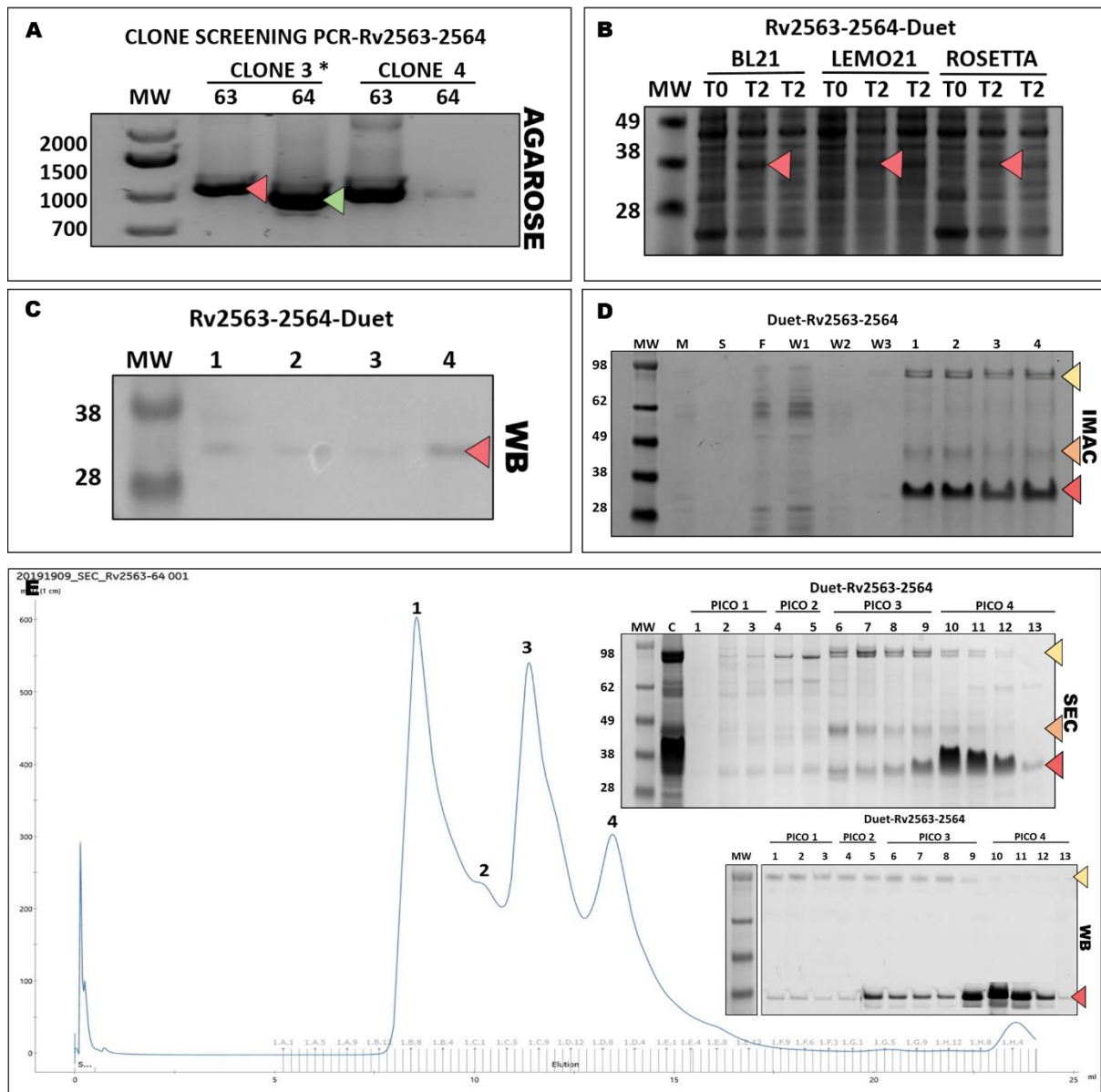


Figura 28 – Co-expressão do transportador Rv2563-Rv2564 utilizando o sistema pRSF-Duet. (A) Gel de agarose dos clones pRSF-Duet-Rv2563-Rv2564. O transportador Rv2563-

Rv2564 foi clonado no sistema de expressão pRSF-Duet, com a Rv2563 no primeiro sítio múltiplo de clonagem e a Rv2564 no segundo sítio. Selecionamos o clone 3 que foi confirmado por PCR e análise de restrição seguido do sequenciamento. Seta vermelha: Rv2563, seta verde: Rv2564. **(B)** SDS-PAGE do teste de expressão do complexo. A construção foi expressa nas células BL21(DE3), Lemo21(DE3) e Rosetta2 pLys. As temperaturas testadas foram 25°C e 18°C. A seta vermelha indica a presença da banda de interesse, ausente na cepa sem indução. **(C)** Western blot das amostras submetidas ao teste de expressão. Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-his tag (Biolegend, USA) na diluição de 1:15000. Que foi positivo para todas as condições testadas. 1- BL21-25°C, 2- BL21 – 18°C, 3- Lemo21 -25°C, 4- Rosetta – 25°C. A maior expressão da proteína de interesse foi em células Rosetta a 25°C. **(D)** SDS-PAGE das frações obtidas na IMAC. O complexo foi purificado por afinidade a níquel conforme o protocolo descrito para a Rv2563. Observou-se a presença de uma banda com massa molecular de 36 kDa que poderia corresponder aos monômeros de ambas as proteínas (seta vermelha); duas outras bandas também foram identificadas, respectivamente, com massas moleculares de 49 kDa (seta laranja) e 90 kDa (seta amarela). M- Membranas; S- Solubilização; F- Flow through; W1- lavagem com 10 mM imidazol; W2- lavagem com 20 mM imidazol; W3- lavagem com 30 mM de imidazol; 1-4: frações da eluição. **(E)** Cromatograma da cromatografia de exclusão molecular. Três picos foram identificados, sendo que as bandas de 36 kDa e 49 kDa estavam presente em todos. A terceira banda de 90 kDa esteve presente somente nas frações de 2 a 12, mas à medida que sua concentração aumentou, houve diminuição da intensidade das demais bandas. O anticorpo anti-his foi capaz de reconhecer as bandas de 36 kDa e 90 kDa, sugerindo que esta última poderia corresponder ao complexo.

Outro fato interessante que esse resultado sugere, é que aparentemente, a formação do complexo parece ser transiente com interações fracas entre as duas proteínas, como de fato, esperado. De qualquer forma, tais resultados foram importantes para o estabelecimento de critérios e oferecimento de perspectivas para o estudo estrutural do sistema. O conjunto de informações obtidas sobre as proteínas individualmente e em complexo será certamente, muito importante para o sucesso de novas tentativas a serem realizadas no futuro.

Produção do domínio periplasmático da Rv2563 (Rv2563per) visando caracterização estrutural e funcional

Paralelamente aos ensaios realizados com o transportador completo, decidimos a clonagem e expressão do domínio periplasmático da Rv2563, doravante denominado Rv2563per, na tentativa de uma produção solúvel para realização de ensaios funcionais e estruturais. Para identificação do início e fim da região periplasmática Rv2563per foram utilizadas as ferramentas TOPCONS e TMHMM e desenhadas nove construções diferenciadas entre si na extensão da região N e C terminal. Os detalhes de cada construção se encontram nos anexos (Tabela A1, Capítulo II – Anexo).

Essa estratégia visou eliminar a presença de muitos aminoácidos hidrofóbicos que se encontram inseridos na membrana e poderiam levar a insolubilidade das construções, como, de fato fora observado.

As nove construções foram clonadas no vetor pHAT2 com cauda de histidina no N-terminal, e realizados testes de expressão variando as cepas de *E. coli* e as condições de indução, como temperatura e concentração de IPTG. Das nove, apenas as construções 8 (resíduos 47-219) e 9 (resíduos 47-213) mostraram-se solúveis ao serem expressas em *E. coli* BL21(DE3) a 25°C por 16 horas com 0.4 mM de IPTG (Figura 29C), sendo essas as menores construções onde se observa a ausência de praticamente toda a hélices transmembrana 1 e 2.

Posteriormente, produzimos duas construções correspondentes aos resíduos 47 a 219 fusionados às proteínas GB1 de *S. pneumoniae* (Rv2563PerBP) e GST (Rv2563perGT) de *E. coli*. A construção Rv2563perBP foi expressa na forma solúvel em meio 2YT a partir da cepa de BL21(DE3) a 37°C e 25°C, enquanto a construção Rv2563perGT foi solúvel apenas a 25°C, conforme a figura 9C.

A purificação da Rv2563perBp incluiu uma IMAC, seguida da clivagem da fusão GB1 presente no N-terminal com 3C protease, IMAC reversa (R-IMAC), e por fim, o polimento em cromatografia de exclusão molecular. O domínio foi satisfatoriamente produzido em células BL21(DE3) e a purificação por afinidade mostrou o Rv2563perBP com massa molecular de 35 kDa (Figura 29D).

A clivagem com 3C teve 95% de eficiência permitindo a recuperação do domínio no lavado da R-IMAC (Figura 29E). Após concentração do Rv2563per em concentrador com corte de 3 kDa, o domínio foi submetido à purificação por exclusão molecular monitorada a 220 nm para identificação das ligações peptídicas (Figura 29F), uma vez que o domínio não apresenta os aminoácidos triptofano e tirosina. A SEC apresentou apenas um único pico entre 60-80 ml de coluna, coletado em 10 frações (Figura 29F).

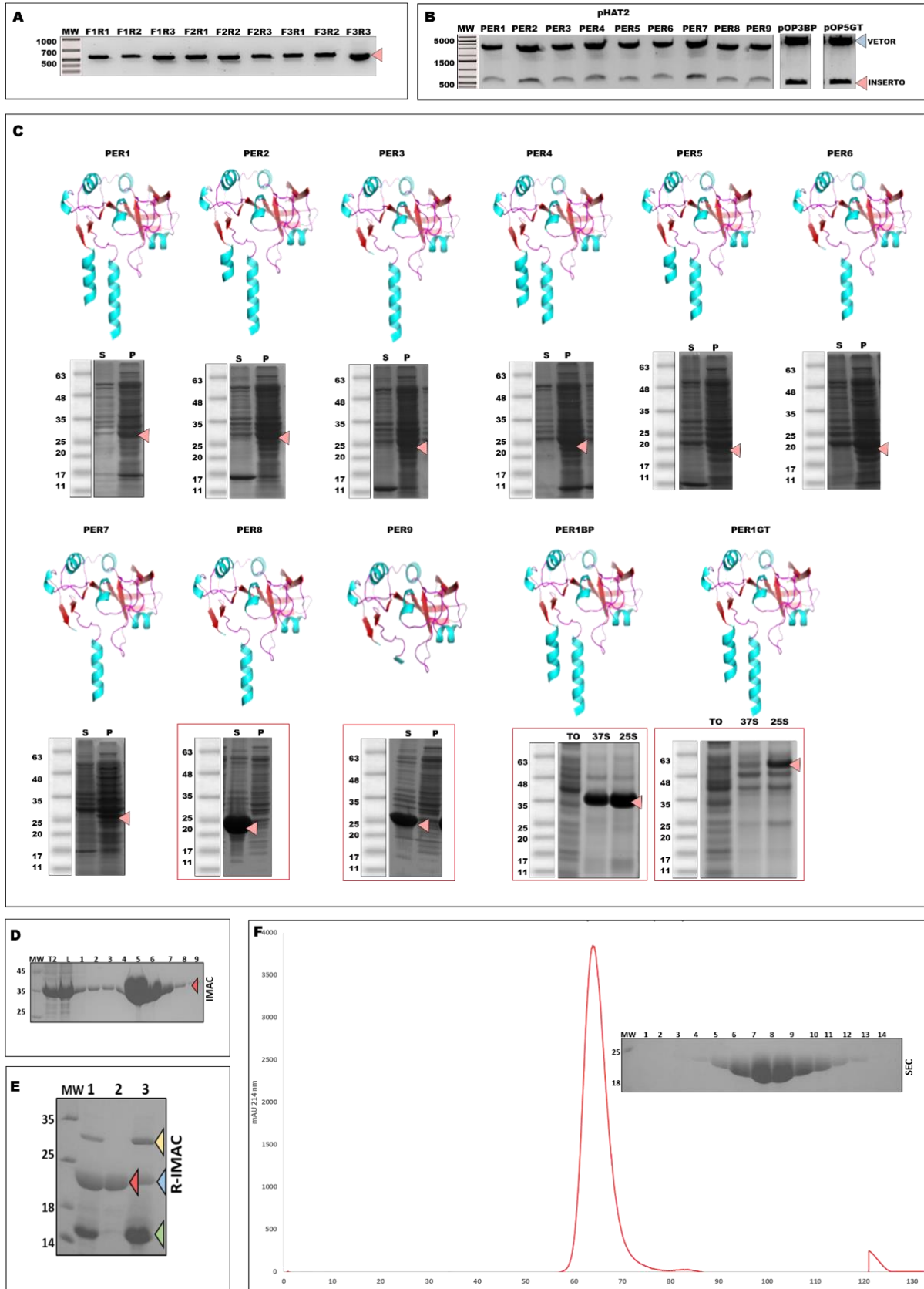


Figura 29 – Delineamento experimental e produção do domínio periplasmático Rv2563per. (A) Gel de agarose mostrando os diferentes fragmentos referentes ao domínio periplasmático da Rv2563 (entre 530-590 bp) obtidos por PCR. As combinações F1R1 e demais representam os oligos usados para a amplificação (Tabela A1, Materiais e Métodos - Anexo). (B) Análise de restrição dos clones obtidos para o vetor pHAT2, pOP3BP e pOP5GT, com

liberação do inserto nos tamanhos esperados após tratamento com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. (C) Modelos e testes de expressão das construções periplasmáticas. Os modelos das diferentes construções da Rv2563per foram feitos no Modeller utilizando-se a estrutura de MacB de *A. baumannii* (PDB: 5W4) como molde. As proteínas apresentam diferença no comprimento do N e C-terminal. Os Testes de expressão foram realizados em diferentes cepas, meios e condições de indução. Apenas a partir das construções 8 e 9 foi possível obter o domínio solúvel com massa molecular de 20 kDa. S: solúvel, P: Pellet; T0: sem indução. (D) SDS-PAGE das frações da IMAC. Após uma série de três lavagens com buffer contendo 10, 20 e 30 mM de imidazol a proteína foi eluída em 9 frações de 1 ml cada. MW: marcador; T2: Células induzidas e L: extrato solúvel de células. (E) Clivagem do domínio com protease 3C. O domínio foi concentrado e o imidazol retirado em coluna de dessalting PD-10. A seguir, para cada 1 mg de proteína adicionamos 200 ng de 3C protease e incubamos sob agitação por 16 horas a temperatura ambiente. O domínio foi obtido após a R-IMAC. 1: Rv2563perBP + 3C protease; 2: lavado da R-IMAC; 3: Fração eluída do R-IMAC. Seta vermelha: Rv2563per, amarela: Rv2563perBP não clivado; azul: 3C protease; verde: fusão GB1. (F) Purificação por exclusão molecular do domínio Rv2563per. Cromatograma da exclusão molecular (220 nm) evidenciando um único pico de eluição entre 60-80 ml de coluna. SDS-PAGE das frações após a SEC com coluna Sephacryl S-200 HR.

O domínio periplasmático da Rv2563 é mais estruturado em condições ácidas

O domínio Rv2563per foi submetido a análise de dicroísmo circular em diferentes condições. Caracteristicamente, espectros de dicroísmo circular que representam estruturas majoritariamente formadas por α -hélices são representados por picos negativos na faixa dos 208 nm e 222 nm. Diferentemente, proteínas com maior conteúdo de folhas- β mostram um pico negativo na faixa 218 nm e regiões não enoveladas na faixa dos 195 nm.

Considerando que o MTB é um patógeno intracelular e que um dos seus mecanismos de sobrevivência e virulência é impedir a acidificação do fagossomo, testamos o comportamento do domínio periplasmático frente a diferenças de pH. Amostras do domínio foram preparadas em tampão fosfato nos pH 5.9, 6.5, 7.5 e 8.0. Primeiramente, avaliamos o espectro de dicroísmo circular do domínio em 20 mM de tampão fosfato no pH 6.5 (Figura 30A, linha azul), o qual revelou um perfil de proteínas com estruturas alfa/beta (24% hélices alfa, 36% folhas beta e 40% de regiões não enoveladas).

De fato, este perfil foi muito similar ao apresentado pelo domínio periplasmático da MacB de *E. coli* (PDB: 5C59) (XU et al., 2009) (Figura 30B, linha azul), o qual mostra 35% de alfa-hélices, 16% de folhas-beta e 49% de regiões não enoveladas. Estes dados também são consistentes com o modelo construído para o domínio Rv2563per que já indica alguma diferença em relação à MacB (maior quantidade de estruturas), mesmo com a alta similaridade (Figura 30C). Estes resultados foram importantes para mostrar que o domínio purificado estava enovelado.

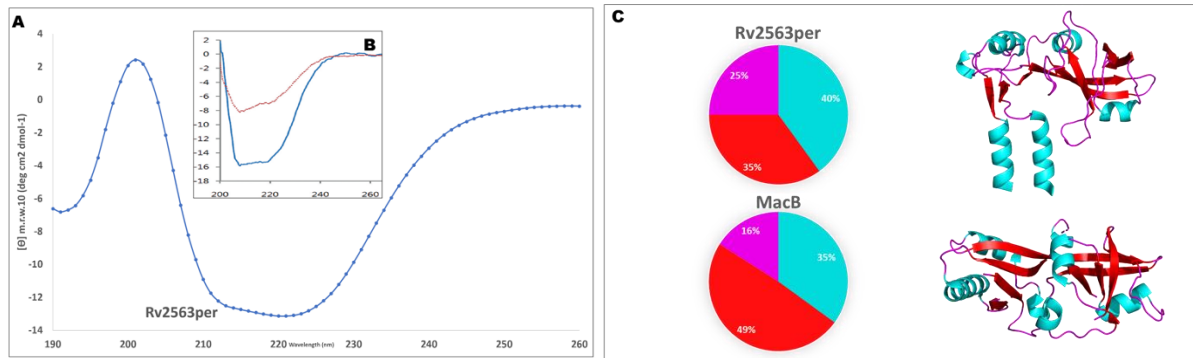


Figura 30 – Espectro de dicroísmo circular do Rv2563per e comparação com o domínio periplasmático da MacB de *E. coli*. (A) Espectro de dicroísmo circular do Rv2563per em tampão fosfato pH 6.5 20 mM mostrando um enovelamento característico de proteínas alfa-beta. (B) Espectro da MacB de *E. coli* realizado por XU e colaboradores (2009) mostrando a similaridade de conteúdo de estruturas secundárias com o domínio Rv2563per. MacB em azul e BSA em vermelho. (C) Comparação do conteúdo de estruturas secundárias entre os dois domínios. Os dados de Rv2563per foram calculados no programa Bestsel e os do domínio MacB de *E. coli* retirados da estrutura disponível no PDB (PDB: 5C59). O modelo de Rv2563per e a estrutura de MacB são apresentados em cartoon com as estruturas secundárias coloridas.

A comparação do espectro de CD do Rv2563per nos diferentes pH revelou que o domínio é sensível e sofre alterações significativas na sua estrutura, tanto em pH mais básico, como mais ácido. Nota-se que o domínio ganha maior conteúdo de estrutura secundária em pH mais ácido, o que não necessariamente, indica seu estado ativado ou funcional, mas mostra que nestas condições, o domínio sofre alterações que podem levar a mudanças consistentes nas hélices transmembranas, ativando ou inibindo o transportador. Pode-se especular que tal domínio teria um papel sensor no MTB para identificação das mudanças ambientais e acidificação do fagossomo, iniciando sinais de ativação de alteração da membrana para inibição da interação com o lisossomo. Por outro lado, é possível que as mudanças sejam apenas decorrentes da força iônica do tampão.

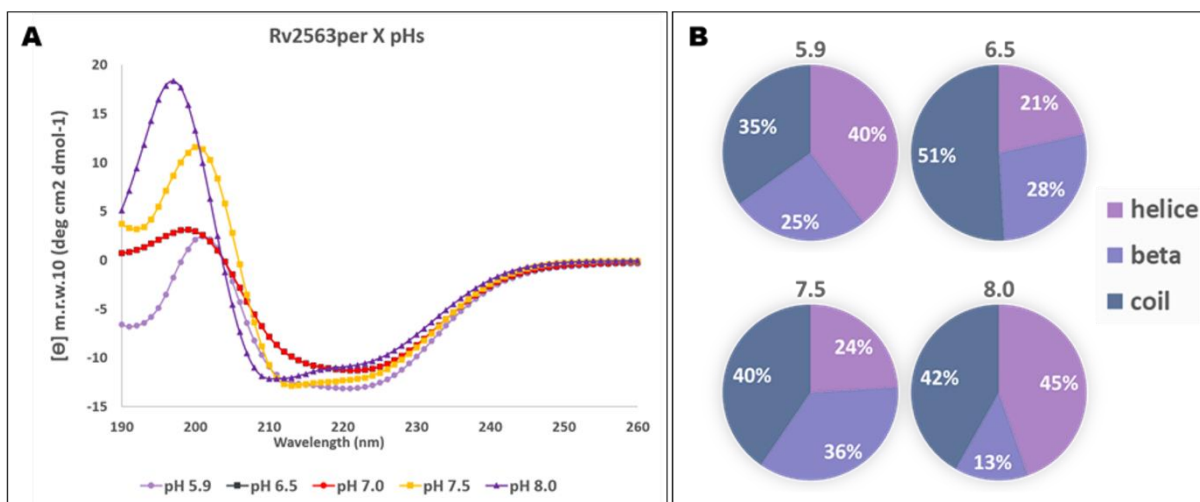


Figura 31 – O espectro da Rv2563per apresenta maior estruturação em ambiente ácido. (A) O espectro do CD da Rv2563per frente a diferentes condições de pH, demonstra que em condições ácidas a proteína apresenta maior quantidade de estruturas secundárias. O espectro mostra que à medida que o pH aumenta o pico presente a 225nm é perdido gradativamente, com a máxima de perda em pH 8.0. (B) Porcentagens de estruturas secundárias previstas para a Rv2563per em diferentes condições de pH, indicando um aumento de regiões de não enoveladas à medida que o pH se torna mais básico.

Alterações no pH, concentração de sais e concentração proteica causam efeitos na polidispersividade do domínio Rv2563per

A dispersividade da amostra influencia na obtenção de cristais para difração e influencia na interação com outras proteínas e ligantes. Para caracterizar a polidispersividade das amostras purificadas de Rv2563per em solução, realizamos o ensaio de espalhamento dinâmico de luz em diferentes condições. Os resultados completos estão disponíveis nos anexos (Figura A2, Capítulo II - Anexo). Primeiramente, os ensaios em diferentes pH (entre 3 e 10) mostraram que pH abaixo de 7.0 (com exceção do pH 5.0) ocorre aumento da monodispersividade da amostra, que se organiza entre estados monomérico e dimérico (entre 1 e 3 nm) (Figura 32).

As amostras apresentaram tendência à monodispersividade nos tampões Bis-tris pH 6.0 e acetato de amônio pH 7.0, onde identificamos a presença quase exclusiva de apenas uma população, com um raio hidrodinâmico compatível com o esperado para o monômero/dímero. Os dados mostram que no pH do tampão no qual o domínio tem sido purificado (7.5), há duas populações na amostra, o que pode indicar variação entre os estados monomérico e dimérico. Este pH foi escolhido por ser próximo ao pH fisiológico e de melhor crescimento do bacilo *in vitro*. Interessantemente, os ensaios de CD apresentados anteriormente, mostraram que o domínio Rv2563per apresenta ganho de estruturas secundárias em condições mais ácidas, indicando que nestes pH pode haver maior estabilização do domínio e menor tendência à agregação/oligomerização.

Em contrapartida, em pH mais básicos, principalmente acima de 8.0, há tendência de aumento da polidispersividade da amostra e os ensaios de CD indicaram perda de estruturas secundárias. Essa perda pode levar à exposição de resíduos favorecendo interações inespecíficas o que refletiria no surgimento de diferentes populações. É interessante notar que embora o MTB seja um patógeno intracelular (pH fisiológico ao redor de 7.0), o interior do fagossomo é caracterizado por estresse de pH, muitas vezes acidificado, o que poderia levar a alterações estruturais significativas neste domínio e conseqüentemente no transportador.

A avaliação da influência da concentração de sais no domínio Rv2563per também foi avaliada por DLS. A força iônica das amostras interfere diretamente nas interações de resíduos que compõem as proteínas com possíveis ligantes e outras proteínas parceiras. Portanto avaliar a influência dos sais auxilia no planejamento dos demais experimentos como ensaios de *pull-down* e cromatografia de exclusão molecular analítica. Os resultados mostraram que a polidispersividade do domínio Rv2563per aumenta em altas concentrações de sais. Os resultados indicam que em altas concentrações de sais a proteína tende a agregar, provavelmente induzido pela interação inespecífica dos monômeros de proteínas, uma vez que sais em altas concentrações podem promover a exposição de resíduos da proteína que passam a interagir de maneira inespecífica.

Os sais que promoveram o melhor perfil de dispersividade do domínio Rv2563per foram o sulfato de sódio a 100 mM e o cloreto de cálcio a 200 mM, sendo que o cloreto de cálcio apresentou duas populações com distribuição de 88% e uma segunda população com 12% da massa. Esses sais, contudo, promovem agregação da proteína em concentrações mais elevadas. A proteína vem sendo purificada em 150 mM de NaCl, que mostrou ser uma concentração que não causou agregação da proteína.

O aumento da concentração de proteína provocou um aumento na polidispersividade da amostra. O aumento do número de populações é visto gradativamente à medida que a amostra é concentrada., culminando na visualização de agregados com enormes raios hidrodinâmicos na maior concentração de 10mg/ml.

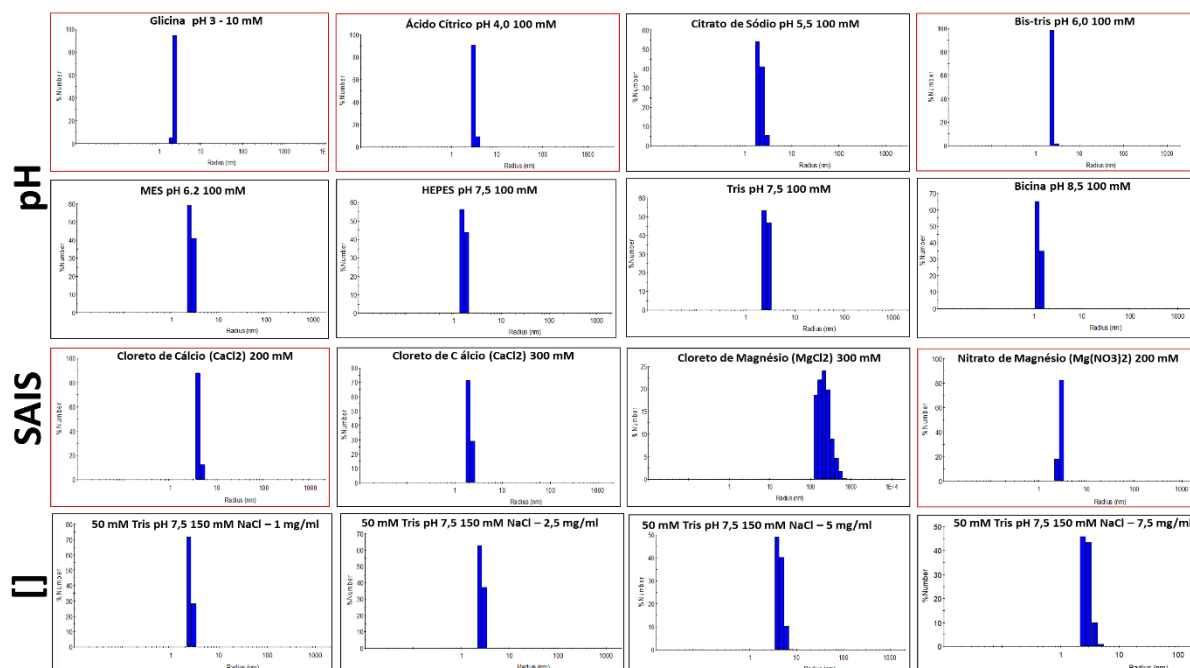


Figura 32 - Padrão de dispersividade do domínio Rv2563per avaliado por DLS em diferentes condições. Amostras de Rv2563per purificado em tampão 50 mM Tris pH 7.5 e 150 mM de NaCl foram diluídas em nas diferentes soluções para análise por DLS. Foram utilizadas variações de pH (3.0 a 10.0), concentração e tipos de sais, e presença de aminoácidos. Em vermelho são apresentadas as condições que favoreceram a formação de amostras monodispersas.

Após as análises de DLS, os dados obtidos foram utilizados para ensaios de cristalização. Nas diversas tentativas realizadas para o domínio Rv2563per, os resultados mostraram precipitados densos em e mais esparsos, com concentrações altas e baixas do domínio, respectivamente. Novos refinamentos estão sendo conduzidos alterando-se as concentrações de proteínas e dos componentes das soluções.

O domínio periplasmático da proteína Rv2563 apresenta-se como um dímero

Os transportadores ABC são caracterizados pela presença de um domínio transmembrana integral, responsável pela formação do poro na membrana interna celular. Sendo assim esperamos que a proteína Rv2563 apresente-se como um homodímero na formação do transportador completo. Para identificar o estado oligomérico que o domínio Rv2563per apresenta em solução nós realizamos purificação por exclusão molecular analítica. A amostra e os padrões de proteína foram purificados nas mesmas condições e concentrações e o volume de eluição foi utilizado para cálculo da massa molecular aproximada e estimativa do estado oligomérico conforme descrito nos materiais e métodos.

Frações contendo o domínio Rv2563per foram eluídas entre os volumes de 60 a 70 mL da coluna Sephacryl 200 HR, entre os picos representativos das proteínas ovoalbumina, cuja monômero apresenta 44 kDa, e anidrase carbônica, cujo monômero apresenta 29 kDa, conforme a figura 33A. A partir do cálculo do valor de Kav para o domínio Rv2563per, conforme descrito nos materiais e métodos, obtivemos a massa molecular aproximada de 36 kDa, indicando estado dimérico do domínio, uma vez que cada monômero consiste em 19 kDa (Figuras 33C e 33D).

O domínio purificado da Rv2563per também foi avaliado em gel nativo em comparação com o gel desnaturante, e os resultados mostraram que enquanto no gel desnaturante o domínio migra entre 18-25 kDa (conforme esperado para o monômero), no gel nativo a migração foi estimada entre 140-250 kDa (Figura 32E). Estes dados mostram que na ausência de condições desnaturantes, o domínio tende a formar oligômeros. De acordo com o modelo tridimensional do mesmo e ensaios prévios de CD, Rv2563per apresenta-se essencialmente como domínio de folhas beta e regiões não enoveladas, o que poderia favorecer a oligomerização.

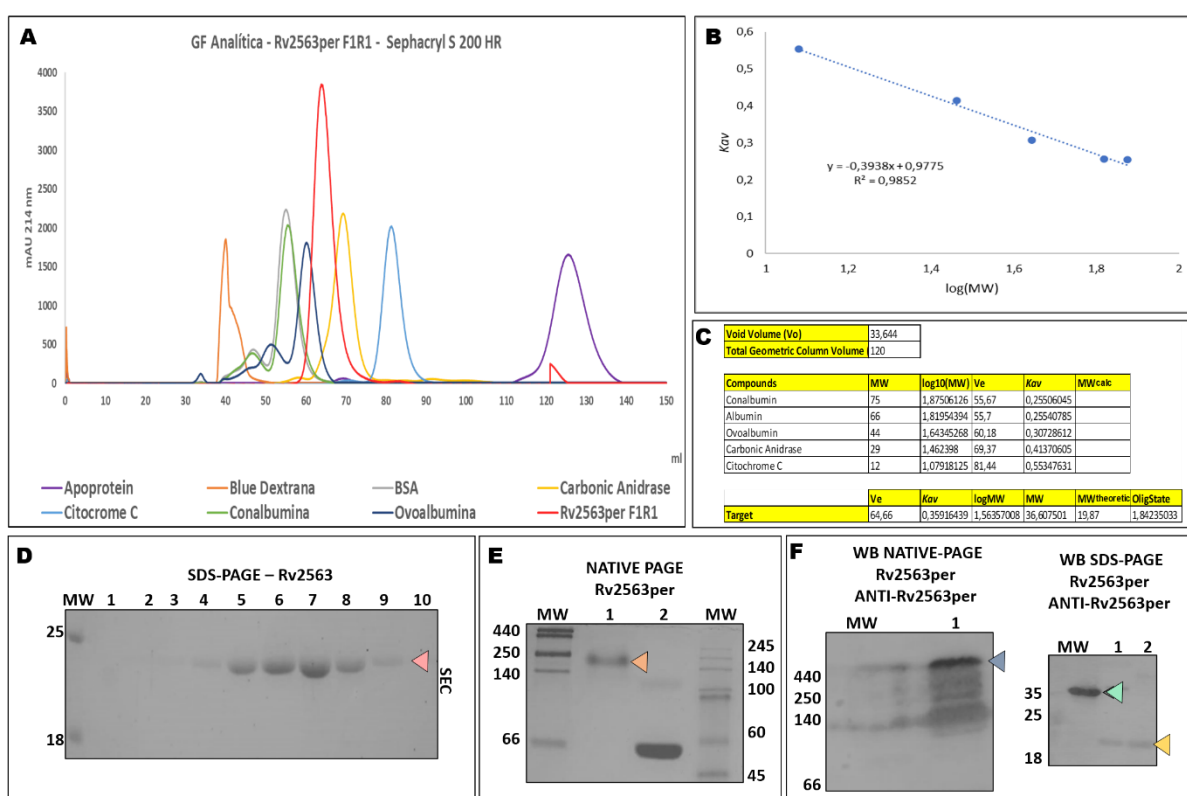


Figura 33 – O domínio Rv2563per apresenta-se como um homodímero em solução, mostrando a capacidade da Rv2563 em formar o poro na membrana celular como esperado. (A) Cromatograma da exclusão molecular realizada no domínio Rv2563per. A proteína eluiu com a máxima do pico a 65ml da coluna Sephacryl 200 HR, entre as proteínas ovoalbumina, cujo monômero corresponde a 44 kDa e a anidrase carbônica com 29 kDa, sugerindo uma massa molar do domínio Rv2563per entre esses dois valores. **(B)** A partir dos valores de eluição dos padrões foi realizado a regressão linear para obtenção dos valores de Kav

dos padrões de proteína. (C) A partir da equação da reta foi calculado o K_{av} para o domínio Rv2563per e o resultado da massa molecular estimada foi definido como 36 kDa, referente a um dímero, uma vez que a massa molecular teórica do monômero consiste em 19 kDa. (D) O SDS-PAGE do domínio Rv2563per após exclusão molecular mostra bandas de aproximadamente 25 kDa. Os números 1-10 correspondem às frações que compõem o pico de eluição do domínio. A seta vermelha indica a Rv2563per (E) 1- Rv2563per apresentou migração entre 140-250 kDa em condições não desnaturantes, indicando a formação de um oligômero. 2- Amostra de albumina (66 kDa) utilizada como controle no gel nativo. (E) Western blot do gel nativo para identificação de Rv2653per utilizando os anticorpos anti-Rv2563per produzidos anteriormente em camundongos identificaram a fração proteica com massa entre 140-250 kDa. A seta laranja indica a Rv2563per em gel nativo. (F) Western blot do SDS-PAGE utilizando os anticorpos anti-Rv2563per. A fração 1 corresponde ao domínio Rv2563per fusionado a proteína GB1, identificado com cerca de 35 kDa. A fração 2 corresponde ao domínio Rv2563per após duas horas de tratamento com 3C protease para clivagem da fusão e apresentou-se com massa molecular próxima a 20 kDa. A seta azul indica a Rv2563per no Western blot realizado no gel não desnaturante, seta verde: Rv2563perBP, seta amarela: Rv2563per.

Para identificarmos se as bandas presentes em ambos os géis correspondiam ao domínio Rv2563per, realizamos um ensaio de Western blot com os anticorpos anti-Rv2563per produzidos em camundongos. Os anticorpos foram capazes de reconhecer as duas amostras, confirmando a formação de um estado oligomérico. Ensaio de ultracentrifugação analítica, serão realizados para cálculo da massa molecular da partícula a partir de seu coeficiente de sedimentação.

Conclusão do capítulo

Os ensaios que realizamos até o momento permitiram identificar alguns pontos-chaves em relação ao transportador Rv2563-2563: (i) tanto a transmembrana Rv2563 quanto a ATPase Rv2564 são melhor expressas na cepa Lemo21(DE3) em cultivos utilizando meios auto-indutores que permitem um melhor controle da expressão; (ii) Os detergentes DM e DDM consistem nos melhores detergentes para solubilização e estabilização da proteína transmembrana; (iii) foram obtidos cristais para a proteína transmembrana cuja difração foi melhorada de 7 para 4.95 Å no processo; (iv) a purificação da ATPase sugere que sua dimerização é um processo extremamente dinâmico, onde encontramos as formas diméricas e monoméricas ao longo do processo; (v) a reconstituição do transportador *in vitro* precisa de testes de variação de concentração, tempo de incubação e concentração dos componentes para ser estabelecida, e pode ser um processo que necessite de estratégias mais eficientes para captura como crosslink e outros; (vi) a co-expressão dos componentes *in vivo* pode ser uma alternativa interessante para obtenção do complexo; (vii) a região periplasmática da Rv2563 consiste em uma ferramenta de estudo interessante para caracterização do transportador, essa região foi

purificada com sucesso, se mostrou como uma proteína com um fold alfa-beta similar aos membros da família MacB de transportadores.

