



Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina – FM
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular – PPGPM

Metalo-proteases de *Mycobacterium tuberculosis*:
características moleculares e funcionais desempenham
papel na biologia da interface patógeno-hospedeiro

André França Corrêa

Brasília, 2014.

André França Corrêa

Metalo-proteases de *Mycobacterium tuberculosis*:
características moleculares e funcionais desempenham
papel na biologia da interface patógeno-hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Jaime Martins de Santana

Co-orientador: Prof. Dr. Ana Paula Junqueira-Kipnis

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Brasília, 2014

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais por todo apoio durante essa longa caminhada da minha vida profissional, pois sem este amparo não seria possível a realização deste projeto.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço minha família, aos meus pais, pela educação e amor que me possibilitaram buscar e alcançar meus objetivos. Agradeço meu irmão e minha cunhada pela força e companheirismo. A Viviane, minha companheira e amiga dos momentos alegres e tristes, por estar sempre do meu lado me apoiando, confortando e incentivando a seguir adiante.

Aos meus colegas do laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro/UnB, dos laboratórios de Imunopatologia das Doenças Infecciosas e Bacteriologia molecular/IPTSP-UFG pelo apoio e ajuda nas atividades realizadas para obtenção de resultados importantes para conclusão deste estudo e pela companhia durante todos estes anos de trabalho. Aos meus amigos que estavam do meu lado durante essa trajetória, em especial ao SCAP que vou levar para toda vida.

Agradeço aos meus orientadores, que hoje tenho como amigos, prof. Jaime e prof.^a Ana Paula que me acolheram em seus laboratórios me dando suporte financeiro, teórico e principalmente emocional para conseguir levar a frente meus projetos de pesquisa e profissional.

Aos professores André Kipnis, Izabela Marques Dourado Bastos, Aline Carvalho Batista, Alexandre Melo Bailão, Célia Maria de Almeida Soares e Osmino Rodrigues Pires Júnior pela contribuição crucial em vários aspectos técnicos e teóricos para obtenção de meus resultados. Aos membros da banca pelo aceite em participar desta defesa, contribuições, sugestões e diferentes pontos de vista que irão acrescentar de forma positiva o fechamento desta etapa profissional.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Prefácio

Este texto sintetiza os conhecimentos e resultados obtidos durante a realização do meu projeto de doutorado. Escolhi organizar esta tese de uma forma que foge pouco do convencional. Pelo trabalho envolver quatro diferentes proteínas, que por sua vez apresentam diferentes funções, os a abordagem conjunta de todas poderia tornar a leitura um tanto confusa. Assim, redigi o texto separando em três grandes partes e cada parte contém diferentes capítulos.

A primeira parte (Parte I) é composta de uma revisão bibliográfica com o intuito de introduzir o tema e conceitos ao leitor. Ela é dividida em três capítulos. O capítulo 1 trata sobre os principais aspectos da tuberculose, como histórico, epidemiologia, imunopatologia, diagnóstico, prevenção e tratamento. Além de aspectos do agente etiológico, o *Mycobacterium tuberculosis*. O capítulo 2 é uma revisão ampla sobre proteases, incluindo as principais enzimas já descritas para o *M. tuberculosis*. O terceiro capítulo traz as justificativas e objetivos deste projeto.

A Parte II é uma compilação dos principais resultados obtidos no estudo e é composta de quatro capítulos. O capítulo 4 trata da obtenção, purificação e identificação das proteínas alvo do estudo. Os capítulos 5 e 6 são manuscritos, redigidos em língua inglesa, de artigos científicos com resultados a respeito de duas das proteínas aqui estudadas. O manuscrito que compõe o capítulo 5 foi submetido e aceito para publicação na revista *Infection and Immunity* com o DOI 10.1128/IAI.02304-14. O Capítulo 7 traz resultados preliminares sobre a avaliação de algumas das proteínas como vacinas de subunidade.

Por último a Parte III traz as considerações finais, composta por apenas um capítulo contendo conclusões e perspectivas futuras.

