

CATHARINA DOS SANTOS SILVA

**Bases estruturais do controle da elongação e da divisão celular em  
*Mycobacterium tuberculosis* e identificação de *hits* a fármacos  
baseada em triagem de fragmentos**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

CATHARINA DOS SANTOS SILVA

**Bases estruturais do controle da alongação e da divisão celular em  
*Mycobacterium tuberculosis* e identificação de *hits* a fármacos baseada em  
triagem de fragmentos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2023

CATHARINA DOS SANTOS SILVA

**Bases estruturais do controle da alongação e da divisão celular em *Mycobacterium tuberculosis* e identificação de *hits* a fármacos baseada em triagem de fragmentos**

**Versão corrigida**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Vinícius Bertacine Dias.

São Paulo  
2023

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)

Dos Santos Silva, Catharina

Bases estruturais do controle da alongação e da divisão celular em Mycobacterium tuberculosis e identificação de hits a fármacos baseada em triagem de fragmentos / Catharina Dos Santos Silva; orientador Marcio Vinicius Bertacine Dias. -- São Paulo, 2023.

158 p.

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

1. Biossíntese de peptidoglicano. 2. Complexos macromoleculares. 3. Descoberta de fármacos com base em estrutura. 4. Tuberculose. I. Bertacine Dias, Marcio Vinicius , orientador. II. Título.





Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-006  
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 856/2016 referente ao projeto intitulado: "*Bases estruturais do controle da elongação e da divisão celular em Mycobacterium tuberculosis e identificação de hits à fármacos baseado em triagem de fragmentos*" sob a responsabilidade de *Catharina dos Santos Silva* e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) *Márcio Vinicius Bertacini Dias*, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo CEPESH - Comitê 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 março de 2017.

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

Prof. Dr. **Paolo Marinho A. Zanotto**  
Coordenador CEPESH ICB/USP

Declaração de participação do curso  
**Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB**



Declaramos para os devidos fins que

**Catharina dos Santos Silva**

participou do Curso "Biossegurança e Boas Práticas de Laboratório do ICB", realizado pela Comissão Interna de Biossegurança do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com carga horária total de 6 horas.

São Paulo, 2 julho 2019  
Comissão Interna de Biossegurança  
ICB USP

Declaro, para os devidos fins, que

**Catharina dos Santos Silva**

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos", realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 2 julho 2019  
(Declaração válida por 5 anos)



**Prof. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva**  
Presidente da Comissão de Segurança Química



**Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira**  
Diretor do ICB

*Às mulheres da minha vida, Edna e Lorena.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiro, minha eterna gratidão a Deus. Obrigada, Senhor, por guiar os meus passos até aqui. Por manter o Teu propósito em minha vida, mesmo quando eu já não achava que ele seria possível. Foi uma caminhada repleta de desafios e dificuldades, mas também de grandes oportunidades e de valiosos aprendizados. A Ti agradeço por cada um dos momentos vividos ao longo desta trajetória, principalmente, àqueles que me conduziram às pessoas sem as quais esta conquista não seria possível.

Agradeço à Universidade de São Paulo, em particular, ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), por todo amparo institucional. Apoio, este, personificado pelo seu corpo docente, técnicos administrativos, técnicos de laboratório, e equipes de apoio. Em especial, agradeço aos secretários do nosso programa de pós-graduação, Gisele e Renato, por todo cuidado, dedicação e torcida por nós, pós-graduandos.

Às agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2016/18721-4), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte a este trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcio Dias, grande responsável pela minha paixão por biofísica de proteínas. Obrigada por ter me acolhido, anos atrás, como sua aluna de iniciação científica, por acreditar que eu seria capaz de conduzir um projeto de doutorado direto, pelas oportunidades e incentivos, pelos conselhos, *coffees* e pela amizade.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Estrutural Aplicada (LBEA - USP), que direta ou indiretamente, participaram deste trabalho. Este, com certeza, foi um projeto de pesquisa construído e desenvolvido por muitas mãos. Obrigada Gerardo Libreros-Zuñiga, por todos os ensinamentos, e pela grande influência na minha formação científica. Minha gratidão, aos colegas com quem tive a maravilhosa oportunidade de dividir a bancada, as alegrias e as dores dos primeiros anos da pós-graduação Natália Cerrone, Tábata Cardoso, João Ribeiro, Fernanda Paiva, Priscila Bury, Laura Rivas, Andreza Alves, Larissa de Sá, João Pimenta, Sair Pacheco. E, àqueles com quem, atualmente, tenho o prazer de compartilhar os géis de SDS-

PAGE, os tempos de Äkta e as colunas de purificação, as frustrações com as proteínas que não expressam e os risos nos nossos momentos de descontração, Gabriel de Oliveira, Bruno Kaik, Danilo Pavão, Luiz Alfredo, Renan Freire e Thayná Barreto.

Em especial, dedico estas linhas aos melhores alunos de iniciação científica que alguém poderia ter: Nicolas Rossini (hoje colega de doutorado), Paula Cânoas e Luis Victor Santana. O que seria de mim sem vocês?

Aos meus amigos e vizinhos de laboratório, Marcelo Barreto, Cristiane Tambascia e Pâmela Pena, pelas ótimas discussões científicas ou conversas cotidianas, sempre regadas a muito café e risadas.

Aos colaboradores deste projeto. À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Márcia Guimarães (ICB - USP), que gentilmente nos cedeu DNA genômico de *M. tuberculosis* (cepa H37Rv) e *M. smegmatis* (cepa MC<sup>2</sup> 155), utilizadas nas etapas de clonagem dos genes de interesse. À especialista em laboratório Dr.<sup>a</sup>. Cláudia Blanes Angeli, do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Giuseppe Palmisano (ICB - USP), pelo auxílio na preparação das amostras para espectrometria de massas no sequenciamento de proteínas de gel 1D. Ao grupo do Prof. Dr. Flávio Emery (FCFRP - USP), em especial ao mestrando Vinícius Tarouquella, pelos esforços dirigidos à síntese de compostos contra uma de nossas enzimas-alvo. À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luzineide Tinoco (LAMAR - UFRJ), pela receptividade e disponibilidade em me ensinar aspectos teóricos e práticos da RMN, e por toda a contribuição na obtenção e análise da maioria dos dados de STD-RMN deste trabalho. Aos Professores Dr. Roberto Salinas (IQ - USP) e Dr. Fábio Almeida (CENABIO I - UFRJ), por sua contribuição nos ensaios preliminares de RMN de proteína realizados neste estudo, e pela disponibilidade de me receber em seus laboratórios e de apresentar um pouco do mundo da biologia estrutural sob a ótica da RMN. Ao Laboratório Nacional de Biociências do Centro Nacional de Pesquisas (LNBio - CNPEM), em particular aos pesquisadores Dr. Maurício Sforça (Laboratório de RMN) e Dr.<sup>a</sup> Fernanda Batista, que nos auxiliaram nos experimentos de STD-RMN e ultracentrifugação analítica, respectivamente. Aos Professores Dr. Glaucius Oliva e Dr. Rafael Guido (IFSC - USP), pela receptividade em todas as vezes que precisei utilizar o equipamento multiusuário de termoforese em microescala (MST). Aproveito para agradecer imensamente à minha amiga e pesquisadora Dr.<sup>a</sup> Nathalya Mesquita, por me auxiliar nos ensaios e análises dos dados de MST, bem como a dividir comigo as aventuras da maternidade na carreira

científica. Agradeço também à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kelly Ishida e ao Dr. Vinícius Barroso pelas contribuições na abordagem de FBDD deste trabalho, e no planejamento de experimentos para a continuação do presente trabalho.

Aos meus amigos Thaís, Daniel, Carla e Ingrid por sempre se fazerem presentes. Obrigada pelo apoio, pelas orações e pelo incentivo. Vocês são anjos em forma de pessoas.

Por fim, agradeço imensamente à minha família. À minha mãe, Edna, as palavras não são suficientes para exprimir o quão grata sou por tudo o que representa para mim. Além de meu maior exemplo de mulher, profissional e mãe, você é a maior incentivadora dos meus projetos. Obrigada por nunca duvidar, por sonhar os meus sonhos, mais até do que eu. Aliás, obrigada por me fazer acreditar que sonhos podem, sim, se tornar realidade. Ao meu namorado, Humberto, pelo apoio, principalmente nas questões matemáticas e na resolução dos meus problemas computacionais; pela torcida, mesmo quando significava que ficaríamos ainda mais distantes; pela compreensão, quando nossos passeios de final de semana eram substituídos por experimentos sem hora para acabar; e pela paciência. À minha filha, Lorena, por ressignificar o amor e a vida para mim. Por ser o meu combustível diário, minha motivação para seguir em frente e, um dia, poder ser seu exemplo. Pois, assim como em outras carreiras, a ciência pode muitas vezes parecer que não foi feita para mulheres; mas, nós mulheres fomos feitas para tudo aquilo o que desejamos ser.

*“A razão cardeal de toda superioridade humana é, sem dúvida, a vontade. O poder nasce do querer. Sempre que um homem aplica a veemência e a perseverante energia de sua alma a um fim, ele vencerá os obstáculos, e se não atingir o alvo, fará pelo menos coisas admiráveis”. (ALENCAR, 1998)*

## RESUMO

SILVA, C.S. **Bases estruturais do controle da elongação e da divisão celular em *Mycobacterium tuberculosis* e identificação de hits a fármacos baseada em triagem de fragmentos.** 2023. 158f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A tuberculose é considerada a infecção de maior letalidade mundial causada por um único agente infeccioso, o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Os crescentes casos de resistência e demais aspectos que compõem a atual carga global da tuberculose evidenciam a necessidade pela descoberta de fármacos e diferentes esquemas de tratamento. Os componentes dos complexos macromoleculares que controlam o crescimento e a divisão celular da micobactéria figuram como alvos interessantes na busca por novos agentes antituberculose. Propõe-se estudar o papel de interações proteína-proteína no controle do ciclo celular da micobactéria entre enzimas envolvidas na biossíntese de peptidoglicano. A hipótese é a de que a proteína de ligação à penicilina PonA1 e a peptidoglicano hidrolase RpfB competem pelo mesmo sítio de interação à endopeptidase RipA. Estas interações sugerem um mecanismo pós-traducional de regulação das atividades de síntese e hidrólise do peptidoglicano na micobactéria. Além disso, as enzimas RipA e PonA1 são alvos atrativos para o desenvolvimento de novos fármacos antituberculose por serem essenciais para o crescimento e divisão celular do bacilo, respectivamente. O estudo busca elucidar a estrutura tridimensional da conformação ativa da endopeptidase RipA e obter os complexos RipA:RpfB e RipA:PonA1. Este trabalho também visa aplicar a estratégia da descoberta de fármacos com base em fragmentos contra o domínio catalítico de RipA e realizar a triagem de compostos  $\beta$ -lactâmicos contra o domínio transpeptidase de PonA1. Por meio da produção de proteínas recombinantes e do emprego de técnicas biofísicas prosseguiu-se com o estudo das enzimas-alvo, bem como das interações proteína:proteína e proteína:ligante. O trabalho notou alterações estruturais na construção ativa de RipA, identificou 11 ligantes contra a endopeptidase e apresentou dados preliminares da interação RipA:RpfB. Este estudo conclui que a ativação proteolítica de RipA resulta em alterações conformacionais da enzima que podem levar à formação de uma estrutura quaternária, sugerindo uma nova hipótese para o controle da atividade enzimática de RipA. Este também é o primeiro trabalho que identificou moléculas com potencial para o desenvolvimento dos primeiros compostos líderes inibidores das enzimas Rip em micobactérias.

**Palavras-chave:** Biossíntese do peptidoglicano. Complexos macromoleculares. Descoberta de fármacos com base na estrutura. Tuberculose.

## ABSTRACT

SILVA, C.S. **Structural bases of the control of cellular elongation and cell division in *Mycobacterium tuberculosis* and identification of drug hits based on fragment screening.** 2023. 158p. Ph.D. Thesis (Microbiology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

Tuberculosis is the world's deadliest infection caused by a single infectious agent, the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*. The increasing in resistance and the current global burden of tuberculosis highlight the need for drug discovery and the search for novel treatment regimens. The components of macromolecular complexes in the control of cellular growth and division in mycobacteria have emerged as interesting targets for novel anti-tuberculosis agents. In this study, we propose to study the role of protein-protein interactions in the control of peptidoglycan biosynthesis during mycobacteria cell cycle. The hypothesis is that the penicillin-binding protein PonA1 and the peptidoglycan hydrolase RpfB compete for the same site of interaction with the endopeptidase RipA. These interactions suggest a post-translational mechanism regulating peptidoglycan synthesis and remodelling in mycobacteria. Furthermore, RipA and PonA1 are attractive targets for the development of new anti-tuberculosis drugs because they are essential for growth and cell separation, respectively. Thus, the study aims to elucidate the three-dimensional structure of the active conformation of RipA and also to obtain RipA:RpfB and RipA:PonA1 complexes. Moreover, in this work we also propose to apply the fragment-based drug discovery strategy against the catalytic domain of RipA and to screen  $\beta$ -lactam compounds against the transpeptidase domain of PonA1. Through the production of recombinant proteins and the use of biophysical techniques, the study of the target enzymes were performed, as well as the research on protein:protein and protein:ligand interactions. The work noted structural alterations in the active conformation of RipA and identified 11 ligands against the endopeptidase. We also presented preliminary data on RipA:RpfB interaction. This study concludes that proteolytic activation of RipA results in conformational alterations of the enzyme and may lead to the formation of a quaternary structure, suggesting a new hypothesis for the control of RipA enzymatic activity. This is also the first work that identified active molecules with potential for the development of the first leading-compounds inhibiting Rip enzymes from mycobacteria.