Ainda sobre o domínio periplasmático da Rv2563, os ensaios sugerem um ganho estrutural em condições ácidas e que pH e concentração de sais afetam a monodispersividades dessas amostras. Por fim, as análises de exclusão molecular analítica mostram que o domínio se comporta como um dímero em solução.

CAPÍTULO III

Caracterização funcional do transportador Rv2563-Rv2564

Os anticorpos anti-Rv2563per produzidos em camundongos C57BL/6 apresentaram altos títulos e capacidade de reconhecimento da proteína Rv2563 nativa

Visando estudos que pudessem nos oferecer alguma informação sobre a funcionalidade do sistema, produzimos anticorpos contra o domínio periplasmático da permease Rv2563 em camundongos C57BL/6 por meio de 3 imunizações utilizando a toxina LT1 como adjuvante vacinal. Após a obtenção do soro dos animais imunizados, verificamos os títulos dos anticorpos para planejamento dos experimentos futuros e verificar a capacidade imunogênica do domínio Rv2563per. A lista completa dos anticorpos produzidos e usados nesse trabalho se encontram nos anexos (Tabela A1, Capítulo III- Anexo).

Foi realizado um ensaio de ELISA indireto com 200 ng/poço do domínio Rv2563per imobilizado e comparamos com a concentração de anti-IgG murino comercial. A diluição inicial do anticorpo foi de 1:25. As concentrações de anticorpos contra o domínio após a imunização dos dois camundongos foram de 0.74 µg/ml no primeiro soro e de 0.59 µg/ml para no segundo soro. A menor diluição que originou resposta no ELISA foi de 1:54000 mostrando que o domínio Rv2563per é imunogênico (Figura 34).

O segundo ensaio foi realizado para avaliar a capacidade do anticorpo anti-Rv2563per identificar a proteína Rv2563 em extratos de MTB, *M. smegmatis* e *M. abscessus* (duas micobactérias usadas como controles negativos porque não possuem o transportador Rv2563-Rv2564), e no extrato de *E. coli* utilizada para a expressão do domínio heterólogo. Os extratos foram aplicados em SDS-PAGE 15% e, posteriormente, transferidos para membrana de PVDF, conforme descrito nos materiais e métodos. Os anticorpos foram capazes de reconhecer o domínio controle Rv2563per com massa molecular aproximada de 25 kDa (domínio periplasmático) e também uma proteína de 35 kDa no extrato de BCG, que apresentou massa molecular esperada para a Rv2563 completa. Como esperado, os anticorpos não identificaram nenhuma proteína nos extratos de *M. abscessus*, *M. smegmatis* e *E. coli*.

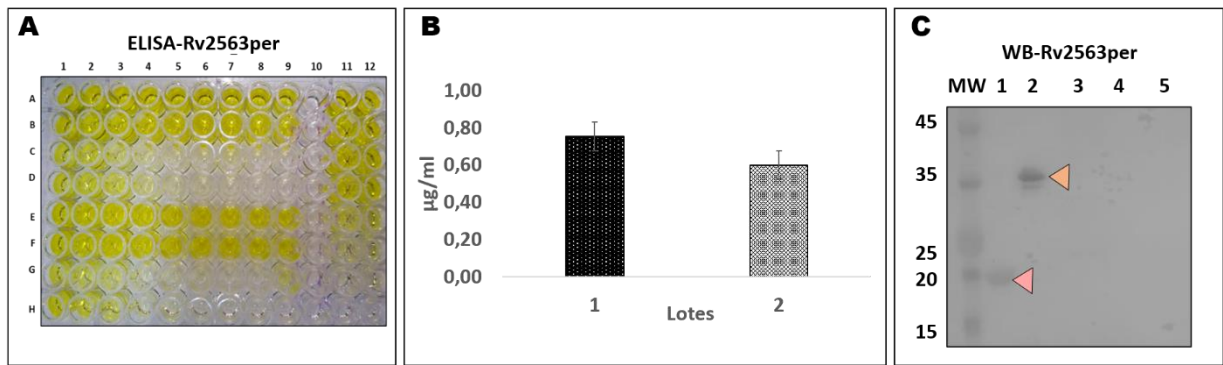


Figura 34 – Titulação dos anticorpos anti-Rv2563per e Western blot para detecção da Rv2563 em extratos de culturas de *M. tuberculosis var bovis* BCG. (A) Ensaio de ELISA com os anticorpos anti-Rv2563per gerados em camundongos Balbc contra o domínio periplasmático. Os anticorpos foram capazes de reconhecer a proteína até a diluição de 1:54000 indicando títulos bastante significativos. (B) Quantificação do título dos anticorpos anti-Rv2563per obtidos a partir de dois camundongos diferentes (Lote 1 e 2). (C) Ensaio de Western blot contra o domínio Rv2563per purificado e extratos bacterianos de *M. tuberculosis var bovis* BCG, *M. smegmatis*, *M. abscessus* e *E. coli*. 1: Domínio Rv2563per purificado identificado com massa molecular de 25 kDa. 2: Extrato de *M. tuberculosis var bovis* BCG apresentou reconhecimento de uma proteína com massa molecular de 35 kDa, como esperado para a Rv2563 completa. 3 e 4: Extratos de *M. smegmatis* e *M. abscessus* mostrando que não houve reconhecimento de proteínas pelos anticorpos anti-Rv2563per. 5: Extrato de *E. coli* B121(DE3) onde também não houve proteínas reconhecidas.

Os anticorpos anti-Rv2563per são capazes de atravessar a micomembrana e reconhecer a proteína Rv2563

A micomembrana consiste em uma das principais barreiras (extremamente hidrofóbica e densa) para defesa do MTB aos agentes externos e, ao mesmo tempo, interage com o ambiente do hospedeiro para regulação e manipulação da resposta imunológica. Em bactérias Gram negativas, a membrana externa exerce uma barreira para a passagem de anticorpos (MIKI; HARDT, 2013), os quais podem reconhecer proteínas de membrana interna apenas após a permeabilização da membrana externa (PARK et al., 2019). Em contrapartida, em bactérias Gram positivas que não apresentam membrana externa, mas uma camada de peptídeoglicanos mais espessa, anticorpos foram capazes de reconhecer proteínas periplasmáticas em diferentes organismos (FERREIRA et al., 2016). Adicionalmente, anticorpos produzidos contra a região periplasmática da permease MalD de *Staphylococcus aureus*, componente transmembrana do transportador ABC responsável pelo transporte de maltose, foram capazes de reconhecer o transportador na membrana do microrganismo em ensaios de fluorescência (GUERRA, 2018).

Considerando que no transportador ABC Rv2563-Rv2564 o componente transmembranar (Rv2563) tem o seu domínio exposto no periplasma, avaliamos a capacidade de reconhecimento do mesmo pelos anticorpos anti-Rv2563per. Foram utilizadas duas

metodologias, o ELISA de célula inteira (*Whole-Cell ELISA*, WCE) (DOS SANTOS et al., 2020) realizado em placas, e a microscopia de fluorescência.

Conforme descrito em Material e Métodos, o WCE foi realizado com células de *M. tuberculosis var bovis* BCG não tratadas e tratadas com tween 80 ou com hexano. Os resultados mostraram que o anticorpo anti-Rv2563per reconheceu o transportador na célula íntegra não tratada e tratada, indicando que não houve necessidade de fragilizar ou remover a micomembrana. Quando as células foram submetidas aos tratamentos de permeabilização da membrana, o reconhecimento foi mais intenso e significativo (Figura 35A).

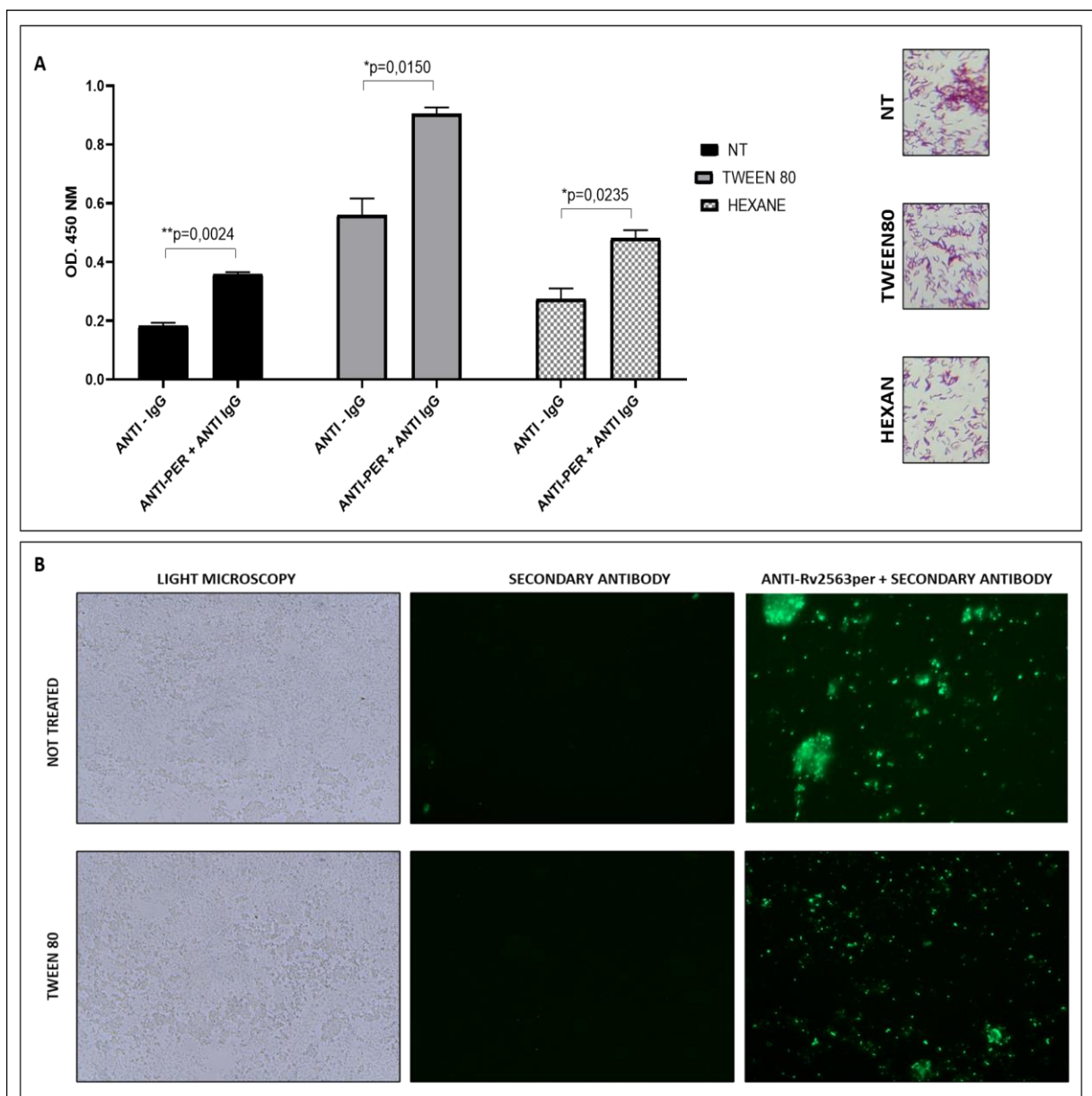


Figura 35 – Os anticorpos anti-Rv2563per foram capazes de atravessar a micomembrana e interagir com o domínio periplasmático da permease Rv2563. (A) Whole-Cell ELISA de células de *M. tuberculosis var. bovis* BCG com anticorpos anti-Rv2563per. Foi utilizado como

controle do ensaio, o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase e três condições: células não tratadas, tratadas com Tween 80 e com hexano. As células tratadas mostraram reconhecimento do anticorpo aumentado devido a retirada da micomembrana. Uma amostra de cada uma das condições testadas foi corada por Ziehl-Neelsen para comprovar a presença do bacilo (imagens de lâminas). **(B)** Microscopia de fluorescência realizada com células de *M. tuberculosis var bovis* BCG crescidas em meio Middlebrook 7H9 por 15 dias. O ensaio foi realizado com as células não tratadas (NOT TREATED) e tratadas com tween 80 (TWEEN 80). *Light microscopy*: microscopia convencional de campo claro mostrando células de BCG fixadas. *Secondary antibody*: células incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa Fluor 488. Não houve interação inespecífica com as células. *Anti-Rv2563per + Secondary antibody*: fluorescência das células não tratadas e tratadas com tween 80 após reconhecimento com o anticorpo anti-Rv2563per. Na célula sem tratamento é possível observar a presença dos grumos característicos da BCG devido à presença do fator corda, enquanto que na célula tratada com tween observa-se maior dispersividade das células devido à perda da micomembrana.

O efeito do tratamento das células de *M. tuberculosis var. bovis* BCG com os agentes mencionados pode ser verificado nas figuras laterais do gráfico da figura 35A.

Nota-se que nas amostras não tratadas há maior quantidade de grumos resultantes do fator corda (fator proteico) que é característico de micobactéria (LANG, 2013). Similarmente aos resultados observados no WCE, os resultados da microscopia mostraram que o anticorpo anti-Rv2563per foi capaz de reconhecer as células não tratadas e tratadas com tween 80, indicando que a micomembrana foi permeável aos anticorpos (Figura 35B).

Estudos realizados por WATSON et al. (2021) também mostraram que anticorpos contra uma proteína periplasmática foram capazes de atravessar a micomembrana de *M. tuberculosis*. Os autores demonstraram que anticorpos presentes em pacientes com TB ativa que eram contra a proteína periplasmática do sistema ABC de importação de fosfato PstS1 (anti-PstS1), inibiram o crescimento do MTB em culturas in vitro. Esses resultados abrem a perspectiva de utilizar componentes de transportadores ABC como alvos para desenvolvimento vacinal, diagnóstico e terapêutico, e o domínio Rv2563per se mostrou um alvo imunogênico.

A tradução do transportador Rv2563-Rv2564 é constante ao longo da curva de crescimento de *M. tuberculosis var bovis* BCG

Os anticorpos anti-Rv2563per foram utilizados para avaliarmos a produção da permease e, indiretamente, do transportador durante o crescimento do bacilo. Amostras de uma cultura de *M. tuberculosis var bovis* BCG foram retiradas em diferentes tempos (em dias) e após extração das proteínas totais, submetidas aos ensaios de Western blot com o anticorpo anti-

Rv2563per. Os resultados mostraram que não houve variação na produção da permease nas diferentes fases de crescimento do bacilo, sugerindo que a expressão da mesma foi constitutiva em meio MB7H9 (Figura 36).

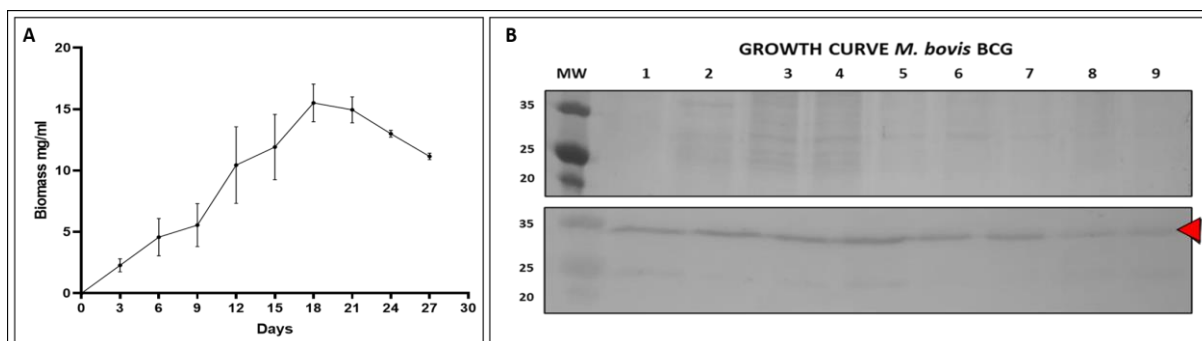


Figura 36 – Identificação de Rv2563 nas diferentes fases da curva de crescimento de *M. tuberculosis* var. *bovis* BCG. (A) Curva de crescimento da linhagem em meio MB7H9. A curva de crescimento foi feita segundo quantificação de massa seca recuperada de cada alíquota de 2 mL. (B) Western blot de extratos da curva de crescimento utilizando anticorpo Anti-Rv2563per gerados em camundongos C57BL/6 (vide MM) na diluição de 1:4000. O ensaio foi revelado com BCIP/NBT (Sigma). A concentração de proteína total em cada poço foi padronizada em 1 mg/mL. Nota-se que o anticorpo reconheceu em todas as amostras uma proteína de massa molecular de aproximadamente 35 kDa, conforme esperado para a permease completa (Rv2563), e que não há indicações de alteração da produção dependente da fase de crescimento.

Esses resultados sugerem que a produção do transportador Rv2563-Rv2564 ocorre de forma similar em todas as fases do crescimento indicando um papel fisiológico basal. Os dados, contudo, não permitem descartar a possibilidade da necessidade de um estímulo específico para a indução positiva do transportador, que poderia ser proveniente do ambiente hostil que o bacilo enfrenta no hospedeiro. Tais fatores poderiam ser estresse oxidativo, alterações nas fontes de nutrientes, lesões da membrana, anaerobiose, ou ainda, o ataque do sistema imunológico no macrófago. Ensaio nessas condições serão realizados buscando responder essas questões.

A presença de antibióticos no meio de cultivo não alterou a transcrição do transportador Rv2563-Rv2564

Nossas análises de bioinformática sugeriram a similaridade estrutural do transportador Rv2563-Rv2564 com os transportadores ABC da família MacB, cujos membros atuam como bombas de efluxo de drogas e toxinas, como a eritromicina e a toxina termolábil de *E. coli* (GREENE et al., 2018), respectivamente (CROW et al., 2017). Baseados nessas informações, decidimos testar se a produção do transportador Rv2563-Rv2564 poderia variar na presença de

determinados antibióticos. Utilizamos no ensaio as cepas de *M. tuberculosis var bovis* BCG e a cepa *M. abscessus* porque esta apresenta resistência intrínseca a diversos antibióticos (controle). Para identificarmos as concentrações sub-inibitórias dos antibióticos, foi realizado o teste de microtitulação com resazaurina (REMA).

A cepa de *M. tuberculosis var bovis* BCG, apresentou o perfil esperado de resistência intrínseca para ampicilina, tetraciclina, ácido nalidíxico, vancomicina, espectinomicina e eritromicina. Para os demais antibióticos, canamicina, estreptomicina, rifampicina, gentamicina, levofloxacina e cloranfenicol, a cepa foi sensível em concentrações mais altas (Figura 4A). Essas análises permitiram a identificação de concentrações de cada antibiótico a ser usada nas curvas de crescimento (Figura 37B).

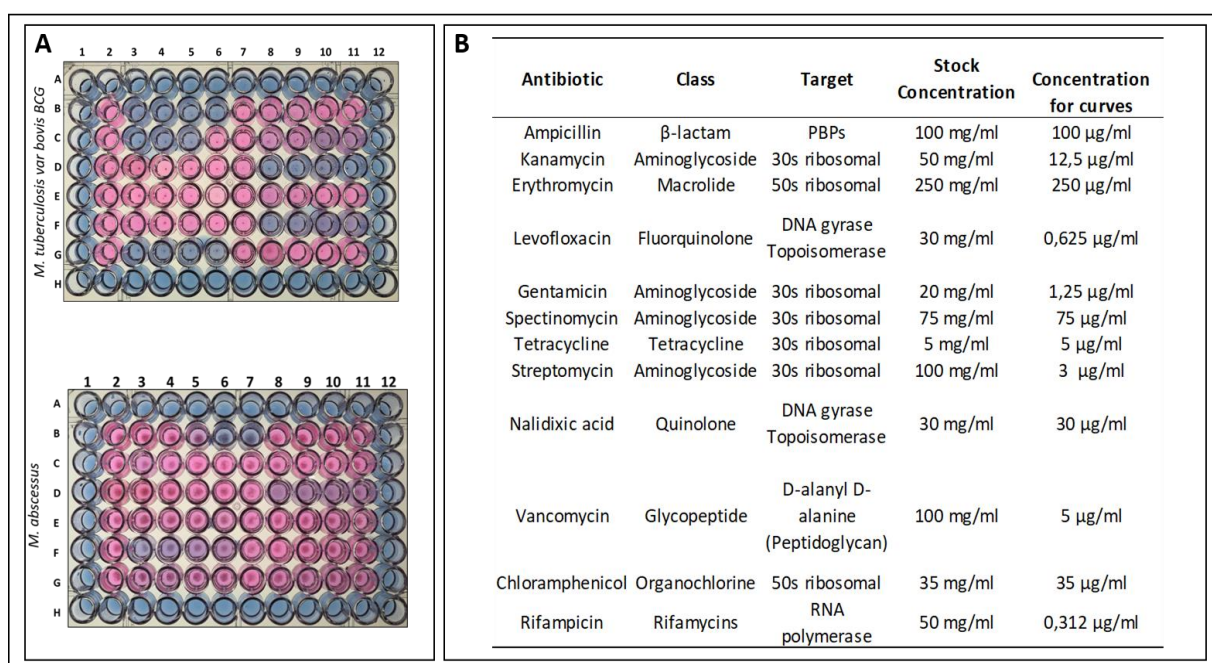


Figura 37 – Avaliação da concentração inibitória mínima de *M. tuberculosis var bovis* BCG por diferentes antibióticos utilizando a metodologia REMA. (A) Diluição seriada dos antibióticos realizada conforme descrito em Materiais e Métodos. Com o crescimento bacteriano a resazaurina é oxidada e é convertida em um composto fluorescente de cor avermelhada. Na figura, nos poços onde não ocorre o crescimento, a cor permanece azul, indicando inibição. Os poços externos correspondem aos controles negativos do ensaio. As colunas 2 e 7 correspondem ao controle positivo para cada um dos antibióticos testados. B2 a B6: Canamicina; B8 a B11: Ampicilina; C2 a C6: Streptomicina; C8 a C11: Spectinomicina; D2 a D6: tetraciclina; D8 a D11: Gentamicina; E2 a E6: Ácido Nalidíxico; E8 a E11: Eritromicina; F2 a F6: Vancomicina; F8 a F11: Gentamicina; G2 a G6: Rifampicina; G8 a G11: Cloranfenicol. (B) Tabela dos antibióticos usados, suas respectivas classes, alvos, concentração de estoque e as concentrações identificadas na microtitulação para utilização nos ensaios.

De acordo com os resultados apresentados anteriormente, realizamos curvas de crescimento da *M. tuberculosis var bovis* BCG em meio MB7H9 com adição de cada um dos antibióticos (isolados) nas concentrações de 100 µg/ml ampicilina, 12.5 µg/ml canamicina, 5 µg/ml tetraciclina, 250 µg/ml eritromicina, 5 µg/ml vancomicina, 35 µg/ml cloranfenicol, 3 µg/ml estreptomicina, 30 µg/ml ácido nalidíxico, 0.625 µg/ml levofloxacina, 75 µg/ml espectinomicina, 1.25 µg/ml gentamicina e 0.312 µg/ml rifampicina.

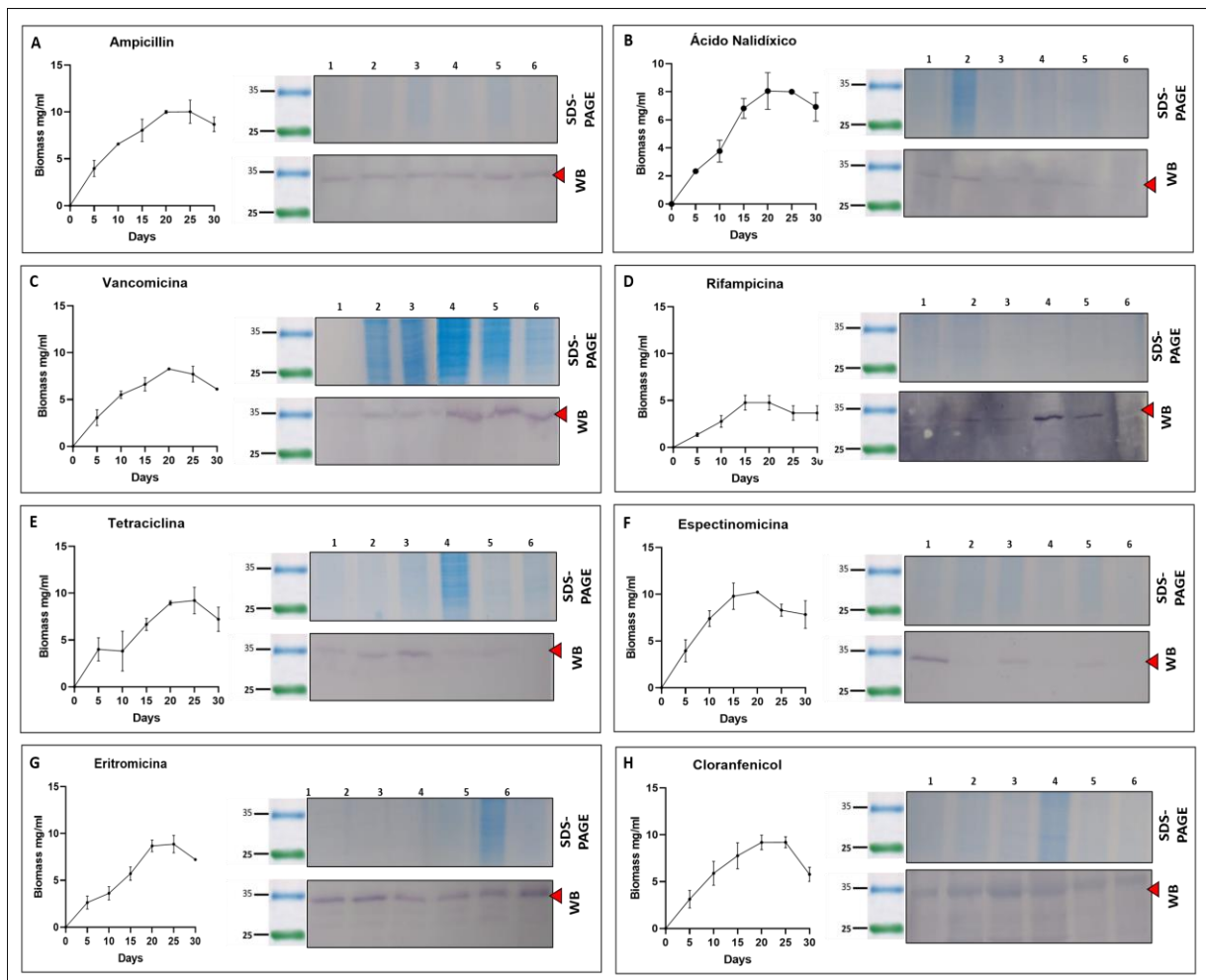


Figura 38 – Efeito da presença de antibióticos na produção da permease Rv2563 em culturas de MTB. O bacilo foi crescido em meio MB7H9 na presença de diferentes antibióticos e amostras de extratos foram utilizadas para ensaios de Western blot com o anticorpo anti-Rv2563per (diluição 1:4000). As curvas de crescimento foram realizadas em 30 dias com as concentrações de antibióticos encontradas no ensaio REMA. Os extratos foram obtidos a partir de 2 ml de cada ponto da curva. O anticorpo anti-Rv2563per foi capaz de identificar em todas as amostras uma proteína com massa molecular de 35 kDa como esperado para a Rv2563. Alguns antibióticos parecem alterar as quantidades da permease, principalmente a partir de 15 dias, ou final da fase logarítmica, embora o gel não seja analítico. (A) Ampicilina. (B) Ácido Nalidíxico. (C) Vancomicina. (D) Rifampicina. (E) Tetraciclina. (F) Espectinomicina. (G) Eritromicina. (H) Cloranfenicol.5.3.5 Os genes *rv2563-rv2564* e *rv0072-rv0073* foram expressos diferencialmente na presença de antibióticos

Amostras de diferentes pontos foram retiradas para extração das proteínas totais e realização de ensaios de Western blot para identificação da produção do transportador Rv2563-Rv2564 pelos anticorpos anti-Rv2563per. Uma proteína com massa molecular de 35 kDa referente a permease completa foi identificada em todas as fases de crescimento, independentemente do antibiótico testado. Rifampicina e vancomicina parecem ter induzido um pequeno aumento da produção da permease nas amostras coletadas após 15 dias de cultivo, ou início da fase estacionária, enquanto os demais antibióticos não mostraram diferenças significativas (Figura 38).

É possível que este resultado tenha sido afetado pela presença de outros genes de resistência no genoma de *M. tuberculosis*, como *bla* (betalactamase) e *erm* (*erythromycin ribosomal methylase*), além da utilização de doses sub-inibitórias dos antibióticos. Além disso, é importante lembrarmos que *M. tuberculosis* possui um operon adicional, Rv0072-Rv0073, que apresenta alta identidade de sequência com Rv2563/Rv2564. Esse operon poderia complementar a atividade do transportador Rv2563-Rv2564, não sendo necessária sua super-expressão. A tentativa de produzir o domínio periplasmático da permease Rv0072 foi realizada em diferentes vetores, mas nenhum foi capaz de expressá-lo. Planejamos repetir estes ensaios em mutantes de Rv2563-Rv2564 e Rv0072-0073, como mutante duplo. Alternativamente, também avaliamos a expressão dos genes *rv2563/rv2564* e *rv0072/rv0073* em ensaios de qPCR.

Nos resultados anteriores obtidos com os extratos de culturas de *M. tuberculosis* crescidas na presença de antibióticos, não foi possível avaliar se houve diferenças significativas na produção dos componentes do transportador Rv2563/Rv2564 durante as diferentes fases de crescimento do bacilo.

Neste caso, avaliamos a expressão relativa dos componentes dos transportadores Rv2563-Rv2563 e Rv0072-Rv0073 por qPCR, e primeiramente trabalhamos na produção do cDNA (Figura 39).

Cinco amostras correspondentes a diferentes etapas da curva de crescimento de *M. tuberculosis var bovis* BCG foram retiradas para as análises de expressão dos genes de interesse. Em relação a expressão do gene *rv2563* observamos um perfil de *down-regulation* na presença dos antibióticos levofloxacina, vancomicina, eritromicina e cloranfenicol em comparação às amostras controle não tratadas (Figura 40A).

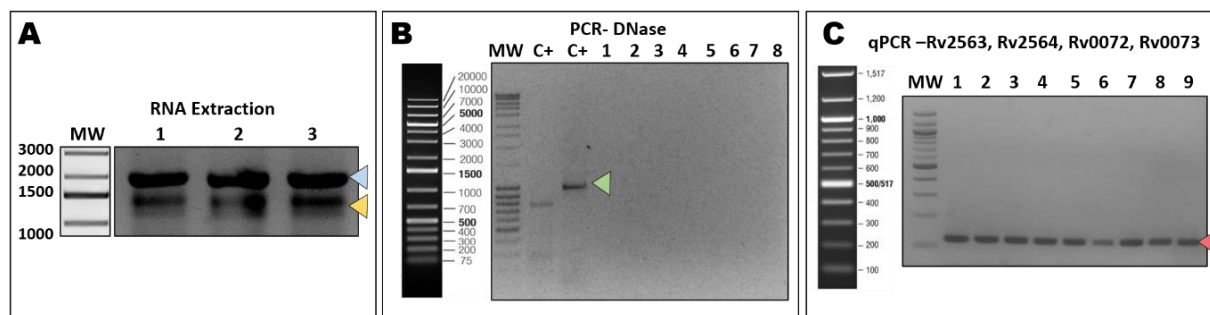


Figura 38 – Extração e produção do cDNA de MTB. (A) O RNA total de MTB foi extraído através da metodologia utilizando Trizol após lise das células com beads de zircônio. O gel de agarose apresentando os RNAs ribossomais 23s (azul) e 16s (amarelo), indicam uma extração de sucesso. (B) PCR utilizando o RNA após tratamento com DNaseI, para verificar a eliminação de todo DNA genômico extraído em conjunto com o RNA. C+: controles positivos da reação (verde), 1-8 amostras das extrações de RNA. (C) Gel de agarose da reação de agarose de alguns pontos da qPCR. 1-3: *Rv2563*, 4-5: *Rv2564*, 6-7: *Rv0072*, 8-9: *Rv0073*.

Estes antibióticos têm como alvos diferentes estruturas celulares: a levofloxacina interage com a DNA girase e topoisomerases, a vancomicina interfere na síntese do peptídeoglicano, enquanto a eritromicina e o cloranfenicol interferem na síntese proteica, com alvo na subunidade 50s do ribossomo bacteriano. Na presença dos aminoglicosídeos estreptomicina, canamicina e gentamicina, houve *down-regulation* do *rv2563* nos quatro primeiros pontos da curva de crescimento, mas regulação positiva na amostra relativa ao 35° dia, com um aumento de 2 vezes em relação ao controle não tratado. Na presença de rifampicina, que atua no nível da RNA polimerase, *rv2563* apresentou um comportamento similar ao dos aminoglicosídeos. A tetraciclina mostrou uma diminuição mais sutil da sua expressão e um aumento significativo de 4 vezes no último ponto da curva (35° dia). A ampicilina, um antibiótico que atua na polimerização do peptídeoglicano, foi o único que *up-regulated* o gene *rv2563* em todas as etapas de crescimento do bacilo.

Ao analisarmos o gene *rv2564* nas mesmas condições, observamos um perfil geral para todos os antibióticos similar ao observado para *rv2563*, com aumento da expressão nas amostras de fase estacionária que correspondem ao 35° dia (Figura 40B). A eritromicina, cloranfenicol e levofloxacina causaram a diminuição da expressão do gene. Em comparação com *rv2563*, esses dados sugerem que os dois genes têm tendência de aumento de expressão no final do crescimento.

Essa tendência pode sugerir duas situações distintas, a primeira que o transportador poderia estar relacionado à exclusão de antibióticos, que dada às condições sub-inibitórias, só chegam a induzir o aumento da expressão do transportador quando o dano à célula se faz mais evidente. A segunda, poderia estar relacionada às condições limitantes de nutrientes

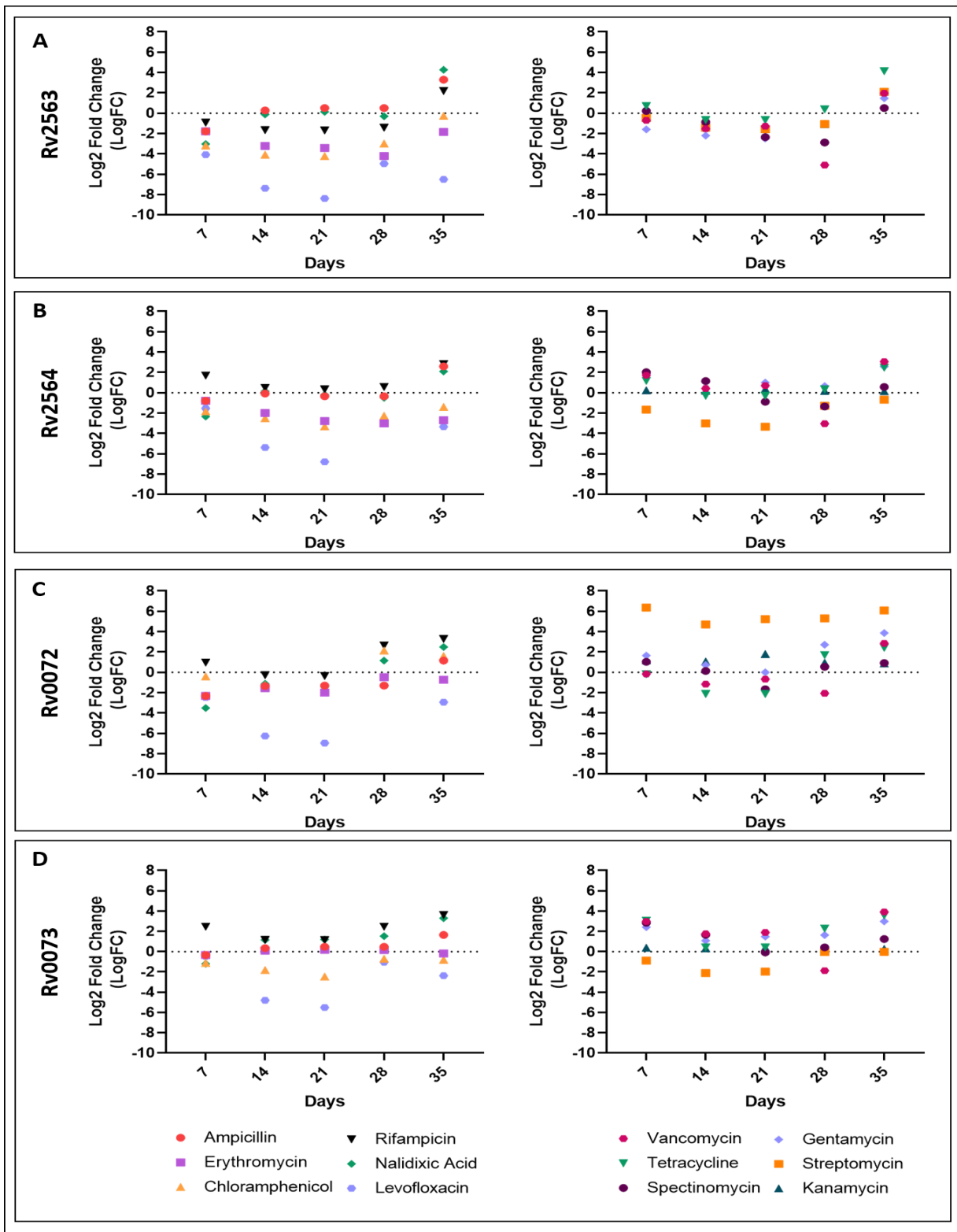


Figura 40 – Perfil de expressão relativa dos genes *rv2563-rv2564* de *M. tuberculosis var bovis* BCG na presença de antibióticos. A expressão dos genes foi avaliada por qPCR em meio MB7H9 na presença de diferentes antibióticos condições de cultivo. (A) *rv2563*. (B) *rv2564*. (C) *rv0072*. (D) *rv0073*. De uma maneira geral, é possível verificar um aumento da

expressão dos quatro genes após 28 dias de cultivo, o que segundo as curvas de crescimento, sugere final de fase logarítmica e início de fase estacionária.