Resumo

A tuberculose (TB) continua sendo um grande problema de saúde global e apesar de vários estudos terem abordado a relação entre o patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) e seu hospedeiro em um nível imunológico, poucos estudos têm abordado o impacto das respostas fisiológicas do hospedeiro sobre a infecção. Proteases produzidas por bactérias têm sido associadas com alterações importantes em tecidos do hospedeiro e como fatores de virulência. O *Mtb* tem mais de 100 genes que codificam proteases ou peptidases. No entanto, um pequeno número de proteases foram estudadas com detalhes e há cada vez mais provas de que essas enzimas podem ser bons alvos de drogas contra o *M. tuberculosis* e infecções bacterianas em geral. O *Mtb* produz uma protease chamada Zmp1, que parece estar associada com a virulência e teria uma ação como uma putativa enzima conversora de endotelina. As endotelinas são uma família de peptídeos vasoativos sendo ET-1 a isoforma mais abundante e melhor caracterizada. Aqui nós demonstramos que *Mtb* produz e secreta uma enzima com capacidade de clivar ET-1. Estes dados demonstram um possível papel da Zmp1 na interação patógeno-hospedeiro e destaca o seu potencial como um alvo de drogas. Além disso, os resultados sugerem que as vias de sinalização por endotelina têm um papel na patogênese da infecções pelo *Mtb* e que a sinalização pelos receptores ETA ou ETB é capaz de modular a resposta do hospedeiro durante a infecção. As aminopeptidases constituem um conjunto diverso de enzimas proteolíticas que removem seletivamente aminoácidos do N-terminal de proteínas. Em muitos organismos as aminopeptidases degradam peptídeos exógenos, que são usados como uma fonte de nitrogênio. Estas enzimas ainda podem realizar passos essenciais em muitas vias de ativação ou inativação de proteínas próprias. Além disso, estudos sugerem que as aminopeptidases podem também desempenhar um papel importante na patogênese de doenças bacterianas. Aqui, foi caracterizada uma leucil-aminopeptidase (LAP) de *Mtb*, como uma metalo-aminopeptidase multimérica e citosólica com propriedades moleculares e enzimáticas que a caracterizam como um membro típico da família M17 de peptidases, incluindo a sensibilidade a inibidores. Dentre estes inibidores, a bestatina inibiu fortemente a atividade da LAP, o crescimento do *Mtb in vitro* e a infecção de macrófagos pela bactéria. Assim, nossos dados sugerem que a enzima LAP participa de uma via importante para sobrevivência e virulência do *Mtb*, sendo um promissor alvo para novas drogas anti-tuberculose.

Palavras chave: Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, protease, Zmp1, LAP

Abstract

Tuberculosis (TB) remains a major global health problem and although multiple studies have addressed the relationship between *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) and the host on an immunological level, few studies have addressed the impact of host physiological responses. Proteases produced by bacteria have been associated with important alterations in the host tissues and bacterial virulence. *Mtb* has more than 100 genes encoding proteases or peptidases. However, a small number of proteases have been studied in some detail and there is increasing evidence that proteases may be good drug targets for *Mtb*, and for bacterial infections in general. *Mtb* produces a protease called Zmp1, which appears to be associated with virulence, which has a putative action as an endothelin converting enzyme. Endothelins are a family of vasoactive peptides, of which 3 distinct isoforms exist and ET-1 is the most abundant and the best characterized isoform. Here we have shown that *M. tuberculosis* produces and secretes an enzyme with ET-1 cleavage activity. These data demonstrate a possible role of Zmp1 for mycobacteria host interactions, and highlights its potential as a drug target. Moreover, the results suggest that endothelin pathways have a role in pathogenesis of *Mtb* infections, and ETA or ETB receptor signaling can modulate the host response to the infection. We hypothesize that a balance between Zmp1 control of ET-1 levels and ETA/ETB signaling can allow *Mtb* adaptation and survival in the lung tissues. Aminopeptidases constitute a diverse set of proteolytic enzymes that selectively remove amino acids from the N-terminus of proteins. In many organisms, aminopeptidases degrade exogenous peptides, which are used as a nitrogen source. Alternatively, these enzymes accomplish key steps in many activation or inactivation pathways by liberating amino acids from the N-terminus of self-derived proteins. Early studies suggested that aminopeptidases can also play an important role in pathogenesis. Herein, we characterized a Leucine aminopeptidase of *M. tuberculosis*, belongs to M17 protease family, as a cytosolic multimeric metallo-aminopeptidase. Moreover, molecular and enzymatic properties lead us to classify *Mtb* LAP as a typical member of the peptidase family M17, including inhibition susceptibility. Furthermore, bestatin could strongly inhibit LAP activity, in vitro *Mtb* growth and macrophage infection. Thus, our data suggesting LAP activity participates of an important pathway for *M. tuberculosis* survival and virulence and may be a promising target for new anti-TB drugs.