**Keywords:** Peptidoglycan biosynthesis. Macromolecular complexes. Drug-discovery based on structure. Tuberculosis.

## **PARTE I - INTRODUÇÃO**

## CAPÍTULO 1 - UMA BREVE HISTÓRIA DA TUBERCULOSE

### 1.1. Aspectos históricos e epidemiológicos da doença

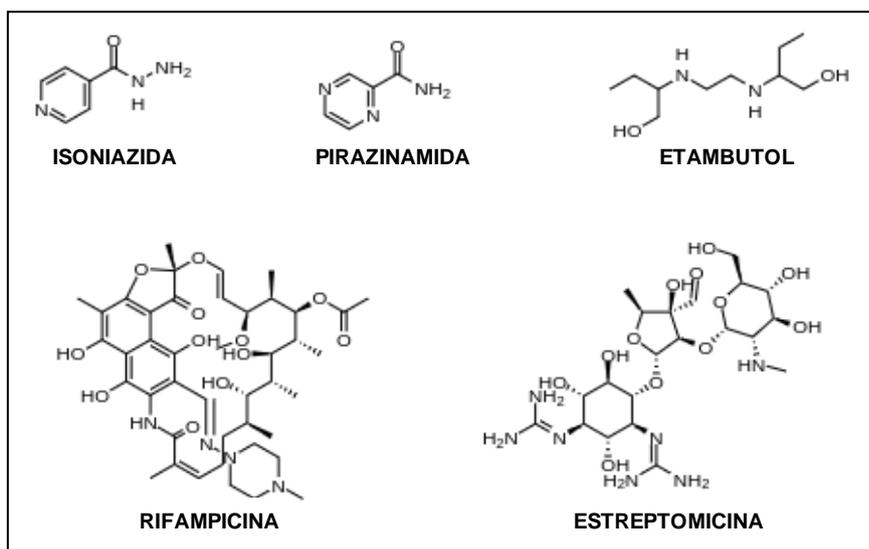
A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa que acomete a humanidade desde as primeiras civilizações. De acordo com registros arqueológicos, deformações na coluna vertebral características de um tipo de TB extrapulmonar (Mal de Pott) foram observadas em alguns exemplares de múmias egípcias, datadas de 2.400 a.C. (BERTOLLI FILHO, 2001, BARBERIS *et al.*, 2017). Outras evidências históricas, bem como análises moleculares, revelam a ocorrência de ciclos epidêmicos da Peste Branca (como era conhecida a TB no século XVIII) em várias civilizações da antiguidade, incluindo povos da Europa, África e Ásia (DANIEL, 2006; BARBERIS *et al.*, 2017).

Ao longo da história, diversas foram as representações da enfermidade e as concepções sobre sua origem. Tais explicações sobre a TB incorporaram os saberes religiosos, filosóficos, populares e científicos da época, e é possível perceber certa dicotomia entre as concepções. Ao mesmo tempo em que alguns associavam a TB a fatores hereditários e místicos, outros argumentavam em favor do caráter infeccioso da tísica, relacionando a doença, principalmente, ao contexto urbano-industrial. Contudo, ambas as vertentes atribuíam, de certa forma, um aspecto social à TB: ou delegando ao doente a culpa pelo seu estado enfermiço, ou atribuindo às condições de vida e trabalho das classes sociais menos favorecidas como fatores de predisposição ao “mal do peito” (GONÇALVES, 2000).

O caráter microbiológico da TB apenas ganhou destaque no final do século XIX. Em 1865, o médico Jean Antoine Villemin comprovou que a consunção era uma doença de natureza infecciosa e transmissível. Anos mais tarde, em 1882, Robert Koch identificou como o agente etiológico da infecção, o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Tais descobertas impulsionaram a busca por estratégias adequadas para prevenção, diagnóstico e tratamento da TB. Em 1907, Charles Mantoux desenvolveu a prova tuberculínica, um teste cutâneo intradérmico utilizado, ainda hoje, como um método auxiliar no diagnóstico da TB (NAYAK; ACHARJYA, 2012). Além disso, na década de 1920, Albert Calmette e Camille Guérin desenvolveram a vacina BCG (Bacilo de Calmette - Guérin), a partir de *Mycobacterium bovis*. Até hoje, a vacina BCG é a única estratégia de imunização

contra a TB e está incluída no calendário básico de vacinação de vários países, sob o incentivo da Organização Mundial da Saúde (OMS) (LUCA; MIHAESCU, 2013), pois previne a manifestação de formas graves da TB, principalmente em crianças. Mais tarde, no período da Segunda Guerra Mundial, o bioquímico Selman Waksman descobriu a atividade bactericida do antimicrobiano estreptomicina (Figura 1) sobre MTB, sendo esta a primeira quimioterapia específica para a TB. Porém, apesar dos resultados promissores, o uso de um único agente antituberculose resultou no rápido desenvolvimento de resistência do patógeno à estreptomicina, o que atestou a necessidade por novos antimicrobianos. Nos anos seguintes, compostos com diferentes mecanismos de ação foram descritos, como a isoniazida, pirazinamida, rifampicina, e o etambutol (Figura 1), possibilitando o seu uso combinado e a implementação de um regime terapêutico eficaz e vigente até os dias atuais (ZUMLA; NAHID; COLE, 2013).

**Figura 1** - Estrutura química dos primeiros fármacos antituberculose.



FONTE: Adptado de ROSSINI; DIAS, 2023.

Apesar do estabelecimento de um esquema de tratamento efetivo, a TB ainda possui um dos maiores índices mundiais de mortalidade. Até a pandemia de COVID-19, a TB era a principal causa de morte por um único agente infeccioso. Em 2021, segundo a OMS, cerca de 10,6 milhões de novos casos da doença foram diagnosticados, um aumento de 4,5 % se comparado ao número de casos em 2020 (10,1 milhões). Além disso, o número de óbitos notificados em 2021 (1,6 milhão)

também aumentou com relação aos anos anteriores (WHO, 2022). Esses dados evidenciaram uma reversão nos avanços alcançados nos últimos anos, um cenário que reflete os impactos negativos da pandemia de COVID-19 no combate à TB, devido às interrupções nos serviços de diagnóstico, notificação de casos e monitoramento dos pacientes neste período.

No Brasil, país que ocupa a 20ª posição entre os 22 países com maior incidência mundial da TB, o Ministério da Saúde registrou mais de 78 mil novos casos em 2022. Ainda, houve um aumento no número de óbitos registrados para o mesmo período (5.072 em 2022), fato que não era observado no país há duas décadas (BRASIL, 2023).

Além do estigma social que acompanha a doença, o presente cenário epidemiológico global apresenta três agravantes: o primeiro se constitui no fato de que quase 10% do total de casos de TB são coinfeções em indivíduos portadores do HIV, sendo esta a principal causa de morte em pacientes com HIV/AIDS (WHO, 2022); o segundo é que MTB tem a capacidade de transitar entre os estados metabólicos ativo e dormente em seu hospedeiro. Por isso, é estimado que cerca de um terço da população mundial esteja infectado pela forma latente do patógeno. Por conseguinte, o terceiro agravante é a emergência de cepas resistentes do bacilo, já identificadas em mais de 80 países (GLAZIOU *et al.*, 2014, PFYFFER, 2015), e com aumento na estimativa de casos de TB resistente entre os anos de 2020 e 2021 (WHO, 2022). Considerando tal panorama, vê-se que o controle da carga global de TB depende, em grande parte, da implementação de novas estratégias terapêuticas e de políticas públicas eficazes para o diagnóstico precoce e acompanhamento dos pacientes.

## **1.2. Mecanismo de transmissão**

A TB é transmitida via aerossóis (Figura 2). A partir da inalação de gotículas contendo células viáveis de MTB, o bacilo se aloja nos pulmões. Entretanto, a micobactéria pode afetar todos os órgãos e sistemas do corpo humano (SMITH, 2003), quando disseminada pelas vias broncogênica, linfática ou hematogênica (BERTOLLI FILHO, 2001, SMITH, 2003). Na TB pulmonar, o bacilo é fagocitado por macrófagos alveolares, após atingir o local da infecção (FORBES *et al.*, 2007). No ambiente intracelular, a micobactéria é retida em fagolisossomos, permanecendo

imersa em um microambiente hostil à sua sobrevivência (SMITH, 2003). A partir do recrutamento de leucócitos, na resposta pró-inflamatória, lesões nodulares são formadas (granulomas) no tecido pulmonar e auxiliam a conter a disseminação de MTB (KIESER; RUBIN, 2014). Estudos descrevem estas lesões como ambientes de elevada acidez e baixa disponibilidade de oxigênio, condições nas quais o bacilo é incapaz de se replicar, porém, pode permanecer em estado de latência durante décadas, delineando uma infecção de curso assintomático e não transmissível (SMITH, 2003). Portanto, a infecção pode seguir rumo a um quadro clínico sintomático, no qual a micobactéria encontra-se em estado metabolicamente ativo; ou, caso o patógeno não seja erradicado pelo sistema imunológico, tornar-se uma infecção crônica (GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012). Devido à existência de duas manifestações clínicas possíveis da doença, o regime terapêutico para a TB consiste no uso combinado de antimicrobianos, por tempo prolongado.

**Figura 2** - Representação esquemática da transmissão da tuberculose pulmonar.

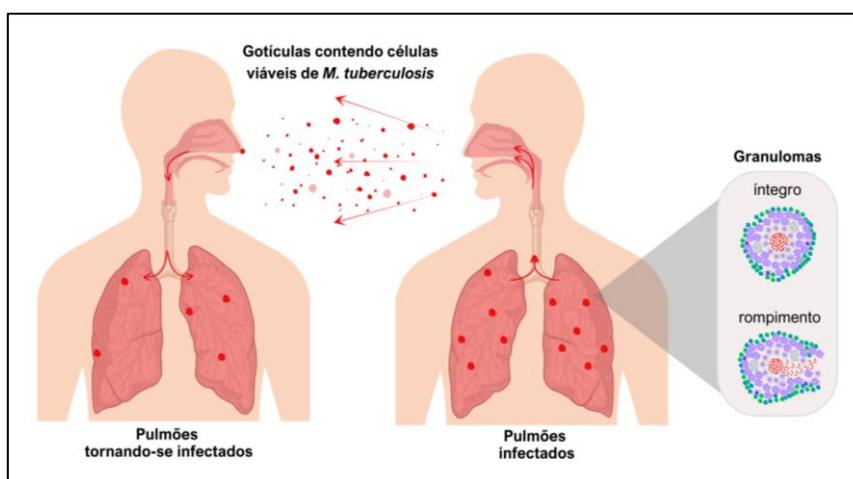


Imagem representativa da rota de transmissão da tuberculose pulmonar. Células viáveis de MTB podem ser transmitidas via aerossóis a partir de episódios de tosse, espirros ou durante a fala de um indivíduo infetado. Ao atingir o local da infecção, a disseminação do patógeno é contida por meio da formação de granulomas, lesões nodulares inflamatórias constituídas, principalmente, por macrófagos. A ruptura dos granulomas resulta na disseminação da bactéria para outras regiões do pulmão e para outros órgãos. FONTE: Elaborado pela própria autora.

### 1.3. Esquemas de tratamento e busca por novos fármacos

O rápido surgimento de resistência de MTB à estreptomicina evidenciou que, para uma estratégia terapêutica de sucesso, seria necessário adotar um regime combinado de fármacos para o tratamento da TB. Assim, na década de 1960,

estudos clínicos culminaram no estabelecimento de um regime padrão acessível e altamente eficaz, constituído por isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol (ZUMLA; NAHID; COLE, 2013). Ainda hoje, a terapia antituberculose se caracteriza pela combinação destes e de outros antimicrobianos. Na infecção ativa, o tratamento é realizado em duas etapas (Quadro 1). De início, o paciente é submetido a dois meses de terapia intensiva sob a administração dos antimicrobianos de primeira linha: isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. Depois, a quimioterapia passa a incluir apenas o uso de isoniazida e rifampicina, por um tempo adicional de quatro meses (ANTON *et al.*, 2019; BRASIL, 2023).

**Quadro 1** - Esquema básico de tratamento da tuberculose em adultos e adolescentes.

INFECÇÃO	ESQUEMA	PESO	DOSAGEM	DURAÇÃO
ATIVA	<b>RHZE</b> rifampicina 150 mg isoniazida 75 mg pirazinamida 400 mg etambutol 275 mg	20 a 35 kg	2 comp	2 meses fase intensiva
		36 a 50 kg	3 comp	
		51 a 70 kg	4 comp	
		Acima de 70 kg	5 comp	
	<b>RH</b> Dose plena (DP): rifampicina 300 mg/ isoniazida 150 mg  Meia dose (MD): rifampicina 150 mg/ isoniazida 75 mg	20 a 35 kg	1 comp DP <b>ou</b> 2 comp MD	4 meses fase de manutenção
		36 a 50 kg	1 comp DP + 1 comp MD <b>ou</b> 3 comp MD	
		51 a 70 kg	2 comp DP <b>ou</b> 4 comp MD	
		Acima de 70 kg	2 comp DP + 1 comp MD <b>ou</b> 5 comp MD	
LATENTE (ILTB)	<b>H</b>	5 a 10 mg/kg/dia até dose máxima de 300 mg/dia		6 a 9 meses
	<b>R</b>	10 mg/kg/dia até dose máxima de 600 mg/dia		4 meses
	<b>HP*</b>	Dose semanal: isoniazida 15 mg/kg (máximo 900 mg)/ rifapentina 900 mg ( > 50 kg)		3 meses

R - rifampicina, H - isoniazida, Z - pirazinamida, E - etambutol, P - rifapentina.