Como outros transportadores de *M. tuberculosis*, a função do Rv2563/Rv2564 poderia estar relacionada à reciclagem de componentes da membrana como fonte de nutrientes.

Como discutido anteriormente, os genes *rv0072-rv0073* apresentam alta identidade de sequências (cerca de 80% para ambos os genes) em comparação ao transportador Rv2563-Rv2564. Essas similaridades poderiam ser resultado da perda de função do transportador original, de divergência funcional durante a evolução ou ainda, duplicação de função devido à relevância deles na fisiologia do bacilo. Desse modo, avaliamos a expressão dos genes *rv0072* e *rv0073* nas mesmas condições utilizadas para os genes *rv2563-rv2564* (Figura 40C e 40D, respectivamente).

Notamos que a eritromicina, substrato do transportador MacB em diversos microrganismos, gerou um perfil de *down-regulation* dos genes. É possível que esse resultado seja decorrente da presença do gene *erm* que também confere resistência a essa classe de antibióticos, tornando a ativação do transportador desnecessária nas quantidades de antibióticos utilizadas.

Além disso, embora tanto Rv2563/Rv2564 quanto Rv0072/Rv0073 sejam similares ao transportador MacB, é possível que transportem outros substratos que não os macrolídeos. Na presença de ampicilina e eritromicina a expressão genica de *rv0073* foi próxima a identificada no controle não tratado, com um leve aumento para a ampicilina após 35 dias de cultivo. Levofloxacina e cloranfenicol causaram a diminuição da expressão do gene. Por outro lado, rifampicina e ácido nalidíxico levaram ao aumento de expressão do gene *rv2564* em 3.6X e 2.5X, respectivamente, em relação ao controle não tratado.

Os dados obtidos sugerem que os antibióticos causaram um nível de expressão maior do transportador Rv0072-Rv0073 em comparação ao que foi observado para o transportador Rv2563-Rv2564. Essa mudança de expressão na presença dos aminoglicosídeos ficou evidente para o gene *rv0072*, embora não acompanhada pelo aumento da expressão do gene *rv0073*, figura 41.

Juntos, os resultados apontam para alguns pontos interessantes: (i) os genes são expressos em níveis diferentes mesmo pertencendo a um mesmo operon; (ii) os mRNAs dos transportadores apresentariam estabilidade diferente justificando as diferenças na expressão; (iii) os antibióticos testados não interferem na expressão dos genes dos transportadores, ou por não serem substratos destes, ou como mencionado anteriormente, por terem sido administrados em concentrações sub-inibitórias.

Desse modo, os ensaios com o transportador completo reconstituído em lipossomas ou com mutantes de *M. tuberculosis var bovis* BCG se mostram relevantes se quisermos identificar a função biológica.

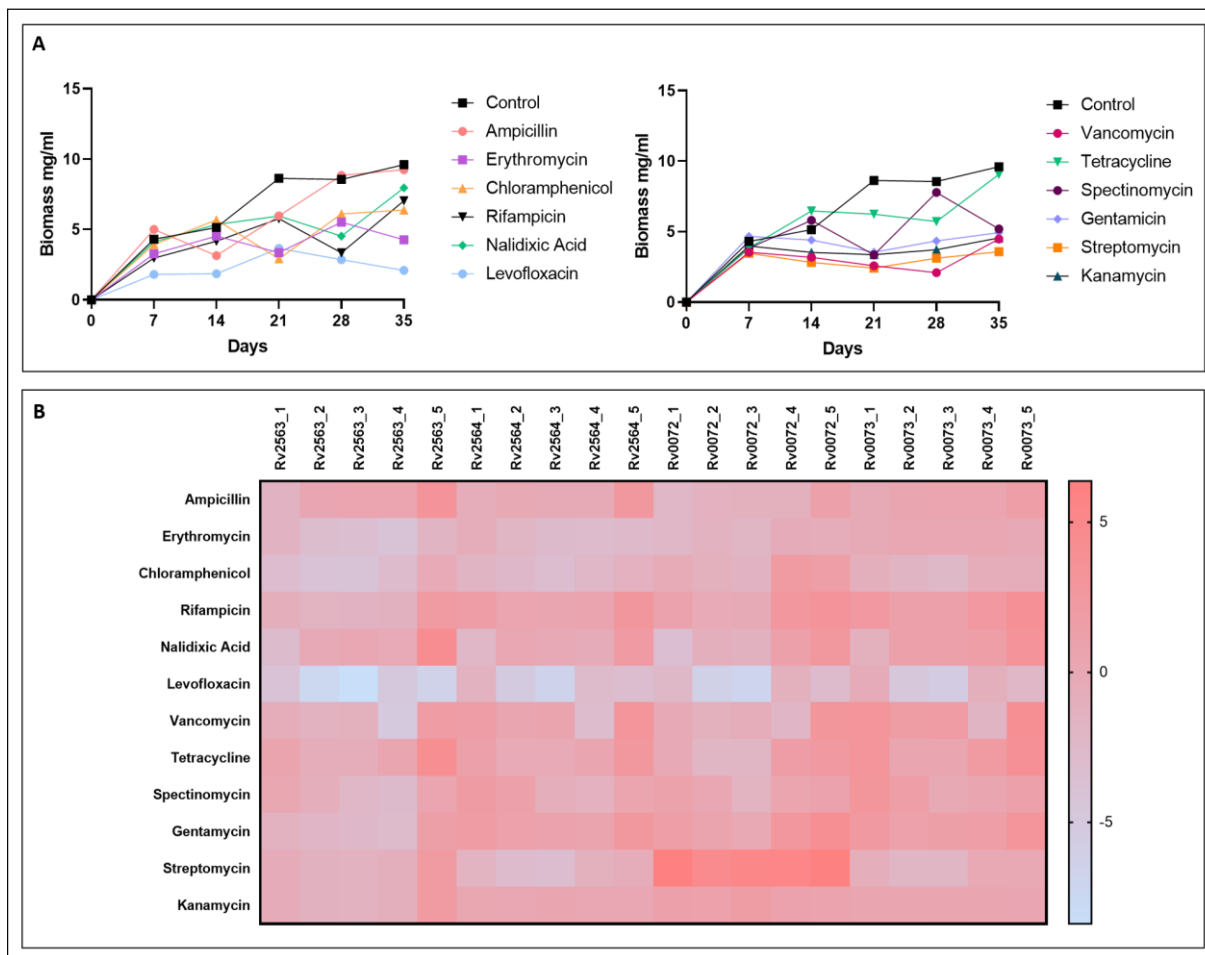


Figura 41 – Crescimento de *M. tuberculosis var bovis* BCG na presença dos antibióticos e perfil de expressão dos genes *rv2563/rv2564* e *rv0072/rv0073*. (A) Curva de crescimento do bacilo (biomassa) na ausência e presença dos diferentes antibióticos. O menor crescimento foi obtido na presença da levofloxacina. (B) *Heatmap* da expressão gênica dos genes dos transportadores Rv2563/Rv2564 e Rv0072/Rv0073 ao longo de 35 dias de cultivo (1 a 5 no eixo *x*) sob influência de 12 antibióticos diferentes (eixo *y*). Nenhum dos antibióticos testados mostrou-se um forte indutor da expressão desses transportadores, contudo, observamos uma tendência no aumento da expressão desses genes com 35 dias de cultura (amostras 5).

O ensaio de Pull-down foi capaz de capturar alguns possíveis parceiros de interação da Rv2563

Um das grandes questões sobre o *M. tuberculosis* é relacionada à presença de proteínas de transporte presentes na micomembrana, altamente hidrofóbica e a composição rica em ácidos micólicos e arabinogalactanas, e suas possíveis parceiras, como evidenciado em bactérias Gram positivas e Gram negativas. Embora a porina MspA (PDB:1UUN), tenha sido identificada em *M. smegmatis*, não foram encontrados homólogos em *M. tuberculosis*. Em sistemas de secreção do tipo I, nos quais transportadores ABC fazem parte em bactérias, e

sistemas tripartite como MacB-MacA-TolC, apresentam proteínas adaptadoras e uma porina de membrana externa que formarão um túnel entre membrana interna e o exterior, pelo qual efetores e antibióticos podem ser transportados.

Considerando que a permease Rv2563 apresenta a proeminente região periplasmática com alta similaridade com o sistema MacB, e que este se associa à proteína periplasmática MacA, buscamos verificar se em *M. tuberculosis* haveria proteínas parceiras de Rv2563. Nesse sentido, realizamos um ensaio de *pull-down* utilizando o domínio Rv2563perBP imobilizado na resina de níquel como isca, e extrato de proteínas totais de *M. tuberculosis*. O ensaio foi realizado conforme descrito nos materiais e métodos e não houve interação inespecífica de componentes do extrato com a resina de níquel, conforme avaliado em SDS-PAGE e gel nativo (Figura 42). Fracas bandas foram identificadas na eluição na região que corresponde a 75-20 kDa, conforme observado na coluna 3 do gel apresentado na figura 42.

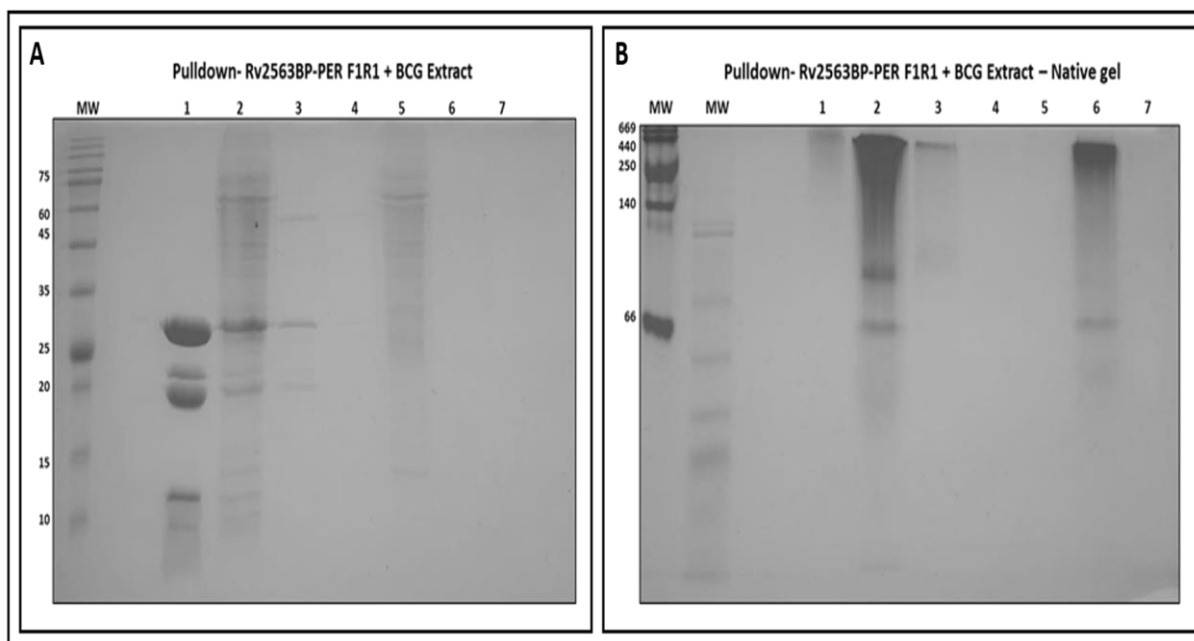


Figura 42 – Ensaio de *pull-down* para identificar possíveis interações do domínio Rv2563per com proteínas presentes no extrato de *M. tuberculosis var bovis* BCG. (A) SDS-PAGE das amostras submetidas ao ensaio de *pull-down* com o domínio Rv2563per imobilizado por meio da cauda de 6 histidinas. (B) Resultado do *pull-down* em gel nativo. 1- Rv2563per purificado, 2- *Flowthrough* do extrato de BCG, 3- Fração 1 eluída após a adição de imidazol, 4- Fração 2, 5- *Flowthrough* do extrato de BCG incubado com resina, 6- Amostra eluída 1 e 7- Amostra eluída 2. Não houve interação inespecífica de proteínas de BCG com a resina, conforme demonstrado nas linhas 6 e 7.

As seções dos géis desnaturantes e não desnaturantes foram divididas em duas partes de 75-45 kDa e de 45-a 20 kDa e enviadas para análise por espectrometria de massas, realizada no serviço Lactad da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.

As análises dos resultados da espectrometria de massas ainda não foram finalizadas, mas apresentamos na Tabela 2, as proteínas com maior representatividade, incluindo glicoproteínas, chaperonas, proteínas citoplasmáticas e proteínas presentes no envelope de *M. tuberculosis*.

Tabela 2: Proteínas originadas do ensaio de Pull-down identificadas na espectrometria de massas.

	Protein Entry	Protein Accession	Description	False positive Rate
Região 75-45 kDa	MP83_MYCTU	P9WNF3	Cell surface glycolipoprotein MPT83 OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=mpt83 PE=1 SV=1	0
	CH601_MYCTU	P9WPE9	60 kDa chaperonin 1 OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=groEL1 PE=1 SV=1	0
	DBH_MYCTU	P9WMK7	DNA-binding protein HU homolog OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=hup PE=1 SV=1	0
	ETF_A_MYCTU	P9WNG9	Electron transfer flavoprotein subunit alpha OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=etfA PE=1 SV=1	0
Região 45-20 kDa	CH601_MYCTU	P9WPE9	60 kDa chaperonin 1 OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=groEL1 PE=1 SV=1	0
	CH602_MYCTU	P9WPE7	60 kDa chaperonin 2 OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=groEL2 PE=1 SV=1	0
	I6XY36_MYCTU	I6XY36	Conserved protein OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=Rv1498A PE=1 SV=1	0
	ARGD_MYCTU	P9WPZ7	Acetylmethionine aminotransferase OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=argD PE=1 SV=1	0
	VAPB1_MYCTU	P0CW29	Putative antioxidant VapB1 OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=vapB1 PE=4 SV=1	0
	Y2564_MYCTU	P9WQI5	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein Rv2564 OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=Rv2564 PE=1 SV=1	0
	EFTU_MYCTU	P9WNN1	Elongation factor Tu OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=tuf PE=1 SV=1	0
	SAHH_MYCTU	P9WGV3	Adenosylhomocysteinase OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=ahcY PE=1 SV=1	0
	Y2628_MYCTU	P9WL65	Putative uncharacterized protein Rv2628 OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=Rv2628 PE=1 SV=1	0
	MMP81_MYCTU	P9WJT5	Probable transport accessory protein MmpS1 OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=mmpS1 PE=3 SV=1	0
	O53905_MYCTU	O53905	Conserved protein OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=Rv1531 PE=1 SV=1	0
	Gel Nativo	DNAK_MYCTU	P9WMJ9	Chaperone protein DnaK OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=dnaK PE=1 SV=1
Q79FN7_MYCTU		Q79FN7	Probable transcriptional regulatory protein MoxR1 OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=moxR1 PE=1 SV=1	0
CH601_MYCTU		P9WPE9	60 kDa chaperonin 1 OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=groEL1 PE=1 SV=1	0
CH602_MYCTU		P9WPE7	60 kDa chaperonin 2 OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=groEL2 PE=1 SV=1	0
ARGD_MYCTU		P9WPZ7	Acetylmethionine aminotransferase OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=argD PE=1 SV=1	0
I6XY36_MYCTU		I6XY36	Conserved protein OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=Rv1498A PE=1 SV=1	0
MP83_MYCTU		P9WNF3	Cell surface glycolipoprotein MPT83 OS=Mycobacterium tuberculosis (strain AT CC 25618 / H37Rv) OX=83332 GN=mpt83 PE=1 SV=1	0

O domínio Rv2563per não apresenta interação direta e capacidade de ativação de células mamíferas

As estratégias para o estabelecimento de uma infecção bacteriana compreendem, entre outras, a interação com células do hospedeiro e a manipulação do sistema imune. MTB apresenta vários mecanismos associados a essas estratégias para infecção e desenvolvimento da tuberculose, com uma característica peculiar que é a sua capacidade de permanecer latente no hospedeiro, com baixa taxa de replicação, protegido do sistema imunológico.

Analisamos se o domínio Rv2563 poderia ter qualquer interação com células de mamíferos e desempenhar algum papel na indução e modulação do sistema imunológico. Foram realizados ensaios de interação do domínio com as células Calu-3, TC-1 e THP-1. A interação foi medida por citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos anti-His e anti-IgG de camundongo marcado com Alexa Fluor 488.

Primeiramente, tentamos utilizar os anticorpos anti-Rv2563per produzidos em camundongos, mas os ensaios mostraram que o anticorpo apresentava interação inespecífica com as linhagens celulares testadas. Alternativamente, utilizamos o domínio Rv2563perBP que tem fusão de GB1 no N-terminal e uma cauda de oito histidinas, as quais puderam ser marcadas pelo anticorpo anti-his. Os ensaios mostraram que não houve diferença na interação entre os controles celulares e a proteína sugerindo que a permease não participa nos processos de adesão e interação com a célula hospedeira (Figura 43). Verificamos também se a proteína Rv2563 teria a capacidade de ativar monócitos humanos em cultura, uma vez que a ativação de monócitos é um importante parâmetro tanto para a resposta imune do hospedeiro como para a patogênese do microrganismo. Utilizamos as células THP-1 e novamente, a citometria de fluxo, para avaliar possível aumento da expressão dos marcadores de ativação HLA-DR, CD-80 e CD-83.

Não houve ativação das células THP-1 *in vitro* pelo domínio Rv2563per uma vez que os valores dos marcadores ficaram próximos ao do controle não ativado. O fato do domínio Rv2563per não ativar células imunes diretamente não descarta a possibilidade de transportar fatores proteicos ou outras moléculas que possam interferir diretamente com as células do hospedeiro, principalmente macrófagos que são as células-alvo do MTB durante o processo de infecção.

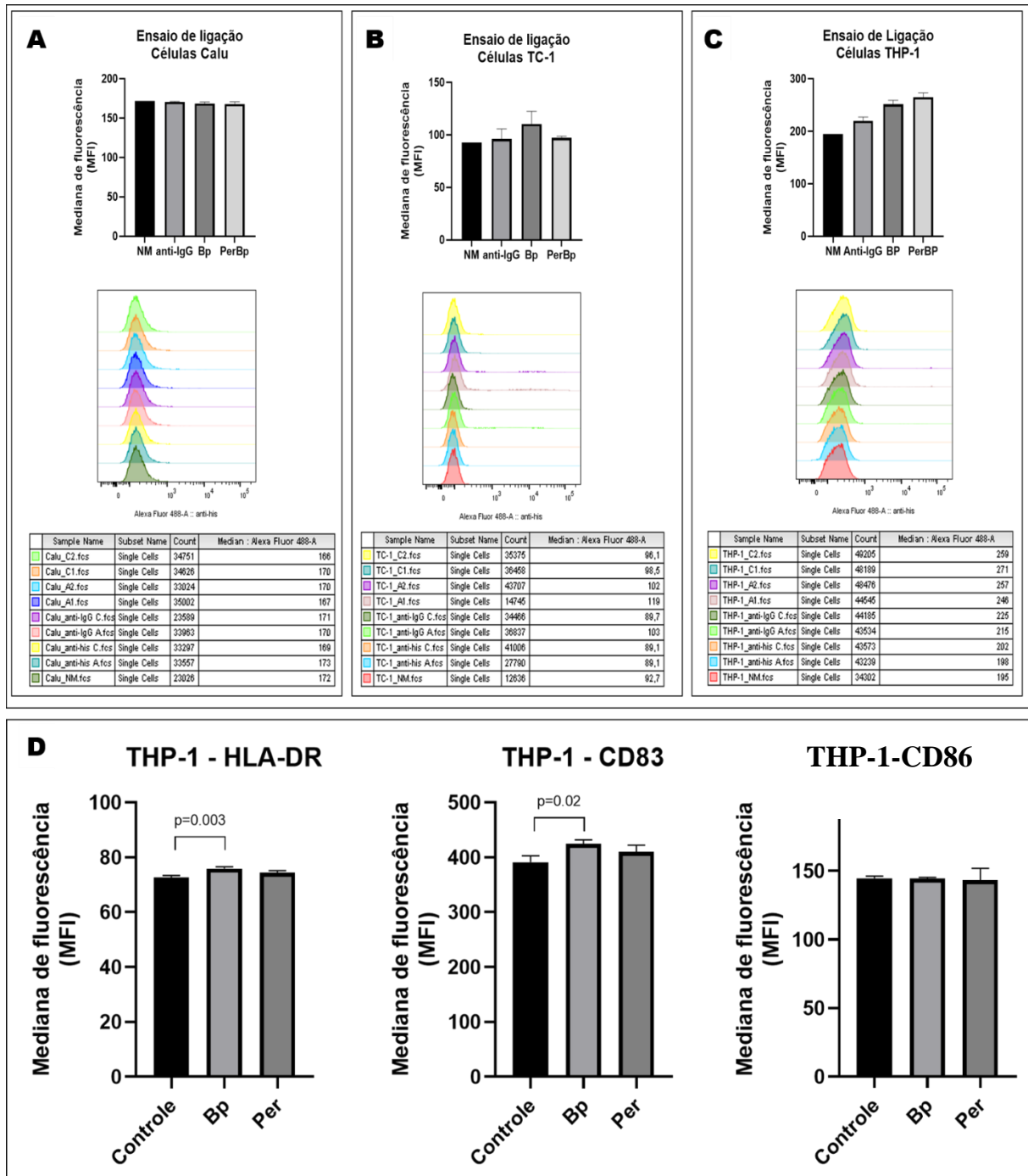


Figura 43 – O domínio Rv2563per não interage diretamente com células pulmonares e monócitos e nem apresenta capacidade de ativação de monócito *in vitro*. (A) Ensaio em células Calu-3. (B) Ensaio com as células TC-1. (C) Ensaio com células THP-1. Controles da proteína BP (proteína GB1), NM (não marcado) e o anticorpo secundário (anti-IgG). Não houve diferença estatística considerável entre o domínio Rv2563per e os demais controles, mostrando que em nenhuma das linhagens celulares testadas há interação direta com o domínio Rv2563per. (D) O domínio Rv2563per não apresentou a capacidade de ativar monócitos humanos *in vitro*. Nenhum dos marcadores de ativação celular de monócitos, HLA-DR, CD83 e CD86 foi mais expresso na presença da proteína nas condições testadas.

A imunização com o domínio Rv2563per sugere ativação de um tipo de resposta Th2

As proteínas de transportadores ABC já foram demonstradas como excelentes antígenos para aplicação diagnóstica e vacinal. A vacina BCG foi um enorme avanço em saúde pública diminuindo a incidência de meningite tuberculosa em crianças, porém, não se mostrou eficiente em diminuir a incidência de tuberculose pulmonar na população mundial.

Desenvolver uma vacina eficiente contra MTB é necessário para melhoria da saúde global. Nesse sentido, como o domínio Rv2563per se mostrou altamente imunogênico em modelo murino, realizamos a avaliação do tipo de resposta gerado por essas imunizações. Foram realizados ensaios de ELISA utilizando os soros de seis camundongos previamente imunizados com o domínio Rv2563per. A resposta induzida foi majoritariamente gerada com anticorpos do isotipo IgG1, que correspondem à uma resposta relacionada ao tipo Th2, conforme a figura 44. A resposta Th2 é caracterizada pela geração de anticorpos majoritariamente por meio da ativação e células B, e em menor quantidade, pela resposta celular. Para patógenos intracelulares como o MTB seria interessante um perfil de resposta Th1 principalmente voltado para a resposta celular.

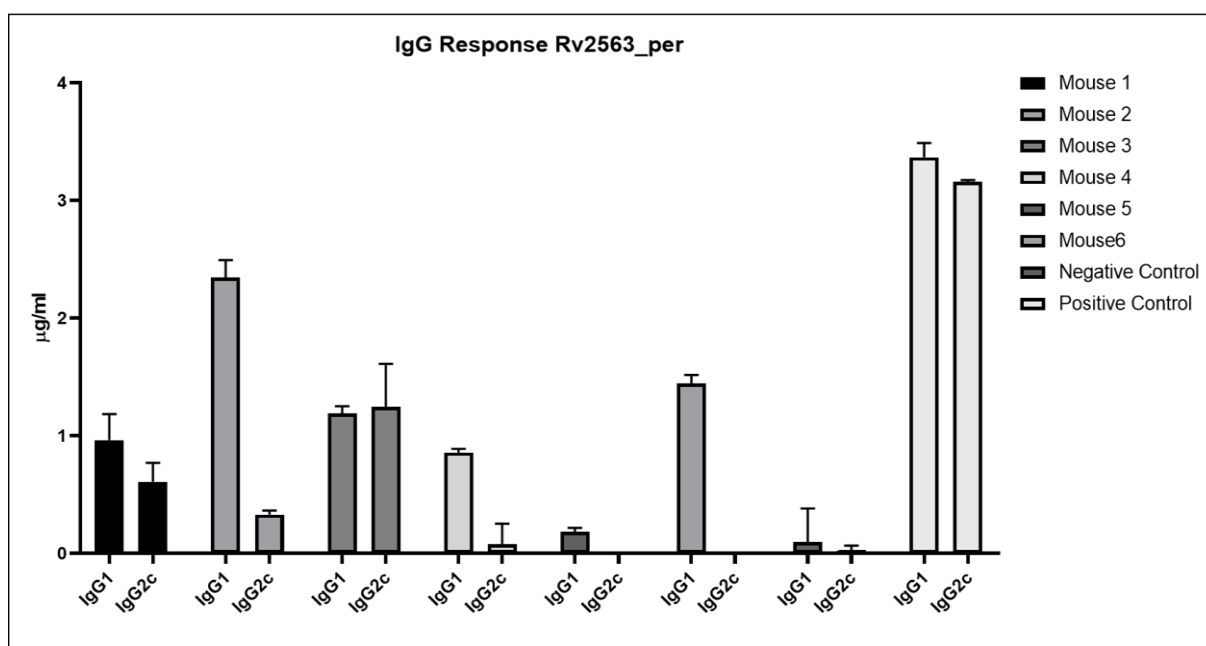


Figura 44 – A estratégia vacinal utilizando a Rv2563per gerou sobretudo uma resposta do tipo Th2 em modelo murino. O soro dos seis camundongos previamente imunizados para geração de anticorpos contra a Rv2563per foi analisado para identificar o padrão de resposta imune gerada. Em todos os modelos murinos a resposta gerou anticorpos do isotipo IgG1, que indicam um padrão de resposta do tipo Th2, com ênfase na resposta humoral mais predominante do que celular.

Contudo, deve-se atentar para o fato de que as imunizações foram feitas com o domínio Rv2563per e como adjuvante a toxina LT1 (toxina termolábil de *E. coli*), cujo efeito já tem sido associado a um aumento da resposta Th2 em detrimento da resposta Th1. Além disso, a via de administração, que no caso foi cutânea, e a concentração de antígenos também tem influência no padrão da resposta gerada, como proposto por OLAFSDOTTIR et al., 2007.

Comparação do perfil de imunogenicidade do transportador Rv2563-Rv2564 com os transportadores da família MacB de proteínas

Considerando o emprego de transportadores ABC como potencial antígeno vacinal ou no uso para desenvolvimento de anticorpos, realizamos a caracterização do perfil imunogênico do transportador Rv2563-Rv2564 em comparação com outros transportadores da família MacB, utilizando ferramentas de bioinformática. Primeiramente, realizamos uma predição de epítomos lineares da Rv2563 para células B e comparamos com o perfil obtido para as transmembranas MacB, LolC, LolE e FtsX de *E. coli*.

Os resultados confirmam, como verificado pelos altos títulos de anticorpos induzidos contra Rv2563per, que o domínio periplasmático da Rv2563 apresenta a maioria dos epítomos preditos na permease. Este resultado também foi observado na comparação com as demais transmembranas da família MacB (Figura 45).

O fato do domínio periplasmático conter a maioria dos epítomos mostra que este é suficiente para a obtenção de uma resposta imunológica interessante visando proteção do organismo. Do ponto de vista biotecnológico, este fato é interessante, uma vez que expressar proteínas de membrana completas é desafiador e envolve não apenas diferentes tentativas como altos custos e o uso de detergentes que não podem ser utilizados em formulações vacinais.

Outras análises realizadas com diferentes algoritmos que avaliaram maior acessibilidade e flexibilidade, também indicaram que o domínio periplasmático é a região com o maior número de epítomos preditos. Esses resultados completos podem ser visualizados nos anexos (Figura A1, Capítulo III – Anexo). O mesmo perfil foi identificado para a família MacB.

Ao realizarmos a mesma análise para o domínio ATPase através da Rv2564, observamos que são preditos poucos epítomos para o domínio catalítico, enquanto que quase todo o domínio regulatório foi predito como fonte de epítomos lineares. Ao compararmos com as proteínas da família MacB (MacB, FtsE e LolD) de *E. coli*, as regiões preditas para epítomos lineares também como no caso da permease, foram muito similares, exceto pelo fato que estas proteínas não apresentam domínios regulatórios (Figura 46).

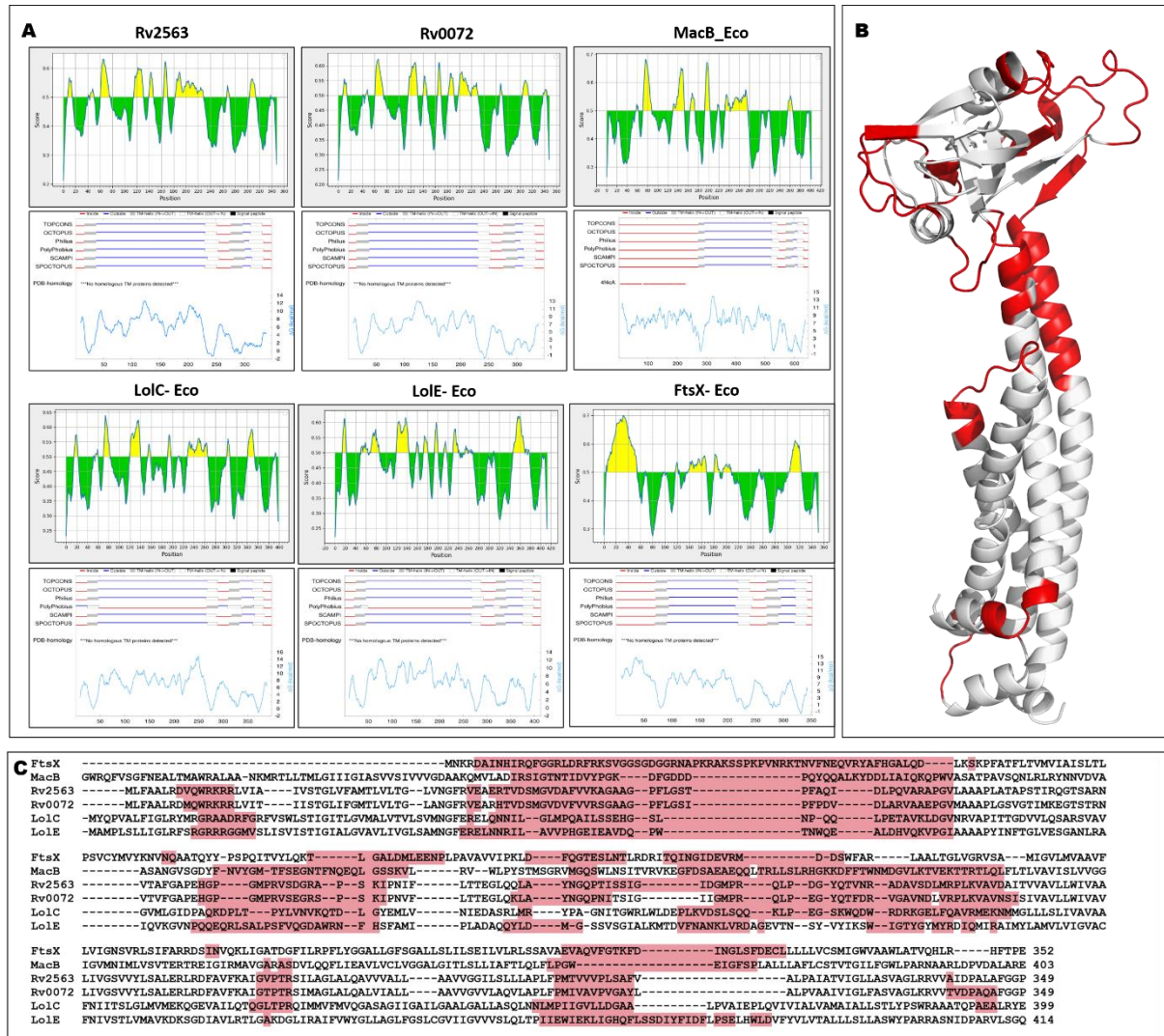


Figura 45 – Predição do epítomos lineares da Rv2563 e comparação com transmembranas da família MacB. (A) A predição dos epítomos lineares foi realizada na ferramenta IEDB para peptídeos lineares (<http://tools.iedb.org/bcell/>), foram feitas as predições para a Rv2563 e Rv0072 de MTB, MacB, LolC, LolE e FtsX de *E. coli*. As regiões em amarelo indicam as regiões preditas como antigênicas, que se mostraram muito parecidas entre a Rv2563 e as demais proteínas. Abaixo a análise do TOPCONS mostra que as proteínas apresentam o perfil de transmembranas muito similar. (B) Modelo da Rv2563 destacando-se as regiões preditas como epítomos lineares, onde a maioria dos epítomos se encontra no domínio periplasmático. (C) Alinhamento entre as seqüências destacando-se os epítomos lineares preditos, os epítomos da Rv2563 identificados são similares aos epítomos identificados para as proteínas da família MacB.

As similaridades entre a predição dos epítomos para as proteínas da família MacB e o transportador Rv2563-Rv2564 reforçam a ideia de que o transportador Rv2563/Rv2564 pertence à família MacB, cujos membros tem mostrando uma diversidade de funções, quase todas relacionadas a extrusão de moléculas.



Figura 46 – Predição do epítomos lineares da Rv2564 e comparação com as ATPases da família MacB. (A) A predição dos epítomos lineares foi realizada na ferramenta IEDB para peptídeos lineares (<http://tools.iedb.org/bcell/>), foram feitas as predições para a Rv2564 e Rv0073 de MTB, MacB, LolD e FtsE de *E. coli*. As regiões em amarelo indicam as regiões preditas como antigênicas, e o perfil do core entre as proteínas se mostrou muito similar. **(B)** Modelo da Rv2564 destacando-se as regiões preditas como epítomos lineares, onde a maioria dos epítomos se encontra no domínio regulatório da Rv2564. **(C)** Alinhamento entre as sequências destacando-se os epítomos lineares preditos, os epítomos identificados para a Rv2564 são similares aos epítomos identificados para as proteínas da família MacB na região do core, destaca-se que o domínio regulatório se mostrou quase completamente como fonte de epítomos lineares.

Ainda considerando a importância de respostas imunes no contexto da TB, seja do ponto de vista da relação patógeno-hospedeiro ou do ponto de vista do desenvolvimento de ferramentas diagnósticas ou terapêuticas, decidimos continuar a caracterização através da predição dos epítomos reconhecidos pelos principais alelos brasileiros do MHC-I e MHC-II (complexo Principal de Histocompatibilidade).

O tipo de resposta imune é decisivo para o curso de uma infecção e no processo de proteção de um organismo, portanto, ativar as respostas adequadas frente ao patógeno é peça chave para o organismo. O MHC-I está presente em todas as células nucleadas e basicamente está relacionada a apresentação de antígenos a células citotóxicas T CD8+, portanto, são importantes para a resposta imune direcionada a patógenos intracelulares como o MTB. Por sua vez o MHC-II está presente em células apresentadoras de antígenos como macrófagos e células dendríticas, apresentando antígenos para células T CD4+, que regulam demais células como células B (NEEFJES et al., 2011).

A avaliação do transportador Rv2563-Rv2564 evidenciou predominância de epítomos do tipo MHC-I, principalmente no domínio periplasmático e ATPase, o que é interessante, visto que por ser um patógeno intracelular, a resposta MHC-I é a mais adequada para o combate ao bacilo. Também em relação aos epítomos de MHC-II, as duas regiões são as mais presentes (Figura 47). Na predição de epítomos conformacionais, também destaca-se a região periplasmática da Rv2563.