Key words: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, protease, Zmp1, LAP

Lista de abreviaturas

°C	grau Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês: Acquired Immunodeficiency Syndrome
AMC	7-amino-4-metil-cumarina
APCs	Célula Apresentadora de Antígenos, do inglês: Antigen Presenting Cells
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BAL	Lavado bronco-alveolar, do inglês: Bronchoalveolar lavage
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
bp	pares de bases
BQ123	Antagonista do receptor ETA
BQ788	Antagonista do receptor ETB
CD	Marcador de Diferenciação, do inglês: Cluster of Differentiation
CFP	Proteína de Filtrado de Cultura, do inglês: Culture Filtrate Protein
CFU	Unidades formadoras de colônia, do inglês: Colony-forming Unit
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidina
DAP	Aspartil-aminopeptidase
DCs	Células Dendríticas
DFP	diisopropilfluorofosfato
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DNA	Ácido Desoxirribonucléico, do inglês: desoxyribonucleic acid
E-64	L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano

EC	Enzyme comission
ECE	Enzima conversora de endotelina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	etilenoglicol-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N' - ácido tetracético
ELISA Assay)	ensaio de ligação imunoenzimática (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
EPNP	1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)
ESAT-6	Antígeno Alvo de Secreção Primária do inglês: Early Secretory Antigenic Target
ET1	Endotelina-1
ETA	Receptor de endotelina tipo A
ETB	Receptor de endotelina tipo B
ERA	Antagonista dos receptores de endotelina
ETR	Receptor de endotelina
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FSC	Dispersão frontal, do inglês: forward scatter
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- γ	Interferon-gama
g	grama
GCP	O-sialoglicoproteína endopeptidase
GST	Glutathione S-transferase
h	hora
iNOS	Sintetase do óxido nítrico induzível
IUBMB	Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
IL	Interleucina
IgG	imunoglobulina G
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
INH	Isoniazida

Kbp	Quilopares de bases
kDa	Quilodalton
Km	constante de Michaelis-Menten
KO	Nocaute, do inglês: Knockout
LACEN	Laboratório Central
LAP	Leucil-aminopeptidase
LB	meio de cultura Luria-Bertani
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe
MTB	Mycobacterium tuberculosis
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
MS	Espectrometria de massa, do inglês: Mass Spectrometry
NBT	nitro-azul-tetrazólico
ng	nanograma
NK	Células Natural Killer
nM	nanomolar
nm	nanômetro
N-terminal	extremidade amino-terminal da cadeia polipeptídica
NO	Óxido Nítrico
OADC	Ácido Oléico, Albumina, Dextrose e Catalase
OD	densidade óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Substrato Ortofenilenodiamina, do inglês: Ortho-Phenylenediamine Dihydrochloride
ORF	fase aberta de leitura
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão Fosfato Salina, do inglês: Phosphate-buffered saline
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês: Polymerase Chain Reaction

PDB	banco de dados de proteína
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína Peridina de Clorofila
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoreto
RD	Regiões de diferenciação
rpm	rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	segundo
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SNPs	Polimorfismo de único nucleotídeo, do inglês: Single Nucleotide Polymorphism
SSC	Dispersão lateral, do inglês: side scatter
TB	Tuberculosis
TB-MDR	Tuberculose Multidroga-Resistente
Th	Linfócito T auxiliar do inglês: T Helper
TLR	Receptor Semelhante ao Toll, do inglês Toll-Like Receptor
TLCK	n- α -Tosil-L-Lisina clorometil cetona
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa, do inglês: Tumor Necrosis Factor
TPCK	n- α -Tosil-L-Fenilalanina clorometil cetona
UV	ultravioleta
V	volt
Vmax	velocidade máxima
W	watt
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo
Zmp1	PepO oligopeptidase/Zinc metalloprotease 1
ZN	Cloração de Ziehl-Neelsen
Ala/A	Alanina
Arg/R	Arginina

Asn/N	Asparagina
Asp/D	Ácido aspártico
Cys/C	Cisteína
Glu/E	Ácido glutâmico
Gln/Q	Glutamina
Gly/G	Glicina
His/H	Histidina
Ile/I	Isoleucina
Leu/L	Leucina
Lys/K	Lisina
Met/M	Metionina
Phe/F	Fenilalanina
Pro/P	Prolina
Ser /S	Serina
Thr/T	Treonina
Trp/W	Triptofano
Tyr/Y	Tirosina
Val/V	Valina