\*Novo esquema terapêutico para ILTB, implementado no Brasil em 2021.

Para o tratamento de tuberculose óssea ou tuberculose no sistema nervoso central o esquema é de 2 meses de fase intensiva + 10 meses de fase de manutenção).

FONTE: Adaptado de ANTON *et al.*, 2019 e BRASIL, 2023.

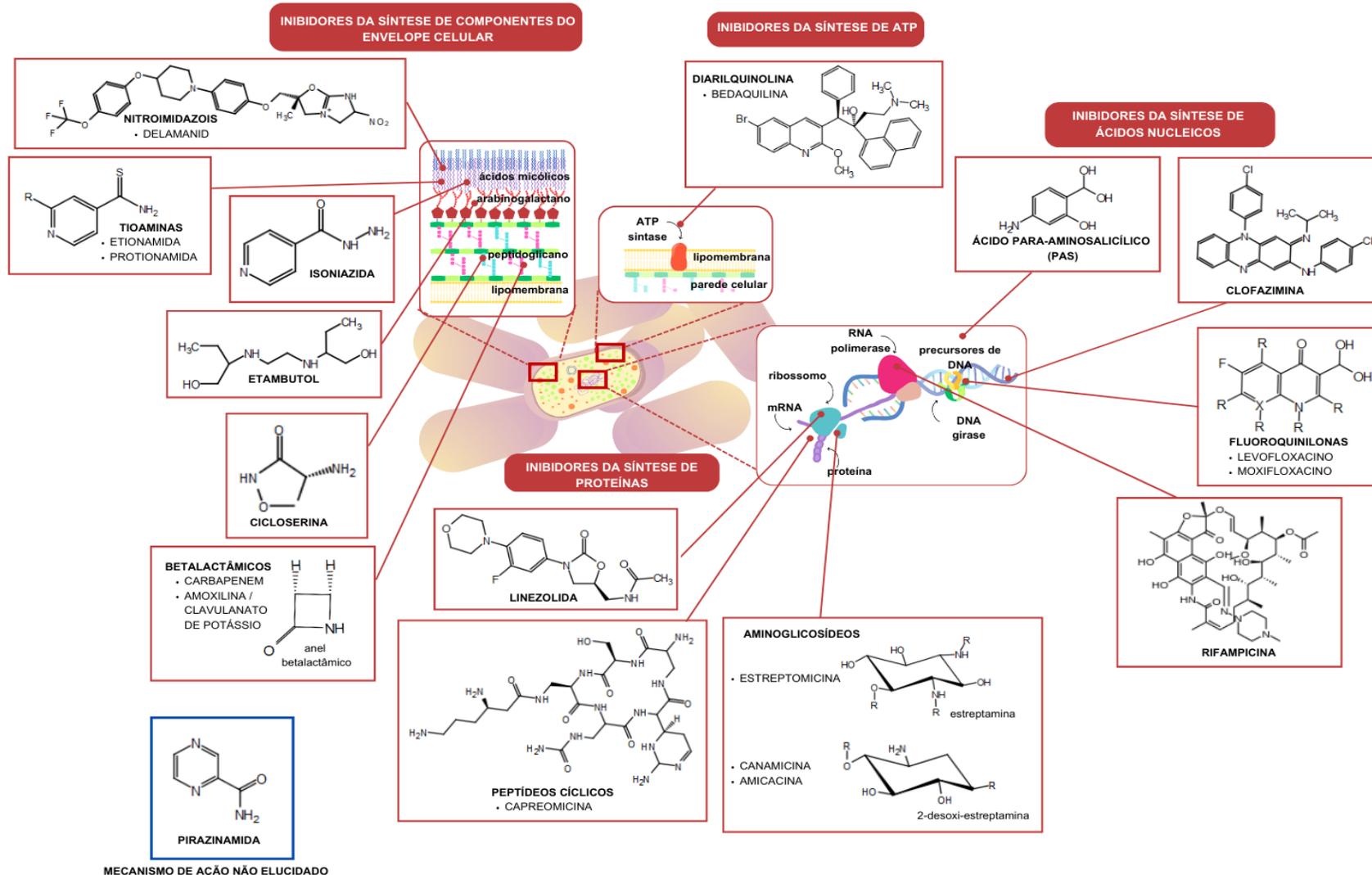
Além deste esquema de tratamento, outros fármacos podem ser empregados nos casos de resistência ou na impossibilidade de utilizar o esquema básico (Figura 3). Por exemplo, para o tratamento de pacientes portadores da TB drogarresistente (DR-TB), no Brasil, o Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) recomenda a adoção de esquemas terapêuticos constituídos por pelo menos quatro antimicrobianos, sendo eles: dois fármacos essenciais e dois fármacos de acompanhamento, de acordo com a classificação racional de fármacos antituberculose (BRASIL, 2019) (Quadro 2).

**Quadro 2** - Classificação racional de fármacos antituberculose.

CLASSIFICAÇÃO		ANTIMICROBIANOS
Fármacos de 1ª linha	GRUPO 1	<b>Essenciais</b> Isoniazida, rifampicina, pirazinamida
		<b>Acompanhante</b> Etambutol
Fármacos de 2ª linha	GRUPO 2 Fluoroquinolonas	<b>Essenciais</b> Levofloxacino (altas doses), moxifloxacino
	GRUPO 3 Injetáveis	<b>Essenciais</b> Estreptomicina, canamicina, ampicacina, capreomicina
	GRUPO 4 Menos eficazes	<b>Acompanhantes</b> Etionamida/protionamida, cicloserina/terizidona, ácido para-amino salicílico (PAS)
	GRUPO 5 Menor experiência clínica	<b>Essenciais</b> Linezolida, bedaquilina, delamanid
<b>Acompanhantes</b> Clofazimina, carbapenem, amoxicilina/clavulanato de potássio		

FONTE: Adaptado de Caminero e Scardigli, 2014, Rendon *et al.*, 2016 e Brasil, 2019.

**Figura 3 - Mecanismo de ação dos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose.**



FONTE: Elaborado pela própria autora.

Devido aos vários padrões de resistência existentes, são adotadas diferentes condutas terapêuticas dependendo do quadro clínico. Por isso, a TB drogarr resistente é classificada conforme a identificação fenotípica e genotípica dos isolados clínicos de MTB, podendo ser: *monorresistente*, quando há a resistência a um dos agentes antituberculose (exceto rifampicina); *polirresistente*, nos casos em que há resistência a dois ou mais fármacos antituberculose (exceto a associação rifampicina-isoniazida), *multirresistente*, quando os exames bacteriológicos identificam bacilos resistentes à rifampicina e isoniazida, *extensivamente resistente*, quando são detectados bacilos resistentes à rifampicina e isoniazida, a um fármaco da classe das fluoroquinolonas e a um injetável da segunda linha (capreomicina/amicacina); ou *rifampicina resistente*.

Considerando os crescentes casos de resistência e os demais aspectos que compõem a atual carga global de TB, novos fármacos e esquemas de tratamento se fazem necessários. Nas últimas décadas, a comunidade científica se viu motivada a buscar compostos com mecanismos de ação inovadores ou propor o reposicionamento de antimicrobianos no contexto da TB, como é o caso dos  $\beta$ -lactâmicos. Até o momento, apenas dois novos fármacos tiveram autorização para serem incluídos no regime de tratamento de pacientes adultos diagnosticados com TB multirresistente. Em 2012, a bedaquilina (diarilquinolona) teve seu uso aprovado (U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012); dois anos mais tarde, foi a vez do composto delamanid (nitroimidazol) receber a aprovação (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2014). Mesmo assim, ainda é necessário desenvolver novos agentes com potencial para combater o bacilo em seus estados ativo e latente, a fim de prevenir futuros surtos da doença e a emergência de cepas resistentes. Estudos envolvendo biologia estrutural e funcional de MTB têm contribuído com a identificação de possíveis alvos para o desenho de novos antimicrobianos, com destaque para as pesquisas cujo enfoque está na compreensão da dinâmica do ciclo celular do bacilo.

## CAPÍTULO 2 - O BACILO DE KOCH

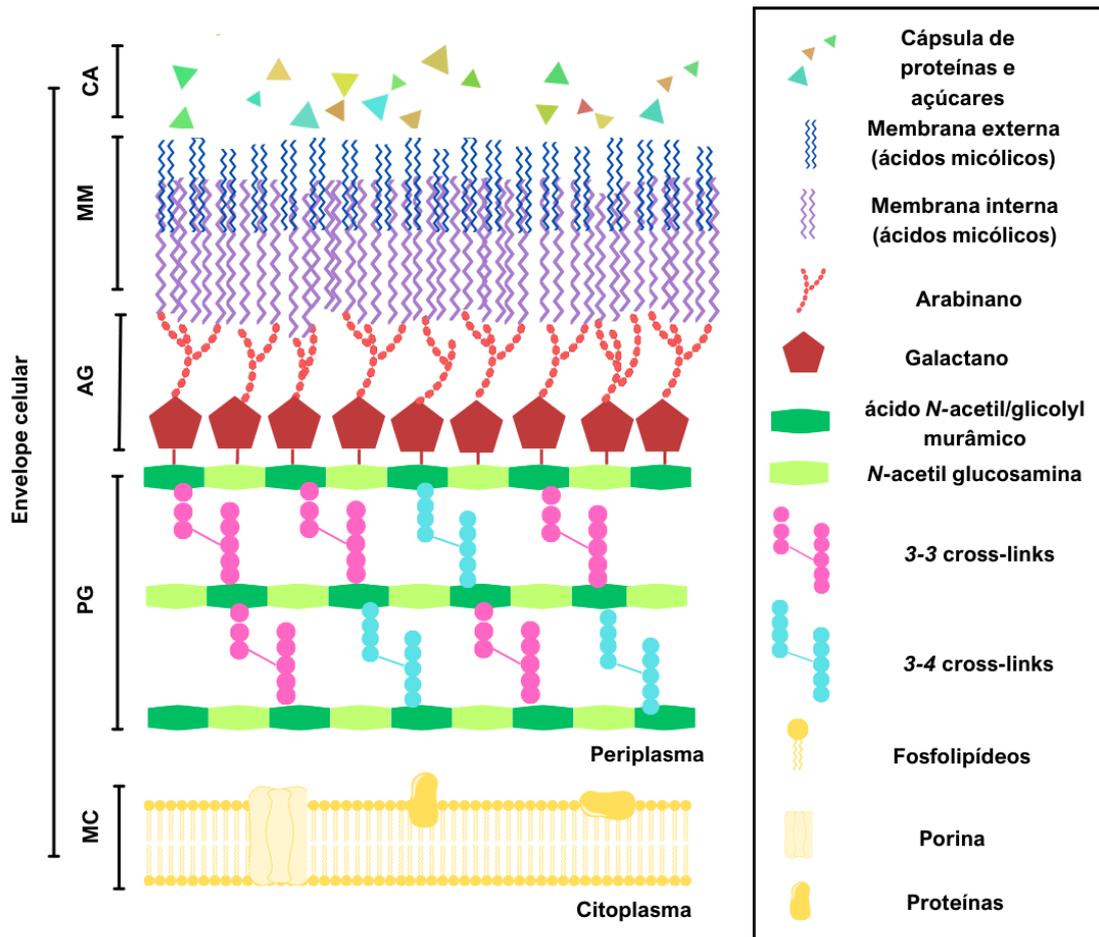
### 2.1. Introdução ao *Mycobacterium tuberculosis*

A maioria dos membros do gênero *Mycobacterium* são espécies não-patogênicas e de vida livre na natureza (GRANJE, 2009). No entanto, algumas micobactérias são patogênicas obrigatórias, inclusive, reconhecidas pela sua capacidade de causar infecções de alta morbidade e mortalidade em todo o mundo (COSMA; SHERMAN; RAMAKRISHNAN, 2003). Este é o caso da TB, uma das infecções bacterianas mais letais do mundo, que afeta principalmente os pulmões ou outros órgãos com alta oxigenação e é causada por MTB (WHO, 2022). Apelidado de bacilo de Koch, MTB é um patógeno intracelular e exclusivamente humano. Apresenta lento crescimento em cultura, metabolismo aeróbio e possui células de pequeno tamanho, ausentes de motilidade e não formadoras de esporos. É também classificado como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), devido aos ácidos micólicos associados à sua parede celular (KIESER; RUBIN, 2014).

As micobactérias são reconhecidas pela arquitetura única e complexa de seu envelope celular (Figura 4). A camada de peptidoglicano é formada por longos polímeros de unidades repetidas de ácido *N*-acetil glucosamina (NAG) e *N*-acetil/glicolil murâmico (NAM) conectadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e altamente reticuladas por ligações peptídicas compostas de L-alanil- $\gamma$ -D-isoglutamil-meso-diaminopimelil-D-alanina (RIMAL *et al.*, 2022, MAMADOU; MARRAKCHI, 2019). Curiosamente, nas cadeias laterais do peptidoglicano das micobactérias são mais abundantes as ligações cruzadas não-canônicas (3-3), sintetizadas pelas enzimas L,D-transpeptidases (LDTs), do que as ligações cruzadas tradicionais (4-3), formadas pelas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) (LAVOLLAY *et al.*, 2008, LAVOLLAY *et al.*, 2001, RIMAL *et al.*, 2022). As estruturas adicionais que circundam o peptidoglicano contribuem para a estrutura particular do envelope das micobactérias, e as diferenciam das bactérias gram-positivas e gram-negativas. Ancorada ao peptidoglicano, está uma camada de arabinogalactano, estrutura constituída por cadeias de galactanas e por arabinanas ramificadas. Estas estão covalentemente ligadas a uma membrana externa de ácidos micólicos de cadeia longa. Essa

“micomembrana”, por sua vez, é responsável pela natureza extremamente lipídica parede celular das micobactérias. Além disso, uma cápsula constituída de proteínas e polissacarídeos, também pode ser encontrada envolvendo a parede celular de espécies patogênicas (MAMADOU; MARRAKCHI, 2019, KIESER; RUBIN, 2014).