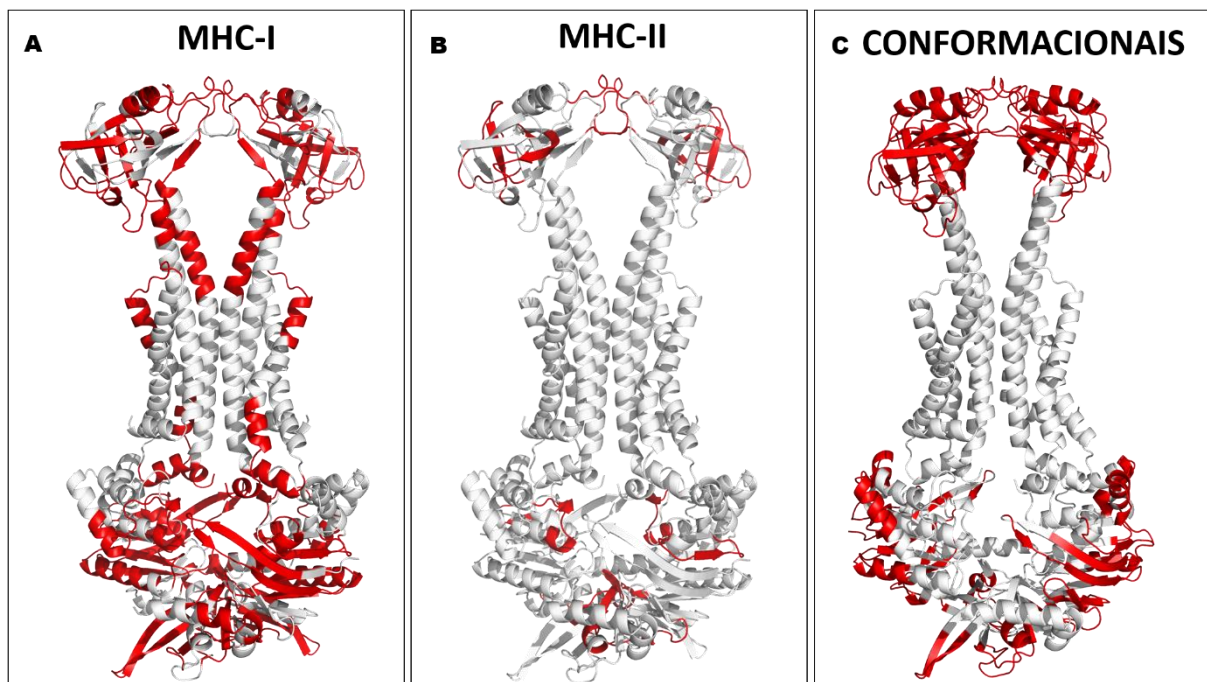


Figura 47 – Predição dos epítomos apresentados pelos principais alelos brasileiros para MHC-I e MHC-II e predição de epítomos conformacionais. (A) Modelo do transportador Rv2563-Rv2564 destacando os epítomos preditos a serem apresentados pelos alelos de MHC-I mais comuns na população brasileira. Foram identificadas principalmente regiões do domínio periplasmático da Rv2563 e na ATPase Rv2564. (B) Os epítomos preditos para os alelos mais incidentes de MHC-II na população brasileira foram poucos em relação ao MHC-I. O domínio periplasmático apresentou o maior número de epítomos preditos. (C) A resposta imune também inclui a identificação de epítomos conformacionais que são dependentes da estrutura local dos epítomos, a predição dos epítomos identificou epítomos em todo o domínio periplasmático da Rv2563, e na região externa da ATPase Rv2564.

A predição também identificou epítomos conformacionais na Rv2564, localizados principalmente no domínio catalítico e algumas regiões do domínio regulatório. DENG e colaboradores (2014), já haviam mostrado por técnicas de *microarray* com as proteínas de MTB, que a ATPase do transportador apresentava altas taxas de reatividade em soro de pacientes positivos para MTB, tornando-se um alvo interessante para o desenvolvimento de uma ferramenta diagnóstica de TB.

Em conjunto, as análises reforçam que o transportador Rv2563-Rv2564 de MTB pode ser utilizado como um componente para o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas e terapêuticas, principalmente considerando o domínio periplasmático da Rv2563, imunogênico nos ensaios *in vitro* realizados nesse trabalho, e um alvo interessante em todas as predições e análises de bioinformática conduzidas.

Conclusão do capítulo

Os dados obtidos no conjunto de experimentos apresentados neste trabalho, sugerem que o domínio periplasmático da Rv2563 apresenta elevada imunogenicidade, aspecto que poderia ser explorado no desenvolvimento de ferramentas diagnósticas e no desenvolvimento de novas opções de tratamento.

A expressão do transportador identificada durante toda a curva de crescimento, sugeriu um papel basal na fisiologia do microrganismo, com maior ênfase na fase estacionária de crescimento, o que poderia associá-lo ao processo de reciclagem da micomembrana. Este resultado poderia também ser relacionado à resposta observada com a adição dos antibióticos, que se de alguma forma mostrou diferenças, foram mais acentuadas no final da fase logarítmica e início da estacionária, onde a necessidade de reciclagem é maior e a membrana poderia estar mais comprometida.

Por fim, a não observância da ativação de células mamíferas pelo domínio Rv2563per não necessariamente exclui seu papel na manipulação da resposta imune do hospedeiro, pois os ensaios foram diretos com as células *in vitro*. Neste caso, ensaios de infecção dos macrófagos com o microrganismo e com mutantes seriam talvez, mais interessantes para responder isso.

CAPÍTULO IV

1 Ensaios complementares

1 A Rv2564 recombinante purificada a partir de células de *E. coli* é funcional

A ATPase Rv2564, assim como o transportador completo, sempre foi um desafio durante todo o projeto. Visando melhorar a solubilidade da proteína e sua estabilidade, foram produzidas construções de tamanhos variados com diferentes proteínas de fusão. A estratégia foi produzir construções truncadas no domínio regulatório (C-terminal), ausente na maioria das ATPases dos sistemas ABC, e que nos nossos ensaios, mostrou-se a região mais passível de degradação. Adicionalmente, seria interessante avaliar o papel do domínio na atividade catalítica da ATPase.

No total, foram realizadas 18 construções da Rv2564 completa, 10 construções truncadas no C-terminal (full ou completa, medium com parte do domínio regulatório e small, sem o domínio regulatório) e uma construção do domínio regulatório isolado. Somente a partir das construções Rv2564-Sumo-Full e Rv2564-Bla foi possível obter a Rv2564 solúvel e mais estável. Tais construções foram testadas em dois ensaios, o de interação com hélices de associação (realizado na Inglaterra) e o ensaio de atividade (realizado no Brasil).

A expressão da Rv2564 fusionada à beta-lactamase no N-terminal (Rv2564-Bla) foi realizada em *E. coli* Artic(DE3), a 12 °C por 24 horas após a adição de 0.4 mM de IPTG. A proteína foi produzida e purificada com massa molecular de 78 kDa (com fusão), e 36 kDa sem a fusão (ou proteína completa com domínio regulatório). Após o processo de purificação que incluiu uma etapa de IMAC, clivagem da fusão com a protease TEV, R-IMAC e SEC, dois picos foram observados no cromatograma (Figura 48B, 48C e 48D). O primeiro pico apresentou duas bandas, respectivamente, com massas moleculares de 37 kDa (Rv2564 sem fusão) e 75 kDa (Rv2564 não clivada e com fusão de beta-lactamase e o segundo uma banda com massa molecular de 45 kDa, correspondente à beta-lactamase (Bla), que de acordo com a SEC, foi purificada como dímero. Esta proteína foi utilizada para avaliação da atividade de ATPase.

Os resultados mostraram que a Rv2564 purificada apresentou atividade de hidrólise do ATP, avaliada pela liberação de fosfato livre (Figura 48E). A atividade de Rv2564 foi avaliada em 3.52 $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$, o que foi comparável aos valores obtidos para a MalK de *E. coli* (CHEN et al., 2013), e SugC de *M. tuberculosis* (SABHARWAL et al., 2020), um importador responsável pela reciclagem de trealose durante a síntese de ácidos micólicos. É importante lembrar que os resultados foram obtidos com a ATPase isolada e que a ausência dos demais componentes do sistema, que seriam a proteína transmembrana Rv2563 e algum outro possível parceiro podem aumentar ou diminuir a atividade de hidrólise de ATP. Em *E. coli*, foi

demonstrado que a atividade de transporte do transportador de MacB (hidrólise de ATP), aumentada na presença da proteína adaptadora MacA (LU; ZGURSKAYA, 2013).

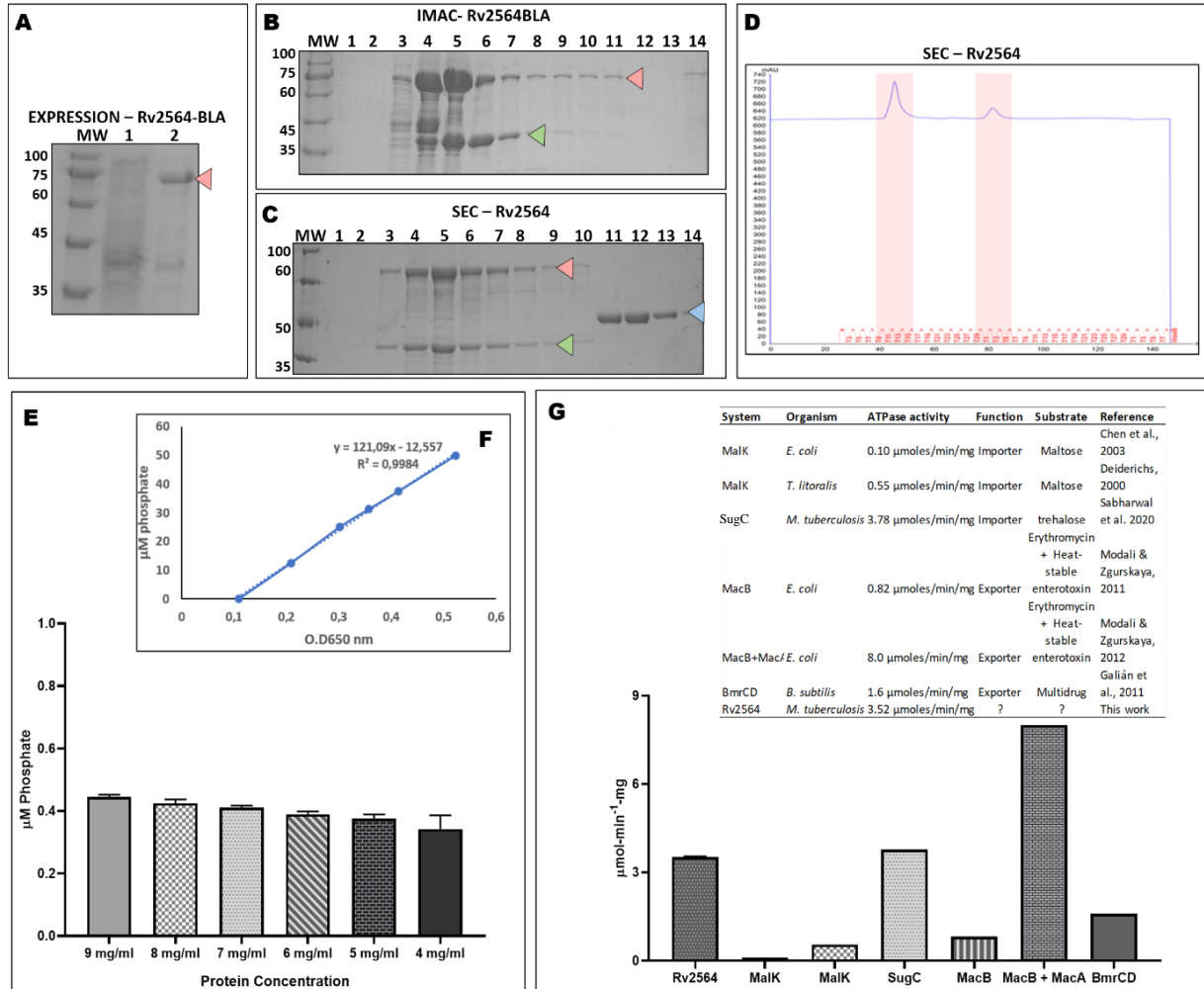


Figura 48 – Obtenção da proteína Rv2564 a partir da construção Rv2564-Bla e atividade de ATPase. (A) SDS-PAGE da expressão de Rv2564-Bla produzida em *E. coli* Artic(DE3) a partir da indução com 0.4 mM de IPTG em temperatura de 12°C. (B) Frações da IMAC de Rv2564-Bla realizada em 50 mM Tris pH 7.5 e 150 mM NaCl e eluídas com 150 mM imidazol. A proteína em fusão com a beta-lactamase foi eluída com massa molecular de 75 kDa. (C) SDS-PAGE após a SEC. Pico 1: frações 1-10. Seta vermelha: Rv2564-Bla não clivada e seta verde: Rv2564. (D) Cromatograma da SEC. As caixas vermelhas destacam os picos eluídos com 55 ml e 80 ml de volume de coluna Sephacryl 200 HR. (E) Ensaio de atividade de ATPase da Rv2564 realizado com o Kit Sigma ATPase/GTPase Activity assay (Sigma, Alemanha). O ensaio foi realizado nas concentrações de proteína de 9 a 4 mg/ml e a produção do fosfato inorgânico foi mensurada através da formação de precipitado colorimétrico, produto da interação do Pi + verde malaquita + molibdato. (F) Curva padrão da concentração de fosfato realizada para o ensaio. (G) Comparação da atividade de Rv2564 com outras ATPases.

A partir da avaliação da funcionalidade da Rv2564 com esta construção, será possível utilizar a mesma proteína para ensaios na presença de outros ligantes, como o cAMP. Em *L. lactis*, o segundo mensageiro c-di-AMP é responsável por inibir o transporte de glicina-betaína

pelo transportador OpuA, responsável pela osmoproteção da célula bacteriana sob condições de stress osmótico (VAN DER HEIDE; POOLMAN, 2000). Neste processo, especula-se que o transportador poderia sentir o estresse osmótico através de uma pequena região da ATPase que contém um motivo hélice-volta-hélice, (helix-turn-helix), o qual em condições normais de osmolaridade, interage com a membrana aniônica (SIKKEMA et al., 2020). A quebra da interação entre a membrana e o pequeno motivo hélice-volta-hélice ativa o transportador, com o afastamento desse motivo da membrana aniônica sem a presença do c-di-AMP.

O segundo ponto de regulação neste sistema, é mediado pelo segundo mensageiro c-di-AMP, que ao interagir com o domínio regulatório promove sua dimerização constante, essa dimerização constante aumenta a taxa de quebra de ATP, contudo o ciclo de transporte é falho, não ocorrendo a entrega do substrato. Nesse transportador isso significa que uma maior taxa de atividade de hidrólise de ATP não está ligada a uma maior taxa de transporte, e que a função do transportador como um todo depende do contexto biológico ao qual o transportador está ajustado.

2 Avaliação do potencial de interação da hélice de associação da permease Rv2563 com a Rv2564 e sua especificidade

Uma importante característica dos transportadores ABC é que a interação entre o domínio transmembrana e o domínio ATPase é realizada por pequenas hélices citoplasmáticas presentes no domínio transmembrana, ou hélices de associação. Essas hélices se acomodam no em bolsões presentes nas ATPases e são capazes de transmitir mudanças conformacionais ocorridas na transmembrana ou estimuladas pela ATPase para abertura ou fechamento dos transportadores. Portanto, tal interação é extremamente importante para a funcionalidade de um transportador ABC.

Baseados nessa premissa, a inibição da atividade da ATPase ou de sua interação com a permease, poderia ser uma estratégia de inibição de transportadores ABC. Como as ATPases são conservadas em procariotos e eucariotos, a inibição da interação com a permease se tornaria mais específica. Por outro lado, a produção de permeases para tais estudos não é trivial, como demonstrado neste trabalho. Neste caso, pensamos em utilizar uma abordagem mais simplista para o estudo de interação entre as permeases e ATPases, na qual ao invés de utilizarmos a proteína de membrana inteira, utilizaríamos apenas as hélices transmembranas, expostas em uma proteína âncora solúvel e de fácil produção. Este trabalho foi elaborado em colaboração com o grupo do Dr. Marko Hyvönen (Departamento de Bioquímica da Universidade de

Cambridge, Inglaterra), o qual desenvolveu um sistema para exposição de peptídeos na proteína RadA de *Pyrococcus furiosus* (ROSSMANN et al., 2017). No sistema, o fragmento correspondente à sequência de aminoácidos de interesse é clonado em um sítio de enzima de restrição localizado no meio do gene *radA*, de forma que quando a proteína for expressa, o peptídeo fica exposto e flanqueado por regiões não enoveladas, o que lhe confere maior flexibilidade. Adicionalmente, a proteína Rad engenheirada é produzida com uma cauda de histidina que permite sua adsorção em microchips específicos para ensaios com a tecnologia de interferometria de biocamada, onde a proteína Rad com a hélice de associação (doravante denominada Rad-ch) permanece fixa e a ATPase em solução (Figura 49).

Nós clonamos a sequência correspondente à hélice de associação da Rv2563 no gene *radA* e utilizamos esta proteína para estudos de interação com a Rv2564. No sistema, a Rv2564 foi imobilizada em biosensores e a Rad_Rv2563_ch mantida em solução.

Para compararmos a especificidade do sistema, utilizamos também hélices de associação de outras permeases de transportadores ABC de *E. coli*, como as proteínas MalF e MalG do sistema de transporte de maltose (OLDHAM et al., 2007; BORDIGNON; GROTE; SCHNEIDER, 2010; RICHET; DAVIDSON; JOLY, 2012; CHEN et al., 2013; GOURIDIS et al., 2014) e a proteína BtuC, permease do sistema de transporte de vitamina B12 (WARNER et al., ; BORTHS et al., 2002; LEWINSON et al., 2010; KORKHOV; MIREKU; LOCHER, 2012).

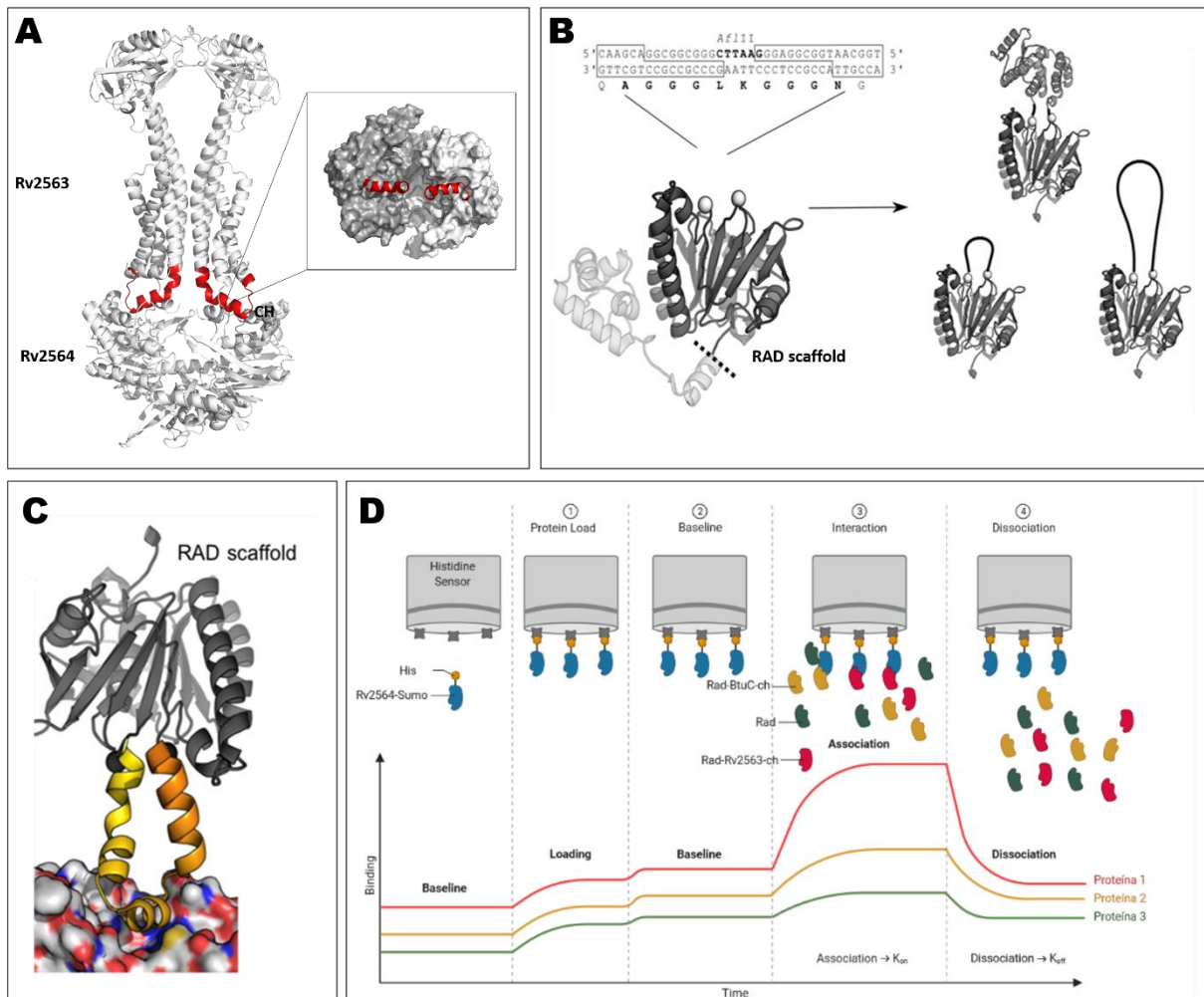


Figura 49 – Sistema Rad Display para estudo das interações entre a hélice de associação da Rv2563 e a ATPase Rv2564. (A) Modelo do transportador Rv2563-2564, destacando as hélices de associação (vermelho) responsáveis pela interação entre o domínio transmembrana e o domínio ATPase. A interação é realizada através do bolsão presente na região superior da ATPase. (B) Sistema Rad-display que tem a proteína RadA de *Pyrococcus furiosus* engenheirada. Através da clonagem LIC inserimos a região codificadora da hélice de associação ou de qualquer peptídeo de interesse em uma região que não enovelada da proteína RadA. (C) Modelo de interação da proteína Rad-Rv2563-ch com a ATPase Rv2564. (D) Esquema representativo do ensaio de Bio-interferometria de camada (BLI). A proteína Rv2563 é imobilizada em sensores contendo anticorpos anti-his que irão capturar a Rv2564 (1), seguido da estabilização do sinal no sistema (2), posteriormente as proteínas Rad contendo as hélices de associação são colocadas em poços individuais em placa de 96 poços e a interação com a Rv2564 é mensurada (3), no final, com adição de tampão ácido (pH 3.0) a dissociação é realizada (4).

A Rv2564 foi produzida em células de *E. coli* BL21(DE3) portadoras da construção Rv2564-SUMO-Full (Rv2564 completa) em meio 2YT com os respectivos antibióticos a partir da indução com 0.4 mM de IPTG por 16 horas a 25°C. A ATPase foi purificada por afinidade ao metal em tampão contendo 50 mM de Tris pH 8.0; 150 mM de NaCl; 5% de glicerol e 5 mM de MgCl₂. Em paralelo foram produzidas as hélices de associação das permeases Rv2563 de

M. tuberculosis e BtuC, MalG e MalF de *E. coli*, a partir do vetor pRAD. A indução da expressão das proteínas foi realizada em cepas BL21(DE3) portadoras do plasmídeo pUBS520, o qual expressa tRNAs raros em *E. coli*, necessários para a síntese da RadA, conforme a figura 50. Após a indução, as proteínas foram purificadas por troca iônica com tampão 20 mM MES pH 6.0 e 1 mM de EDTA, realizada na coluna HiTrap SPHP de 5 ml.

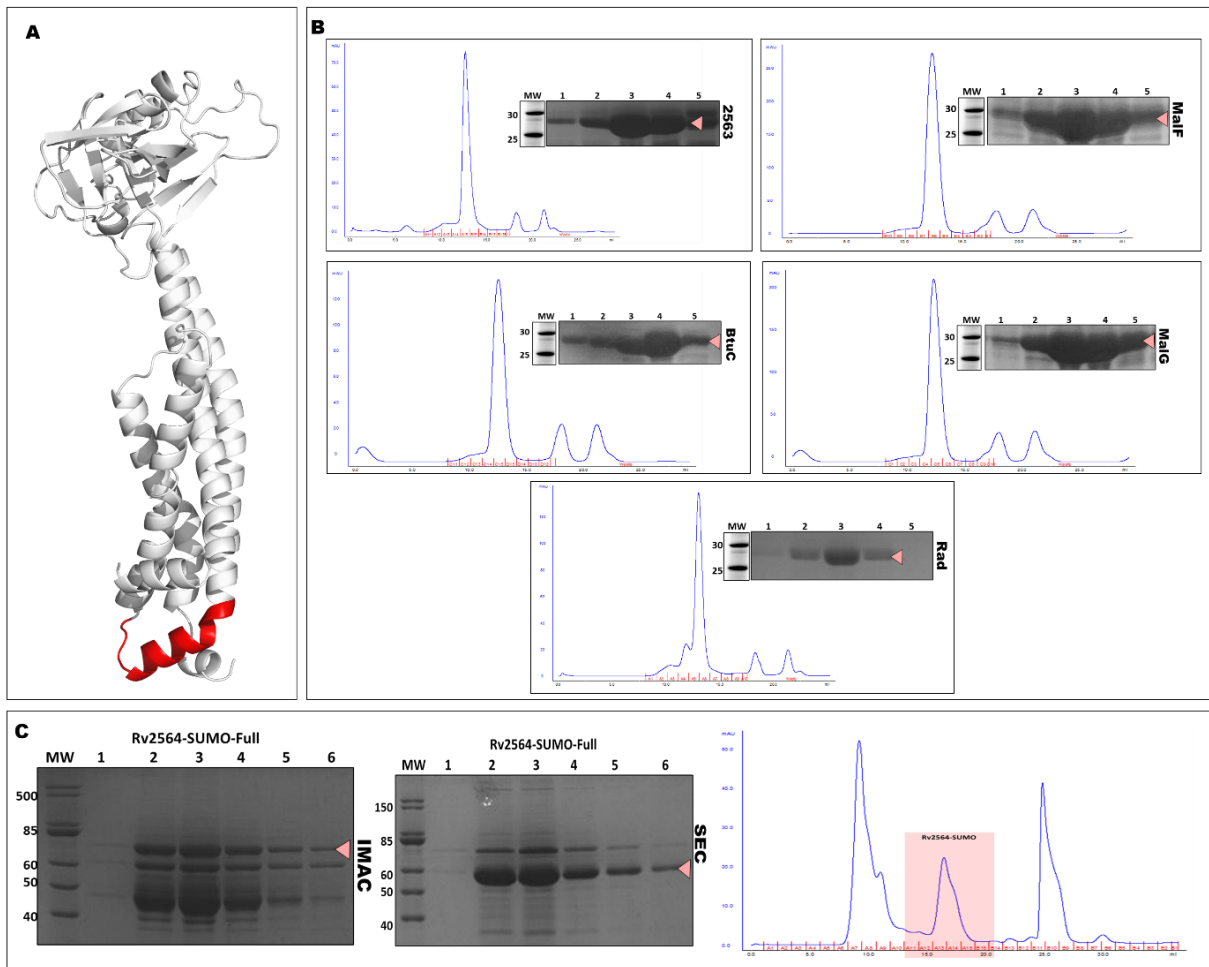


Figura 50 – Expressão e purificação das hélices de associação das permeases Rv2563 de *M. tuberculosis* e BtuC, MalF e MalG dos transportadores ABC de *E. coli*. (A) Modelo da transmembrana Rv2563 com a hélice de associação destacada. (B) Amostras das proteínas Rad-ch purificadas por cromatografia de troca catiônica e submetidas à SEC. 2563: Rad-Rv2563-ch; BtuC: Rad-BtuC-ch; MalF: Rad-MalF-ch; MalG: Rad-MalG-ch; Rad: proteína RadA scaffold. (C) Etapas da purificação da ATPase Rv2564 a partir da construção Rv2564-SUMO-Full, após a expressão em células B121(DE3). A proteína foi purificada por IMAC, seguida de SEC em coluna Superdex 200 10/30. A proteína intacta apresenta 60 kDa, mas é possível observar bandas de degradação. O cromatograma apresentou três picos distintos com a Rv2564 presente no segundo pico eluído nas frações de 15 a 18 ml de coluna.

Os resultados da BLI mostraram que houve interação entre a hélice de associação da Rv2563 e a ATPase Rv2564 (Figura 51), evidenciada pela curva de associação em comparação com os controles negativos (somente tampão) e RadA sem inserto (Figura 51).

Também foi possível verificar que a interação da ATPase foi específica com a Rad-Rv2563-ch, uma vez que não houve sinal detectado nos ensaios com as hélices dos transportadores de *E. coli*. Além de sugerir a especificidade da interação, o ensaio mostrou que o sistema proposto para o estudo de interação entre regiões extra-membranares de permeases com ATPases foi eficiente. Os próximos passos incluem a realização de ensaios com as permeases imobilizadas e as ATPases em solução, determinação dos parâmetros de interação (constantes de associação e dissociação) e repetição dos ensaios na presença de moléculas e fragmentos de drogas para avaliação do potencial de inibição da interação.

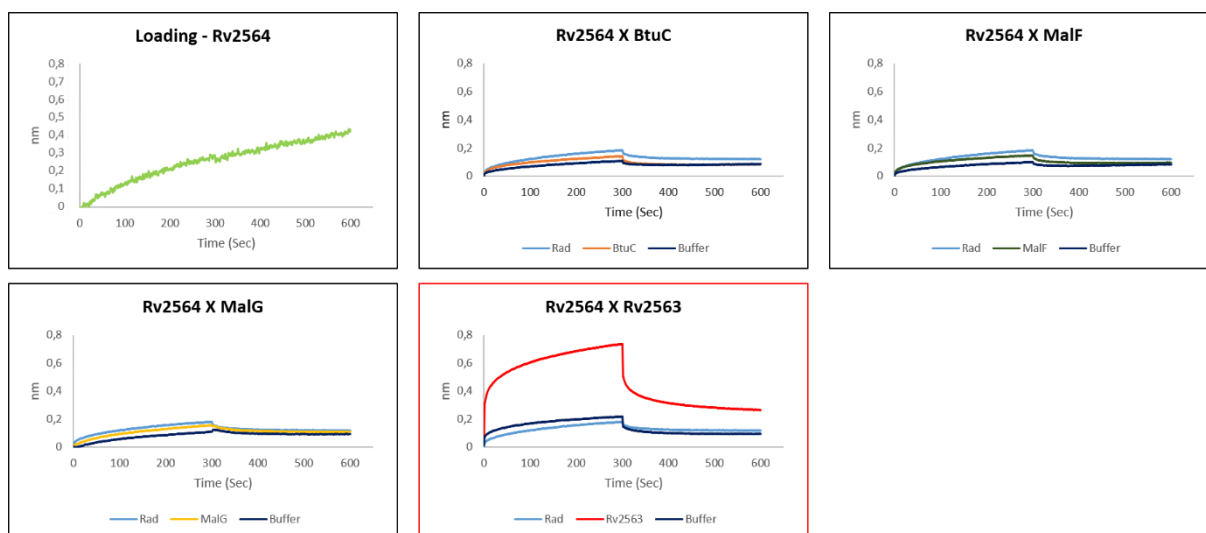


Figura 51 – Ensaio de interação entre a hélices da Rv2563 e dos transportadores ABC de *E. coli* contra a Rv2564. A interação entre as diferentes proteínas foi mensurada por interferometria de biocamada utilizando o sistema Octet com sensor de histidina para imobilização da Rv2564. Após a imobilização da Rv2564 conforme apresentado no primeiro quadro, ela foi submetida à análise de interação com as hélices BtuC, MalF, MalG e Rv2563.

Conclusões do capítulo

Os ensaios realizados nesse capítulo mostraram que a Rv2564 é uma ATPase funcional com taxas de hidrólise de ATP semelhantes às observadas para outras ATPases de transportadores ABC, apesar de sua instabilidade. Estes dados foram importantes porque permitirão a utilização desta proteína para estudos de interação com outras moléculas visando compreender mecanismos de ativação/inibição do domínio regulatório. Adicionalmente, podemos realizar estudos estruturais por SAXS para avaliar as mudanças conformacionais da

ATPase na presença dos cofatores, ligantes e substratos. Estes dados são importantes para a caracterização da mecanística do transporte e das próprias ATPases, além de indicarem o possível papel do transportador no bacilo.

Os estudos de interação com as hélices de associação, funcionaram como uma prova de conceito, e primeiramente, mostram que o sistema de estudo foi capaz de avaliar a interação proteína-proteína, mas principalmente, entre uma proteína de membrana e um parceiro não presente na membrana. Este fato é de grande valia, pois elimina a necessidade de produção das proteínas de membrana de forma integral, o que é muito oneroso e de alto custo. A utilização do sistema pode ser extrapolada para diferentes proteínas de membrana, não somente transportadores ABC, incluindo domínios maiores do que as hélices de associação.

Ficamos particularmente interessados na avaliação da especificidade da ATPase de *M. tuberculosis* pelo seu transportador. É sabidamente conhecido que em *E. coli*, algumas ATPases podem ser promíscuas e atuarem em diferentes sistemas, mas até o nosso conhecimento, não há na literatura, dados similares sobre estas proteínas em sistemas de *M. tuberculosis*, muitos dos quais são defectivos na presença das ATPases. Este trabalho abre a possibilidade de novos estudos com proteínas de *M. tuberculosis*.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A caracterização estrutural e funcional do transportador Rv2563-Rv2564 de MTB foi muito desafiadora, principalmente no que se refere à produção das proteínas para os estudos estruturais que eram nossa prioridade. Por outro lado, apesar de não termos conseguido o complexo, conseguimos obter um conjunto significativo de resultados que demonstram a sua organização estrutural como um membro da classe de transportadores ABC do tipo VII, muito similares, porém com diferenças significativas, como as evidenciadas nas análises evolutivas, de conservação e de sequências, aos observados nos transportadores da superfamília MacB.

Em contraste com a predição realizada por Braibant e colaboradores (2000) que classificaram o transportador como um tipo importador de glutamina, nossos dados, definitivamente, excluíram essa predição e apontaram para um transportador do tipo exportador e, que sim, teria um papel na fisiologia no microrganismo. A exclusividade do domínio regulatório na ATPase Rv2564 em comparação com os outros membros da família MacB, também sugere que o transportador não é regulado apenas pelo substrato, como classicamente evidenciado nestas proteínas, mas que pode haver condições ambientais específicas para sua ativação, como esperado acontecer durante a infecção dos macrófagos.

A presença de um segundo transportador (Rv0072-Rv0073) com alta identidade em relação ao Rv2563-Rv2564 somente nas bactérias do complexo, corroboram a sua importância e associados com os resultados dos ensaios de RT-PCR, sugerem que tais transportadores poderiam estar relacionados de alguma forma à reciclagem, modelamento da membrana ou condições de estresse. Ensaios funcionais poderão ser realizados visando a caracterização do transportador no processo de infecção no macrófago como também avaliação do seu potencial vacinal e de diagnóstico que podem ser estudados com maior profundidade.

Por outro lado, os ensaios de produção das proteínas e/ou domínios bem como os realizados com as hélices de associação, trouxeram informações e definiram protocolos que serão muito importantes para a caracterização do transportador, sua mecânica de transporte e formas de inibição da atividade. Em nosso laboratório, conseguimos produzir anticorpos contra proteínas de membrana baseados no sistema Rad-display, e poderíamos avaliar a neutralização do transportador Rv2563-Rv2564 em um mutante do transportador Rv0072-Rv0073.

Os ensaios de pull-down, que não puderam ser repetidos e otimizados, como as análises da espectrometria de massas, podem nos revelar parceiros de interação do transportador. É importante lembrar que devido às diferenças estruturais da parede celular de *M. tuberculosis*, espera-se que os sistemas de transporte dependente de parceiros periplasmáticos sejam diferentes dos descritos para bactérias Gram positivas e Gram negativas e abre perspectivas de estudos extremamente instigantes.

Em relação as perspectivas para o transportador Rv2563-2564, podemos dividi-las nas planejadas para o transportador completo e para os diferentes componentes obtidos durante esse trabalho.

Para o transportador completo as perspectivas incluem a caracterização estrutural por cristalografia de raios-X e criomicroscopia em nanodiscos e micelas de detergentes a partir da construção pRSF-Duet obtida nesse trabalho. Para a caracterização funcional esperamos realizar ensaios com o transportador reconstituído nos proteolipossomos e em nanodiscos, para avaliar a taxa de hidrólise de ATP na presença e ausência de nucleotídeos cíclicos.

Esperamos avaliar também a expressão do transportador no interior do macrófago sob condições de stress de membrana. Além do estudo do transportador a partir de mutantes que incluem o mutante duplo Δ Rv2563-2564 e Δ Rv0072-0073.

Para o domínio periplasmático esperamos obter o envelope proteico através do SAXS, ensaios de ITC e termoforese com possíveis ligantes e parceiro de interação que serão identificados pelo Pull Down com o extrato de MTB.

Ensaio estruturais para a Rv2563 e Rv2564 completas. Para o domínio Rv2564 esperamos realizar a caracterização da atividade na presença e ausência dos nucleotídeos cíclicos, além de avaliar as constantes de associação pelas técnicas de ITC e termoforese. Além da produção de anticorpos contra esse domínio. Os mesmos ensaios serão realizados com a construção contendo apenas o domínio regulatório, cuja expressão já se mostrou solúvel e passível de purificação.

Em relação a interação entre as hélices de associação e a ATPase, esperamos realizar o ensaio de biointerferometria novamente para estabelecimento das constantes de associação e estudo de fragmentos que possam interferir nessa interação.