Sumário

Dedicatória.....	III
Agradecimentos.....	IV
Prefácio.....	V
Resumo.....	VI
Abstract.....	VII
Lista de abreviaturas.....	VIII
Sumário.....	XIII
PARTE I.....	1
INTRODUÇÃO.....	1
Capítulo 1.....	2
Tuberculose.....	2
1.1- Histórico da tuberculose.....	3
1.2 - Agente etiológico.....	4
1.3 - Imunopatologia da tuberculose.....	6
1.4 - Epidemiologia.....	9
1.4.1 - Epidemiologia Mundial.....	9
1.4.2 - Epidemiologia no Brasil.....	10
1.5 - Diagnóstico.....	12
1.6 - Prevenção.....	13
1.6.1 - Novas vacinas contra a TB.....	14
1.7 - Tratamento.....	16
1.7.1 - MDR-TB.....	17
1.7.2 - Desenvolvimento de novas drogas.....	18
Referências Bibliográficas.....	19
Capítulo 2.....	25
Proteases.....	25

2.1 - Nomenclatura e classificação	26
2.2 - Serino-proteases	28
2.2.1 - Serino-proteases no <i>Mtb</i>	29
2.3 - Cisteíno-proteases.....	33
2.3.1 - Cisteíno proteases no <i>Mtb</i>	33
2.4 - Aspártico-proteases	34
2.4.1 – Aspártico-proteases no <i>Mtb</i>	35
2.5 - Treonino-proteases	35
2.5.1 - Treonino proteases no <i>Mtb</i>	36
2.6 - Glutâmico-proteases e Asparargino-proteases	37
2.7 - Metallo-proteases.....	37
2.7.1 - Metallo-proteases no <i>Mtb</i>	39
2.8 - Proteínas que propomos estudar	40
2.8.1 - O-sialoglicoproteína endopeptidase (Gcp)	40
2.8.2 - PepO oligopeptidase (Zmp1)	41
2.8.3 - Leucil-aminopeptidase (LAP) e Aspartil-aminopeptidases (DAP).....	42
Referências Bibliográficas	42
Capítulo 3	53
Objetivos.....	53
3.1 - Objetivo Geral	54
3.2 - Objetivos específicos.....	54
PARTE II.....	55
RESULTADOS	55
Capítulo 4	56
Obtenção das proteínas recombinantes	56
4.1 - Clonagem dos genes	57
4.2 - Expressão das proteínas recombinantes	59
4.3 - Purificação das proteínas recombinantes.....	59
4.4 - Mudança de vetor de expressão.....	62
4.5 - Produção das enzimas pelo <i>M. tuberculosis</i>	63
4.6 - Considerações.....	65
4.7 - Material e Métodos.....	65

4.7.1 - Amplificação dos genes por PCR	65
4.7.2 - Clonagem dos genes amplificados nos vetores de expressão	66
4.7.3 - Expressão das proteínas recombinantes.....	68
4.7.4 - Purificação das enzimas recombinantes.....	68
4.7.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida	69
4.7.7 - ELISA	70
4.7.8 - Western Blot.....	70
Referências Bibliográficas	71
Capítulo 5	72
Endothelin system has a significant role in the pathogenesis and progression of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infection.....	72
INTRODUCCION	73
MATERIALS AND METHODS.....	74
RESULTS.....	78
DISCUSSION	83
ACKNOWLEDGEMENTS	86
REFERENCES.....	87
FIGURES	93
SUPPLEMENTAL MATERIAL	100
Capítulo 6	106
The cytosolic M17 family leucine aminopeptidase of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : aminopeptidases as potential drug target in tuberculosis.....	106
INTRODUCTION.....	107
MATERIALS AND METHODS.....	108
RESULTS.....	113
DISCUSSION	117
ACKNOWLEDGEMENTS	120
REFERENCES.....	120
FIGURES	126
Capítulo 7	131
Imunização.....	131
7.1 - Imunogenicidade das proteínas recombinantes	132
7.2 - Proteção	133