**Figura 4** - Representação esquemática do envelope celular de *M. tuberculosis*.



O envelope celular de MTB é composto por diferentes camadas de biomoléculas: acima da membrana celular (MC) estão as cadeias de peptidoglicano (PG), um polímero composto pelo dissacarídeo *N*-acetil-glucosamina e uma mistura dos dissacarídeos ácido *N*-glicolil-murâmico e ácido acetil-murâmico. Circundando a camada de peptidoglicano, dispõe-se o polissacarídeo arabinogalactano (AG), formado a partir dos açúcares galactano e arabinano. Logo após, são encontrados os ácidos micólicos (MM - micomembrana), que são ácidos graxos de cadeia longa, envolvidos por uma outra estrutura (cápsula, CA) constituída de polissacarídeos e proteínas. FONTE: Elaborado pela própria autora.

Ao contrário da maioria dos bacilos, as células de MTB tem crescimento polar e dividem de modo assimétrico. Essa dinâmica do ciclo celular resulta em células-filhas que diferem em tamanho, taxa de crescimento e composição de

seu envelope celular. A heterogeneidade fenotípica das populações de MTB facilita a sobrevivência do patógeno no hospedeiro e confere tolerância aos antimicrobianos (KIESER; RUBIN, 2014).

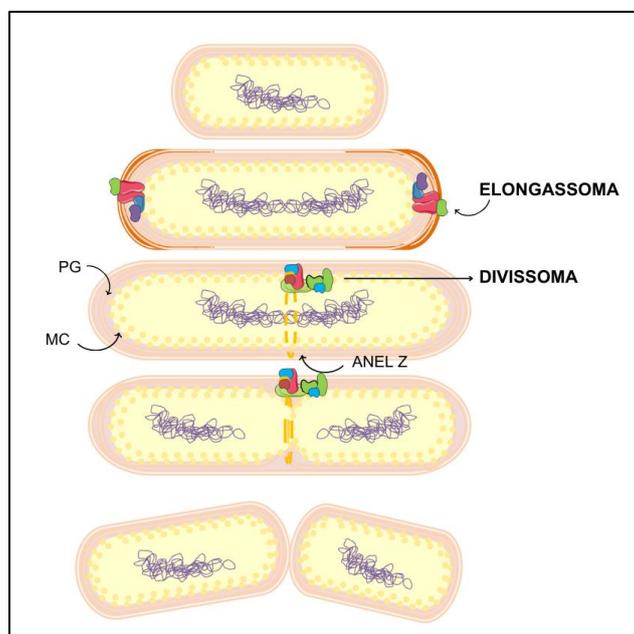
Os componentes da parede celular sofrem constante remodelamento durante o ciclo celular. Por conseguinte, o sincronismo entre os processos de hidrólise e síntese da parede celular é fundamental para a manutenção da forma e sobrevivência da bactéria, bem como para que haja a sua proliferação. Neste contexto, grandes complexos multiproteicos são responsáveis pelo controle do crescimento e da divisão celular (Figura 5). Contudo, os mecanismos que coordenam a atividade destes complexos em micobactérias permanecem elusivos (KIESER; RUBIN, 2014, KIESER *et al.*, 2015a).

O processo de crescimento celular é regulado pelo complexo do *elongassoma* (Figura 5), constituído por enzimas sintases e hidrolases de peptidoglicano e por fatores estruturais (KIESER; RUBIN, 2014). O correto posicionamento do *elongassoma* é assegurado por proteínas citoplasmáticas que o ancoram nos polos da célula. Em micobactérias, a proteína Wag31 ancora o *elongassoma* no polo de crescimento por meio do reconhecimento da curvatura da membrana celular, atuando como uma proteína homóloga de DivIVA de *Bacillus subtilis* (KIESER; RUBIN, 2014, KANG *et al.*, 2008, VIJAY *et al.*, 2014). Além disso, a localização de Wag31 no polo de crescimento é estabilizada pela interação com a proteína de membrana CwsA, envolvida na síntese de peptidoglicano (PLOCISNSKI *et al.*, 2012, KIESER; RUBIN, 2014). Os polímeros de Wag31 formam uma base para o recrutamento dos demais componentes do *elongassoma*, como as enzimas peptidoglicano sintases bifuncionais PonA1 e PonA2.

Após a elongação, o processo de divisão celular é iniciado a partir do deslocamento da síntese de peptidoglicano dos polos para a região central da célula, onde haverá a formação do septo de divisão. Os eventos que integram a divisão celular são coordenados pelo complexo do *divissoma* (Figura 5), que também contém proteínas estruturais e enzimas envolvidas na biossíntese e remodelagem do peptidoglicano (KIESER; RUBIN, 2014). Nas micobactérias, a região da célula em que o septo pode ser posicionado é muito mais ampla do que em outros organismos-modelo. Por conseguinte, as células-filhas das

micobactérias apresentam diferenças de tamanho entre si, contribuindo para a heterogeneidade populacional (KIESER; RUBIN, 2014).

**Figura 5** - Representação esquemática do crescimento e da divisão celular em *M. tuberculosis*.



Em MTB a alongação acontece nos polos da célula e é regulada por proteínas do complexo do elongassoma. A divisão celular é assimétrica, com a formação do septo de divisão posicionada pelo anel Z e coordenada por componentes do complexo do divissoma. MC - membrana celular, PG – peptidoglicano. FONTE: Elaborado pela própria autora.

A formação do septo, assim como em outras linhagens bacterianas, acontece a partir da auto-associação da GTPase FtsZ em uma estrutura em forma de anel. O anel Z determina o local da septação e funciona como base para o recrutamento dos outros componentes do divissoma. Portanto, a formação do septo de divisão é coordenada por diversos fatores que modulam a polimerização de FtsZ e a localização do anel Z. Neste aspecto, outra característica particular das micobactérias é a fosforilação de FtsZ pela ação da serina/treonina quinase PknA, que reduz a atividade de hidrólise de GTP pela FtsZ e, conseqüentemente, a habilidade de auto-polimerização (THAKUR; CHAKRABORTI, 2006).

Após a formação do anel Z, outros componentes do divissoma se reúnem para a formação do septo e separação das células-filhas. O peptidoglicano do septo de divisão é sintetizado pelas proteínas ligadoras de penicilina monofuncionais PBPA e PBPB, e pela sintase bifuncional PonA1. Na

separação das células-filhas, a maioria das bactérias apresentam peptidoglicano hidrolases de função redundante. Em contrapartida, nas micobactérias, pelo menos a endopeptidase RipA (*Rpf-interacting Protein*) é essencial neste processo. Outras proteínas que também podem estar envolvidas na divisão celular são as hidrolases à família dos fatores promotores da reativação celular (Rpf - *Resuscitation Promoting Factors*) (MUKAMOLOVA *et al.*, 2002, ROSSER *et al.*, 2017). Adicionalmente, experimentos de duplo híbrido e coprecipitação identificaram a interação entre o fator RpfB e RipA (HETT *et al.*, 2007). RipA e RpfB co-localizam-se no septo de divisão e atuam de modo sinérgico na hidrólise do septo de divisão (HETT *et al.*, 2008). Contudo, ainda não existem dados estruturais desta interação, e muitas questões sobre o mecanismo por elas controlado precisam ser elucidadas.

Além disso, estudos têm proposto a existência de um mecanismo pós-traducional que coordena os processos de hidrólise e de síntese do peptidoglicano por meio de interações entre proteínas antagonistas. Hett, Chao e Rubin (2010) descobriram que a ação sinérgica do complexo RipA:RpfB, em favor da divisão celular, é inibida pela interação entre as proteínas antagonistas RipA e PonA1. Desta maneira, a remodelagem do peptidoglicano, tanto na reativação de MTB como ao longo de todo o ciclo normal de alongação e divisão celular, é provavelmente regulada por um mecanismo interposto pela competição entre as proteínas PonA1 e RpfB para interagir com RipA. Tal hipótese foi corroborada por resultados de coprecipitação e ensaios enzimáticos, os quais indicam que a região carboxi-terminal de PonA1 (domínio transpeptidase), e o domínio catalítico de RpfB interagem com resíduos do domínio catalítico de RipA. Entretanto, não há qualquer estudo que demonstre como são estabelecidas as interações entre RipA:PonA1 e RipA:RpfB.

## **2.2. Fatores que controlam o crescimento e a divisão celular e seu potencial para o desenvolvimento de novos antimicrobianos**

### **2.2.1. Penicillin-binding protein A1 (PonA1)**

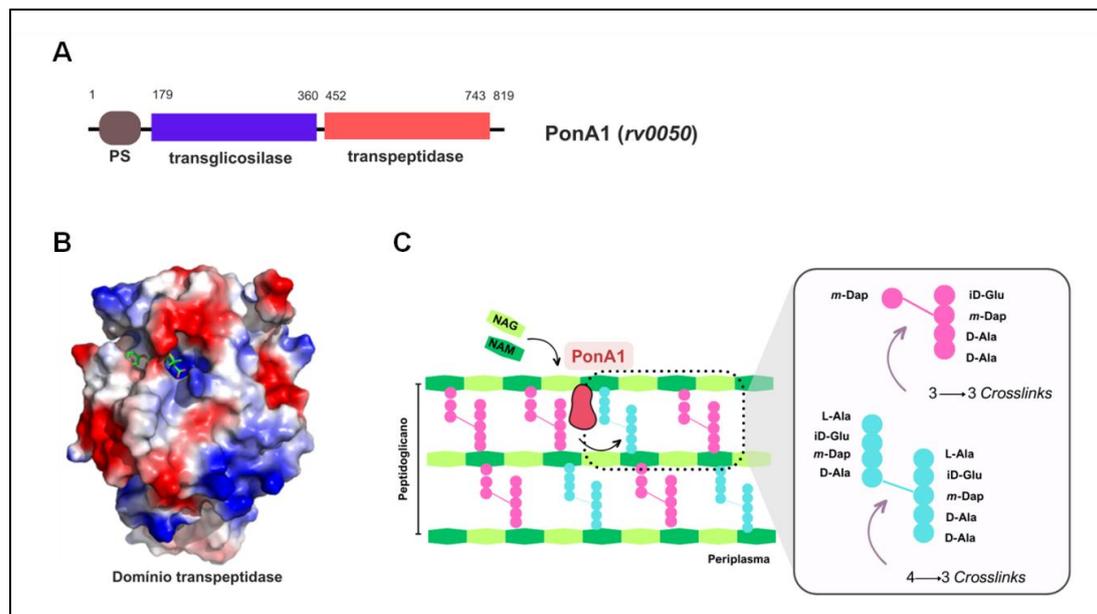
Durante a alongação, uma nova parede celular é sintetizada pela inserção de unidades de peptidoglicano à estrutura preexistente. Neste

processo, são protagonistas as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), que atuam como transpeptidases ao catalisar as ligações-cruzadas entre as cadeias de glicanas (MADIGAN *et al.*, 2010). Em MTB, as proteínas PonA1 e PonA2 são PBPs de alta massa molecular que, apesar de homólogas, apresentam funções biológicas não-redundantes (BHAKTA; BASU, 2002). Kieser e colaboradores (2015b) descobriram que a enzima PonA1 é central no crescimento celular, tendo influência na determinação do tamanho da célula e no início do novo ciclo de alongação. Em experimentos *in vivo*, os pesquisadores demonstraram que a deleção de *ponA1* diminui a proliferação do patógeno nos pulmões, assim como impede a disseminação da infecção em camundongos, comprometendo, portanto, o *fitness* de MTB. Além disso, sendo uma PBP de alta massa molecular, PonA1 é bifuncional e, assim, apresenta, além do domínio catalítico transpeptidase, um domínio de transglicosilação. Logo, a PonA1 está envolvida na catálise das duas reações necessárias para a síntese do peptidoglicano (KIESER *et al.*, 2015b). Além disso, PonA1 possui uma região citoplasmática contendo o peptídeo sinal e que é substrato da seria/treonina quinase PknB. Segundo Kieser e colaboradores, a fosforilação de PonA1 não está relacionada ao ancoramento da enzima nos complexos do elongassoma ou divisssoma celular, nem é requerida para as atividades enzimáticas da peptidoglicano sintase. Porém, tal modificação pós-traducional está envolvida no controle da taxa de alongação por meio da modulação da atividade de transglicosilação de PonA1.

O domínio transglicosilase de PonA1 realiza a catálise da ligação entre o NAM do sáculo do peptidoglicano e o *N* acetil-glucosamina NAG do lipídeo II. Entretanto, uma vez que a biologia estrutural do domínio transglisossilase ainda não foi resolvida, seu exato mecanismo de ação e de regulação ainda precisa ser investigado. Em contrapartida, a estrutura do domínio transpeptidase de PonA1 foi determinada tanto em sua forma livre como em complexo com a penicilina V. Esta estrutura promoveu um ponto de partida para o desenvolvimento de novos inibidores para o tratamento da TB, pois permitiu a caracterização estrutural do mecanismo de ligação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos à esta classe de enzimas (FILIPPOVA *et al.*, 2016) (Figura 6). Embora seja bem relatado que MTB é um resistente inato à maioria dos  $\beta$ -lactâmicos, em virtude da presença da  $\beta$ -lactamase cromossomal BlaC

(FLORES *et al.*, 2005), a adoção de estratégias para a identificação de pequenas moléculas, ou fragmentos, pode levar à descoberta de compostos inibidores de PBPs e contribuir para um avanço considerável na descoberta de fármacos contra a TB.