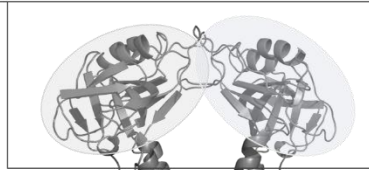
Entendemos que o projeto foi prejudicado pela pandemia que impediu a realização de uma série de ensaios, como o acesso a equipamentos e colaborações que estavam em andamento, mas acreditamos que as descobertas trazidas nesta tese não se limitam a ela mas abrem diversas perspectivas. Finalmente, apresentamos a figura 52 como uma compilação dos dados obtidos durante esse trabalho,

O Transportador ABC Rv2563-2564 de *M. tuberculosis*

- Transportador com estrutura similar à da superfamília MacB, classicamente relacionada ao transporte de drogas
- Apresenta alta identidade com transportador Rv0072-0073, também de *M. tuberculosis*, e juntos são exclusivos de espécies do complexo MTB
 - Sua expressão foi identificada durante todo o crescimento do bacilo, com aumento na fase estacionária

Domínio periplasmático de Rv2563 (Rv2563per)

- Estrutura dimérica com enovelamento
- Alfa/beta e rica em regiões não estruturadas;
- Não mostrou interação com nenhum aminoácido ou antibiótico
- Domínio imunogênico que não interage com células mamíferas ou ativa monócitos *in vitro*

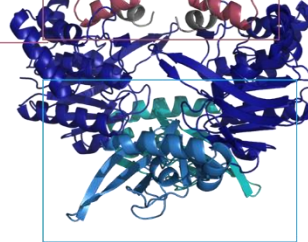


Transmembrana Rv2563

- Estrutura similar a de transportadores ABC tipo VII
- Metodologia de produção estabelecida apresentando maior estabilidade na presença dos detergentes fosfocolina-12, DM e DDM, além de ter sido reconstituída em nanodiscos
- Cristais difrataram a 4.95 Å

Rv2563ch - Hélice de Associação

- Conservadas
- Sistema Rad display se mostrou uma boa ferramenta para estudos de interação com a Rv2564 – potencial para caracterização de inibidores



Domínio catalítico de Rv2564 ATPase ou NBD

- Altamente conservado
- Apresentou atividade *in vitro* e interação específica com a hélice de associação da Rv2563

Domínio regulatório de Rv2564

- Apesar do transportador completo apresentar similaridade com transportadores do tipo VII, este domínio é exclusivo do transportador Rv2563/Rv2564
- Mostrou similaridade com domínios tipo CAP-ED que apresentam cAMP como ligante

Figura 52 – Compilação dos principais fatos identificados durante a pesquisa. Os principais dados obtidos foram separados de acordo com os diferentes componentes e domínios do transportador identificados e estudados durante a pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

- AAGAARD, C. et al. TB vaccines: current status and future perspectives. **Immunology and Cell Biology**, v. 87, n. 4, p. 279–286, 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/icb.2009.14>>.
- AGARWAL, N. et al. Cyclic AMP intoxication of macrophages by a Mycobacterium tuberculosis adenylate cyclase. **Nature**, v. 460, n. 7251, p. 98–102, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature08123>>.
- ALCORLO, M. et al. Structural characterization of the essential cell division protein FtsE and its interaction with FtsX in Streptococcus pneumoniae. **bioRxiv**, v. 11, n. 5, p. 1–20, 2020.
- ALVAREZ, M. A. et al. Research Priorities for HIV / M . tuberculosis Co-Infection. **Open Access Journal for Infectious Diseases**, p. 14–20, 2011.
- ANDREWS, J. R. et al. Risk of progression to active tuberculosis following reinfection with Mycobacterium tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 784–791, 2012.
- AONO, S. et al. CO sensing and regulation of gene expression by the transcriptional activator CooA. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 82, n. 1–4, p. 51–56, 2000.
- ARE, V. N. et al. Crystal structure and biochemical investigations reveal novel mode of substrate selectivity and illuminate substrate inhibition and allostericity in a subfamily of Xaa-Pro dipeptidases. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1865, n. 2, p. 153–164, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.10.016>>.
- ARRIAZA, B. T. et al. Pre-Columbian tuberculosis in Northern Chile: Molecular and skeletal evidence. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 98, n. 1, p. 37–45, 1995.
- BABADY, N. E.; WENGENACK, N. L. Clinical Laboratory Diagnostics for Mycobacterium tuberculosis. **Understanding Tuberculosis - Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis**, p. 3–36, 2012.
- BAENA, A. et al. Differential determinants of virulence in two Mycobacterium tuberculosis Colombian clinical isolates of the LAM09 family. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 695–710, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1642045>>.
- BARRAL-NETTO, M. et al. Tuberculosis among Yanomamicommunities from Alto Rio Negro, State of Amazonas, Brazil, 1990 to 2002. **Enferm. emerg**, v. 10, n. 3, p. 138–143, 2008. Disponível em: <<http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-90759>>.
- BARRY, C. E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: Rethinking the biology and

- intervention strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 845–855, 2009.
- BEHAR, S. M.; DIVANGAHI, M.; REMOLD, H. G. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? **Nature reviews. Microbiology**, 2010.
- BERNTSSON, R. P. A. et al. A structural classification of substrate-binding proteins. **FEBS Letters**, v. 584, n. 12, p. 2606–2617, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.043>>.
- BERROW, N. S. et al. A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. v. 35, n. 6, 2007.
- BIEMANS-OLDEHINKEL, E.; DOEVEN, M. K.; POOLMAN, B. **ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains** **FEBS Letters**, 2006. .
- BORDIGNON, E.; GROTE, M.; SCHNEIDER, E. The maltose ATP-binding cassette transporter in the 21st century - Towards a structural dynamic perspective on its mode of action: MicroReview. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 6, p. 1354–1366, 2010.
- BORTHS, E. L. et al. The structure of *Escherichia coli* BtuF and binding to its cognate ATP binding cassette transporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 26, p. 16642–16647, 2002.
- BOS, K. I. et al. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. **Nature**, v. 514, n. 7253, p. 494–497, 2014.
- BOSEDASGUPTA, S. et al. Striking the right balance determines TB or not TB. 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRAIBANT, M.; GILOT, P.; CONTENT, J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 449–467, 2000.
- BRITES, D. et al. **A New Phylogenetic Framework for the Animal-adapted Mycobacterium tuberculosis Complex** **bioRxiv**, 2018. .
- CAWS, M. et al. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 3, 2008.
- CERDA-MAIRA, F.; DARWIN, K. H. The *Mycobacterium tuberculosis* proteasome: more than just a barrel-shaped protease. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 14–15, p. 1150–1155, 2009.
- CHAKRABORTI, P. K. et al. Signalling mechanisms in *Mycobacteria*. **Tuberculosis**, v.

- 91, n. 5, p. 432–440, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2011.04.005>>.
- CHAN, M. K. CoxA, CAP and allostery. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 10, p. 822–824, 2000.
- CHATTERJEE, D. The mycobacterial cell wall: Structure, biosynthesis and sites of drug action. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 1, n. 4, p. 579–588, 1997.
- CHEN, S. et al. Carbon catabolite repression of the maltose transporter revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 499, n. 7458, p. 364–368, 2013.
- CHIARADIA, L. et al. Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.
- CHIM, N. et al. **WITHDRAWN Infectious Disord Targets**, 2016. . Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23167715>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3695056>>.
- CHOI, C. C.; FORD, R. C. ATP binding cassette importers in eukaryotic organisms. **Biological Reviews**, 2021.
- COLE, S. et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. NOVEMBER, p. 537–544, 1998a.
- COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, 1998b.
- CROW, A. et al. Structure and mechanotransmission mechanism of the MacB ABC transporter superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 47, p. 12572–12577, 2017.
- DA SILVA ANTUNES, R.; PINTO, M.; TRAJMAN, A. Patient costs for the diagnosis of tuberculosis in Brazil: Comparison of Xpert® MTB/RIF and smear microscopy. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 18, n. 5, p. 547–551, 2014.
- DAFFÉ, M.; MARRAKCHI, H. Unraveling the structure of the mycobacterial envelope. **Gram-Positive Pathogens**, p. 1087–1095, 2019.
- DAVIDSON, A. L. **Mechanism of coupling of transport to hydrolysis in bacterial ATP-binding cassette transporters** **Journal of Bacteriology**, 2002. .
- DAVIDSON, A. L.; CHEN, J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 241–268, 2004.
- DAWSON, R. J. P.; LOCHER, K. P. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. **Nature**, v. 443, n. 7108, p. 180–185, 2006.
- DAWSON, R. J. P.; LOCHER, K. P. Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from Staphylococcus aureus in complex with AMP-PNP. **FEBS Letters**, 2007.

- DE BOER, M. et al. Conformational and dynamic plasticity in substrate-binding proteins underlies selective transport in ABC importers. **eLife**, v. 8, p. 1–56, 2019.
- DE JONG, B. C.; ANTONIO, M.; GAGNEUX, S. Mycobacterium africanum—review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, 2010.
- DEJESUS, M. A. et al. Statistical analysis of genetic interactions in Tn-Seq data. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 11, p. 1–11, 2017a.
- DEJESUS, M. A. et al. Comprehensive essentiality analysis of the Mycobacterium tuberculosis genome via saturating transposon mutagenesis. **mBio**, v. 8, n. 1, p. 1–17, 2017b.
- DENG, J. et al. Mycobacterium Tuberculosis Proteome Microarray for Global Studies of Protein Function and Immunogenicity. **Cell Reports**, v. 9, p. 2317–2329, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.023>>.
- DICHIARA, J. M. et al. Multiple small RNAs identified in Mycobacterium bovis BCG are also expressed in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 12, p. 4067–4078, 2010.
- DONOGHUE, H. D. Paleomicrobiology of Human Tuberculosis. **Paleomicrobiology of Humans**, n. 1, p. 113–130, 2016.
- DREW, D. et al. GFP-based optimization scheme for the overexpression and purification of eukaryotic membrane proteins in Saccharomyces cerevisiae. **Nature protocols**, 2008.
- DROBNIEWSKI, F. et al. Systematic review, meta-analysis and economic modelling of molecular diagnostic tests for antibiotic resistance in tuberculosis. **Health Technology Assessment**, 2015.
- DU, S.; PICHOFF, S.; LUTKENHAUS, J. FtsEX acts on FtsA to regulate divisome assembly and activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 34, p. E5052–E5061, 2016.
- DULBERGER, C. L.; RUBIN, E. J.; BOUTTE, C. C. The mycobacterial cell envelope — a moving target. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 47–59, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41579-019-0273-7>>.
- DUROVNI, B. et al. Impact of Replacing Smear Microscopy with Xpert MTB/RIF for Diagnosing Tuberculosis in Brazil: A Stepped-Wedge Cluster-Randomized Trial. **PLoS Medicine**, v. 11, n. 12, 2014.
- EJIM, L. J. et al. Cystathionine β -lyase is important for virulence of Salmonella enterica serovar typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3310–3314, 2004.

- EJIM, L. J. et al. Inhibitors of bacterial cystathionine β -lyase: Leads for new antimicrobial agents and probes of enzyme structure and function. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 755–764, 2007.
- FERREIRA, E. L. et al. Sublingual immunization with the phosphate-binding-protein (PstS) reduces oral colonization by *Streptococcus mutans*. **Molecular Oral Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 410–422, 2016.
- FITZPATRICK, A. W. P. et al. Structure of the MacAB-TolC ABC-type tripartite multidrug efflux pump. **Nature Microbiology**, v. 2, n. May, 2017.
- FORBES, B. A. et al. Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria. p. 48, 2018. Disponível em: <www.clsi.org.>.
- GAGNEUX, S. Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 202–213, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2018.8>.
- GOH, K. S. et al. Rapid differentiation of “*Mycobacterium canettii*” from other *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms by PRC-restriction analysis of the hsp65 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3705–3708, 2001.
- GOPINATH, K. et al. A vitamin B12 transporter in *Mycobacterium tuberculosis*. **Open Biology**, v. 3, n. FEB, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.120175>.
- GOURIDIS, G. et al. Conformational dynamics in substrate-binding domains influences transport in the ABC importer GlnPQ. **Nature Publishing Group**, v. 22, n. 1, 2014.
- GRABOWICZ, M. Lipoprotein Transport: Greasing the Machines of Outer Membrane Biogenesis: Re-Examining Lipoprotein Transport Mechanisms Among Diverse Gram-Negative Bacteria While Exploring New Discoveries and Questions. **BioEssays**, v. 40, n. 4, p. 1–11, 2018.
- GREENE, N. P. et al. Antibiotic resistance mediated by the MacB ABC transporter family: A structural and functional perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAY, 2018.
- GRIFFIN, J. E. et al. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, p. 1–9, 2011.
- GUERRA, G. S. **Desenvolvimento de uma estratégia de inibição de transportadores ABC utilizando anticorpos**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, p.83. 2019.
- HANNAUER, M. et al. An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized siderophore by *Pseudomonas aeruginosa*. **FEBS Letters**, v. 584, n. 23, p. 4751–4755, 2010.
- HARTMAN-ADAMS, H.; CLARK, K.; JUCKETT, G. Update on latent tuberculosis

- infection. **American Family Physician**, 2014.
- HERSHKOVITZ, I. et al. Tuberculosis origin: The Neolithic scenario. **Tuberculosis**, v. 95, n. S1, p. S122–S126, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2015.02.021>>.
- HIGGINS, C. F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview. **Research in microbiology**, 2001.
- HOFFMANN, C. et al. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 10, p. 3963–3967, 2008.
- HOKEY, D. A.; GINSBERG, A. **The current state of tuberculosis vaccines Human Vaccines and Immunotherapeutics**, 2013. .
- HOLLENSTEIN, K.; FREI, D. C.; LOCHER, K. P. Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. **Nature**, 2007.
- IBRAHIM, S. A. et al. Three pseudomonas putida FNR family proteins with different sensitivities to O₂. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 27, p. 16812–16823, 2015.
- IMPERI, F.; TIBURZI, F.; VISCA, P. Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 48, p. 20440–20445, 2009.
- JEFFERSON, C. et al. TB Diagnostics Market in Select High-Burden Countries : Current Market and Future Opportunities for Novel Diagnostics. **Unitaid**, 2015.
- KALSCHEUER, R. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* capsule: A cell structure with key implications in pathogenesis. **Biochemical Journal**, v. 476, n. 14, p. 1995–2016, 2019.
- KAPLAN, E. et al. Insights into bacterial lipoprotein trafficking from a structure of LolA bound to the LolC periplasmic domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 31, p. E7389–E7397, 2018.
- KOBAYASHI, N. et al. Membrane topology of ABC-type macrolide antibiotic exporter MacB in *Escherichia coli*. **FEBS Letters**, v. 546, n. 2–3, p. 241–246, 2003.
- KORKHOV, V. M.; MIREKU, S. A.; LOCHER, K. P. **Structure of AMP-PNP-bound vitamin B12 transporter BtuCD–FNature**, 2012. .
- KWON, K.; PETERSON, S. N. High-throughput cloning for biophysical applications. **Methods in Molecular Biology**, v. 1140, p. 61–74, 2014.
- LEE, C. et al. MemStar: A one-shot *Escherichia coli*-based approach for high-level bacterial membrane protein production. **FEBS Letters**, v. 588, n. 20, p. 3761–3769, 2014.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.08.025>>.

LEE, S. J. et al. **The ABC of binding-protein-dependent transport in Archaea***Trends in Microbiology*, 2007. .

LEUNG, C. C.; LANGE, C.; ZHANG, Y. **Tuberculosis: Current state of knowledge: An epilogue***Respirology*, 2013. .

LEWINSON, O. et al. A distinct mechanism for the ABC transporter BtuCD-BtuF revealed by the dynamics of complex formation. **Nature structural & molecular biology**, 2010.

LICHT, A.; SCHNEIDER, E. **ATP binding cassette systems: Structures, mechanisms, and functions***Central European Journal of Biology*, 2011. .

LIENHARDT, C. et al. **Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects***Nature Reviews Microbiology*, 2012. .

LOCHER, K. P. **Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters***Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2009. .

LOCHER, K. P. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 23, n. 6, p. 487–493, 2016.

LU, S.; ZGURSKAYA, H. I. MacA, a periplasmic membrane fusion protein of the macrolide transporter MacAB-TolC, binds lipopolysaccharide core specifically and with high affinity. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 21, p. 4865–4872, 2013.

MAITRA, A. et al. Cell wall peptidoglycan in *Mycobacterium tuberculosis*: An Achilles' heel for the TB-causing pathogen. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 5, p. 548–575, 2019.

MANJUNATHA, U. H.; SMITH, P. W. Perspective: Challenges and opportunities in TB drug discovery from phenotypic screening. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 16, p. 5087–5097, 2015.

MATTEELLI, A.; ROGGI, A.; CARVALHO, A. C. C. **Extensively drug-resistant tuberculosis: Epidemiology and management***Clinical Epidemiology*, 2014. .

MAVRICI, D. et al. *Mycobacterium tuberculosis* FtsX extracellular domain activates the peptidoglycan hydrolase, RipC. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 22, p. 8037–8042, 2014.

MIR, M. A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* Cell Division Protein, FtsE, is an ATPase in Dimeric Form. **Protein Journal**, v. 34, n. 1, p. 35–47, 2015.

MOOSAZADEH, M.; KHANJANI, N.; PARSAAEE, M. The Prevalence of Latent Tuberculosis Infection and Smear Positive Pulmonary Tuberculosis in People with

- Household Close Contact with Tuberculosis in North of Iran. **Iran J Med Sci March Iran J Med Sci**, v. 4040, n. 22, p. 161–165, 2015.
- MÜLLER, R.; ROBERTS, C. A.; BROWN, T. A. Biomolecular identification of ancient *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in human remains from Britain and continental Europe. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 153, n. 2, p. 178–189, 2014.
- NEEFJES, J. et al. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 12, p. 823–836, 2011.
- NIEDERWEIS, M. Mycobacterial porins - New channel proteins in unique outer membranes. **Molecular Microbiology**, v. 49, n. 5, p. 1167–1177, 2003.
- NIEDERWEIS, M. et al. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 109–116, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.005>>.
- NISHI, J. et al. The Export of Coat Protein from Enterococcal *Escherichia coli* by a Specific ATP-binding Cassette Transporter System. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45680–45689, 2003.
- NORBIS, L. et al. **Tuberculosis: Lights and shadows in the current diagnostic landscape** *New Microbiologica*, 2013. .
- NOVOA-APONTE, L.; SOTO OSPINA, C. Y. **Mycobacterium tuberculosis p-type ATPases: Possible targets for drug or vaccine development** *BioMed Research International*, 2014. .
- OKADA, U. et al. Crystal structure of tripartite-type ABC transporter MacB from *Acinetobacter baumannii*. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-01399-2>>.
- OLDHAM, M. L. et al. Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter. **Nature**, 2007.
- OLIVELLA, M. et al. Relation between sequence and structure in membrane proteins. **Bioinformatics**, v. 29, n. 13, p. 1589–1592, 2013.
- ORME, I. M. Vaccine development for tuberculosis: Current progress. **Drugs**, 2013.
- OSÓRIO FERRI, A. et al. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. **Revista Liberato**, v. 15, n. 24, p. 145–154, 2014.
- OSWALD, C.; HOLLAND, I. B.; SCHMITT, L. **The motor domains of ABC-transporters: What can structures tell us?** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2006. .
- PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, 2016.

- PARK, S. et al. An Improved Method for Bacterial Immunofluorescence Staining to Eliminate Antibody Exclusion from the Fixed Nucleoid. **Biochemistry**, 2019.
- PFYFFER, G. E. et al. Mycobacterium canettii, the smooth variant of M. tuberculosis, isolated from a Swiss patient exposed in Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 631–634, 1998.
- PIDDOCK, L. J. V. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. **Nature reviews. Microbiology**, 2006.
- PLAZA, D. F. et al. The Mycobacterium tuberculosis membrane protein Rv2560 - Biochemical and functional studies. **FEBS Journal**, v. 274, n. 24, p. 6352–6364, 2007.
- RANGANATHAN, S. et al. Novel structural features drive DNA binding properties of Cmr, a CRP family protein in TB complex mycobacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 1, p. 403–420, 2018.
- REES, D. C.; JOHNSON, E.; LEWINSON, O. ABC transporters: The power to change. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 3, p. 218–227, 2009.
- REMPEL, S. et al. A mycobacterial ABC transporter mediates the uptake of hydrophilic compounds. **Nature**, v. 580, n. 7803, p. 409–412, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2072-8>>.
- RICE, A. J. et al. Small substrate transport and mechanism of a molybdate ATP binding cassette transporter in a lipid environment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 21, p. 15005–15013, 2014.
- RICHET, E.; DAVIDSON, A. L.; JOLY, N. The ABC transporter MalFGK2 sequesters the MalT transcription factor at the membrane in the absence of cognate substrate. **Molecular Microbiology**, v. 85, n. 4, p. 632–647, 2012.
- RICKMAN, L. et al. A member of the cAMP receptor protein family of transcription regulators in Mycobacterium tuberculosis is required for virulence in mice and controls transcription of the rpfA gene coding for a resuscitation promoting factor. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1274–1286, 2005.
- ROBERTS, G. P.; YOUN, H.; KERBY, R. L. CO-Sensing Mechanisms. v. 68, n. 3, p. 453–473, 2004.
- ROMA SÁNCHEZ, A. A. M. M. Tuberculose em população carcerária do Estado do Rio de Janeiro: prevalência e subsídios para formulação de estratégias de controle. p. xi,72-xi,72, 2008. Disponível em: <<http://bvssp.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=1497>>.
- ROSSMANN, M. et al. Development of a multipurpose scaffold for the display of peptide

- loops. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 30, n. 6, p. 419–430, 2017.
- RUSSELL, D. G. **TB comes to a sticky beginning**. *Nature medicine*, 2001. .
- RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature reviews. Microbiology**, 2007.
- RUSSELL, D. G. et al. The Sculpting of the Mycobacterium tuberculosis Genome by Host Cell-Derived Pressures Introducing the host cell. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 2, p. 58, 2014.
- SABHARWAL, N. et al. Biochemical and biophysical characterization of nucleotide binding domain of Trehalose transporter from Mycobacterium tuberculosis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 109–116, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.237>>.
- SAMANOVIC, M. I.; LI, H.; DARWIN, K. H. The Pup-Proteasome System of Mycobacterium tuberculosis. **Subcell Biochem**, 2013.
- SANI, M. et al. Direct visualization by Cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: A labile structure containing ESX-1-secreted proteins. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 3, 2010.
- SANTOS, S. et al. Active and latent tuberculosis in Brazilian correctional facilities : a cross-sectional study. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 24, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4307675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- SARATHY, J. P.; DARTOIS, V.; LEE, E. J. D. The role of transport mechanisms in mycobacterium tuberculosis drug resistance and tolerance. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, 2012.
- SASSETTI, C. M.; BOYD, D. H.; RUBIN, E. J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 77–84, 2003.
- SASSETTI, C. M.; RUBIN, E. J. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 22, p. 12989–12994, 2003.
- SAÚDE, M. da. Tuberculose | 2021. **Boletim Epidemiológico**, v. 3, n. 1, p. 44, 2021.
- SCHEEPERS, G. H.; LYCKLAMA A NIJEHOLT, J. A.; POOLMAN, B. An updated structural classification of substrate-binding proteins. **FEBS Letters**, v. 590, n. 23, p. 4393–4401, 2016.
- SCHLEGEL, S. et al. Optimizing membrane protein overexpression in the Escherichia coli strain Lemo21(DE3). **Journal of Molecular Biology**, v. 423, n. 4, p. 648–659, 2012.
- SEEGER, M. A.; VAN VEEN, H. W. **Molecular basis of multidrug transport by ABC**

- transporters***Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2009. .
- SHARPE, T. Circular Dichroism Unit Conversion. **Biozentrum Biophysics Facility**, v. 1, n. September, p. 1, 2012.
- SHEHZAD, A. et al. Challenges in the development of drugs for the treatment of tuberculosis. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, 2015.
- SIKKEMA, H. R. et al. Gating by ionic strength and safety check by cyclic-di-AMP in the ABC transporter OpuA. **Science Advances**, v. 6, n. 47, p. 1–12, 2020.
- SONG, H. et al. Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 88, n. 6, p. 526–544, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2008.02.004>>.
- STEWART, G. R. et al. Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. **PLoS Pathogens**, v. 1, n. 3, p. 0269–0278, 2005.
- STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein expression and purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.
- SUH, S. et al. Use in routine clinical practice of two commercial real-time PCR assays for detection of mycobacterium tuberculosis complex: Comparison of cobas taqman MTB test and advansure TB/NTM real-time PCR. **Journal of Molecular Diagnostics**, 2013.
- SZUMOWSKI, J. D.; LYNCH, J. B. Profile of delamanid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 677–682, 2015. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/permissions.php>>.
- TANG, X. et al. Cryo-EM structures of lipopolysaccharide transporter LptB2FGC in lipopolysaccharide or AMP-PNP-bound states reveal its transport mechanism. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-11977-1>>.
- TANG, X. et al. Structural basis for bacterial lipoprotein relocation by the transporter LolCDE. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 347–355, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41594-021-00573-x>>.
- TAVANAEE SANI, A. et al. Epidemiological Characterization of Drug Resistance among *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from Patients in Northeast of Iran during 2012-2013. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- THOMAS, C. et al. Structural and functional diversity calls for a new classification of ABC transporters. **FEBS Letters**, v. 594, n. 23, p. 3767–3775, 2020.
- THOMAS, C.; TAMPÉ, R. Structural and Mechanistic Principles of ABC Transporters.

Annual Review of Biochemistry, v. 89, p. 605–636, 2020.

TIEMERSMA, E. W. et al. Natural history of tuberculosis: Duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

TORRADO, E.; COOPER, A. M. Cytokines in the balance of protection and pathology during mycobacterial infections. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 2013.

TRUTNEVA, K. A. et al. One-Year Old Dormant, “Non-culturable” Mycobacterium tuberculosis Preserves Significantly Diverse Protein Profile. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. January, p. 1–12, 2020.

TURLIN, E. et al. Protoporphyrin (PPIX) efflux by the MacAB-TolC pump in Escherichia coli. **MicrobiologyOpen**, v. 3, n. 6, p. 849–859, 2014.

TURNER, B. M. The use of alkaline-phosphatase-conjugated second antibody for the visualization of electrophoretically separated proteins recognized by monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 63, n. 1, p. 1–6, 1983.

VAN DER DOES, C.; TAMPÉ, R. **How do ABC transporters drive transport? Biological Chemistry**, 2004. .

VAN DER HEIDE, T.; POOLMAN, B. Osmoregulated ABC-transport system of Lactococcus lactis senses water stress via changes in the physical state of the membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2000.

VAN SOOLINGEN, D. et al. A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: Characterization of an exceptional isolate from Africa. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1236–1245, 1997.

VERGNE, I.; GILLERON, M.; NIGOU, J. Manipulation of the endocytic pathway and phagocyte functions by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. 2015.

VIEGAS, A.; VIENNET, T.; ETZKORN, M. The power, pitfalls and potential of the nanodisc system for NMR-based studies. **Biological Chemistry**, v. 397, n. 12, p. 1335–1354, 2016.

VINCENT, A. T. et al. The mycobacterial cell envelope: A relict from the past or the result of recent evolution? **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. OCT, p. 1–9, 2018.

WALLS, G. et al. Drug-resistant tuberculosis in HIV-infected patients in a national referral hospital, Phnom Penh, Cambodia. **Global Health Action**, v. 8, n. 1, 2015.

WHO. The End TB Strategy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

- WHO. **Global tuberculosis report 2019**. [s.l: s.n.].
- WILKENS, S. Structure and mechanism of ABC transporters. **F1000Prime Reports**, v. 7, 2015. Disponível em: <<http://f1000.com/prime/reports/b/7/14>>.
- WOLFE, L. M. et al. Proteomic definition of the cell wall of mycobacterium tuberculosis. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 11, p. 5816–5826, 2010.
- WONG, K. et al. Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 1, p. 8–16, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2013.11.002>>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO). **WHO report on TB 2020**. [s.l: s.n.]v. 1
- YAKUSHI, T. et al. A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 4, p. 212–218, 2000.
- YAMANAKA, H. et al. MacAB is involved in the secretion of Escherichia coli heat-stable enterotoxin II. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 23, p. 7693–7698, 2008.
- YANG, D. C. et al. An ATP-binding cassette transporter-like complex governs cell-wall hydrolysis at the bacterial cytokinetic ring. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 45, 2011.
- ZIMPEL, C. K. et al. Complete genome sequencing of Mycobacterium bovis SP38 and comparative genomics of Mycobacterium bovis and M. tuberculosis strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, p. 1–14, 2017.
- ZINK, A. et al. Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient egyptian population. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 355–366, 2001.
- ZUBER, B. et al. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 16, p. 5672–5680, 2008.

ANEXOS

MATERIAL E MÉTODOS

Tabela A1 - Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem dos genes e fragmentos de interesse em diferentes vetores.

Construção	Gene	Oligonucleotídeos para Clonagem	Enzima de Restrição	Vetor	Pares de Base (bp)
2563-GFP	Rv2563	Forward1: 5' CAGGAAACAGCTATGCTTTTTGCGGCTTTGCG 3' Reverse1: 5' AAACAGAACTTCCAGGGGACCTCCGAACGCTAGT 3'	Infusion Cloning	pOPINE-3C-eGFP pOPINE-CDE-GFP	1074
2563-Per1 F1-R1 (34-223)	Rv2563	Forward1: 5' ATATGGATCCACCGGACTTGTGAACGGGTTTCGGGTCGAGGCC 3' Reverse1: 5' ATATAAGCTTTAGCGGGCGCATCAGATCGCTGACAGC 3'	BamHI HindIII	pHAT2 pOP3BP pOP5GT	593
2563-Per2 F1-R2 (34-219)	Rv2563	Forward1: 5' ATATGGATCCACCGGACTTGTGAACGGGTTTCGGGTCGAGGCC 3' Reverse2: 5' ATATAAGCTTTAGATCGCTGACAGCATCCGCTCGATTGAC 3'	BamHI HindIII	pHAT2	581
2563-Per3 F1-R3 (34-213)	Rv2563	Forward1: 5' ATATGGATCCACCGGACTTGTGAACGGGTTTCGGGTCGAGGCC 3' Reverse3: 5' ATATAAGCTTTAGATCCGCTCGATTGACGGTCTGATAGCC 3'	BamHI HindIII	pHAT2	569
2563-Per4 F2-R1 (37-223)	Rv2563	Forward2: 5' ATATGGATCCGTGAACGGGTTTCGGGTCGAGGCCGAGCGAAC 3' Reverse1: 5' ATATAAGCTTTAGCGGGCGCATCAGATCGCTGACAGC 3'	BamHI HindIII	pHAT2	564
2563-Per5 F2-R2 (37-219)	Rv2563	Forward2: 5' ATATGGATCCGTGAACGGGTTTCGGGTCGAGGCCGAGCGAAC 3' Reverse2: 5' ATATAAGCTTTAGATCGCTGACAGCATCCGCTCGATTGAC 3'	BamHI HindIII	pHAT2	572
2563-Per6 F2-R3 (37-213)	Rv2563	Forward2: 5' ATATGGATCCGTGAACGGGTTTCGGGTCGAGGCCGAGCGAAC 3' Reverse3: 5' ATATAAGCTTTAGATCCGCTCGATTGACGGTCTGATAGCC 3'	BamHI HindIII	pHAT2	560
2563-Per7 F3-R1 (47-223)	Rv2563	Forward3: 5' ATATGGATCCACCGTCGATTCCATGGGTGTCGACGCATTTCG 3' Reverse1: 5' ATATAAGCTTTAGCGGGCGCATCAGATCGCTGACAGC 3'	BamHI HindIII	pHAT2	554
2563-Per8 F3-R2 (47-219)	Rv2563	Forward3: 5' ATATGGATCCACCGTCGATTCCATGGGTGTCGACGCATTTCG 3' Reverse2: 5' ATATAAGCTTTAGATCGCTGACAGCATCCGCTCGATTGAC 3'	BamHI HindIII	pHAT2	542
2563-Per9 F3-R3 (47-213)	Rv2563	Forward3: 5' ATATGGATCCACCGTCGATTCCATGGGTGTCGACGCATTTCG 3' Reverse3: 5' ATATAAGCTTTAGATCCGCTCGATTGACGGTCTGATAGCC 3'	BamHI HindIII	pHAT2	530
Rv2564-Halo	Rv2564	Forward1: 5' GAAACAGCTATGACCATGGGGCGCCTAACCATT 3' Reverse1: 5' AAACAGAACTTCCAGTTTCGCTGGCAAGCTCGCG 3'	Infusion Cloning	pOPINE3C-Halo pOPINE-RSE	1020
Rv2564_full (1-330)	Rv2564	Forward1: 5' ATATACCATGGGAGGACTAACCATATCCGAC 3' Reverse1: 5' ATATAAGCTTATTCGCTGGCAAGCTCGCGGTG 3'	NcoI HindIII	pHAT2 pOP3BP pOP3MP pOP3SUMO pOP1	1008

Rv2564_full (1-330)	<i>Rv2564</i>	Forward1: 5' ATATAGGATCCATGGGCGGCCTAACCATTTCGGAC 3' Reverse1: 5' ATATAAGCTTATTCGCTGGCAAGCTCGCGGTG 3'	<i>Bam</i> HI <i>Hind</i> III	pOP5GT	1012
Rv2564_full (1-330)	<i>Rv2564</i>	Forward1: 5' GATCCATATGATGGGCGGCCTAACCATTTCGG 3' Reverse1: 5' ATATAAAGCTTCTATTCGCTGGCAAGCTCGCGGTG 3'	<i>Nde</i> I <i>Hind</i> III	pET28a	1014
Rv2564_medium (1-248)	<i>Rv2564</i>	Forward1: 5' ATATACCATGGGAGGACTAACCATATCCGAC 3' Reverse2: 5' ATATAAGCTTAGTAGATCAGATCGCCATTGTGG 3'	<i>Nco</i> I <i>Hind</i> III	pHAT2 pOP3BP pOP3MP pOP3SUMO pOP1	762
Rv2564_small (1-225)	<i>Rv2564</i>	Forward1: 5' ATATACCATGGGAGGACTAACCATATCCGAC 3' Reverse3: 5' ATATAAGCTTATGGCTGATTGCGGACACCTG 3'	<i>Nco</i> I <i>Hind</i> III	pHAT2 pOP3BP pOP3MP pOP3SUMO pOP1	693
Rv2564-regulatory (223-330)	<i>Rv2564</i>	Forward1: 5' ATATAGGATCCAATCAGCCACCCGAAACGGTG 3' Reverse2: 5' ATATAAGCTTATTCGCTGGCAAGCTCGCGGTG 3'	<i>Bam</i> HI <i>Hind</i> III	pOP5GT	346
Rv0411c-Full^a (30-328)	<i>Rv0411c</i>	Forward1: 5' ATATACCATGGAAACGCTGGGGGTGGAGGCGAC 3' Reverse1: 5' ATATAAAGCTTTCAGTCCACATACCTCGGCGTGGGCGG 3'	<i>Nco</i> I <i>Hind</i> III	pHAT2 pOP3BP pOP3MP pOP3SUMO pOP1	922
Rv0411c-Medium^b (80-328)	<i>Rv0411c</i>	Forward2: 5' ATATACCATGGAGCGCGACGCCGCGGTGGCCG 3' Reverse1: 5' ATATAAAGCTTTCAGTCCACATACCTCGGCGTGGGCGG 3'	<i>Nco</i> I <i>Hind</i> III	pHAT2 pOP3BP pOP3MP pOP3SUMO pOP1	772
Rv2563-2564_Duet^c	<i>Rv2563-2564</i>	Forward1: 5' ATAGGATCCAATGCTTTTTGCGGCTTTGCGTGATG 3' Reverse1: 5' ATATAAAGCTTCTAGGGACCTCCGAACGCTAGTGCC 3'	<i>Bam</i> HI <i>Hind</i> III <i>Nde</i> I <i>Eco</i> RV	pRSF-Duet	1071
		Forward2: 5' GATCCATATGATGGGCGGCCTAACCATTTCGG 3' Reverse2: 5' GTAGATATCCTATTCGCTGGCAAGCTCGCGG 3'			1012

^aRv0411- sem peptídeo sinal; ^bRv0411-sem peptídeo sinal e sem região N-terminal rica em prolinas; ^cRv2563- sítio múltiplo de clonagem 1 com his-tag-N-terminal, Rv2564-sítio múltiplo de clonagem 2.

Tabela A2 – Condições de expressão dos genes de interesse e produção das proteínas em larga escala em células de *E. coli*.