7.3 - Considerações.....	133
7.4 - Materiais e métodos.....	135
7.4.1 - Imunização.....	135
7.4.2 - Obtenção do soro para realização de ELISA.....	135
7.4.3 - ELISA.....	135
7.4.4 - Obtenção das células do baço.....	136
7.4.5 - Avaliação da produção celular de citocinas.....	136
7.4.6 - Infecção intravenosa com <i>Mtb</i>	137
7.4.7 - Determinação da carga bacilar no pulmão.....	137
7.4.8 - Análise Estatística.....	138
Referências Bibliográficas.....	138
PARTE III.....	139
CONCLUSÃO.....	139
Capítulo 8.....	140
Considerações finais.....	140
8.1 - Conclusões.....	141
8.2 - Perspectivas.....	142

PARTE I

INTRODUÇÃO

Capítulo 1

Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa crônica caracterizada por uma resposta inflamatória ocasionada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), ou bacilo de Koch, agente etiológico da doença. O *M. tuberculosis* é considerado um patógeno humano que está relacionado com a ativação e adaptação da resposta imune no hospedeiro. Estimasse que um terço da população mundial esteja infectada, sendo que apenas em 2013 ocorreram cerca de 9 milhões de novos casos, com uma taxa de 1.5 milhões de mortes, sendo 360 mil mortes em pacientes HIV positivos. Além disso, estimasse cerca de 10 milhões de órfão devido à morte de pais infectados.

1.1- Histórico da tuberculose

Tuberculose (TB) é considerada uma das mais antigas doenças identificadas no ser humano. A TB cresceu nas grandes epidemias e depois recuou, assim como outras doenças infecciosas, mas com uma escala de tempo que desafia explicações aceitas para ciclos epidêmicos. Estima-se que o *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal da TB pode ter matado mais pessoas do que qualquer outro patógeno microbiano [1].

Na Alemanha foram encontradas evidências da TB em esqueletos de 8000 a.C. [2]. Múmias egípcias de 5000 a.C. foram encontradas apresentando lesões na coluna vertebral características de infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* conhecida como mal de Pott [3]. Civilizações orientais, como os Chineses e Hindus, já descreviam conjuntos de sintomas clínicos semelhantes à tuberculose desde 2000 a.C. Na América do Sul, através de achados arqueológicos, foi encontrado uma múmia peruana de 1100 a.C que revelava a presença de TB pulmonar [3], [4]. Hipócrates, o pai da medicina, apresentou em 380 a.C. a doença como tísica, que significa “derreter-se”, devido às lesões caseosas que ela provocava. Por volta de 350 a.C., Aristóteles descreve a característica contagiosa da tuberculose [5]. No século II d.C., Galeno, um médico grego desenvolveu estratégias terapêuticas para a doença que foram aplicadas por quase mil anos e incluíam repouso, boa alimentação, habitação em climas amenos, ar fresco, o uso de leite e viagens marítimas [6].

Apesar da primeira confirmação da existência da TB na era pré-colombiana a 1100 anos a.C, no Brasil, a tuberculose surgiu durante a colonização portuguesa, trazida por escravos africanos, colonos e jesuítas infectados pelo *Mtb*. O contato constante dos doentes com os índios promoveu o adoecimento e a morte de muitos nativos e dessa forma muitas tribos indígenas foram erradicadas em curto espaço de tempo. Com o crescimento urbano e populacional decorridos dos séculos posteriores, a TB foi sendo cada vez mais difícil de ser controlada, tomando proporções endêmicas [7].

O nome tuberculose surgiu pela primeira vez em 1839, pelo médico Johann Schönheim. Em 1865, Jean Villemin demonstrou o aparecimento de nódulos em animais inoculados com pus de cavidades pulmonares de doentes [8]. Somente na segunda metade do século XIX, em 24 de março de 1882, que o agente etiológico causador da tuberculose foi isolado, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), então

denominado *Mycobacterium tuberculosis*, pelo cientista alemão Heinrich Hermann Robert Koch [9].

1.2 - Agente etiológico

O gênero *Mycobacterium* compreende atualmente 180 espécies incluindo as subespécies do gênero *Mycobacterium spp.* Este gênero é classicamente dividido em bactérias de crescimento rápido (onde colônias são vistas dentro de uma semana) e bactérias de crescimento lento que estão filogeneticamente relacionadas. O grupo de crescimento rápido possui como principal patógeno humano, o *M. abscessus*, enquanto que no grupo de crescimento lento inclui o que chamamos de complexo *M. tuberculosis* e outras espécies associadas com doença em humanos como *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. leprae*, *M. marinum*, *M. ulcerans* e *M. kansasii* [10].