**Figura 6** - Composição de domínios e função de PonA1.



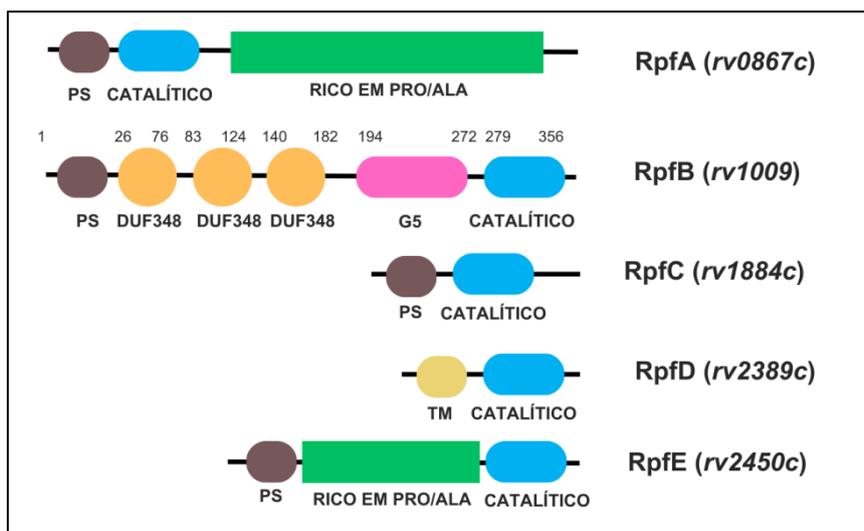
(A) Organização dos dois domínios funcionais de PonA1. (B) Superfície eletrostática do domínio transpeptidase de PonA1, o único que possui sua estrutura tridimensional resolvida. Em verde é mostrada a penicilina V ligada ao sítio ativo do domínio transpeptidase. (C) Representação esquemática do mecanismo de ação de PonA1, uma PBP bifuncional, capaz de catalisar as duas reações necessárias para a síntese de peptidoglicano: transglicosilação e transpeptidação das ligações cruzadas 3-3. PS – peptídeo sinal. FONTE: adaptado de FILLIPOVA *et al.*, 2016.

### 2.2.2. *Ressuscitation-promoting factor B (RpfB)*

Os fatores promotores da reativação celular (Rpf) são enzimas secretadas, originalmente identificadas em *Micrococcus luteus*, e que, como o nome sugere, promovem a reativação de bactérias viáveis em estado não-replicativo (ZHU; PLIKAYTIS; SHINNICK, 2003). No genoma de MTB existem cinco sequências codificadoras de proteínas homólogas de Rpf (MUKAMOLOVA, *et al.*, 2002) (Figura 7). Os genes *rpfA-E* são redundantes e individualmente dispensáveis para o crescimento celular, embora acredita-se que há certa especialização entre eles. Por exemplo, apenas *rpfB* se mostrou essencial para a propagação microbiana em situações de estresse

(RUGGIERO *et al.*, 2008). Mesmo assim, embora RpfB seja essencial para a reativação de MTB em modelos animais, Hett e colaboradores (2008) demonstraram que a deleção de *rpfB* não afeta nem a morfologia nem o *fitness* do bacilo *in vitro*.

**Figura 7** - Organização de domínios das proteínas Rpf de *M. tuberculosis*.

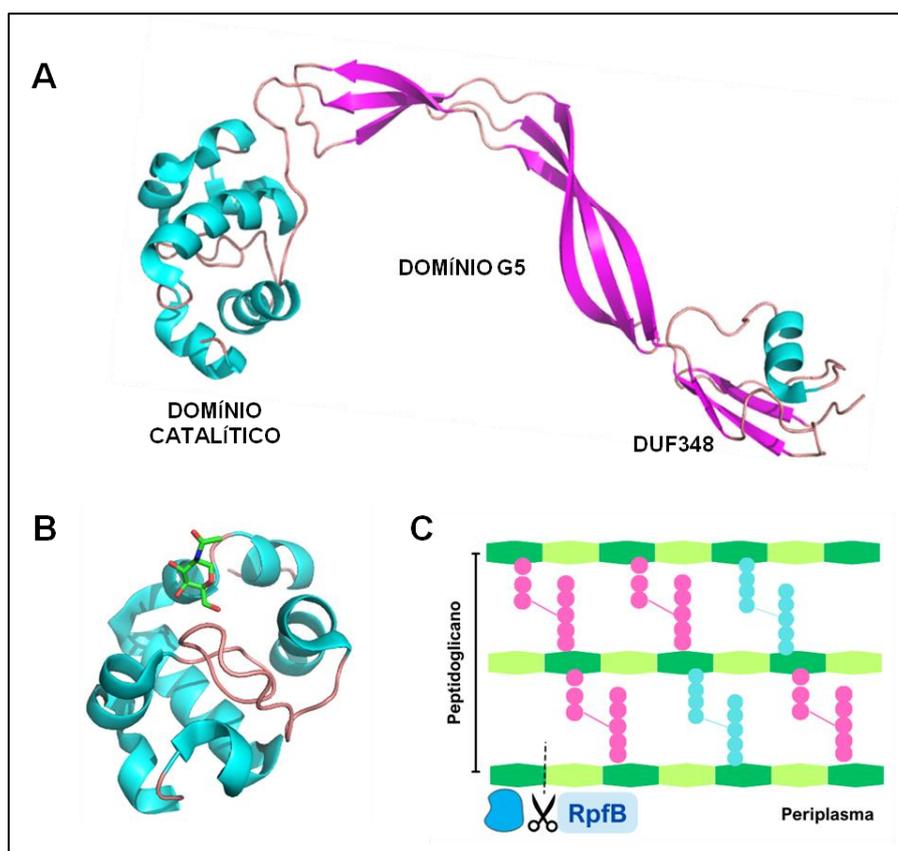


PS – peptídeo sinal, TM – transmembrana, PRO – prolina, ALA – alanina. FONTE: Adaptado de KAPRELYANTS *et al.*, 2012.

O fator RpfB é uma proteína solúvel e de alta complexidade estrutural comparado às demais enzimas da família (Figuras 7) (RUGGIERO *et al.*, 2008). Possui um domínio G5 cujo enovelamento é único para esta classe de enzimas, sendo constituído por duas folhas- $\beta$  conectadas por um pequeno motivo de três  $\alpha$ -hélices, o que é próprio de proteínas adesivas. Esta característica pode estar relacionada à adesão da proteína ao peptidoglicano, conforme sugere a estrutura truncada de RpfB obtida por Ruggiero e colaboradores (2013) (Figura 8A). Isto corrobora o fato de que RpfB é responsável pela hidrólise das ligações glicosídicas entre NAG e o NAM que compõem o peptidoglicano (Figura 8C). Squeglia e colaboradores (2013) obtiveram a estrutura do domínio catalítico de RpfB, à alta resolução (1,3 Å), na presença de NAG, evidenciando o modo de interação de componentes do peptidoglicano à enzima (Figura 8B). O domínio catalítico apresenta formato globular e é considerado como um híbrido compacto de duas classes de peptidoglicano hidrolases. Isto, pois, apresenta estrutura semelhante à das lisozimas do tipo C, com seis  $\alpha$ -hélices e uma folha- $\beta$  composta por três fitas;

mas, é funcionalmente semelhante às transglicosilases líticas Slt (*soluble lytic transglycosilases*), onde o grupo 4-hidroxil do NAG estabelece uma ligação de hidrogênio com um resíduo de treonina (Thr<sub>315</sub>). Embora o mecanismo de ação de RpfB ainda não seja completamente elucidado, sabe-se que a catálise acontece pela formação de um íon oxocarbênio e não pela formação de um intermediário covalente. Além disso, o único resíduo indispensável para a catálise é um glutamato (Glu<sub>292</sub>), o qual é mantido na correta conformação por uma molécula de água. O fator RpfB ainda possui três domínios DUF348, sendo que apenas um deles teve sua estrutura determinada, a qual revelou um enovelamento similar ao das proteínas ubiquitinas e, por isso, foi nomeado UBL<sub>G5</sub>.

**Figura 8** – Estrutura truncada e função de RpfB.



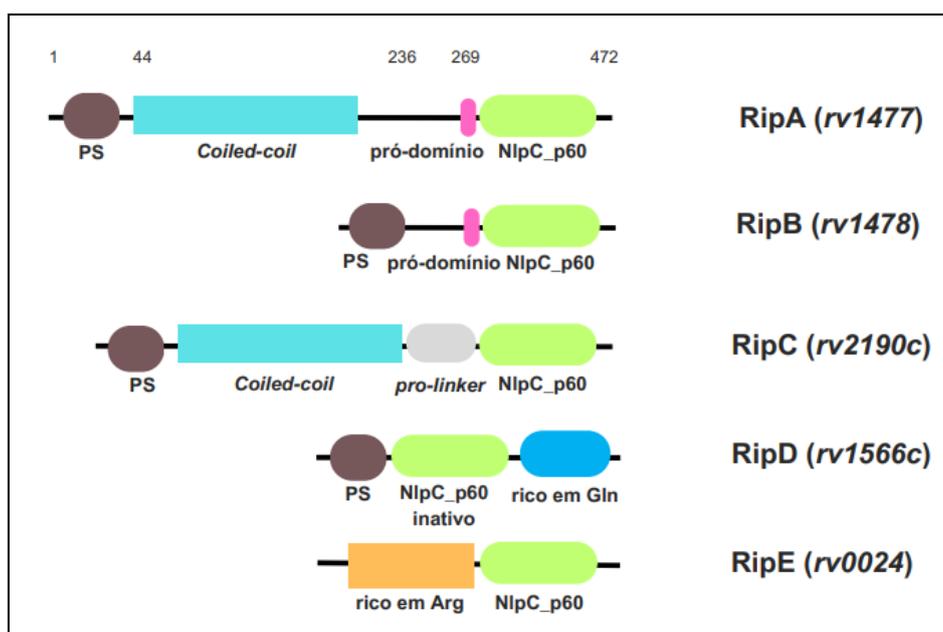
RpfB é composta pelos domínios catalítico (semelhante à lisozima), G5, DUF348/UBL<sub>G5</sub> (estruturalmente similar à ubiquitina), e outros dois domínios de função desconhecida (DUF348). Os domínios catalítico, G5 e um DUF348 estão representados em (A), enquanto a imagem (B) mostra a estrutura do domínio catalítico de RpfB, evidenciando a interação da enzima com N-acetilglucosamina. (C) Representação esquemática da atividade de transglicosilase lítica de RpfB.

Fonte: Adaptado de RUGGIERO et al. 2013; SQUEGLIA et al., 2013.

### 2.2.3. Rpf-interacting protein A (RipA)

A proteína de interação ao Rpf (RipA) é uma das cinco enzimas da família NlpC\_p60 no genoma de MTB (Figura 9). Inicialmente descrita como parceira de ligação para a glicosidase RpfB (HETT *et al.*, 2007, HETT *et al.*, 2008), a endopeptidase RipA passou de coadjuvante no processo de reativação de células em dormência para se tornar uma das enzimas mais intrigantes de MTB, devido aos seus múltiplos papéis na regulação da divisão celular, na virulência e na patogenicidade do bacilo (HEALY; GOUZY; EHRT, 2020). RipA funciona como uma D,L endopeptidase, com sítio de clivagem entre os resíduos de D-glutamato e *meso*-diaminopimelato (m-DAP) do pentapeptídeo (GAO *et al.*, 2006, HETT *et al.*, 2008, BÖTH; SCHNEIDER; SCHNELL, 2011), e tem papel essencial na separação das células-filhas em micobactérias. Foi demonstrado que a deleção do ortólogo de *ripA* em *M. smegmatis* impede o crescimento vegetativo da bactéria e resulta em um fenótipo de células alongadas e multi-septadas, já em MTB, esta deleção também resulta no aumento da suscetibilidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (HETT *et al.*, 2008, HEALY; GOUZY; EHRT, 2020).

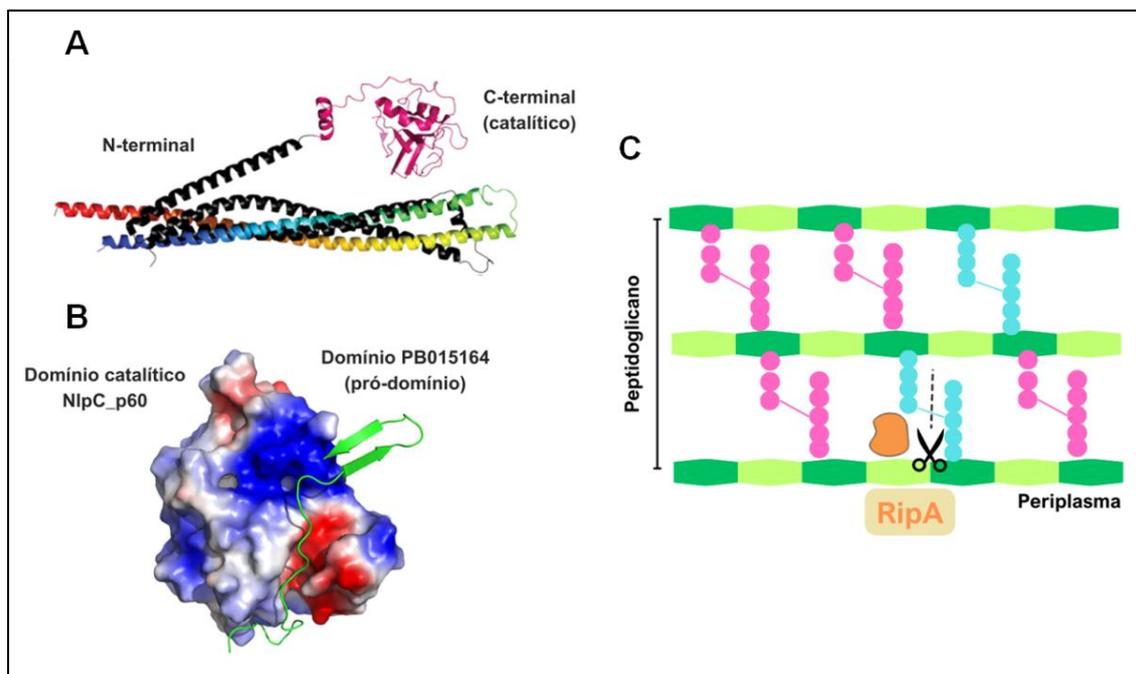
**Figura 9** - Organização de domínios das proteínas Rip de *M. tuberculosis*.