Construção	Gene	Cepa	Resistencia	Meio de Cultura	Temperatura	Incubação	Agitação
2563-PerBP-F1R1(Rv2563per)#	Rv2563	BI21(DE3)	Ap	2YT	25 °C	16 horas	220 RPM
2563-Per8 F3-R2 (Rv2563per8)	Rv2563	BI21(DE3)	Ap	Luria Bertani	25 °C	16 horas	220 RPM
2563-Per9 F3-R3 (Rv2563per9)	Rv2563	BI21(DE3)	Ap	Luria Bertani	25 °C	16 horas	220 RPM
pOPINE-3C-GFP 2563	Rv2563	Lemo21(DE3)(DE3)	Cm/Ap	Meio ZYM 5250 Luria Bertani [§]	20 °C	16 horas	220 RPM
pOPINE-CDE-GFP 2563	Rv2563	Lemo21(DE3)(DE3)	Cm/Spec	Meio ZYM 5250 Luria Bertani	20 °C	16 horas	220 RPM
HALO-2564	Rv2564	Lemo21(DE3)(DE3)	Cm/Km	Meio ZYM 5250 Luria Bertani [§]	20 °C 37 °C	16 horas 4 horas	220 RPM
2564- SUMO-Full	Rv2564	BI21(DE3)	Ap	Luria Bertani	25 °C	16 horas	220 RPM
2564-Bla	Rv2564	BI21(DE3)	Ap	2YT	15 °C	20 horas	220 RPM
2564-Bla	Rv2564	Artic (DE3)(DE3)	Ap/Gen	2YT	12 °C	24 horas	220 RPM
pOPINE-3C-GFP 2563 + HALO 2564 (Co-expressão)	Rv2563-2564	Lemo21(DE3)(DE3)	Cm/Ap/Km	Luria Bertani	20 °C	16 horas	220 RPM
Rv2563_CH_LIC	Rv2563	BI21(DE3)+pUBS520 [@]	Ap/Km	2YT	25 °C	16 horas	220 RPM
BtuC_CH_LIC	BtuC	BI21(DE3)+pUBS520 [@]	Ap/Km	2YT	25 °C	16 horas	220 RPM
MalF_CH_LIC	MalF	BI21(DE3)+pUBS520 [@]	Ap/Km	2YT	25 °C	16 horas	220 RPM
MalG_CH_LIC	MalG	BI21(DE3)+pUBS520 [@]	Ap/Km	2YT	25 °C	16 horas	220 RPM
pRSF-Duet-Rv2563-2564	Rv2563-2564	Rosetta 2	Cm/Km	Luria Bertani	20 °C	16 horas	220 RPM

O meio ZYM 5250 é composto de extrato de levedura, peptona, 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 2,8 mM glicose, 54 mM glicerol e 5,6 mM de lactose.

#Fusão GB1 no N-terminal. [§]Nos ensaios realizados na Inglaterra utilizamos o meio Luria Bertani. [@]Plasmídeo resistente a canamicina para suplementar os códons raros para ARG (AGG/AGA).

Tabela A3 – Condições de purificação das proteínas estudadas neste trabalho e expressas em larga escala.

Construção	Gene	Purificação 1	Purificação 2	Buffer A	Buffer B	Buffer C
2563-PerBP-F1R1(Rv2563per)	Rv2563	Afinidade a metal	Exclusão Molecular	50 mM Tris pH 7.5	50 mM Tris pH 7.5	50 mM Tris pH 7.5
				150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
				10 mM Imidazol	200 mM Imidazol	
2563-Per8 F3-R2	Rv2563	Afinidade a metal	Exclusão Molecular	50 mM Tris pH 7.5	50 mM Tris pH 7.5	50 mM Tris pH 7.5
				150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
				10 mM Imidazol	200 mM Imidazol	
pOPINE-3C-GFP 2563 <i>Solubilização em 1% DM</i>	Rv2563	Afinidade a metal	Exclusão Molecular	PBS pH 7.5	PBS pH 7.5	20 mM Tris pH 7.5
				0,26% DM	0,26% DM	0,26% DM
				150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
				10% Glicerol	10% Glicerol	10% Glicerol
				10 mM Imidazol	250 mM Imidazol	
HALO-2564	Rv2564	Afinidade a metal	Exclusão Molecular	20 mM Tris pH 7.5	20 mM Tris pH 7.5	20 mM Tris pH 7.5
				150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
				5 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂
				10 mM Imidazol	500 mM Imidazol	1 mM ATP
				1 mM ATP	1 mM ATP	10% Glicerol
				10% Glicerol	10% Glicerol	
2564- Bla	Rv2564	Afinidade a metal	Exclusão Molecular	50 mM Tris pH 7.5	50 mM Tris pH 7.5	50 mM Tris pH 8,0
				150 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
				5 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂	5 mM MgCl ₂
				10 mM Imidazol	200 mM Imidazol	

<p>pOPINE-3C-GFP 2563</p> <p>+</p> <p>Halo-2564 (co-expressão)</p> <p>Solubilização em 1% DM</p>	<p><i>Rv2563-2564</i></p>	<p>Afinidade a metal</p>	<p>Exclusão Molecular</p>	<p>PBS pH 7.5</p> <p>0,26% DM</p> <p>150 mM NaCl</p> <p>10% Glicerol</p> <p>10 mM Imidazol</p>	<p>PBS pH 7.5</p> <p>0,26% DM</p> <p>150 mM NaCl</p> <p>10% Glicerol</p> <p>250 mM Imidazol</p>	<p>20 mM Tris pH 7.5</p> <p>0,26% DM</p> <p>150 mM NaCl</p> <p>10% Glicerol</p>
<p>pRSF-Duet-Rv2563-2564</p> <p>Solubilização em 1% DM</p>	<p><i>Rv2563-2564</i></p>	<p>Afinidade a metal</p>	<p>Exclusão Molecular</p>	<p>PBS pH 7.5</p> <p>0,26% DM</p> <p>150 mM NaCl</p> <p>10% Glicerol</p> <p>10 mM Imidazol</p>	<p>PBS pH 7.5</p> <p>0,26% DM</p> <p>150 mM NaCl</p> <p>10% Glicerol</p> <p>250 mM Imidazol</p>	<p>20 mM Tris pH 7.5</p> <p>0,26% DM</p> <p>150 mM NaCl</p> <p>10% Glicerol</p>
<p>Rv2564-SUMO-Full</p>	<p><i>Rv2564</i></p>	<p>Afinidade a metal</p>	<p>Exclusão Molecular</p>	<p>50 mM Tris pH 8,0</p> <p>500 mM NaCl</p> <p>5% Glicerol</p> <p>5 mM MgCl₂</p> <p>10 mM Imidazol</p>	<p>50 mM Tris pH 8,0</p> <p>500 mM NaCl</p> <p>5% Glicerol</p> <p>5 mM MgCl₂</p> <p>200 mM Imidazol</p>	<p>50 mM Tris pH 8,0</p> <p>150 mM NaCl</p> <p>5% Glicerol</p> <p>5 mM MgCl₂</p>
<p>Rv2564-MBP-Medium</p>	<p><i>Rv2564</i></p>	<p>Afinidade a metal</p>	<p>Exclusão Molecular</p>	<p>50 mM Tris pH 8,0</p> <p>500 mM NaCl</p> <p>5% Glicerol</p> <p>5 mM MgCl₂</p> <p>10 mM Imidazol</p>	<p>50 mM Tris pH 8,0</p> <p>500 mM NaCl</p> <p>5% Glicerol</p> <p>5 mM MgCl₂</p> <p>200 mM Imidazol</p>	<p>50 mM Tris pH 8,0</p> <p>150 mM NaCl</p> <p>5% Glicerol</p> <p>5 mM MgCl₂</p>
<p>Rad</p>	<p><i>RadA</i></p>	<p>Troca iônica</p>	<p>Exclusão Molecular</p>	<p>20 mM MES pH 6,0</p> <p>0,5 mM EDTA</p>	<p>20 mM MES pH 6,0</p> <p>0,5 mM EDTA</p> <p>1 M NaCl</p>	<p>20 mM MES pH 6,0</p> <p>0,5 mM EDTA</p> <p>200 mM NaCl</p> <p>1 mM DTT</p>

BtuC-CH-LIC	<i>BtuC</i>	Troca iônica	Exclusão Molecular	20 mM MES pH 6,0 0,5 mM EDTA	20 mM MES pH 6,0 0,5 mM EDTA 1 M NaCl	20 mM MES pH 6,0 0,5 mM EDTA 200 mM NaCl 1 mM DTT
MalF-CH-LIC	<i>MalF</i>	Troca iônica	Exclusão Molecular	20 mM MES pH 6,0 0,5 mM EDTA	20 mM MES pH 6,0 0,5 mM EDTA 1 M NaCl	20 mM MES pH 6,0 0,5 mM EDTA 200 mM NaCl 1 mM DTT
MalG-CH-LIC	<i>MalG</i>	Troca iônica	Exclusão Molecular	20 mM MES pH 6,0 0,5 mM EDTA	20 mM MES pH 6,0 0,5 mM EDTA 1 M NaCl	20 mM MES pH 6,0 0,5 mM EDTA 200 mM NaCl 1 mM DTT
Rv2563-CH-LIC	<i>Rv2563</i>	Troca iônica	Exclusão Molecular	20 mM MES pH 6,0 0,5 mM EDTA	20 mM MES pH 6,0 0,5 mM EDTA 1 M NaCl	20 mM MES pH 6,0 0,5 mM EDTA 200 mM NaCl 1 mM DTT

*No tampão A foi adicionado 1 mg/ml DNase e 1 pastilha de inibidores de protease para cada 30 ml de extrato (Protease Inhibitors - Cocktail Tablets, Roche Life Sciences) durante a primeira lise das células.

Tabela A4 – Oligonucleotídeos para qPCR Transportadores Rv2563-2564 e Rv0072-0073 pelo sistema SYBR Green

Gene	Pares de Base	Sequência
Rv2563	100bp	5'-GCTTTGCGTGATGTCCA-3' 5'-TCACAAGTCCGGTCAGAA-3'
Rv2564	112bp	5'-AGGGCGAGTTCGAGATT-3' 5'-CGTGGCAGGTGAAACAG-3'
Rv0072	100bp	5'-CTTACAGAAATTGGCGTACAAC-3' 5'-CCGATCGAAAGTCTGGTAAC-3'
Rv0073	102bp	5'-GGGCGAGTTTGAGATTGT-3' 5'-TGAAACAGCACGCCTATC-3'
MTB16s	121bp	5'-TGGTGGGGCGTAGGCCGTGA-3' 5'- ACCTGGAACAAGTCCGAGTG-3'

Tabela A5 - Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem do tipo LIC de fragmentos codificadores de hélices de associação das proteínas de interesse. BtuC: permease do sistema ABC de importação de vitamina B12 de *E. coli*; MalF e MalG: permeases do sistema ABC de importação de maltose de *E. coli*.

Construção	Gene	Oligonucleotídeos para Clonagem	Enzima de Restrição	Sequência Hélice
BtuC-CH-LIC	<i>BtuC</i>	Forward: 5'GGCGGCGGGCTTAAGCACTTGGCGAGATCTCGGCGCGGCAACTGGGTTTACCCC3' Reverse: 5'CCGCCTCCCTTAAGGGGTAAACCCAGTC3'	Método LIC Vetor pRAD linearizado com <i>Afl</i> II	Nter-ALGAEISARQLGLP-Cterm
MalF-CH-LIC	<i>MalF</i>	Forward: 5'GGCGGCGGGCTTAA ATTCCGGACGATTTGTATGAAGCCC3' Reverse: 5'CCGCCTCCCTTAAGGGCTTCATAC3'	Método LIC Vetor pRAD linearizado com <i>Afl</i> II	Nter-IPDDLVEASAMDGAG-Cterm
MalG-CH-LIC	<i>MalG</i>	Forward: 5'GGCGGCGGGCTTAAGGAAACCATCGACAGTTCGCT3' Reverse: 5'CCGCCTCCCTTAAGCTTTGGTAGCTGTCAAGCGACCTTCTTCGACGACGCGACCTACCACGCTGTC3'	Método LIC Vetor pRAD linearizado com <i>Afl</i> II	Nter-ETIDSSLEEAALDGAT-Cterm
Rv2563-CH-LIC	<i>Rv2563</i>	Forward: 5'GGCGGCGGGCTTAAGTTGGAGCGGCTGCGTGACTTTGCGGTGTTCAAGGCGATCGGCGTGCCGACGCGCC3' Reverse: 5'CCGCCTCCCTTAAGGCGCGTCGGCACGCCGATGCCTTGAACACCGCAAAGTCACGCAGCCGCTCCAAC3'	Método LIC Vetor pRAD linearizado com <i>Afl</i> II	Nter-LERLRDFAVFKAIGVPTR-Cter

*Insertos gerados por hibridização dos oligonucleotídeos de 95°C até 25°C com decréscimo da temperatura de 0.5°C por minuto.

CAPÍTULO I

Tabela A1 – Pesquisa dos transportadores ABC Rv2563-2564 e Rv0072-0073 na plataforma Patric. (Figuras 9, 18, 19 e 20). As sequências foram utilizadas para modelagem comparação entre as proteínas, assim como a árvore filogenética.

Group	Genome	Patric ID	Rv2563	Rv0072	Rv2564	Rv0073
			Identity (%)	Identity (%)	Identity (%)	Identity (%)
	<i>Mycobacterium xenopi</i> RIVM700367		-	-	-	-
<i>M. celatum</i>	<i>Mycobacterium fragae</i>		-	-	-	-
	<i>Mycobacterium shimoidei</i>		-	-	-	-
	<i>Mycobacterium celatum</i>		-	-	-	-
	<i>Mycobacterium kyorinense</i>		-	-	-	-
	<i>Mycobacterium kubicae</i> strain JCM 13573	fig 120959.18.peg.127 fig 120959.18.peg.128	-	81	-	88
	<i>Mycobacterium gordonae</i> strain 24T	fig 1778.48.peg.251 fig 1778.48.peg.252	-	82	-	87
<i>M. kansasii</i>	<i>Mycobacterium gastri</i> 'Wayne'	fig 1436723.3.peg.427 9 fig 1436723.3.peg.427 8	-	86	-	92
	<i>Mycobacterium kansasii</i> strain 1010001454	fig 1768.23.peg.1310 fig 1768.23.peg.1311	-	86	-	91
	<i>Mycobacterium marinum</i> M	fig 216594.6.peg.252 fig 216594.6.peg.253	-	86	-	90
	<i>Mycobacterium liflandii</i> 128FXT	fig 459424.11.peg.195 fig 459424.11.peg.196	-	85	-	89
	<i>Mycobacterium ulcerans</i> strain P7741	fig 1809.17.peg.190 fig 1809.18.peg.2034	-	86	-	89

	<i>Mycobacterium szulgai</i> strain DSM 44166	<i>fig/1787.5.peg.4758</i> <i>fig/1787.5.peg.4759</i>	-	82	-	91
	<i>Mycobacterium riyadhense</i> strain DSM 45176	<i>fig/486698.3.peg.2180</i> <i>fig/486698.3.peg.2181</i>	-	83	-	91
	<i>Mycobacterium lacus</i> strain DSM 44577	<i>fig/169765.3.peg.4081</i> <i>fig/169765.3.peg.4080</i>	-	86	-	92
	<i>Mycobacterium leprae</i> TN		-	-	-	-
M. <i>tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium canettii</i> CIPT 140060008	<i>fig/1205676.3.peg.329</i> 7 <i>fig/1205676.3.peg.92</i> <i>fig/1205675.3.peg.83</i> <i>fig/1205675.3.peg.286</i> 6	100	100	100	99
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	<i>fig/83332.12.peg.83</i> <i>fig/83332.12.peg.2871</i> <i>fig/83332.12.peg.84</i> <i>fig/83332.12.peg.2872</i>	100	100	100	100
	<i>Mycobacterium africanum</i> MAL010137	<i>fig/1354183.3.peg.284</i> 9 <i>fig/1354183.3.peg.84</i> <i>fig/1354183.3.peg.285</i> 0 <i>fig/1354183.3.peg.85</i>	100	100	100	100
	<i>Mycobacterium orygis</i> 112400015	<i>fig/1305739.3.peg.290</i> 4 <i>fig/1305739.3.peg.179</i> <i>fig/1305739.3.peg.180</i> <i>fig/1305739.3.peg.290</i> 5	100	100	99	100

	<i>Mycobacterium bovis</i> AF2122/97	fig/233413.5.peg.2851 fig/233413.5.peg.84 fig/233413.5.peg.2852 fig/233413.5.peg.85	100	100	100	95
	<i>Mycolicibacterium fallax</i> strain JCM 6405		-	62		74
	<i>Mycobacterium canariasense</i> strain CCUG 47953		-	-	-	-
<i>M. abscessus</i>	<i>Mycobacterium immunogenum</i> strain FLAC016		-	-	-	-
	<i>Mycobacterium massiliense</i> CCUG 48898 = JCM 15300 [PRJNA65215]		-	-	-	-
	<i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> strain 369		-	-	-	-
	<i>Mycobacteroides abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> strain 114		-	-	-	-
	<i>Mycobacteroides chelonae</i> strain MOTT36W		-	-	-	-
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i> strain NCTC8159		-	-	-	-
	<i>Mycobacterium wolinskyi</i> strain ATCC 700010		-	-	-	-
<i>M. fortuitum</i>		fig/451644.16.peg.566 3				
	<i>Mycobacterium conceptionense</i> strain CCUG 50187	fig/451644.16.peg.566 4	62			72
	<i>Mycobacterium fortuitum</i> strain CT6	fig/1766.6.peg.5025 fig/1766.6.peg.5026 fig/1209984.3.peg.692 7	-	57		73
	<i>Mycobacterium mageritense</i> DSM 44476	fig/1209984.3.peg.692 6	65			73
	<i>Mycobacterium peregrinum</i> strain ACS819	fig/43304.7.peg.23 fig/43304.7.peg.24	-	56		72

<i>Mycobacterium triviale</i> strain DSM 44153		-	-	-	-
<i>Mycobacterium chubuense</i> NBB4		-	-	-	-
<i>Mycobacterium doricum</i> strain DSM 44339		-	-	-	-
<i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK		-	-	-	-
<i>Mycobacterium iranicum</i> strain DSM 45541		-	-	-	-
<i>Mycobacterium phlei</i> DSM 43072		-	-	-	-
	<i>fig/710685.3.peg.5381</i>				
<i>Mycobacterium rhodesiae</i> NBB3	<i>fig/710685.3.peg.5382</i>	69	-	80	-
<i>Mycobacterium thermoresistibile</i> ATCC 19527		-	-	-	-
	<i>fig/1798.4.peg.1781</i>				
<i>Mycobacterium triviale</i> strain DSM 44153	<i>fig/1798.4.peg.1782</i>	61	-	73	-
	<i>fig/710687.3.peg.4106</i>				
<i>Mycobacterium tusciae</i> JS617	<i>fig/710687.3.peg.4107</i>	69	-	77	-
<i>Mycobacterium vaccae</i> ATCC 25954		-	-	-	-
<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> PYR-1		-	-	-	-
<i>Mycolicibacterium chubuense</i> strain NCTC10819		-	-	-	-
<i>Mycolicibacterium doricum</i> strain JCM 12405		-	-	-	-
	<i>fig/386913.3.peg.2250</i>				
<i>Mycobacterium senuense</i> strain DSM 44999	<i>fig/386913.3.peg.2251</i>	55	-	60	-
	<i>fig/875328.12.peg.387</i>				
	8				
	<i>fig/875328.12.peg.387</i>				
<i>Mycobacterium sinense</i> strain 1274684.2	7	54		60	
	<i>fig/1788.4.peg.512</i>				
<i>Mycobacterium terrae</i> strain NCTC10856	<i>fig/1788.4.peg.511</i>	55	-	60	-
	<i>fig/29314.3.peg.3169</i>				
<i>Mycobacterium hiberniae</i> strain ATCC 49874	<i>fig/29314.3.peg.3168</i>	56	-	61	-

	<i>Mycobacterium engbaekii</i> strain ATCC 27353	fig/188915.3.peg.1452 fig/188915.3.peg.1451	55	-	61	-
	<i>Mycobacterium conspicuum</i> strain DSM 44136	fig/44010.3.peg.3359 fig/44010.3.peg.3360	-	80	-	85
<i>M. simiae</i>	<i>Mycobacterium bohemicum</i> DSM 44277		-	-	-	-
	<i>Mycobacterium europaeum</i> strain CSUR P1344	fig/761804.3.peg.2017 fig/292462.10.peg.343 9	58	-	-	-
	<i>Mycobacterium florentinum</i> strain JCM 14740	fig/292462.10.peg.343 8	80	-	84	-
	<i>Mycobacterium interjectum</i> strain DSM 44064		-	-	-	-
	<i>Mycobacterium nebraskense</i> strain AKUC1	fig/244292.3.peg.613	56	-	-	-
	<i>Mycobacterium palustre</i> strain DSM 44572		-	-	-	-
	<i>Mycobacterium paraense</i> strain FI-07156		-	-	-	-
	<i>Mycobacterium parascrofulaceum</i> ATCC BAA-614		-	-	-	-
	<i>Mycobacterium parmense</i> strain DSM 44553		-	-	-	-
	<i>Mycobacterium saskatchewanense</i> strain DSM 44616		-	-	-	-
	<i>Mycobacterium sherrisii</i> strain ATCC BAA-832		-	-	-	-
	<i>Mycobacterium triplex</i> strain DSM 44626		-	-	-	-
	<i>M. avium</i>	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i> strain DSM 44156		-	-	-
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain OCU466			-	-	-	-
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> MAP4			-	-	-	-
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> strain MAPK_JB16/15			-	-	-	-
<i>Mycobacterium chimaera</i> strain CSURP9141			-	-	-	-
<i>Mycobacterium colombiense</i> CECT 3035			-	-	-	-

<i>Mycobacterium indicus pranii</i> MTCC 9506	-	-	-	-
<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950	-	-	-	-
<i>Mycobacterium intracellulare</i> strain FLAC0133	-	-	-	-
<i>Mycobacterium yongonense</i> strain Asan 36527	-	-	-	-

Tabela A2 – Sequências utilizadas para a produção da árvore filogenética Rv2563 X Família MacB e homólogos. As sequências foram retiradas do banco de dados Uniprot.

Entry	Entry name	Protein name	Gene name	Organism	Length
P57061	LOLC_NEIMA	Lipoprotein-releasing system transmembrane	lolC NMA1403	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup A/serotype 4A (strain DSM 15465)	415
P44250	LOLE_HAEIN	Lipoprotein-releasing system transmembrane	lolE HI_1548	<i>Haemophilus influenzae</i> (strain ATCC 51907)	416
A0KGB3	MACB1_AERHH*	Macrolide export ATP-binding/permease	macB1 AHA_0761	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> (strain ATCC 7966)	648
Q5HVG3	MACB_CAMJR*	Macrolide export ATP-binding/permease	macB CJE0710	<i>Campylobacter jejuni</i> (strain RM1221)	641
Q04LE4	FTSX_STRP2	Cell division protein FtsX	ftsX SPD_0660	<i>Streptococcus pneumoniae</i> serotype 2 (strain D39/NCTC 7466)	308
Q81X30	FTSX_BACAN	Cell division protein FtsX	ftsX BA_5415, BAS5033, GBAA_5415	<i>Bacillus anthracis</i>	297
Q9I190	MACB_PSEAE*	Macrolide export ATP-binding/permease	macB PA2390	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (strain ATCC 15692)	663
Q8ZQE4	MACB_SALTY*	Macrolide export ATP-binding/permea...	macB STM0942	<i>Salmonella typhimurium</i> (strain LT2/SGSC1412/ATCC 700720)	648
O34741	BCEB_BACSU	Bacitracin export permease protein	bceB barD, ytsD, BSU30370	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	646
P9WG19	FTSX_MYCTU	Cell division protein FtsX	ftsX Rv3101c, MTCY164.12c	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	297
Q9K618	BCEB_BACHD	Bacitracin export permease protein	bceB BH3914	<i>Bacillus halodurans</i> (strain ATCC BAA-125)	648
P0AC32	FTSX_SHIFL	Cell division protein FtsX	ftsX SF3480, S4283	<i>Shigella flexneri</i>	352
P0AC30	FTSX_ECOLI	Cell division protein FtsX	ftsX ftsS, b3462, JW3427	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	352
Q2FVR0	HRTB_STAA8	Putative hemin transport system permease	hrtB SAOUHSC_02641	<i>Staphylococcus aureus</i> (strain NCTC 8325/PS 47)	351
O34876	FTSX_BACSU	Cell division protein FtsX	ftsX BSU35250	<i>Bacillus subtilis</i> (strain 168)	296
Q9AGF2	FTSX_AERHY	Cell division protein FtsX	ftsX	<i>Aeromonas hydrophila</i>	317

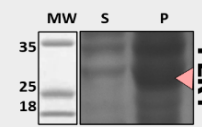
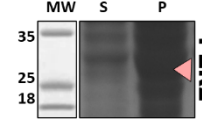
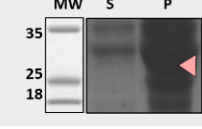
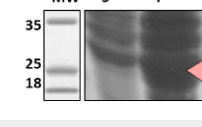
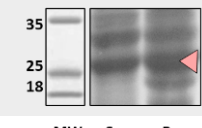
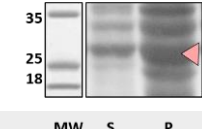
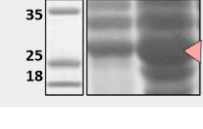
P44872	FTSX_HAEIN	Cell division protein FtsX	ftsX HI_0770	<i>Haemophilus influenzae</i> (strain ATCC 51907)	310
P75958	LOLE_ECOLI	Lipoprotein-releasing system transmembrane	lolE ycfW, b1118, JW1104	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	414
Q8YIT2	MACB_BRUME*	Macrolide export ATP-binding/permease	macB BMEI0360/BMEI0361	<i>Brucella melitensis</i> biotype 1 (strain 16M/ ATCC 23456)	647
P44252	LOLC_HAEIN	Lipoprotein-releasing system transmembrane	lolC HI_1555	<i>Haemophilus influenzae</i> (strain ATCC 51907)	393
Q9K0N7	MACB_NEIMB*	Macrolide export ATP-binding/permease	macB NMB0549	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup B (strain MC58)	644
P0ADC3	LOLC_ECOLI	Lipoprotein-releasing system transm...	lolC ycfU, b1116, JW5161	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	399
A1VYW8	MACB_CAMJJ*	Macrolide export ATP-binding/permease	macB CJJ81176_0636	<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> serotype O:23/36 (strain 81-176)	641
Q5MK06	MACB_NEIGO*	Macrolide export ATP-binding/permease	macB	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	644
P75831	MACB_ECOLI*	Macrolide export ATP-binding/permease	macB ybjZ, b0879, JW0863	<i>Escherichia coli</i> (strain K12)	648
Q63MM6	MACB_BURPS*	Macrolide export ATP-binding/permease	macB BPSS0624	<i>Burkholderia pseudomallei</i> (strain K96243)	653
Q6FYL0	MACB_BARQU*	Macrolide export ATP-binding/permease	macB BQ12380	<i>Bartonella quintana</i> (strain Toulouse) (<i>Rochalimaea quintana</i>)	660
Q3Z3Q4	MACB_SHISS*	Macrolide export ATP-binding/permease	macB SSON_0866	<i>Shigella sonnei</i> (strain Ss046)	648
P57062	LOLC_NEIMB	Lipoprotein-releasing system transmembrane	lolC NMB1235	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup B (strain MC58)	415
Q4L8L8	HRTB_STAHJ	Putative hemin transport system permease	hrtB SH0698	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (strain JCSC1435)	351
P95357	FTSX_NEIGO	Cell division protein FtsX	ftsX	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	305
Q49ZT7	HRTB_STAS1	Putative hemin transport system permease	hrtB SSP0542	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> (strain ATCC 15305)	350
Q2EHL8	MACB_AGGAC*	Macrolide export ATP-binding/permease	macB	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	644

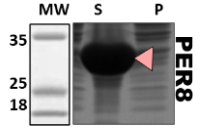
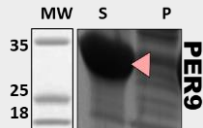
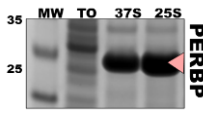
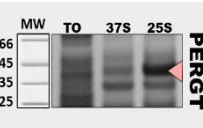
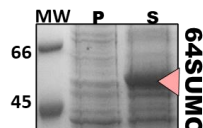
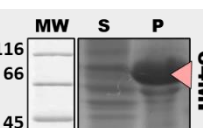
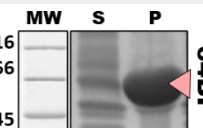
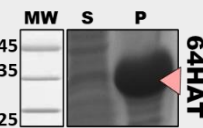
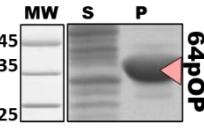
Q9CM47	MACB_PASMU*	Macrolide export ATP-binding/permease	macB PM0996	<i>Pasteurella multocida (strain Pm70)</i>	649
Q7VMF9	MACB_HAEDU*	Macrolide export ATP-binding/permease	macB HD_1019	<i>Haemophilus ducreyi (strain 35000HP / ATCC 700724)</i>	696
O32882	FTSX_MYCLE	Cell division protein FtsX	ftsX ML0670, MLCB1779.20c	<i>Mycobacterium leprae (strain TN)</i>	297
O31712	YKNZ_BACSU	Uncharacterized ABC transporter permease	yknZ BSU14370	<i>Bacillus subtilis (strain 168)</i>	397
A0A0D8G707	A0A0D8G707_ACIBA	Macrolide export ATP-binding/permease	macB A4U85_15970, A7M79_04890, AB945B12_01667, ABA1_00593, ABA9102_08080	<i>Acinetobacter baumannii</i>	664
A0A064C3C4	A0A064C3C4_STREE	ABC transporter permease	macB_1 macB_2, macB_3, macB_4, macB_6, yknZ	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	419
B7LWU9	B7LWU9_ECO55	AatP permease	aatP pEC55989_0058	<i>Escherichia coli (strain 55989 / EAEC)</i>	387
K7WSF8	K7WSF8_9NOST	ABC transporter permease protein	devC ANA_C10618	<i>Anabaena sp. 90</i>	391
A3QMZ3	A3QMZ3_ENTFC	AS-48H	as-48H	<i>Enterococcus faecium</i>	399
Q8RKC0	Q8RKC0_ENTFL	Membrane subunit	as-48H	<i>Enterococcus faecalis subsp. liquefaciens</i>	399

*O transportadores MacB apresentam a fusão do domínio NBD no N-terminal da proteína, para o alinhamento essas regiões foram identificadas e excluídas

CAPÍTULO II

Tabela A1 – Construções obtidas e testadas nesse trabalho e condições dos testes de expressão realizados.

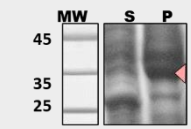
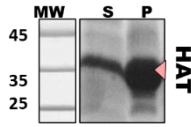
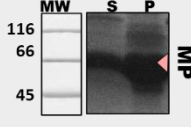
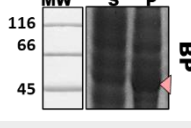
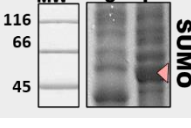
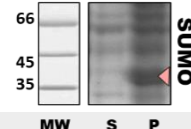
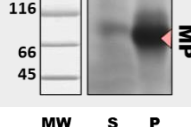
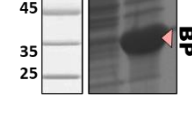
Construção	Gene	MC	Domínio	Segmento	Vetor	Fusão	P*	MW ¹	Mw ²	AA	pI ³	pI ⁴	Cepas	Sol ⁵	Temp	Amostra testes
2563- Per 1 F1-R1 (34-223)	<i>Rv2563</i>	<i>Mtu</i>	TM	Periplasmático	pHAT2	His_N_Ter	-	21,93	-	210	5.9	-	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
2563- Per 2 F1-R2 (34-219)	<i>Rv2563</i>	<i>Mtu</i>	TM	Periplasmático	pHAT2	His_N_Ter	-	21,43	-	206	5.5	-	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
2563- Per 3 F1-R3 (34-213)	<i>Rv2563</i>	<i>Mtu</i>	TM	Periplasmático	pHAT2	His_N_Ter	-	21,07	-	202	5.9	-	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
2563- Per 4 F2-R1 (37-223)	<i>Rv2563</i>	<i>Mtu</i>	TM	Periplasmático	pHAT2	His_N_Ter	-	21,66	-	207	5.9	-	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
2563- Per 5 F2-R2 (37-219)	<i>Rv2563</i>	<i>Mtu</i>	TM	Periplasmático	pHAT2	His_N_Ter	-	21,16	-	203	5.5	-	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
2563- Per 6 F2-R3 (37-213)	<i>Rv2563</i>	<i>Mtu</i>	TM	Periplasmático	pHAT2	His_N_Ter	-	20,79	-	199	5.9	-	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
2563- Per 7 F3-R1 (47-223)	<i>Rv2563</i>	<i>Mtu</i>	TM	Periplasmático	pHAT2	His_N_Ter	-	20,50	-	197	5.8	-	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	

2563- Per 8 F3-R2 (47- 219)	Rv2563	<i>Mtu</i>	TM	Periplasmático	pHAT2	His_N_Ter	-	20	-	193	5.4	-	B121(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Sol.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
2563- Per 9 F3-R3 (47- 213)	Rv2563	<i>Mtu</i>	TM	Periplasmático	pHAT2	His_N_Ter	-	19,63	-	189	5.8	-	B121(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Sol.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
2563- PerBP F1-R1 (34- 223)	Rv2563	<i>Mtu</i>	TM	Periplasmático	pOP3BP	Avi-Tag- His-GB1_N- Ter	3C	30.95	19.87	294	5.5	5.0	B121(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Sol.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
2563- PerGT F1-R1 (34- 223)	Rv2563	<i>Mtu</i>	TM	Periplasmático	pOP5GT	His-GST_N- Ter	TEV	48.56	19.71	441	6.5	5.0	B121(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Sol.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564_ful l_ SUMO	Rv2564	<i>Mtu</i>	ATPase	Completo	pOP3SU	Avi-Tag- His- SUMO_N- Ter	SUMO	50.33	35.57	459	5.6	5.2	B121(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Sol.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564_ful l_ MP	Rv2564	<i>Mtu</i>	ATPase	Completo	pOP3MP	Avi-Tag- His- MBP_N-Ter	3C	81.46	35.72	750	5.2	5.2	B121(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564_ful l_ BP	Rv2564	<i>Mtu</i>	ATPase	Completo	pOP3BP	Avi-Tag- His-GB1_N- Ter	3C	46.81	35.72	434	5.4	5.2	B121(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564_ful l_ pHAT2	Rv2564	<i>Mtu</i>	ATPase	Completo	pHAT2	His_N_Ter	-	36.55	-	339	6.2	-	B121(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564_ful l_ pOP1	Rv2564	<i>Mtu</i>	ATPase	Completo	pOP1	Proteína Nativa	-	35.4	-	330	5.2	-	B121(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C	

Rv2564 full GT	Rv2564	Mtu	ATPase	Completo	pOP5GT	His-GST_N- Ter	TEV	64.42	35.57	581	6.2	5.2	C41(DE3) C43(DE3) Bl21 Star(DE3) Rosetta 2	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C	
Rv2564 pET28a	Rv2564	Mtu	ATPase	Completo	pET28a	His_N_Ter	Tromb	37.72	35.84	35	6.4	5.4	Bl21- Star(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564 medium_ SUMO	Rv2564	Mtu	ATPase	Menor no C- terminal	pOP3SU	Avi-Tag- His- SUMO_N- Ter	SUMO	41.44	26.68	377	6.1	6.3	Bl21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564 medium_M P	Rv2564	Mtu	ATPase	Menor no C- terminal	pOP3MP	Avi-Tag- His- MBP_N-Ter	3C	72.57	26.84	668	5.5	6.3	Bl21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564_ medium_B P	Rv2564	Mtu	ATPase	Menor no C- terminal	pOP3BP	Avi-Tag- His-GB1_N- Ter	3C	37.92	26.68	352	6.0	6.3	Bl21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564 medium_ pHAT2	Rv2564	Mtu	ATPase	Menor no C- terminal	pHAT2	His_N_Ter	-	27.67	-	257	6.9	-	Bl21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564_ medium_p OP1	Rv2564	Mtu	ATPase	Menor no C- terminal	pOP1	Proteína Nativa	-	26.54	-	248	6.3	-	Bl21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564_ short_SUM O	Rv2564	Mtu	ATPase	Sem Domínio Regulatório	pOP3SU	Avi-Tag- His- SUMO_N- Ter	SUMO	38.90	24.14	354	6.4	7.1	Bl21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	

Rv2564 short_MP	Rv2564	Mtu	ATPase	Sem Domínio Regulatório	pOP3MP	Avi-Tag-His-MBP_N-Ter	3C	70.03	24.29	645	5.7	7.1	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564 short_BP	Rv2564	Mtu	ATPase	Sem Domínio Regulatório	pOP3BP	Avi-Tag-His-GB1_N-Ter	3C	35.38	24.29	329	6.3	7.1	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564 short_pHAT2	Rv2564	Mtu	ATPase	Sem Domínio Regulatório	pHAT2	His_N_Ter	-	25.12	-	234	7.4	-	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564 short_pOP1	Rv2564	Mtu	ATPase	Sem Domínio Regulatório	pOP1	Proteína Nativa	-	23.99	-	225	7.1	-	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2564 Regulatory-GT	Rv2564	Mtu	ATPase	Regulatório	pOP5GT	His-GST_N-Ter	TEV	40.78	11.93	359	5.9	4.4	<u>BI21</u> <u>Star(DE3)</u> <u>Rosetta 2</u>	Sol.	37 °C <u>25 °C</u> 18 °C	
Rv2564 Trx	Rv2564	Mtu	ATPase	Completo	pExp-Trx	His-Trx_N_Term	TEV	49.72	35.29	461	5.7	5.2	BI21(DE3) Artic(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 15 °C 12 °C	
Rv2564 8His	Rv2564	Mtu	ATPase	Completo	pOP2H	His-C_Term	-	37.05	-	343	6.4	-	BI21(DE3) Artic(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 15 °C 12 °C	
Rv2564 Bla	Rv2564	Mtu	ATPase	Completo	pExp-Bla	His-Bla_N_Term	TEV	77.46	35.29	719	4.5	5.2	<u>BI21(DE3)</u> <u>Artic(DE3)</u>	Sol.	37 °C 25 °C <u>15 °C</u> <u>12 °C</u>	