O complexo *M. tuberculosis* é composto por várias espécies de microbactérias que incluem o *Mtb* sensu stricto e outros agentes relacionados, causadores de tuberculose em seus respectivos hospedeiros. Por exemplo, *Mycobacterium bovis*, causador da TB bovina, *Mycobacterium caprae* (ovelhas e cabras), *Mycobacterium microti* (ratazanas), *Mycobacterium pinnipedii* (focas e leões marinhos), *Mycobacterium mungi* (mangustos), *Mycobacterium orygis* (antilopes). No entanto, dentre as espécies do complexo, o *M. africanum* e o *M. tuberculosis* são os principais causadores da tuberculose humana. Baseado em várias técnicas de genotipagem, as cepas causadoras da TB humana são atualmente divididas filogeneticamente em seis linhagens, podendo uma linhagem estar associada à resistência a drogas, maior virulência ou imunogenicidade. O *M. africanum* é restrito a algumas regiões do continente africano. Sendo assim, do ponto de vista sanitário, o *M. tuberculosis* o principal agente etiológico da doença a nível global (Figura 1.1)[11].

O *Mycobacterium tuberculosis* é uma micobactéria que pertence à classe *Schizomycetes*, ordem *Actinomycetales*, subordem *Corynebacteriaceae*, família das *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. O *Mtb* é um bacilo aeróbio estrito e classificado como um parasito intracelular facultativo, graças a sua capacidade de sobreviver e se replicar dentro de macrófagos. Suas características fenotípicas incluem bacilo delgado, ligeiramente curvo, com espessura de 0.3 a 0.6 μm e com um

comprimento entre 1 a 4 μm . O gênero *Mycobacterium* possui a característica de reter fortemente na parede celular o corante fucsina da coloração de Ziehl-Neelsen e não perder este corante através da descoloração com álcool e ácido. Essa característica é conferida graças à composição complexa da sua parede celular, sendo assim considerado um BAAR [12].