PS – peptídeo sinal, Gln – glutamina, Arg – arginina. FONTE: Adaptado de SQUEGLIA *et al.*, 2019.

A arquitetura geral de RipA consiste em um peptídeo de sinal, um domínio amino-terminal não-catalítico e uma região carboxi-terminal contendo um pró-domínio e o domínio catalítico do tipo NlpC\_p60 (Figuras 9 e 10). Este último é altamente conservado em várias linhagens de bactérias e comumente relacionado à atividade de peptidase da parede celular na citocinese (RUGGIERO *et al.*, 2010; STEINER *et al.*, 2018, ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). O domínio catalítico possui organização  $\alpha+\beta$ , com seis  $\alpha$ -hélices em torno de uma folha- $\beta$  central contendo seis fitas antiparalelas e por uma pequena folha- $\beta$  formada por duas fitas (RUGGIERO *et al.*, 2010, SQUEGLIA *et al.*, 2019) □

**Figura 10** - Estrutura e função de RipA.



(A) Modelo da estrutura de RipA contendo o domínio não-estrutural *coiled-coil* e o domínio catalítico NlpC\_p60. (B) Representação da superfície eletrostática do domínio catalítico de RipA, com a fenda catalítica bloqueada pela alça de inativação (pró-domínio), representado em *cartoon* verde. (C) Representação esquemática da atividade de endopeptidase de RipA. FONTE: Adaptado de SQUEGLIA *et al.*, 2019 e BÖTH *et al.*, 2011.

Como esperado, o motivo Asp-Cys-Ser-Gly (DCSG) necessário para a atividade de peptidoglicano hidrolase de NlpC\_p60 está presente na sequência primária de RipA (GAO *et al.*, 2006, ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003) □ No entanto, a enzima também requer um motivo RGD para sua função. O tripeptídeo Arg-Gly-Asp (RGD) é reconhecido por intermediar a adesão celular

pelo reconhecimento do receptor de integrina, localizado na superfície da célula hospedeira (D'SOUZA; GINSBERG; PLOW, 1991, RUOSLAHTI, 1996) □ permitindo a captação do patógeno (SCIBELLI *et al.*, 2007) □ Estudos prévios mostraram que mutações nas sequências RGD e DCSG em lipA, um ortólogo RipA em *M. marinum*, resultam em células de formato anormal e impedem que as bactérias invadam o macrófago, sugerindo que esses dois motivos são necessários tanto para a atividade da peptidase quanto para a invasão das células hospedeiras (GAO *et al.*, 2006). Apesar de ter um domínio catalítico do tipo NlpC\_p60, a tríade catalítica de RipA (Cys<sub>383</sub>-His<sub>432</sub>-Glu<sub>444</sub>) assemelha-se à das proteínas contendo o domínio CHAP (amidases/peptidases dependentes de cisteína e histidina, tríade catalítica Cys-His-Asp) (RUGGIERO *et al.*, 2010, BATEMAN; RAWLINGS, 2003). Essas proteínas são uma classe de autolisinas em que a atividade ocorre mediante um mecanismo de ataque nucleofílico da cisteína (BATEMAN; RAWLINGS, 2003) □ De fato, a estrutura cristalográfica conhecida de RipA sugere a formação de um tiolato como nucleófilo após a polarização do grupo tiol da cisteína catalítica pelo imidazol da histidina catalítica.

As hidrolases de peptidoglicano são reconhecidas por estarem sob rigorosa regulação a fim de cumprirem seu papel no ciclo celular sem se tornarem autolisinas potencialmente letais. Portanto, várias etapas pós-traducionais e de processamento estão envolvidas no controle da atividade de RipA. Dois grupos de pesquisa determinaram, simultaneamente, as estruturas do domínio catalítico e do pró-domínio, revelando que este último bloqueia fisicamente a fenda catalítica, inativando o domínio NlpC\_p60 (Figura 10B) (BÖTH *et al.*, 2011; RUGGIERO *et al.*, 2010). Esta alça de bloqueio é constituída por um  $\beta$ -hairpin exposto ao solvente e uma longa  $\alpha$ -hélice anfipática que interage com a fenda catalítica através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Dados cinéticos e biofísicos revelaram que o pró-domínio não é necessário para o enovelamento e nem para a atividade da RipA (RUGGIERO *et al.*, 2010). Portanto, acredita-se que RipA seja produzida como um zimogênio e requer a hidrólise do pró-domínio para a sua ativação (RUGGIERO *et al.*, 2010). É importante ressaltar que a enzima responsável pela ativação proteolítica de RipA, bem como o local exato de clivagem para a liberação da alça de inativação permanecem desconhecidos. Além disso, a

estrutura tridimensional disponível do domínio catalítico de RipA é a de sua forma zimogênica, portanto, inativa. Deste modo, as alterações conformacionais que ocorrem após o processamento da enzima e que podem estar relacionadas à sua estrutura funcional precisam ser investigadas.

O papel do domínio N-terminal na regulação da atividade RipA também é uma questão de debate. Primeiro, foi sugerido que o N-terminal participava da ativação de RipA, sendo clivado por MarP, uma cisteína protease associada à membrana, em condições de estresse ácido (BOTELLA *et al.*, 2017). No entanto, de acordo com o trabalho de Steiner colaboradores (2018), esse domínio não-catalítico estaria mais relacionado ao posicionamento de RipA dentro do divisssoma do que ao controle da atividade enzimática, já que a ausência dessa região não teve influência na acessibilidade do sítio catalítico. De fato, este módulo se assemelha a uma longa haste de duas  $\alpha$ -hélices, como uma estrutura de bobina enrolada, e posiciona a região catalítica RipA em direção ao local de degradação de peptidoglicano.

Recentemente, um mecanismo mais complexo para a ativação da endopeptidase foi proposto para um homólogo de RipA, a enzima Cg1735 de *Corynebacterium glutamicum*. De acordo com o estudo, tanto a proteólise quanto as interações proteína-proteína regulariam a ativação de RipA, em diferentes circunstâncias. Em pH neutro, Cg1735 seria ativado por um complexo de proteína transmembrana a partir da detecção de um sinal do divisssoma, enquanto que a ativação proteolítica por meio do processamento pelo ortólogo de MarP ocorreria em um ambiente ácido (GADAY *et al.*, 2022).

## **CAPÍTULO 3 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

### **3.1. Justificativa do estudo**

A determinação da biologia estrutural de interações proteína-proteína, como entre RipA e suas parceiras RpfB e PonA1, pode contribuir para a elucidação de mecanismos pós-traducionais de regulação da biossíntese da parede celular de MTB durante os eventos de crescimento e divisão celular. Somado a isto, por serem essenciais à viabilidade, ao crescimento e citocinese, principalmente PonA1 e RipA, ou por contribuírem para o aumento da susceptibilidade a outros antibióticos, essas enzimas são alvos atrativos para o desenvolvimento de novos fármacos contra a TB. Neste contexto, o emprego da estratégia da Descoberta de Fármacos com Base em Fragmentos (FBDD, do inglês, *Fragment-Based Drug Discovery*) contra estas proteínas pode ser justificado pela presença de duas características próprias deste sistema: primeiramente, essas enzimas são exportadas/secretadas e, portanto, os inibidores não precisariam cruzar a membrana para atuarem; além disso, mesmo o bloqueio das interações proteína-proteína já poderia levar a uma desregulação da divisão celular, o que inevitavelmente levaria a uma atenuação da bactéria. Até o momento, não há qualquer estudo na literatura que vise a bioprospecção de novos inibidores para estas enzimas, apesar de serem potenciais alvos para o desenvolvimento de agentes antituberculose.

### **3.2. Objetivos do estudo**

#### *3.2.1. Objetivos Gerais*

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo estudar a biologia estrutural da conformação ativa de RipA e obter o seu complexo com as parceiras RpfB e PonA1 a fim de entender o mecanismo de ação desta endopeptidase e o papel das interações proteína-proteína na regulação da divisão celular em MTB. E, em paralelo, identificar as primeiras moléculas ativas inibidoras das etapas de biossíntese de peptidoglicano que são reguladas por este sistema de proteínas.

### 3.2.2. *Objetivos Específicos*

- Obter as construções dos domínios catalíticos de RipA, RpfB e PonA1 em sua forma solúvel;
- Realizar estudos de cinéticos para o domínio transpeptidase de PonA1 e de enzimas ortólogas;
- Realizar a triagem de compostos  $\beta$ -lactâmicos contra o domínio transpeptidase de PonA1;
- Caracterizar as interações entre os inibidores  $\beta$ -lactâmicos e o domínio transpeptidase de PonA1 e enzimas ortólogas;
- Investigar as alterações conformacionais e a formação de oligômeros de RipA em sua forma ativa;
- Obter dados estruturais da conformação ativa de RipA;
- Realizar a triagem da Biblioteca de Fragmentos contra o domínio catalítico ativo de RipA;
- Determinar os parâmetros de ligação entre RipA e seus ligantes;
- Co-purificar os complexos RipA:RpfB e RipA:PonA1;
- Obter dados estruturais dos complexos RipA:RpfB e RipA:PonA1.

## **PARTE III - CONCLUSÃO**

## CAPÍTULO 9 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 9.1. Conclusão

Como apresentado ao longo deste trabalho, conseguimos estabelecer o protocolo para a produção dos três domínios de interesse: RipA<sub>332-472</sub>, RpfB<sub>280-362</sub> e PonA<sub>1452-743</sub>. Entretanto, devido aos desafios encontrados ao longo do projeto, optamos por direcionar nossos esforços à frente de estudo mais relacionada à área de química medicinal, com a busca por inibidores enzimáticos pela abordagem FBDD. Neste âmbito, atingimos um dos objetivos propostos para este trabalho, no qual identificamos as primeiras moléculas líderes para o desenvolvimento de fármacos baseado em FBDD contra o domínio catalítico de RipA. De nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que apresenta moléculas com potencial para a inibição de uma das principais enzimas envolvidas nos processos de divisão celular e patogênese em MTB. O presente trabalho também foi dedicado ao estudo da biologia estrutural do domínio catalítico de RipA. Com base em todos os resultados obtidos nos ensaios biofísicos da enzima, concluímos que RipA<sub>332-472</sub> tem tendência à oligomerização, uma característica ainda não reportada para esta construção. Por isso, lançamos a hipótese de que a produção de RipA como um zimogênio consiste em uma etapa de regulação da sua atividade hidrolítica, não apenas por bloquear a fenda catalítica, mas, porque mantêm a estrutura do domínio catalítico em uma conformação mais compacta. A remoção da alça de inativação permite que a RipA ativa assuma uma conformação mais flexível e permite sua dimerização. Análises adicionais são necessárias para testar esta hipótese e investigar como a dimerização está envolvida no mecanismo de ação de RipA e, possivelmente, na interação com suas parceiras. Assim, esse trabalho torna-se somente o início de uma série de investigações para esclarecer a estrutura, função, mecanismo e controle em que as três proteínas alvo deste estudo fazem parte.

## 9.2. Limitações e perspectivas

Uma das principais características deste trabalho foi o perfil desafiador dos alvos. Desenhamos o projeto com duas principais frentes de estudo em pesquisa básica, voltadas tanto para a compreensão da biologia celular como para o combate do patógeno MTB. Primeiro, propusemos a resolução estrutural dos complexos proteicos RipA:PonA1 e RipA:RpfB, essenciais para a regulação do ciclo celular do bacilo. Mas, cientes do desafio de estudar interações proteína-proteína, também objetivamos buscar por inibidores para RipA e PonA1, proteínas essenciais à viabilidade e sobrevivência de MTB. Neste contexto, enfrentamos dificuldades para conseguir os domínios catalíticos de PonA1, devido ao caráter hidrofóbico e instável dos mesmos. Como estratégia, desenhamos diferentes construções para os domínios ortólogos de PonA1 em *M. smegmatis* e *M. thermoresistibile*. No entanto, as dificuldades permaneceram, o que impediu a aplicação da abordagem de fragmentos e a triagem de compostos  $\beta$ -lactâmicos contra os domínios transpeptidase, bem como o estudo do complexo RipA:PonA1. Como tentativa, novas construções para a enzima de MTB estão sendo produzidas, no intuito de dar prosseguimento a esta vertente do trabalho. Em contrapartida, os resultados obtidos para RipA, na abordagem de FBDD, abrem caminhos na área de química medicinal em direção ao desenvolvimento de séries de compostos, a partir dos ligantes identificados, a fim de obter os primeiros compostos líderes inibidores dessa classe de enzimas. Ainda sobre RipA, iniciamos os ensaios de RMN para a determinação estrutural da conformação ativa do domínio catalítico da enzima, como alternativa ao insucesso nas tentativas de cristalização. A elucidação da estrutura de RipA ativa possibilitará o avanço na caracterização do modo de ligação de RipA aos ligantes, pois conseguiremos realizar a ancoragem molecular a partir de modelos mais realísticos. Os experimentos de RMN também podem ser explorados no estudo do complexo RipA:RpfB, que já possui dados preliminares. A partir do mapeamento da superfície de interação, serão identificados os resíduos-chave na formação do complexo. Essa informação é muito útil no estudo de interações proteína-proteína, principalmente em complexos transientes, pois permite a construção de cross-linkings entre as proteínas parceiras, forçando a

formação de um complexo estável. Paralelamente, esses dados também podem ser utilizados como parâmetros de restrições para a otimização do modelo experimental gerado para o complexo, a partir dos dados de SAXS. Uma outra perspectiva ao presente trabalho é a caracterização biofísica do zimogênio de RipA, a fim de comparar os resultados dessa com os que obtivemos para a RipA ativa no presente trabalho.