Rv2564 NusA	Rv2564	Mtu	ATPase	Completo	pExp-NusA	His-Nus_N_Term	TEV	92.79	35.29	847	4.5	5.2	Bl21(DE3) Artic(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 15 °C 12 °C	
Rv2564 DsbC	Rv2564	Mtu	ATPase	Completo	pExp-DsbC	His-DsbC_N_Term	TEV	61.51	35.29	569	6.2	5.2	Bl21(DE3) Artic(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 15 °C 12 °C	
Rv2564 DnaK	Rv2564	Mtu	ATPase	Completo	pExp-DnaK	His-DNaK_N_Term	TEV	106.6	35.29	985	4.8	5.2	Bl21(DE3) Artic(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 15 °C 12 °C	
Rv2564 Tsf	Rv2564	Mtu	ATPase	Completo	pExp-Tsf	His-Tsf_N_Term	TEV	68.34	35.29	635	5.6	5.2	Bl21(DE3) Artic(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 15 °C 12 °C	
Rv2564 IF2	Rv2564	Mtu	ATPase	Completo	pExp-IF2	His-IF2_N_Term	TEV	55.67	35.29	510	6.6	5.2	Bl21(DE3) Artic(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 15 °C 12 °C	
Rv2564 DsbA	Rv2564	Mtu	ATPase	Completo	pExp-DsbA	His-DsbA_N_Term	TEV	59.18	35.29	542	6.0	5.2	Bl21(DE3) Artic(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 15 °C 12 °C	
Rv2564 TF	Rv2564	Mtu	ATPase	Completo	pExp-TF	His-TF_N_Term	TEV	86.11	35.29	784	4.8	5.2	Bl21(DE3) Artic(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 15 °C 12 °C	
Rv2564 mCherry	Rv2564	Mtu	ATPase	Completo	pExp-mCherry	His-TF_N_Term	TEV	64.64	35.29	588	6.1	5.2	Bl21(DE3) Artic(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 15 °C 12 °C	

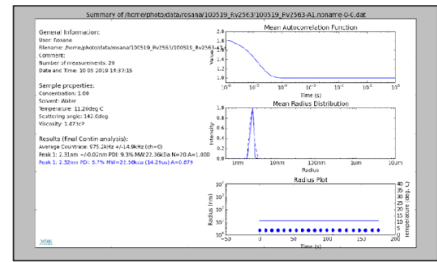
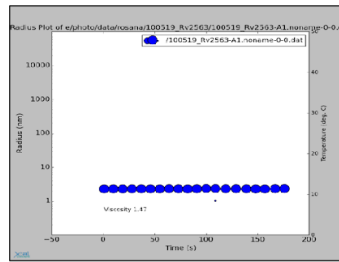
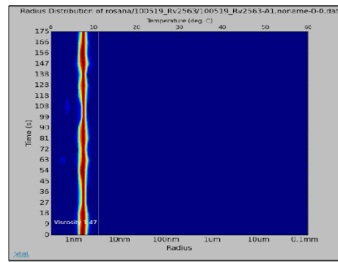
Rv0411c Full ^a _pOP1	Rv0411c	Mtu	PL	Sem Peptídeo Sinal	pOP1	Proteína Nativa	-	32.62	-	300	4.6	-	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C		POP 0411
Rv0411c Full ^a _pHAT2	Rv0411c	Mtu	PL	Sem Peptídeo Sinal	pHAT2	His_N_Ter	-	33.75	-	309	5.5	-	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C		HAT 0411
Rv0411c Full ^a _MP	Rv0411c	Mtu	PL	Sem Peptídeo Sinal	pOP3MP	Avi-Tag-His-MBP_N-Ter	3C	78.65	32.92	720	4.9	4.5	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C		MP 0411
Rv0411c Full ^a _BP	Rv0411c	Mtu	PL	Sem Peptídeo Sinal	pOP3BP	Avi-Tag-His-GB1_N-Ter	3C	44	32.92	404	4.8	4.5	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C		BP 0411
Rv0411c Full ^a _SUMO	Rv0411c	Mtu	PL	Sem Peptídeo Sinal	pOP3SU	Avi-Tag-His-SUMO_N-Ter	SUMO	47.52	32.76	429	5.6	4.5	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C		SUMO 0411
Rv0411c Medium ^b _SUMO	Rv0411c	Mtu	PL	Sem Região N-terminal Rica em Prolinas	pOP3SU	Avi-Tag-His-SUMO_N-Ter	SUMO	42.34	27.58	379	5.5	5.0	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C		SUMO 0411
Rv0411c Medium ^b _MP	Rv0411c	Mtu	PL	Sem Região N-terminal Rica em Prolinas	pOP3MP	Avi-Tag-His-MBP_N-Ter	3C	73.47	27.73	670	5.1	5.0	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C		MP 0411
Rv0411c Medium ^b _BP	Rv0411c	Mtu	PL	Sem Região N-terminal Rica em Prolinas	pOP3BP	GB1-N-Ter	3C	38.82	27.73	354	5.3	5.0	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C		BP 0411

Rv0411c Medium ^b pOP1	<i>Rv0411c</i>	<i>Mtu</i>	PL	Sem Região N-terminal Rica em Prolinas	pOP1	Proteína Nativa	-	27.44	-	250	5.0	-	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv0411c Medium ^b pHAT2	<i>Rv0411c</i>	<i>Mtu</i>	PL	Sem Região N-terminal Rica em Prolinas	pHAT2	His_N_Ter	-	28.56	-	259	6.4	-	BI21(DE3) Tuner(DE3) Artic(DE3) C41(DE3) C43(DE3)	Ins.	37 °C 25 °C 18 °C 12 °C	
Rv2563_D uet	<i>Rv2563</i>	<i>Mtu</i>	TM	Completo	pETDuet	His_N_Ter	-	37.63	-	363	10.1	-	BI21(DE3) Rosetta 2 C41(DE3) C43(DE3)	-	25 °C 18 °C	
Rv2564_D uet1	<i>Rv2564</i>	<i>Mtu</i>	ATPase	Completo	pETDuet	Proteína Nativa	-	35.42	-	330	5.24	-	BI21(DE3) Rosetta 2 C41(DE3) C43(DE3)	-	25 °C 18 °C	
pOPINE-3C-EGFP 2563	<i>Rv2563</i>	<i>Mtu</i>	TM	Completo	pOPINE-3C_EGFP	EGFP-C-Ter 3C	64.65	36.02	602	7.0	10.3	Lemo21 (DE3)	-	20 °C		
pOPINE-CDE-GFP 2563	<i>Rv2563</i>	<i>Mtu</i>	TM	Completo	pOPINE_CDE	EGFP-C-Ter 3C	64.65	36.02	602	7.0	10.3	Lemo21 (DE3)	-	20 °C		
RSE 2564	<i>Rv2564</i>	<i>Mtu</i>	ATPase	Completo	pOPINE_RSE	Proteína Nativa	-	35.4	35.4	330	5.2	-	Lemo21 (DE3)	X	20 °C	
HALO 2564	<i>Rv2564</i>	<i>Mtu</i>	ATPase	Completo	pOPINE_HALO	HALO-TAG-C-Ter 3C	70.41	36.15	638	5.29	5.0	Lemo21 (DE3)	Sol	20 °C		

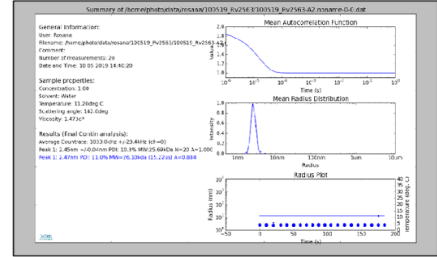
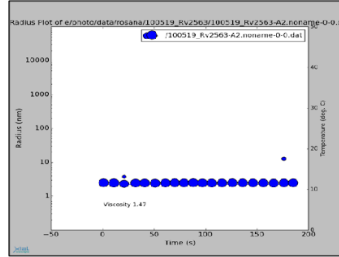
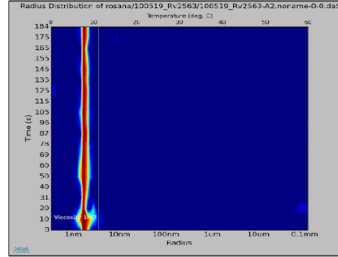
Rad	<i>RadA</i>	<i>Pfu</i>	ATPase	Completo	pRAD	Rad Display	-	25.94	-	238	7.7	-	BI21(DE3) + PUBS520	Sol	25 °C	
BtuC_CH_LIC	<i>BtuC</i>	<i>Eco</i>	TM	Hélice de Associação	pRAD	Rad Display	-	27.49	-	253	8.55	-	BI21(DE3) + PUBS520	Sol	25 °C	
MalF_CH_LIC	<i>MalF</i>	<i>Eco</i>	TM	Hélice de Associação	pRAD	Rad Display	-	27.69	-	255	6.8	-	BI21(DE3) + PUBS520	Sol	25 °C	
MalG_CH_LIC	<i>MalG</i>	<i>Eco</i>	TM	Hélice de Associação	pRAD	Rad Display	-	27.85	-	257	6.6	-	BI21(DE3) + PUBS520	Sol	25 °C	
Rv2563_CH_LIC	<i>Rv2563</i>	<i>Mtu</i>	TM	Hélice de Associação	pRAD	Rad Display	-	28.25	-	258	9.52	-	BI21(DE3) + PUBS520	Sol	25 °C	

Figura A1 - Ensaios de DLS realizados para a Rv2563 em diferentes detergentes, com a presença e ausência de glicerol na amostra. O DLS foi realizado por 48 horas no sistema Spectro Light 600 (Xtal Concepts, Alemanha) utilizando Terasaki 72 wells plates (Greiner Bio-One, USA). Amostras com 1.5 mg/ml.

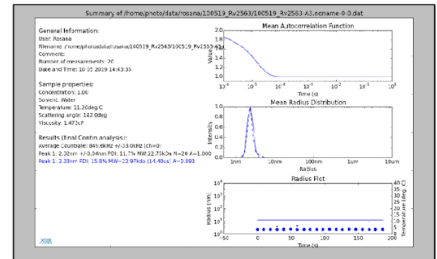
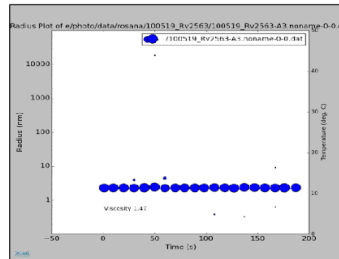
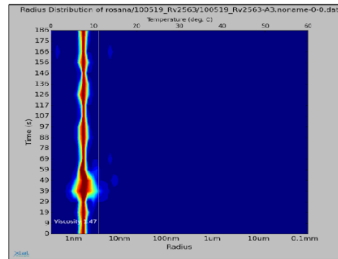
Rv2563_DM



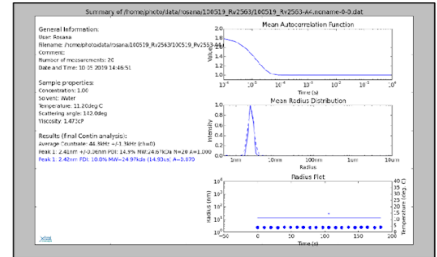
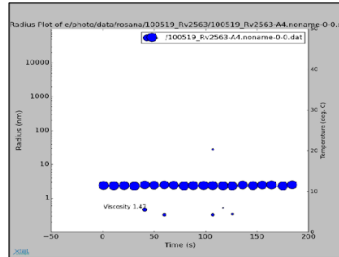
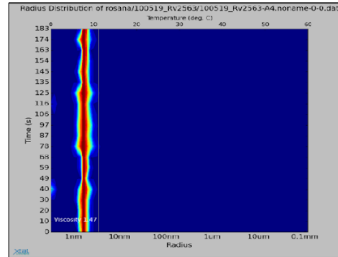
Rv2563_DM + Glycerol



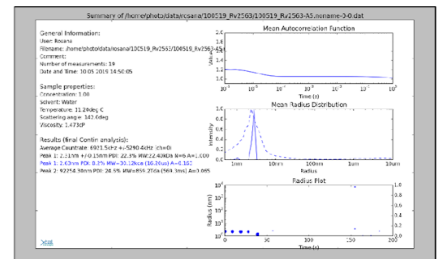
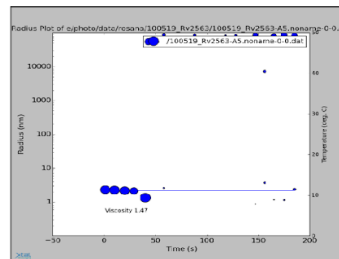
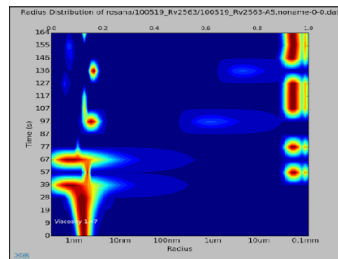
Rv2563_DDM



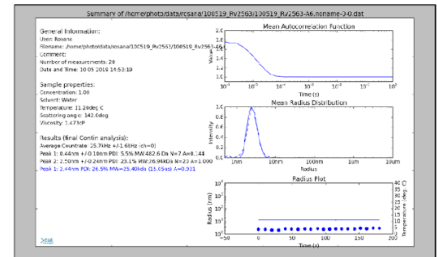
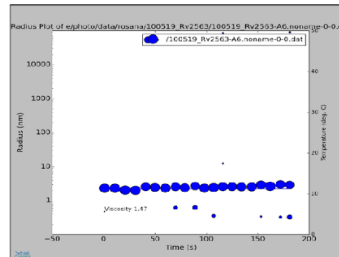
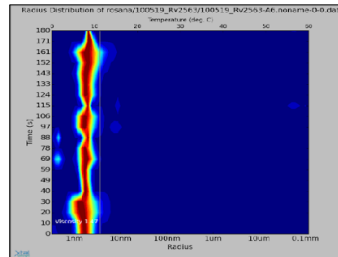
Rv2563_DDM + Glycerol



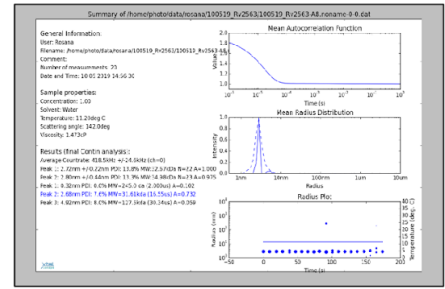
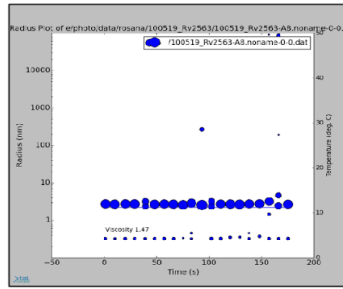
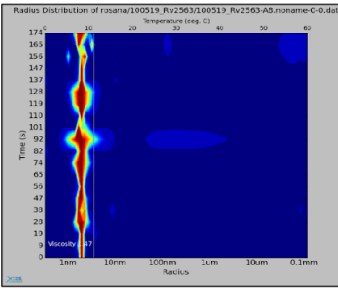
Rv2563_UDM



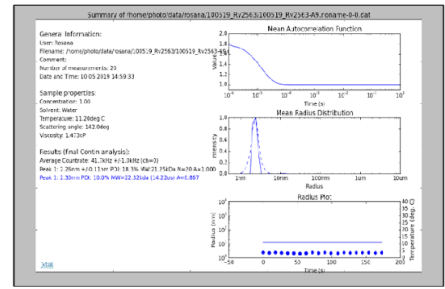
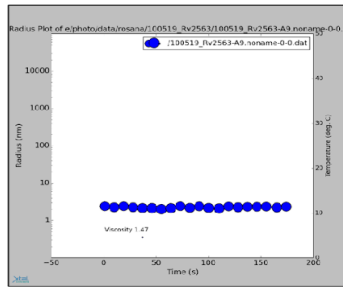
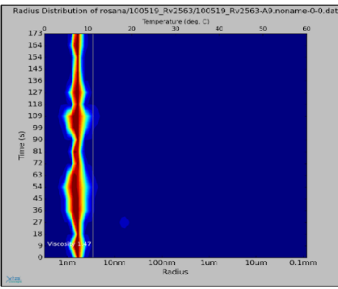
Rv2563_UDM + Glycerol



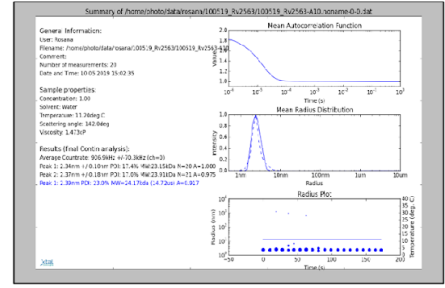
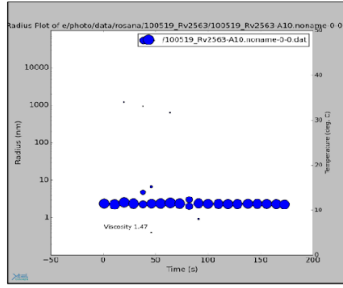
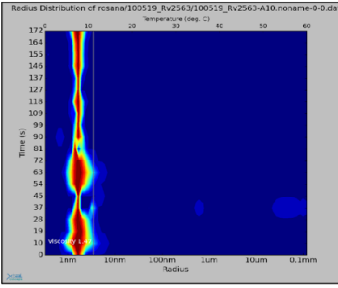
Rv2563_C12E8 + Glycerol



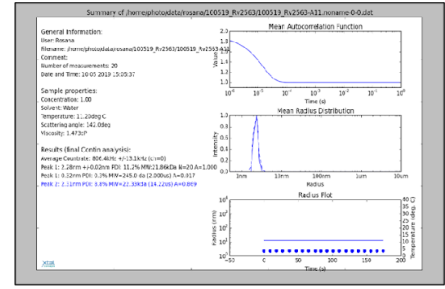
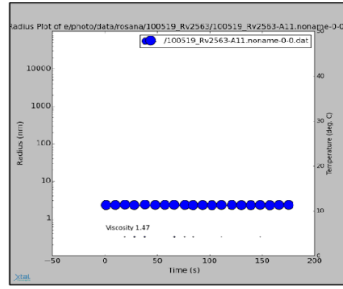
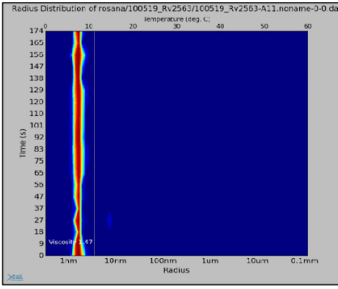
Rv2563_OG



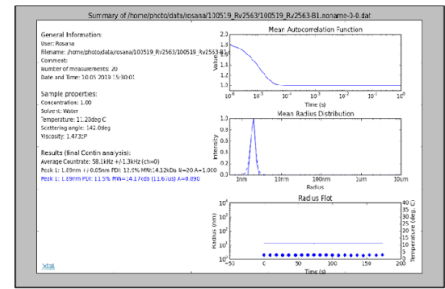
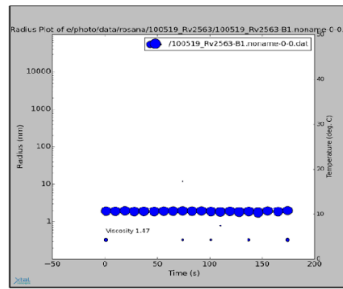
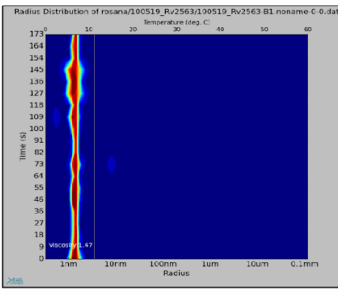
Rv2563_OG + Glycerol



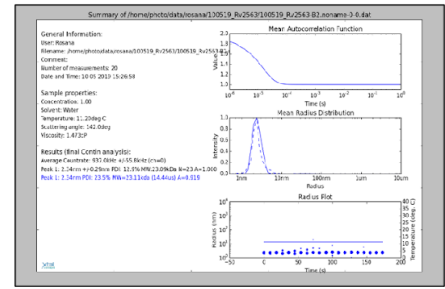
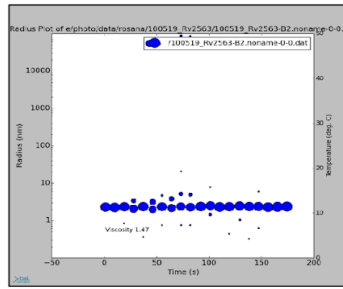
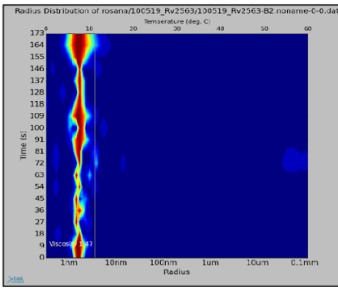
Rv2563_LMNG



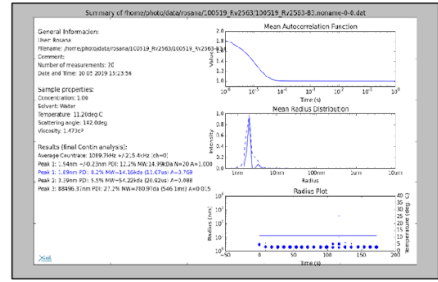
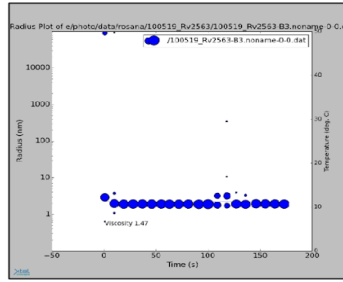
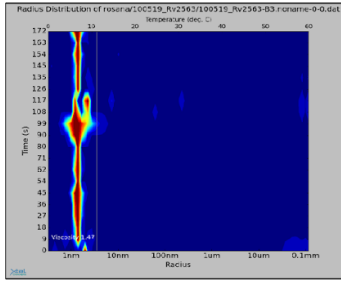
Rv2563_CHAPS



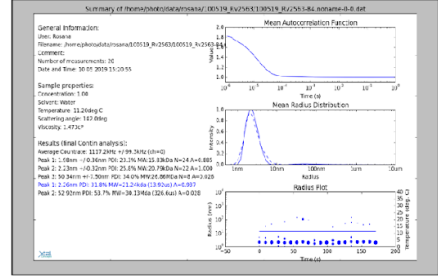
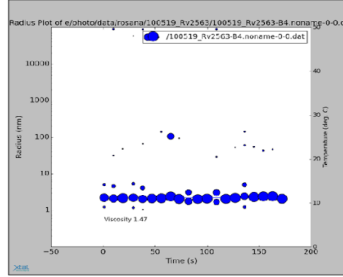
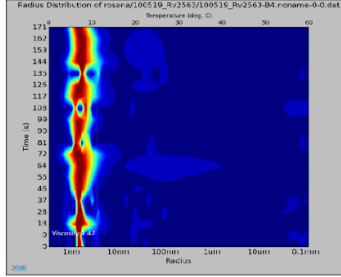
Rv2563_CHAPS + Glycerol



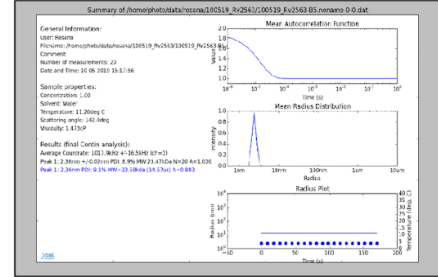
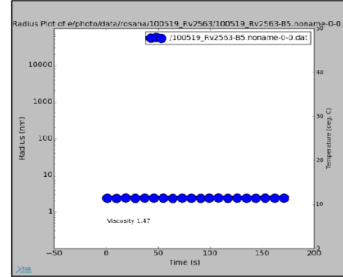
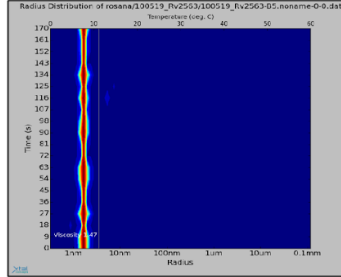
Rv2563_CHAPSO



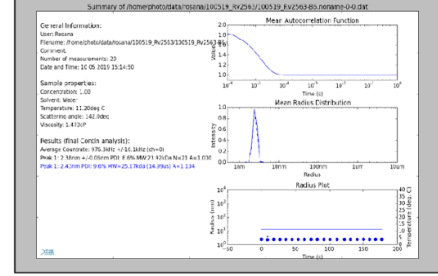
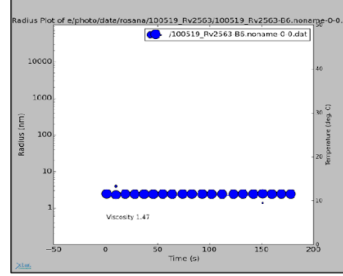
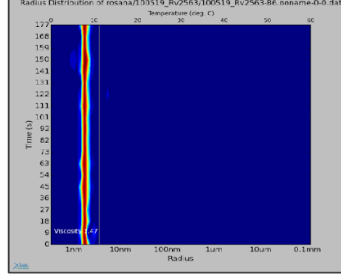
Rv2563_CHAPSO + Glycerol



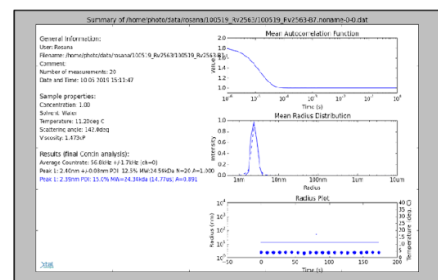
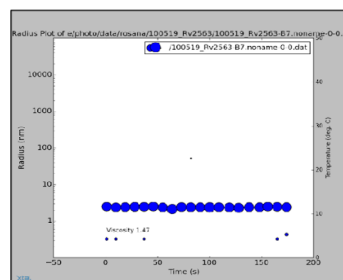
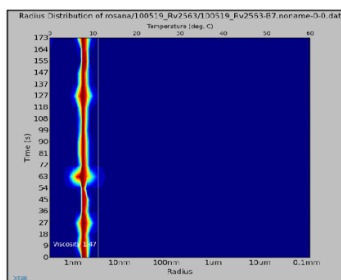
Rv2563_CYMAL



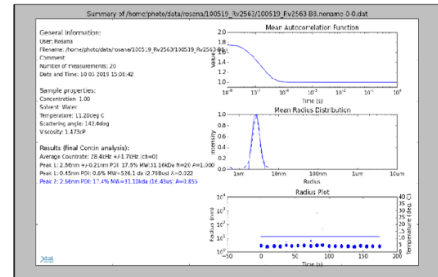
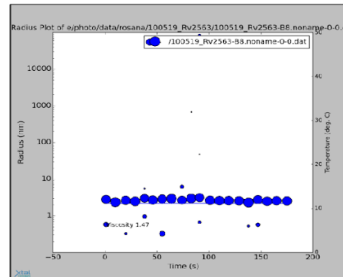
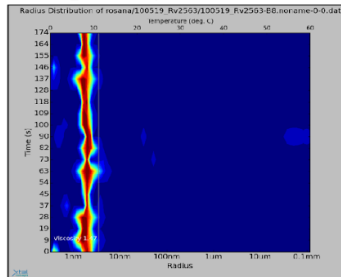
Rv2563_CYMAL + Glycerol



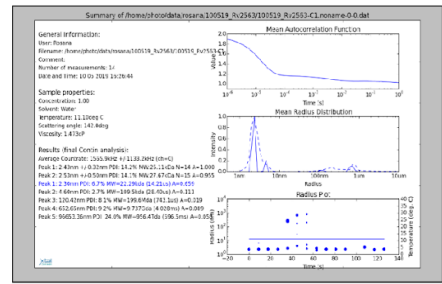
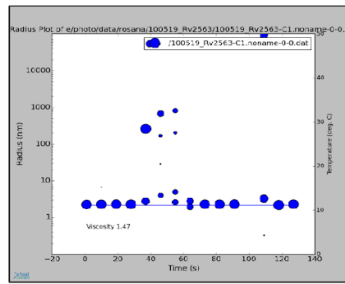
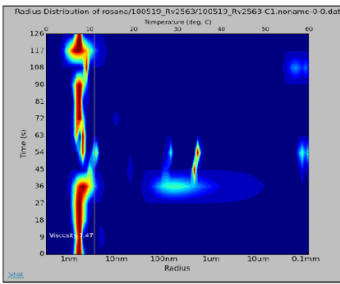
Rv2563_LDAO



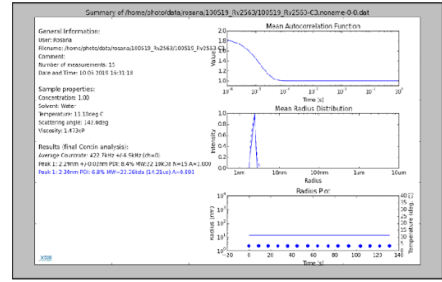
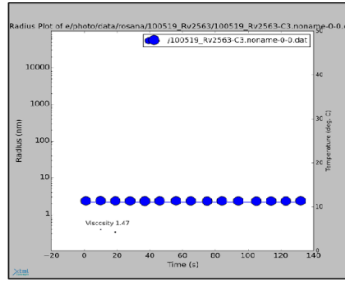
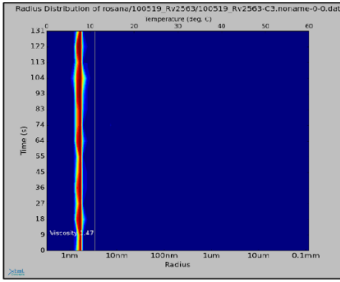
Rv2563_LDAO + Glycerol



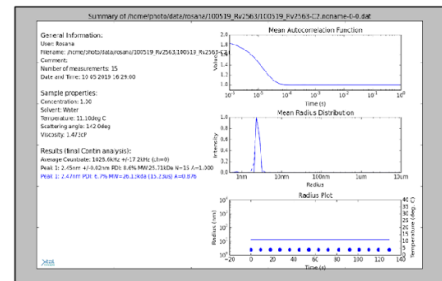
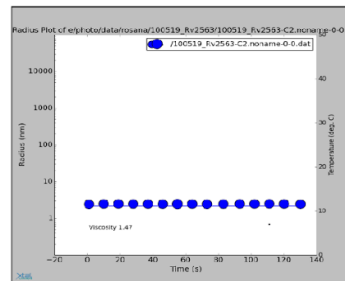
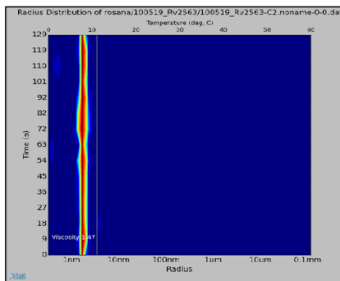
Rv2563_DM



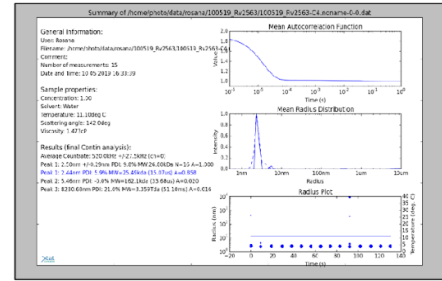
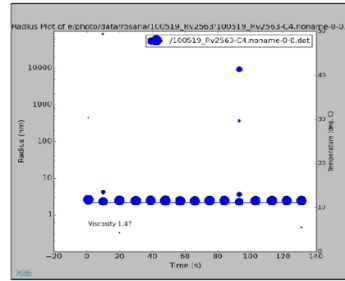
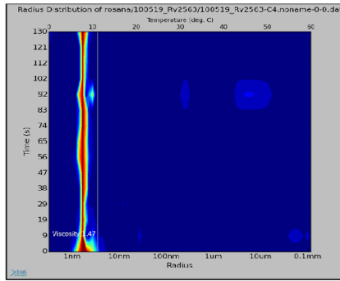
DM



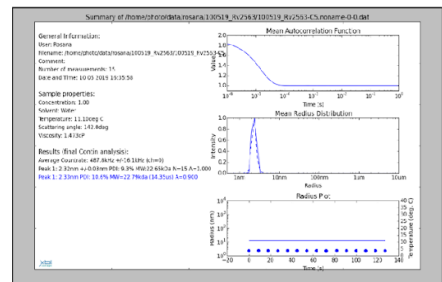
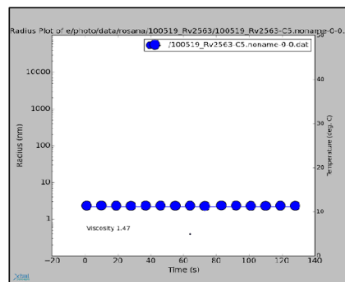
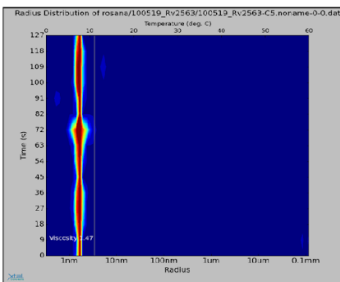
Rv2563_DM + GLYCEROL



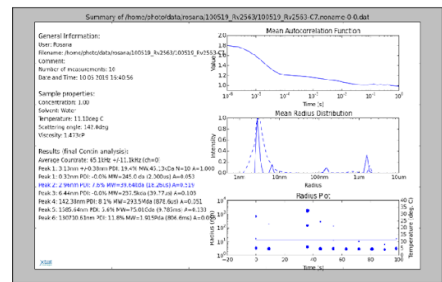
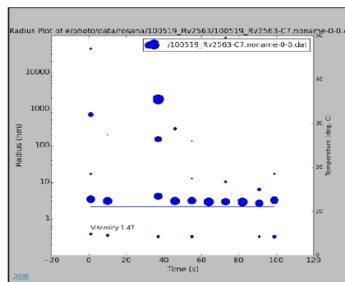
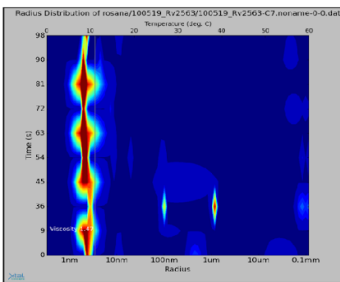
DM + GLYCEROL



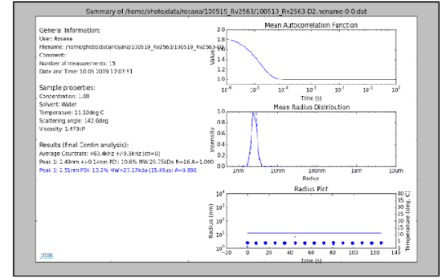
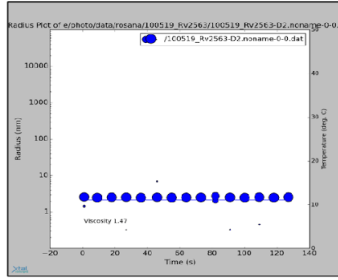
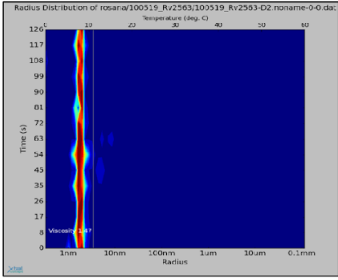
Rv2563_DDM



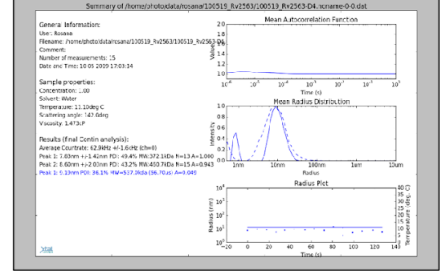
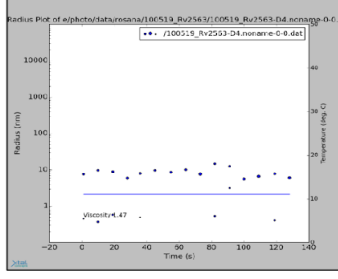
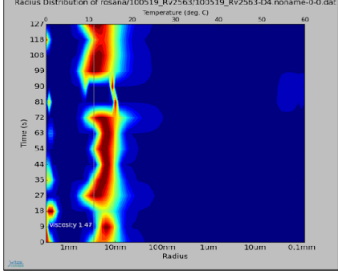
DDM



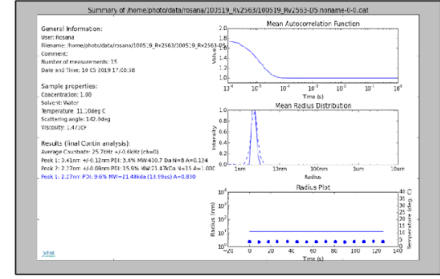
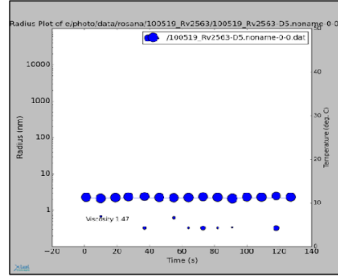
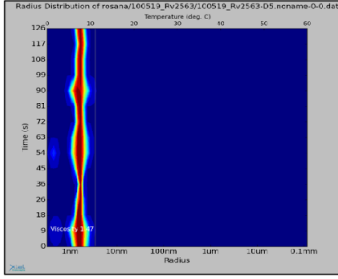
Rv2563_C12E8 +GLYCEROL



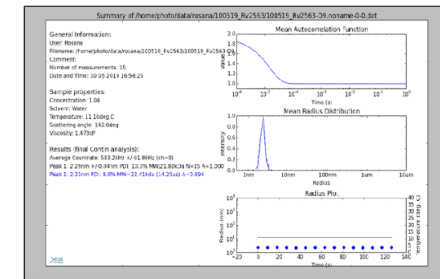
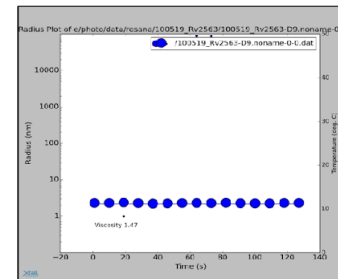
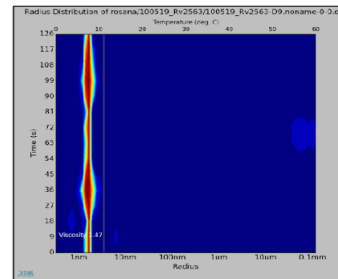
C12E8 + GLYCEROL



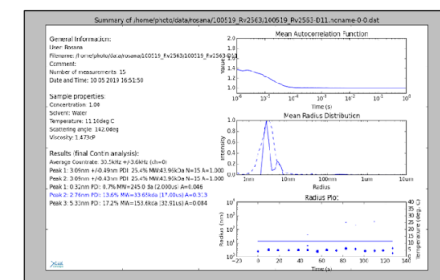
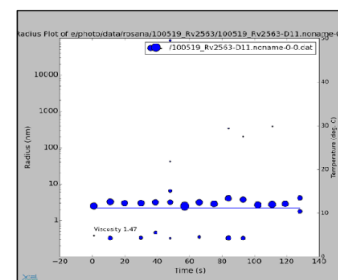
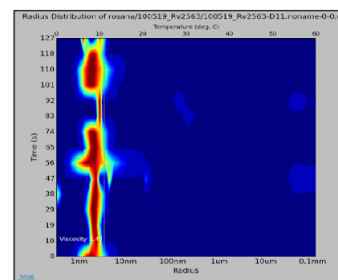
Rv2563_OG



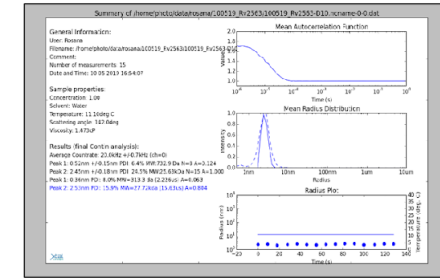
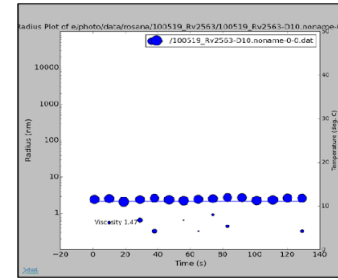
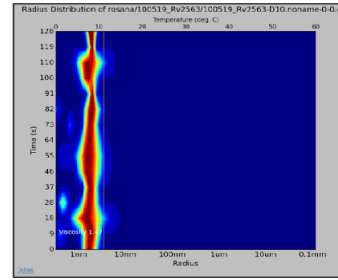
Rv2563_LMNG



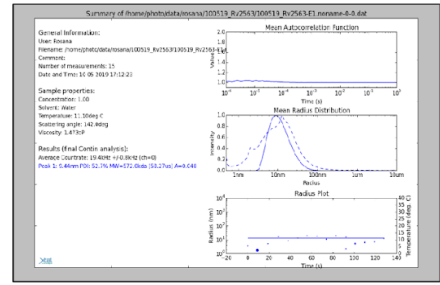
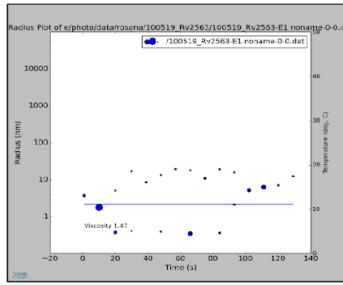
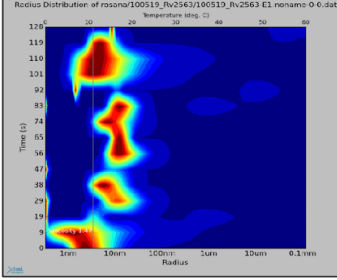
LMNG



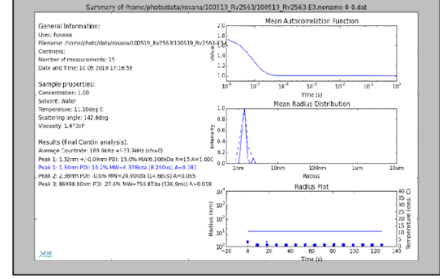
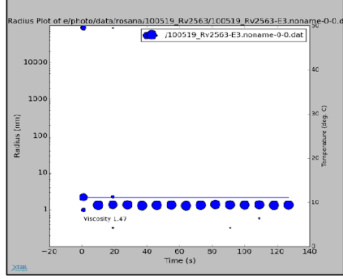
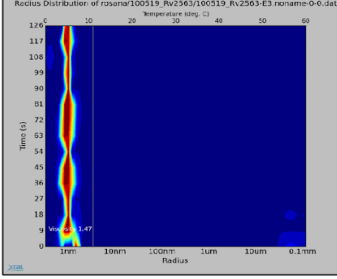
Rv2563_LMNG + GLYCEROL



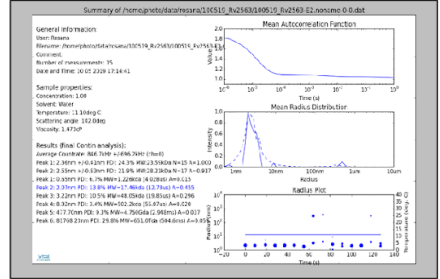
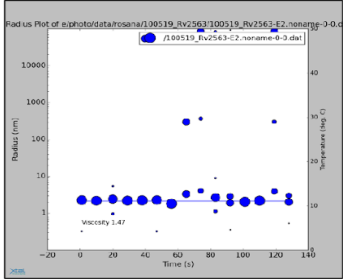
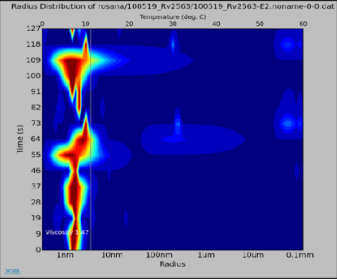
Rv2563_CHAPS



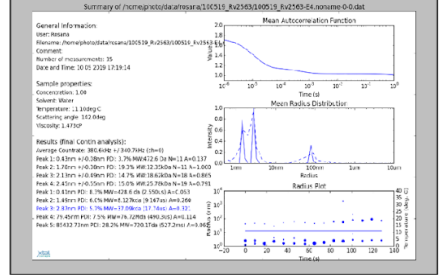
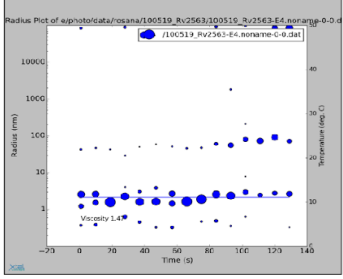
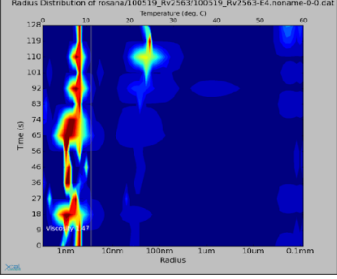
CHAPS



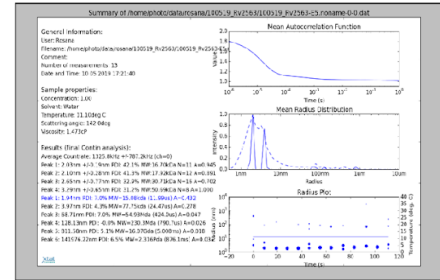
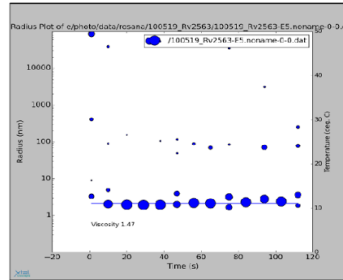
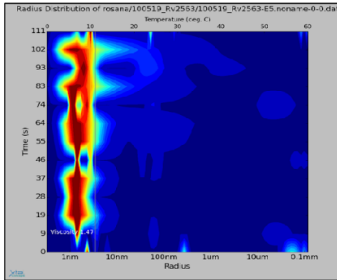
Rv2563_CHAPS + GLYCEROL



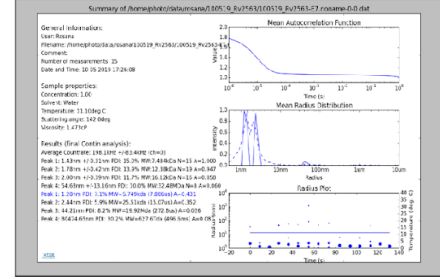
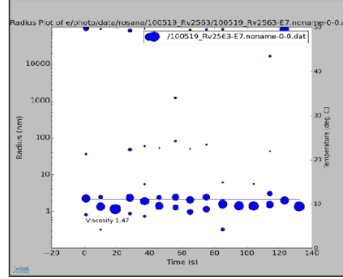
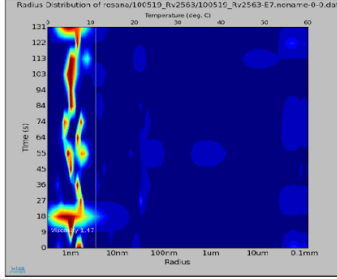
CHAPS + GLYCEROL



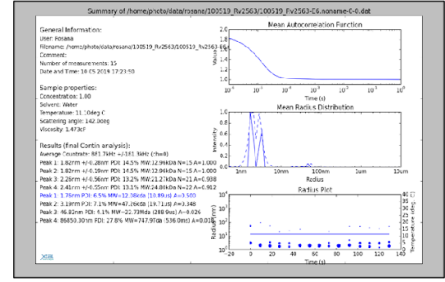
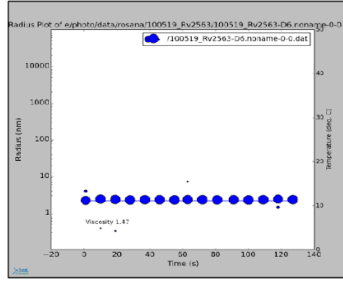
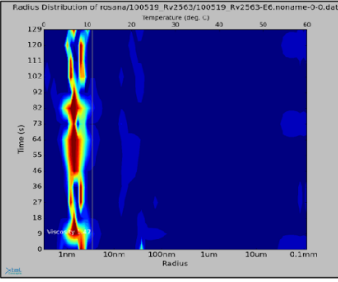
Rv2563_CHAPSO



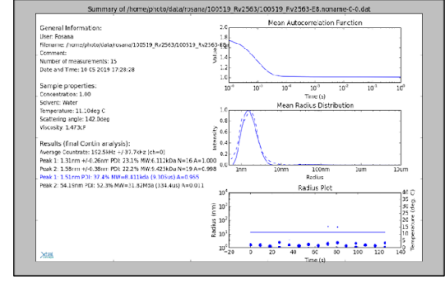
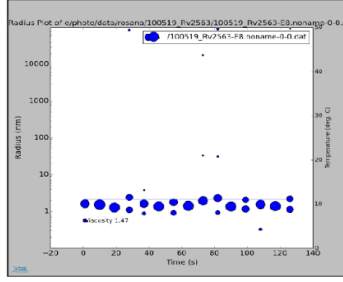
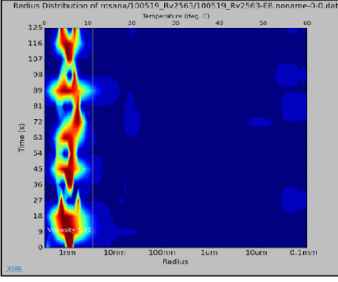
CHAPSO



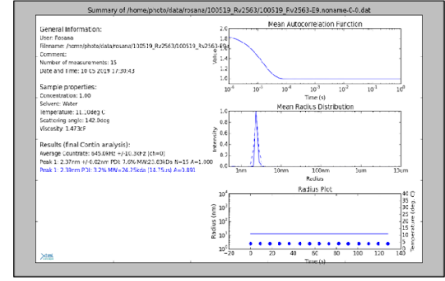
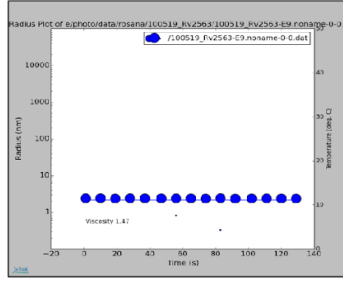
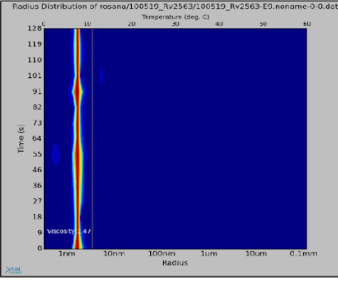
Rv2563_CHAPSO + GLYCEROL



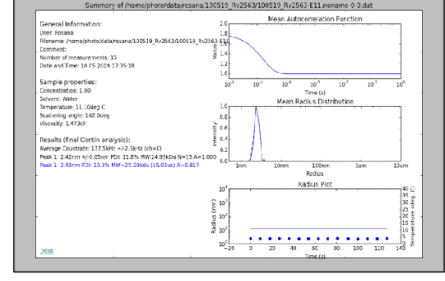
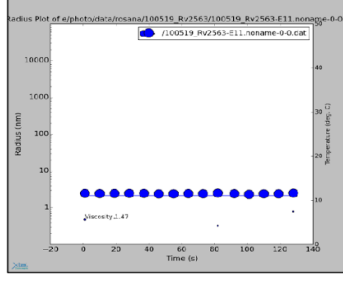
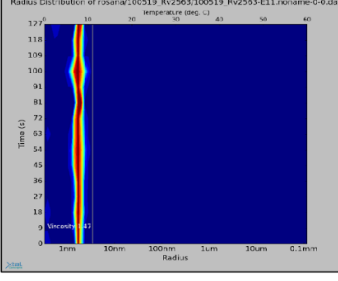
CHAPSO + GLYCEROL



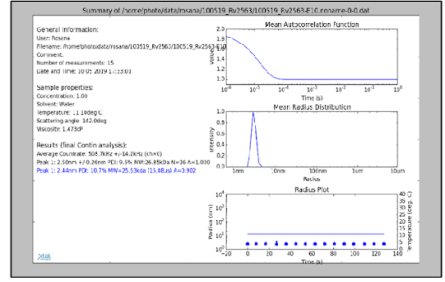
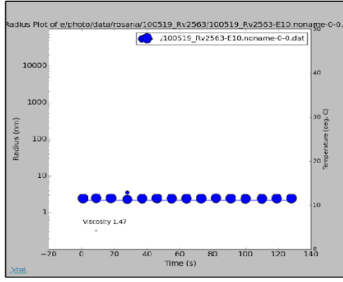
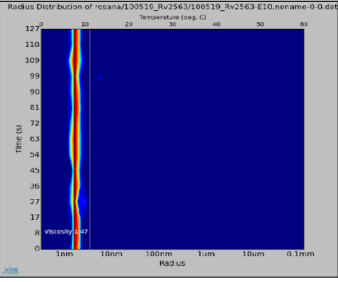
Rv2563_CYMAL



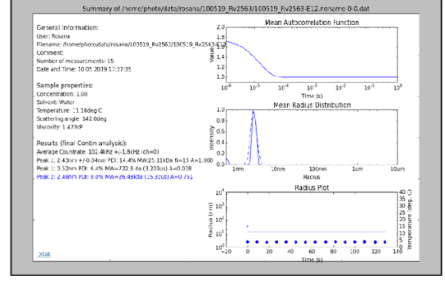
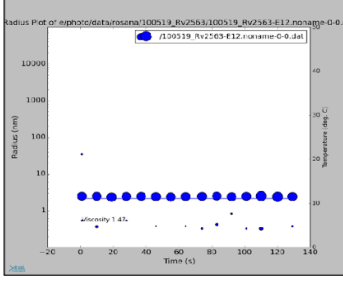
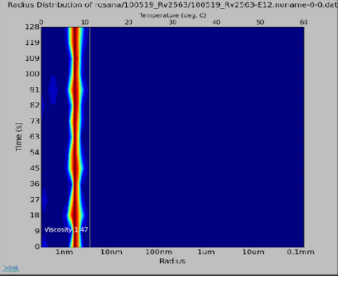
CYMAL



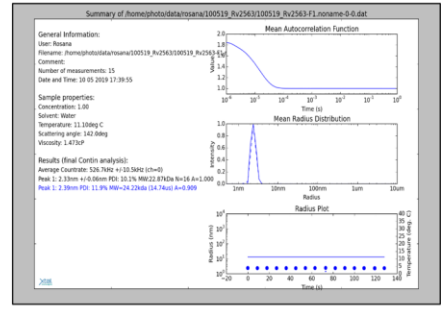
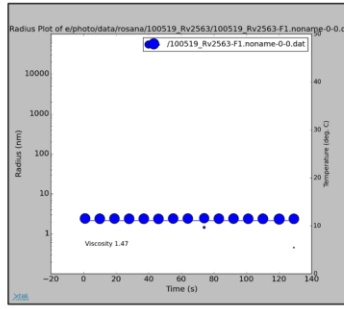
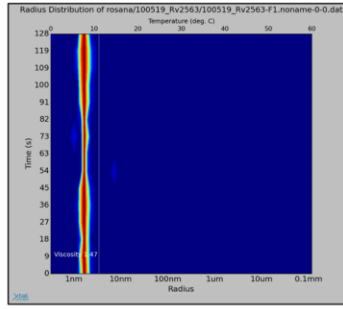
Rv2563_CYMAL + GLYCEROL



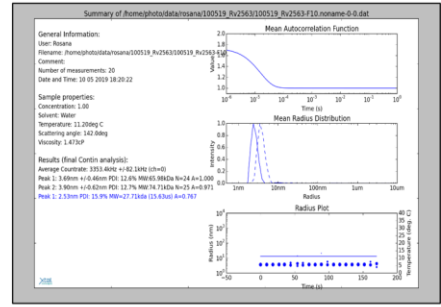
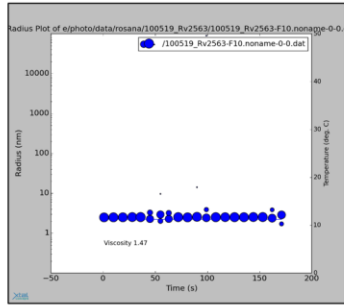
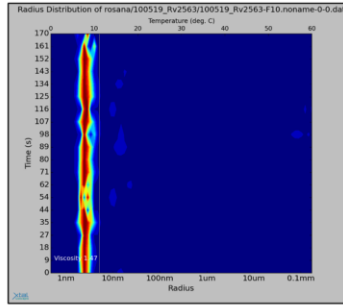
CYMAL + GLYCEROL



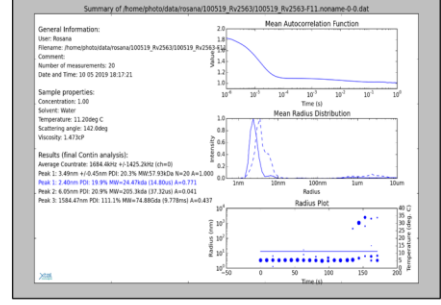
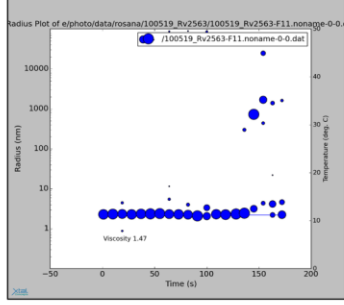
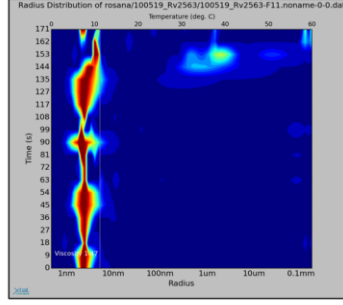
Rv2563_LDAO



Rv2563_DM



Rv2563_DM_DILUTION



Rv2563_DM + GLYCEROL + DILUTION

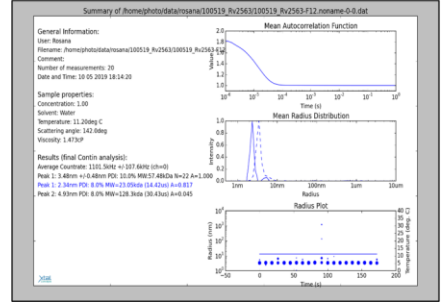
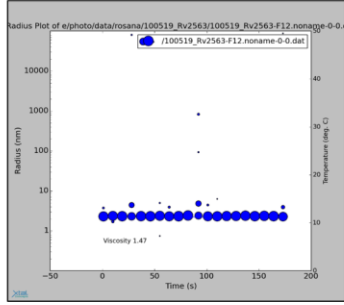
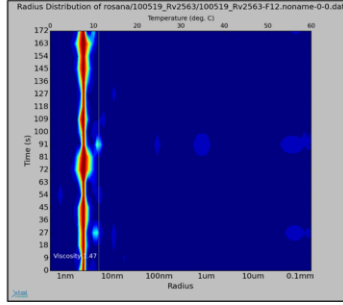
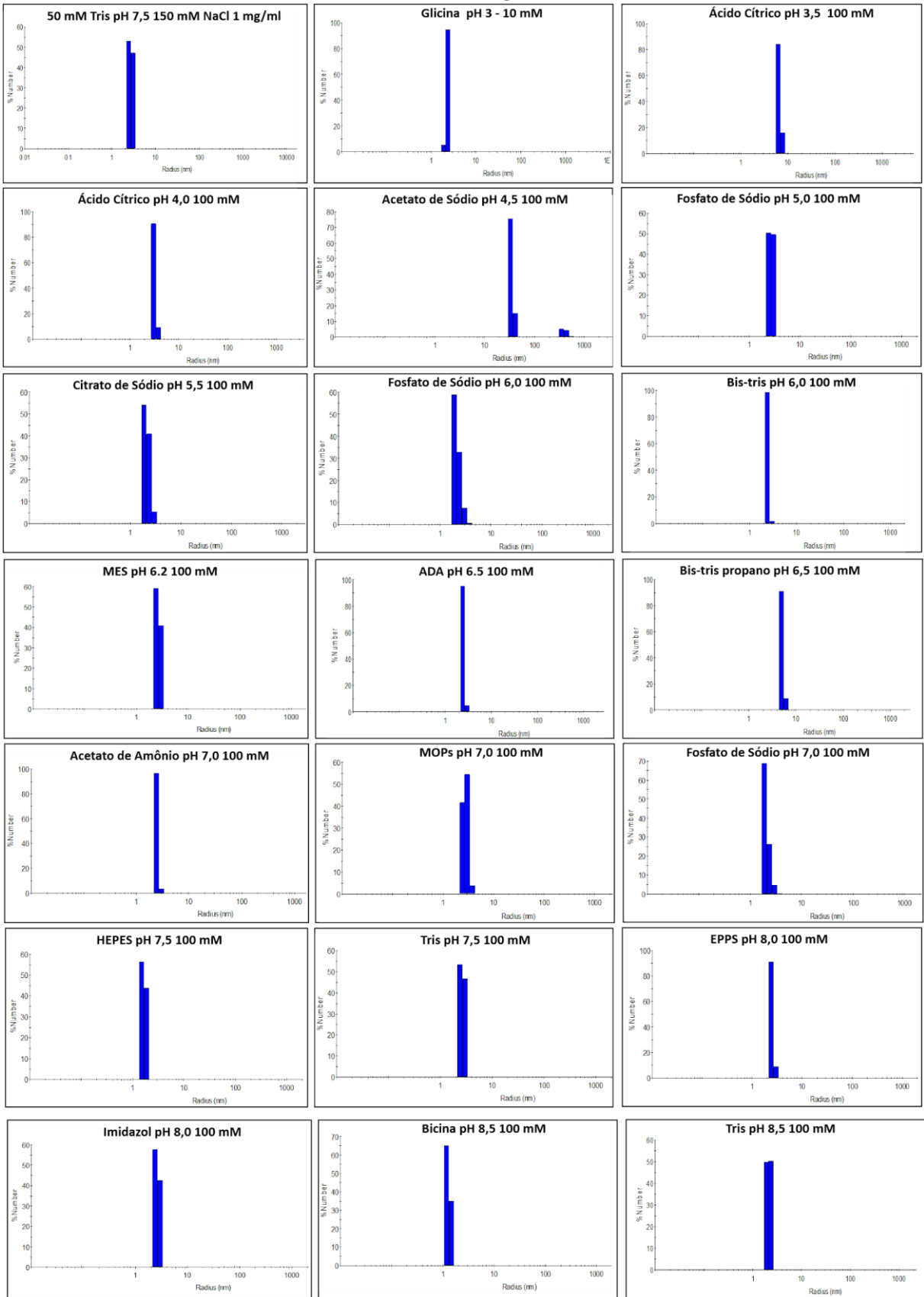
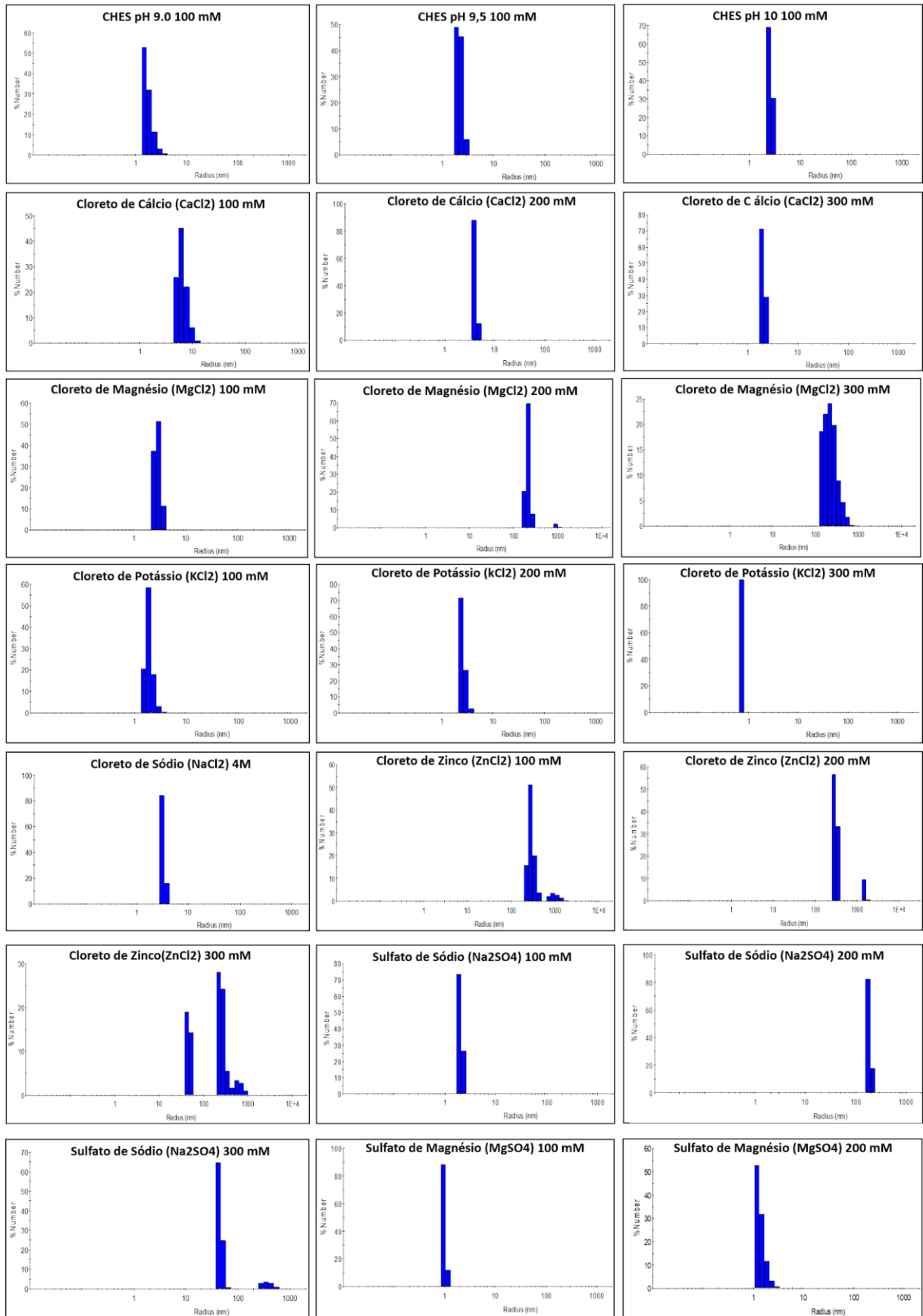
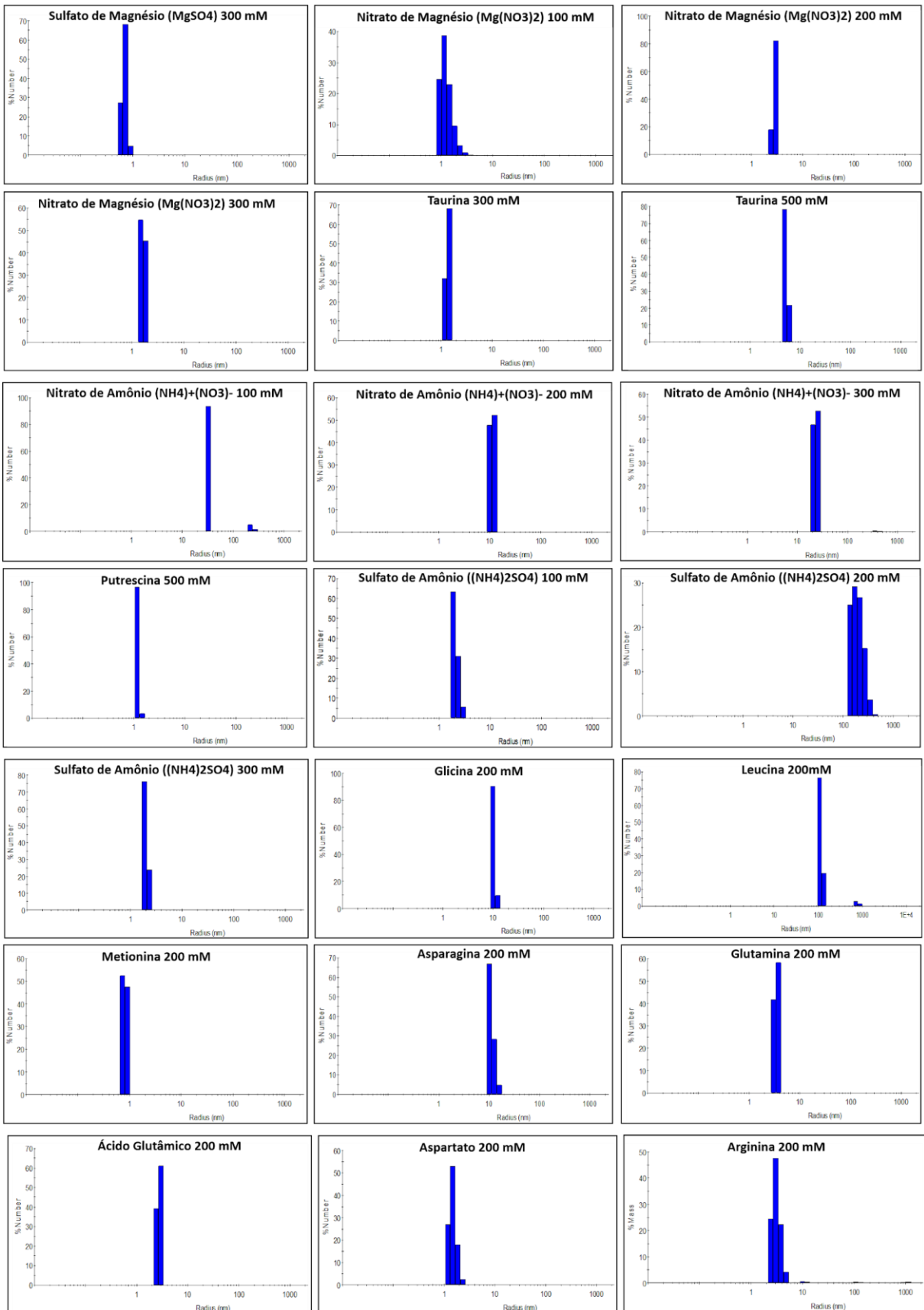
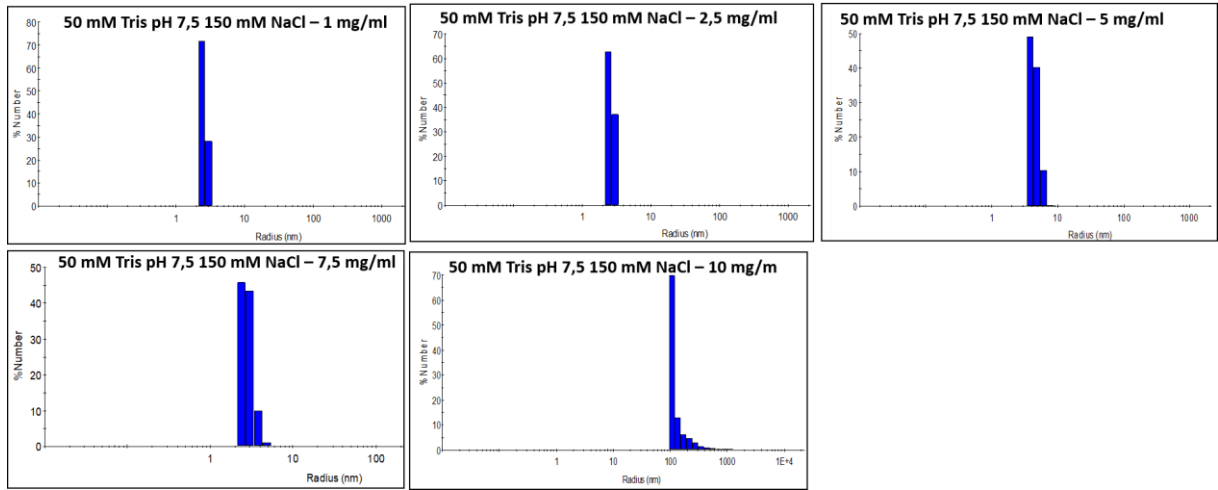


Figura A2- Ensaios de DLS realizados para a Rv2563per em diferentes condições de buffer, concentração de sais, presença de aminoácidos e variação da concentração de proteína. O DLS foi realizado com 10 acumulações e três repetições no DynaPro Plate Reader II (Wyatt Technology, USA) utilizando MicroUV Star 96 wells (Greiner Bio-One, USA). Amostras com 1 mg/ml.









CAPÍTULO III

Tabela A1 – Lista de anticorpos utilizados e produzidos nesse trabalho para os ensaios de citometria, western blot, imunomicroscopia, whole-cell ELISA e ELISA.

Anticorpo	Alvo	Reatividade	Isotipo	Conjugado	Clone	Fabricante	código
anti-Rv2563per	Rv2563per	anti-MTB	x	x	Policlonal	Este trabalho. Produzido em camundongo	x
APC/Cyanine7 anti-human HLA-DR Antibody	HLA-DR	Human, African Green, Baboon, Chimpanzee, Cynomolgus, Dog (Canine), Marmoset, Rhesus, Squirrel Monkey, Tamarin	Mouse IgG2a, κ	APC/Cyanine7	L243	Biolegend	307618
PE anti-human CD83 Antibody	CD-83	Human, African Green, Baboon, Pigtailed Macaque, Rhesus	Mouse IgG1, κ	PE	HB15e	Biolegend	305308
APC Mouse Anti-Human CD86	CD-86	Human (QC Testing), Rhesus, Cynomolgus, Baboon (Tested in Development)	Mouse BALB/c IgG1, κ	Allophycocyanin (APC)	2331	BD	555660
Anti-his	His-tag	Mouse	Mouse / IgG2b	x	HIS.H8	Invitrogen	MA1-21315
Anti-Mouse IgG (whole molecule) – Alkaline Phosphatase Monoclonal	IgG mouse	Mouse	x	alkaline phosphatase conjugate	Policlonal	Sigma	A4312
Anti-polyHistidine – Alkaline Phosphatase	His-tag	x	IgG2a	alkaline phosphatase conjugate	HIS-1	Sigma	A5588
Goat anti-Mouse IgG1	Mouse IgG gamma 1	Mouse	Goat / IgG	HRP	Policlonal	Invitrogen	A10551

Goat anti-Mouse IgG2c	mouse IgG2c	Mouse	Goat IgG	HRP	Policlonal	SouthernBiotech	1078-05
Goat anti-Rat IgG (H+L)-Alexa Fluor 488	Gamma Immunoglobulins	Rat	Goat / IgG	Alexa Fluor® 488	Policlonal	Invitrogen	A11006

Figura A1 - Análises de bioinformática realizadas com as proteínas transmembranas Rv2563 e Rv0072 de MTB, LolC, LolE, MacB e FtsX de *E. coli*. As análises foram realizadas na ferramenta IEDB (<http://tools.iedb.org/main/>) utilizando as configurações gerais. As caixas em vermelho indicam as regiões mais imunogênicas.



Figura A2 - Análises de bioinformática realizadas com as proteínas ATPases Rv2564 e Rv0073 de MTB, LoD, MacB e FtsE de *E. coli*. As análises foram realizadas na ferramenta IEDB (<http://tools.iedb.org/main/>) utilizando as configurações gerais.