Vê-se, pois, que, face às dificuldades encontradas ao longo das etapas experimentais, o desenvolvimento deste trabalho se mostrou possível e abre perspectivas no contexto do estudo da biologia de MTB e no campo do desenvolvimento de antimicrobianos para campanhas de combate à TB.

## REFERÊNCIAS

ALENCAR, J. **A pata da gazela**. São Paulo: Ática, 15ª ed., 1998. (Bom Livro). Disponível

em: <<http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/bv000138.pdf>>. Acesso em: 01 mai. 2023.

ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L. Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. **Genome Biology**, vol. 4, n. 2, p. 1–12, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-2-r11>>. Acesso em: 22 mai. 2021.

ANTON, C.; MACHADO, F.D.; RAMIREZ, J.M.A.; BERNARDI, R.M.; PALOMINOS, P.E.; BRENOL, C.V.; MELLO, F.C.D.Q.; SILVA, D.R. Latent tuberculosis infection in patients with rheumatic diseases. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 45, 2019.

ARBEX, M. A.; VARELLA, M. D. C. L.; SIQUEIRA, H. R.; MELLO, F. A. F. Drogas antituberculose: Interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais. Parte 1: Fármacos de primeira linha. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, vol.36, n.5, p.626-640, 2010.

BAGCCHI, S. WHO's Global Tuberculosis Report 2022. **The Lancet Microbe**, 4(1), p.e20, 2023

BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnologies**, 22, 1399–1408, 2004. <https://doi.org/10.1038/nbt1029>.

BARBERIS, I.; BRAGAZZI, N.L.; GALLUZZO, L.; MARTINI, M. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. **Journal of preventive medicine and hygiene**, 58(1), p.E9, 2017.

BATEMAN, A.; RAWLINGS, N.D. The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases. **Trends in Biochemical Sciences** 28(5):234–237, 2003.

BERTOLLI FILHO, C. **História social da tuberculose e do tuberculoso: 1900-1950**. Editora Fiocruz, 2001.

BHAKTA, S.; BASU, J.. Overexpression, purification and biochemical characterization of a class a high-molecular-mass penicillin-binding protein (PBP), PBP1\* and its soluble derivative from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemical Journal**, v. 361, n. 3, p. 635-639, 2002.

BIETZ, U.; SCHULZ, R. Protoss: a holistic approach to predict tautomers and protonation states in protein-ligand complexes. **Journal of Cheminformatics**, vol. 6, n. 1, p. 1-12, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1758-2946-6-12>>. Acesso em: 25 mai. 2021.

BOTELLA, H.; VAUBOURGEIX, J.; LEE, M.H.; SONG, N.; XU, W.; MAKINOSHIMA, H.; GLICKMAN, M.S.; EHRT, S. *Mycobacterium tuberculosis* protease MarP activates a peptidoglycan hydrolase during acid stress. **The EMBO journal**, 36(4):536-548, 2017.

BÖTH, D.; SCHNEIDER, G.; SCHNELL, R. Peptidoglycan remodeling in *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of structures and catalytic activities of RipA and RipB. **Journal of Molecular Biology**, vol. 413, p. 247-260, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Boletim Epidemiológico. **Tuberculose 2023**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2023/boletim-epidemiologico-de-tuberculose-numero-especial-mar.2023/>>. Acesso em: 17 de abr. 2023.

BRUDAR, S.; HRIBAR-LEE, B. Effect of buffer on protein stability in aqueous solutions: A simple protein aggregation model. **The Journal of Physical Chemistry B**, 125(10), pp.2504-2512, 2021.

BRUNELLE, J.L.; GREEN, R. One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE). **In Methods in enzymology**, (Vnol. 541, pp. 151-159). Academic Press. 2014.

CAMINEIRO, J.; SCARDIGLI, A. Classification of antituberculosis drugs: a new proposal based on the most recent evidence. **European Respiratory Journal**, 46(4) 887-893, 2015. DOI: 10.1183/13993003.00432-2015

CARPOUSIS, A. J. The RNA degradosome of Escherichia coli: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 61, p. 71-87, 2007.

CHAO, M.C.; KIESER, K.J.; MINAMI, S.; MAVRICI, D.; ALDRIDGE, B.B.; FORTUNE, S.M.; ALBER, T.; RUBIN, E.J. Protein complexes and proteolytic activation of the cell wall hydrolase RipA regulate septal resolution in mycobacteria. **PLoS pathogens**, 9(2):e1003197, 2013.

CHATURVEDI, S.K.; MA, J.; ZHAO, H.; SCHUCK, P. Use of fluorescence-detected sedimentation velocity to study high-affinity protein interactions. **Nature protocols**, 12(9), pp.1777-1791, 2017.

COLE, J.L.; LARY, J.W.; MOODY, T.P.; LAUE, T.M. Analytical ultracentrifugation: sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. **Methods in cell biology**, 84, pp.143-179, 2008.

CONGREVE, M.; CARR, R.; MURRAY, C.; JHOTI, H. A 'rule of three' for fragment-based lead discovery? **Drug Discovery Today**, 8(19):876-7, 2003. doi: 10.1016/s1359-6446(03)02831-9. PMID: 14554012.

COSMA, C.L.; SHERMAN, D.R.; RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annual Reviews in Microbiology**, 57(1):641-676, 2003.

cultures. **Protein expression and purification**, vol. 41,1 (2005): 207-34.

D'SOUZA, S.E.; GINSBERG, M.H.; PLOW, E.F. Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. **Trends in Biochemical Sciences**, 16: 246–250, 1991.

DAFFÉ, M.; MARRAKCHI, H. Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope. **Microbiol Spectr**, 7(4), 2019. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018. PMID: 31267927.

DAI, R.; WILSON, D.J.; GEDERS, T.W.; ALDRICH, C.C.; FINZEL, B.C. Inhibition of Mycobacterium tuberculosis Transaminase BioA by Aryl Hydrazides. **ChemBiochem**, v. 15, n. 4, p. 575-586, 2014.

DANIEL, T.M. **The History of Tuberculosis**. Respiratory Medicine , vol. 100 , n. 11 , p. 1862 - 1870, 2006.  
doi:10.1016/j.pep.2005.01.016

DUMON-SEIGNOVERT, L.; CARIOT, G.; VUILLARD, L. The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli: a comparison of overexpression in BL21 (DE3), C41 (DE3), and C43 (DE3). **Protein expression and purification**, 37(1), pp.203-206, 2004.

EDWARDS, G.B.; MUTHURAJAN, U.M.; BOWERMAN, S.; LUGER, K. Analytical ultracentrifugation (AUC): an overview of the application of fluorescence and absorbance AUC to the study of biological macromolecules. **Current protocols in molecular biology**, 133(1), p.e131, 2020.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Summary of opinion**: initial authorisation of Detylba, delamanid. London, 2013, 2p. Disponível em: <[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Summary\\_of\\_opinion](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Summary_of_opinion)

\_ - \_Initial\_authorisation/human/002552/WC500155458.pdf >. Acesso em: 10 set. 2016.

FILIPPOVA, E. V.; KIESER, K. J.; LUAN, C. H.; WAWRZAK, Z.; KIRYUKHINA, O.; RUBIN, E. J.; Anderson, W. F. Crystal structures of the transpeptidase domain of the *Mycobacterium tuberculosis* penicillin-binding protein PonA1 reveal potential mechanisms of antibiotic resistance. **The FEBS journal**, vol. 283, n. 12, p. 2206-2218, 2016.

FLORES, A.R.; PARSONS, L.M.; PAVELKA, M.S. Characterization of novel *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* mutants hypersusceptible to beta-lactam antibiotics. **Journal of Bacteriology**, vol. 187, p.1892-1900, 2005.

FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S.; SCOTT, E.G.; BAILLEY, W.R. Diagnostic microbiology 12th Edition: Mosby Elsevier, St. Louis, MO, 2007, p.778- 781.

FOX, B.G.; BLOMMEL, P.G. Autoinduction of protein expression. **Curr Protoc Protein Sci.** Chapter 5:5.23.1-5.23.18, 2009 doi: 10.1002/0471140864.ps0523s56. PMID: 19365792; PMCID: PMC5602607.

FUMAGALLI, F.; DE MELO, S.M.G.; RIBEIRO, C.M.; SOLCIA, M.C.; PAVAN, F.R.; DA SILVA EMERY, F. Exploiting the furo [2, 3-b] pyridine core against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 29(8), pp.974-977, 2019.

GADAY, Q.; MEGRIAN, D.; CARLONI, G.; MARTINEZ, M.; SOKOLOVA, B.; BEN ASSAYA, M.; LEGRAND, P.; BRÛLÉ, S.; HAOUZ, A.; WEHENKEL, A.M.; ALZARI, P.M. FtsEX-independent control of RipA-mediated cell separation in *Corynebacteriales*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 119(50):e2214599119, 2022.

GAO, L.Y.; PAK, M.; KISH, R.; KAJIHARA, K.; BROWN, E.J. A mycobacterial operon essential for virulence in vivo and invasion and intracellular persistence in macrophages. **Infection and immunity**, vol. 74, n. 3, p. 1757–1767, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/IAI.74.3.1757-1767.2006>>. Acesso em 25 maio 2021.

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. **FEMS microbiology reviews**, vol. 36, n.3, p.514-532, 2012.

GLATTER, O. New Method for Evaluation of Small-Angle Scattering Data. **Journal of Applied Crystallography** 10, 415-421, 1977. doi: 10.1107/s0021889877013879.

GLAZIOU, P.; SISMANIDIS, C.; FLOYD, K.; RAVIGLIONE, M. Global Epidemiology of Tuberculosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, vol.5, n.2,a017798, 2014.

GONÇALVES, H. A tuberculose ao longo dos tempos. **Hist. cienc. saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro , v. 7, n. 2, p. 305-327, 2000.

GRANGE, J.M. The genus Mycobacterium and the Mycobacterium tuberculosis complex. **Tuberculosis: a comprehensive clinical reference**, 5: 44-59, 2009.

GRUNBERG-MANAGO, M. Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. **Annual review of genetics**, v. 33, n. 1, p. 193-227, 1999.

HAMMERSLEY, A. P. FIT2D: a multi-purpose data reduction, analysis and visualization program. **Journal of Applied Crystallography**, 49:646-652, 2016. doi: 10.1107/s1600576716000455.

HEALY, C.; GOUZY, A.; EHRT, S. Peptidoglycan Hydrolases RipA and Ami1 Are Critical for Replication and Persistence of Mycobacterium tuberculosis in the Host. **Mbio**, 11(2):1–14, 2020.

HETT, E. C.; CHAO, M. C.; DENG, L. L.; RUBIN, E. J. A mycobacterial enzyme essential for cell division synergizes with resuscitation-promoting factor. **PLoS Pathogens**, vol. 4, n.2, p.e1000001, 2008.

HETT, E. C.; CHAO, M. C.; RUBIN, E. J. Interaction and modulation of two antagonistic cell wall enzymes of mycobacteria. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 7, p. e1001020, 2010.

HETT, E. C.; CHAO, M. C.; STEYN, A. J.; FORTUNE, S. M.; DENG, L. L.; RUBIN, E.J. A partner for the resuscitation-promoting factors of Mycobacterium tuberculosis. **Molecular Microbiology**, vol. 66, p.658-668, 2007.

HOARAU, M.; VANICHTANANKUL, J.; SRIMONGKOLPITHAK, N.; VITSUPAKORN, D.; YUTHAVONG, Y.; KAMCHONWONGPAISAN, S. Discovery of new non-pyrimidine scaffolds as Plasmodium falciparum DHFR inhibitors by fragment-based screening. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 36(1), pp.198-206, 2021.

HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**: 3. ed. Wiley, 2007. Disponível em: <<http://www.usp.br/massa/2014/qfl2144/pdf/MassSpectrometry.pdf#page=11>>. Acesso em 22 maio 2020.

HONG, P.; KOZA, S.; BOUVIER, E.S. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. **J Liq Chromatogr Relat Technol**. 35(20):2923–2950, 2012. doi:10.1080/10826076.2012.743724. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/applletter/2012/204384Orig1s000ltr.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/applletter/2012/204384Orig1s000ltr.pdf)>. Acesso em: 28 jun. 2018.

JHOTI, H.; LEACH, A.R. (Ed.). **Structure-based drug discovery**. Dordrecht: Springer, 2007.

KANG, C. M.; NYAYAPATHY, S.; LEE, J. Y.; SUH, J. W.; HUSSON, R. N. Wag31, a homologue of the cell division protein DivIVA, regulates growth, morphology and polar cell wall synthesis in mycobacteria. **Microbiology**, 154(3), 725-735, 2008.

KAPRELYANTS, A. S.; MUKAMOLOVA, G. V.; RUGGIERO, A.; MAKAROV, V. A.; DEMINA, G.R.; SHLEEVA, M.O.; POTAPOV, V.D.; SHRAMKO, P.A. Resuscitation-promoting factors (Rpf): in search of inhibitors. **Protein and Peptide Letters**, 19(10), pp.1026-1034, 2012.

KIESER, K. J.; BARANOWSKI, C.; CHAO, M. C.; LONG, J. E.; SASSETTI, C. M.; WALDOR, M. K.; ...; RUBIN, E. J. Peptidoglycan synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* is organized into networks with varying drug susceptibility. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 112, n.42, p.13087-13092, 2015a.

KIESER, K. J.; BOUTTE, C. C.; KESTER, J. C.; BAER, C. E.; BARCZAK, A. K.; MENICHE, X.; ...; RUBIN, E. J. Phosphorylation of the peptidoglycan synthase PonA1 governs the rate of polar elongation in mycobacteria. **PLoS Pathogens**, vol. 11, n.6, p.e1005010, 2015b.

KIESER, K.J.; RUBIN, E.J. How Sisters Grow Apart: Mycobacterial Growth and Division. **Nature Reviews Microbiology**, vol. 12, n. 8, p. 550 - 562, 2014.

KUNTZ, I. D.; CHEN, K.; SHARP, K. A.; KOLLMAN, P. A. The maximal affinity of ligands. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96, 9997– 10002, 1999. DOI: 10.1073/pnas.96.18.9997.

LAVOLLAY, M.; ARTHUR, M.; FOURGEAUD, M.; DUBOST, L.; MARIE, A.; VEZIRIS, N.; BLANOT, D.; GUTMANN, L.; MAINARDI, J.L. The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L,D-transpeptidation. **Journal of Bacteriology**, 190(12):4360-4366, 2008.

LAVOLLAY, M.; FOURGEAUD, M.; HERRMANN, J.L.; DUBOST, L.; MARIE, A.; GUTMANN, L.; ARTHUR, M.; MAINARDI, J.L. The peptidoglycan of *Mycobacterium abscessus* is predominantly cross-linked by L,D-transpeptidases. **Journal of Bacteriology**, 193(3):778-82, 2011.

LIBREROS-ZÚÑIGA, G. A.; SILVA, C.S.; SALGADO FERREIRA, R.S.; DIAS, M. V. B. Structural Basis for the Interaction and Processing of  $\beta$ -Lactam Antibiotics by L, d-Transpeptidase 3 (LdtMt3) from *Mycobacterium tuberculosis*. **ACS infectious diseases**, vol. 5, n. 2, p. 260-271, 2018.

LUCA, S.; MIHAESCU, T. History of BCG vaccine. **Maedica (Buchar)**, v. 8, n. 1, p. 53-58, 2013.

MACIEJEWSKI, M.W.; SCHUYLER, A.D.; GRYK, M.R.; MORARU, I.I.; ROMERO, P.R.; ULRICH, E.L.; EGHBALNIA, H.R.; LIVNY, M.; DELAGLIO, F.; HOCH, J.C. NMRbox: a resource for biomolecular NMR computation. **Biophysical journal**, 112(8), pp.1529-1534, 2017.

MADEIRA, F.; PEARCE, M.; TIVEY, A.R.; BASUTKAR, P.; LEE, J.; EDBALI, O.; MADHUSOODANAN, N.; KOLESNIKOV, A.; LOPEZ, R. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. **Nucleic acids research**, 50(W1), pp.W276-W279, 2022.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V. CLARK; DP **Microbiologia de Brock**. Traduzido de Brock Biology of Microorganisms. 12<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MUKAMOLOVA, G.V.; TURAPOV, O.A.; YOUNG, D.I.; KAPRELYANTS, A.S.; KELL, D.B; YOUNG, M. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular microbiology**, 46(3), pp.623-635, 2002.

MURAKAMI, L., M., Z.; RULLER, R. **Memorando técnico**: Uso da técnica de dicroísmo circular para avaliação de proteínas com aplicações biotecnológicas. Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais, CNPEM, 2016.

NAYAK S.; ACHARJYA B. Mantoux test and its interpretation. **Indian dermatology online journal**, v. 3, n. 1, p. 2-6, 2012.

OLIVEIRA, C. L. P. Investigating Macromolecular Complexes in Solution by Small Angle X-Ray Scattering. In **Current Trends in X-Ray Crystallography**, edited by Dr. Annamalai Chandrasekaran, 367-392. InTech. 2011.

OLIVEIRA, C. L. P., M. A. BEHRENS, J. S. PEDERSEN, AND et al. A SAXS Study of Glucagon Fibrillation. **Journal of Molecular Biology**, 387 (1):147-161, 2009. doi: 10.1016/j.jmb.2009.01.020.

PETOUKHOV, M.V.; FRANKE, D.; SHKUMATOV, A.V.; TRIA, G.; KIKHNEY, A.G.; GAJDA, M.; GORBA, C.; MERTENS, H.D.; KONAREV, P.V.; SVERGUN, D.I. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. **J Appl Crystallogr.** 15;45(Pt 2):342-350, 2012. doi: 10.1107/S0021889812007662. PMID: 25484842; PMCID: PMC4233345.

PFYFFER, G.E. Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. In **Manual of Clinical Microbiology**, Eleventh Edition, American Society of Microbiology, p. 536-569, 2015.

PIELAK, G.J. Buffers, especially the good kind. **Biochemistry**, 60(46), pp.3436-3440, 2021.

PLOCINSKI, P.; ARORA, N.; SARVA, K.; BLASZCZYK, E.; QIN, H.; DAS, N., PLOCINSKA, R.; ZIOLKIEWICZ, M.; DZIADEK, J.; KIRAN, M.; GORLA, P. Mycobacterium tuberculosis CwsA interacts with CrgA and Wag31, and the CrgA-CwsA complex is involved in peptidoglycan synthesis and cell shape determination. **Journal of bacteriology**, 194(23), pp.6398-6409, 2012.

RATH, A.; GLIBOWICKA, M.; NADEAU, V.G.; CHEN, G.; DEBER, C.M. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106(6), pp.1760-1765, 2009.

REES, David C. et al. Fragment-based lead discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 660-672, 2004.

RENDON, A.; TIBERI, S.; SCARDIGLI, A.; D'AMBROSIO, L.; CENTIS, R.; CAMINERO, J.A.; MIGLIORI, G.B. Classification of drugs to treat multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB): evidence and perspectives. **J Thorac Dis.**, 8 (10): 2666-2671, 2016. doi: 10.21037/jtd.2016.10.14. PMID: 27867538; PMCID: PMC5107456.

RIMAL, B.; SENZANI, S.; EALAND, C.; LAMICHHANE, G.; KANA, B.; KIM, S.J. Peptidoglycan compositional analysis of *Mycobacterium smegmatis* using high-resolution LC–MS. **Scientific reports**, 12(1):11061, 2022.

ROSSER, A.; STOVER, C.; PAREEK, M.; MUKAMOLOVA, G.V. Resuscitation-promoting factors are important determinants of the pathophysiology in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Critical reviews in microbiology**, 43(5), pp.621-630, 2017.

ROSSINI, N.D.O.; DIAS, M.V.B. Mutations and insights into the molecular mechanisms of resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line. **Genetics and Molecular Biology**, 46, 2023.

RUGGIERO, A.; MARASCO, D.; SQUEGLIA, F.; SOLDINI, S.; PEDONE, E.; PEDONE, C.; BERISIO, R. Structure and functional regulation of RipA, a mycobacterial enzyme essential for daughter cell separation. **Structure**, vol. 18, n. 9, p. 1184-1190, 2010.

RUGGIERO, A.; MARCHANT, J.; SQUEGLIA, F.; MAKAROV, V.; DE SIMONE, A.; BERISIO, R. Molecular determinants of inactivation of the resuscitation

promoting factor B from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 31, n. 2, p. 195-205, 2013.

RUOSLAHTI, E. Rgd and Other Recognition Sequences for Integrins. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 12(1):697–715, 1996.

SCHÄGGER, H. Tricine–sds-page. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 16, 2006.

SCHÄGGER, H; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SCHRÖDINGER, L. L. C. **The PyMOL Molecular Graphics System**, Version 2.0, 2017.

SCIBELLI, A.; ROPERTO, S.; MANNA, L.; PAVONE, L.M.; TAFURI, S.; DELLA MORTE, R.; STAIANO, N. Engagement of integrins as a cellular route of invasion by bacterial pathogens. **The Veterinary Journal**, 173(3):482-491, 2007.

SEMENYUK, A. V.; SVERGUN, D. I. GNOM - A Program Package for Small-Angle Scattering Data-Processing. **Journal of Applied Crystallography**, 24:537-540. doi: 10.1107/s002188989100081x, 1991.

SHI, Y.; MOWERY, R.A.; ASHLEY, J.; HENTZ, M.; RAMIREZ, A.J.; BILGICER, B.; SLUNT- BROWN, H.; BORCHELT, D.R.; SHAW, B.F. Abnormal SDS-PAGE migration of cytosolic proteins can identify domains and mechanisms that control surfactant binding. **Protein Science**, 21(8), pp.1197-1209, 2012.

SIBINELLI-SOUSA, S.; HESPANHOL, J.T.; NICASTRO, G.G.; MATSUYAMA, B.Y.; MESNAGE, S.; PATEL, A.; DE SOUZA, R.F.; GUZZO, C.R.; BAYER-SANTOS, E. A family of T6SS antibacterial effectors related to I, d-transpeptidases targets the peptidoglycan. **Cell reports**, 31(12), p.107813, 2020.

SMITH, B.J. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. **Methods Mol Biol.** 32:23-34, 1994. doi: 10.1385/0-89603-268-X:23. PMID: 7524943.

SMITH, I. Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, vol.16, n.3, p.463-496, 2003.

SQUEGLIA, F.; ROMANO, M.; RUGGIERO, A.; VITAGLIANO, L.; DE SIMONE, A.; BERISIO, R. Carbohydrate recognition by RpfB from Mycobacterium tuberculosis unveiled by crystallographic and molecular dynamics analyses. **Biophysical Journal**, vol. 104, p. 2530-2539, 2013.

SQUEGLIA, F.; RUGGIERO, A.; ROMANO, M.; VITAGLIANO, L.; BERISIO, R. Mutational and structural study of RipA, a key enzyme in Mycobacterium tuberculosis cell division: evidence for the L-to-D inversion of configuration of the catalytic cysteine. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography** 70(9):2295-2300, 2014.

STEINER, E.M.; LYNGSØ, J.; GUY, J.E.; BOURENKOV, G.; LINDQVIST, Y.; SCHNEIDER, T.R.; PEDERSEN, J.S.; SCHNEIDER, G.; SCHNELL, R. The structure of the N- terminal module of the cell wall hydrolase RipA and its role in regulating catalytic activity. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 86(9):912-923, 2018.

STEINER, E.M.; LYNGSØ, J.; GUY, J.E.; BOURENKOV, G.; LINDQVIST, Y.; SCHNEIDER, T.R.; PEDERSEN, J.S.; SCHNEIDER, G.; SCHNELL, R. The structure of the N-terminal module of the cell wall hydrolase RipA and its role in regulating catalytic activity. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 86(9):912-923, 2018.

STRICKLER, S.S.; GRIBENKO, A.V.; GRIBENKO, A.V.; KEIFFER, T.R.; TOMLINSON, J.; REIHLE, T.; LOLADZE, V.V.; MAKHATADZE, G.I. Protein stability and surface electrostatics: a charged relationship. **Biochemistry**, 45(9), pp.2761-2766, 2006.

STUDIER, F W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein expression and purification**, vol. 41,1: 207-34, 2005. doi:10.1016/j.pep.2005.01.016

THAKUR, M.; CHAKRABORTI, P.K., GTPase activity of mycobacterial FtsZ is impaired due to its transphosphorylation by the eukaryotic-type Ser/Thr kinase, PknA. **Journal of Biological Chemistry**, 281(52), pp.40107-40113, 2006.

TIWARI, P.; KAILA, P.; GUPTASARMA, P. Understanding anomalous mobility of proteins on SDS- PAGE with special reference to the highly acidic extracellular domains of human E- and N- cadherins. **Electrophoresis**, 40(9), pp.1273-1281, 2019.

TROTT; O. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, **Journal of Computational Chemistry**, vol. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

TSUMOTO, K.; UMETSU, M.; KUMAGAI, I.; EJIMA, D.; PHILO, J.S.; ARAKAWA, T. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. **Biotechnology progress**, v. 20, n. 5, p. 1301-1308, 2004.

U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Sirturo (bedaquiline)**. Disponível em: <

UNZAI, S. Analytical ultracentrifugation in structural biology. **Biophysical Reviews**, 10, pp.229-233, 2018.

VAGENENDE, V.; YAP, M.G.; TROUT, B.L. Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol. **Biochemistry**, 48(46), pp.11084-11096, 2009.

VIJAY, S.; NAGARAJA, M.; SEBASTIAN, J.; AJITKUMAR, P. Asymmetric cell division in Mycobacterium tuberculosis and its unique features. **Archives of microbiology**, 196, pp.157-168, 2.014

VRANKEN, W.F.; BOUCHER, W.; STEVENS, T.J.; FOGH, R.H.; PAJON, A.; LLINAS, M.; ULRICH, E.L.; MARKLEY, J.L.; IONIDES, J.; LAUE, E.D. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. **Proteins: structure, function, and bioinformatics**, v. 59, n. 4, p. 687-696, 2005.

WARR, W.A. Fragment-based drug discovery. **J Comput Aided Mol Des**, 23, 453–458, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10822-009-9292-1>

WHO. **Global tuberculosis report 2022**. Glob Tuberc. Rep. 2022. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061729>