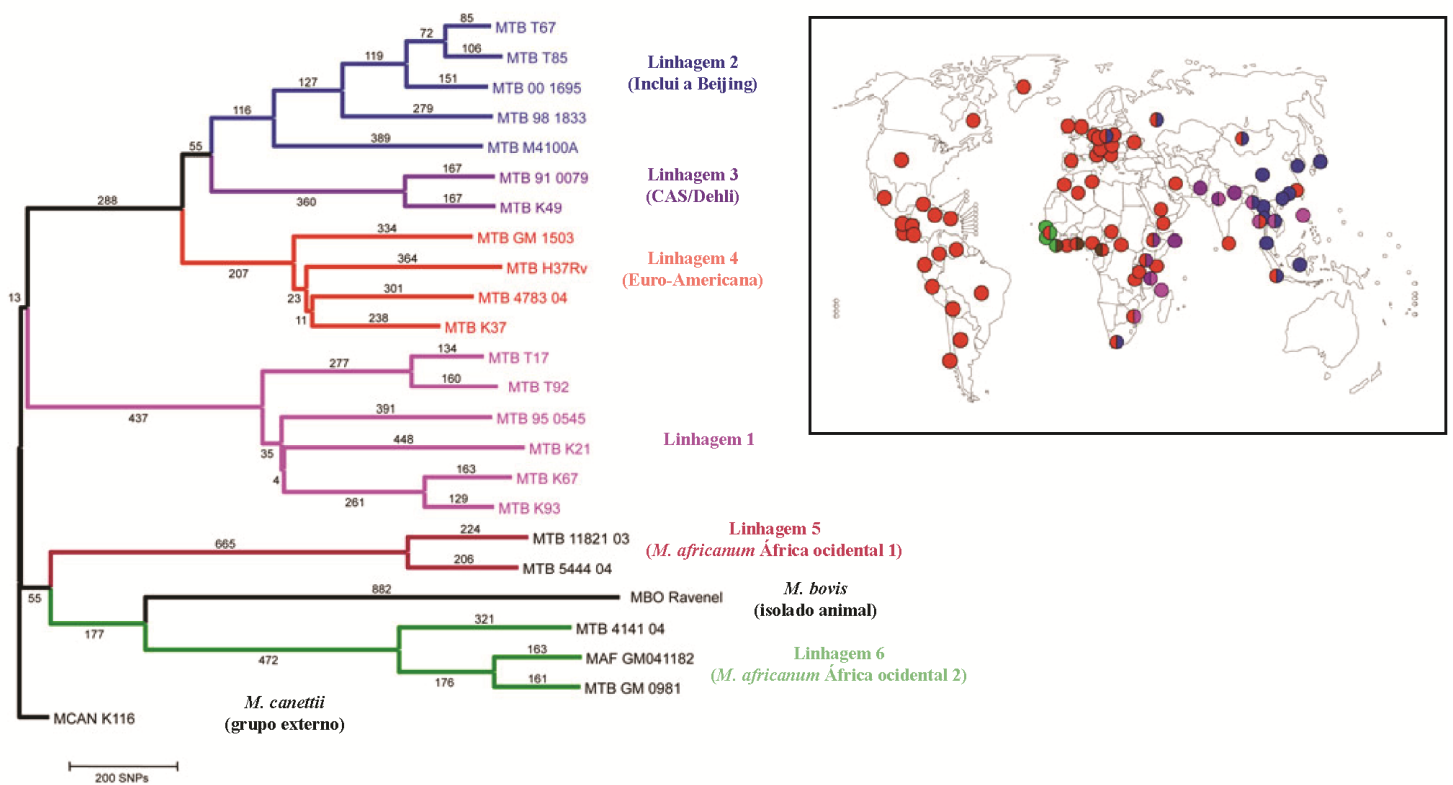


Figura 1.1 Filogenia global do complexo *M. tuberculosis* baseado em 24 seqüências completas de genoma. *M. canettii* foi usado como grupo externo. Os braços coloridos indicam as seis principais linhagens associadas com a doença em humanos. Os números sobre os braços indicam a quantidade de SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*). O inserto mostra a filogeografia das seis linhagens. Adaptado da referência [11].

1.3 - Imunopatologia da tuberculose

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa, transmitida principalmente por via aérea pela inalação de gotículas contendo o bacilo que podem ser expelidas durante a fala, tosse ou espirro por indivíduos infectados pelo *Mtb* [13]. Clinicamente a infecção pode se apresentar na forma pulmonar ou extrapulmonar. As formas extrapulmonares da tuberculose desenvolvem-se frequentemente em regiões/órgãos com maior suprimento sanguíneo e, portanto, de oxigênio. Incluem-se aqui o córtex renal e cerebral, os ossos longos, as vértebras e as adrenais. Visto que o patógeno pode se disseminar por via linfática ou hematogênica, pode causar infecção sistêmica conhecida como tuberculose miliar. Contudo a forma pulmonar é a mais frequente e de maior importância clínica. Ao chegar ao trato respiratório, o bacilo entra em contato com macrófagos alveolares, infectando essas células. A partir desse momento, o estabelecimento da infecção ativa depende de fatores como virulência da cepa e estado imunológico do indivíduo [14].

Cerca de 95% dos indivíduos desenvolvem uma resposta imune capaz de eliminar o bacilo ou impedir a progressão da doença, gerando um estado de latência [15]. Assim, apenas 5% dos indivíduos desenvolvem a doença ativa, destes indivíduos cerca de 50% transmitem o bacilo [16]. Nos indivíduos onde a infecção se torna latente, 5% podem sofrer reativação e manifestação dos sintomas clínicos, em pacientes com HIV a proporção chega a 50%. Com o tratamento, em 95% dos casos se consegue a cura caso a cepa seja sensível aos antibióticos, sendo que em 5% destes casos pode haver recaída após o tratamento com retorno dos sintomas. Se não tratada a tuberculose pode levar a uma alta taxa de mortalidade (Figura 1.2) [17].

O contato e fagocitose do bacilo pelos macrófagos alveolares se dão pelo intermédio de diversos receptores, como os receptores de complemento (CR1, CR2, CR3 e CR4) que facilitam a fagocitose pela ativação da via alternativa do complemento [18]. A interação entre bactéria e macrófago também pode ocorrer via ligação de componentes do bacilo, como peptidoglicanas e proteínas de parede, aos receptores *toll-like* do macrófago ou via ligação de lipoarabinomanana aos receptores de manose [19], [20]. Esses processos iniciam a resposta inflamatória, por ocasionarem a síntese de citocinas pró-inflamatórias [21].

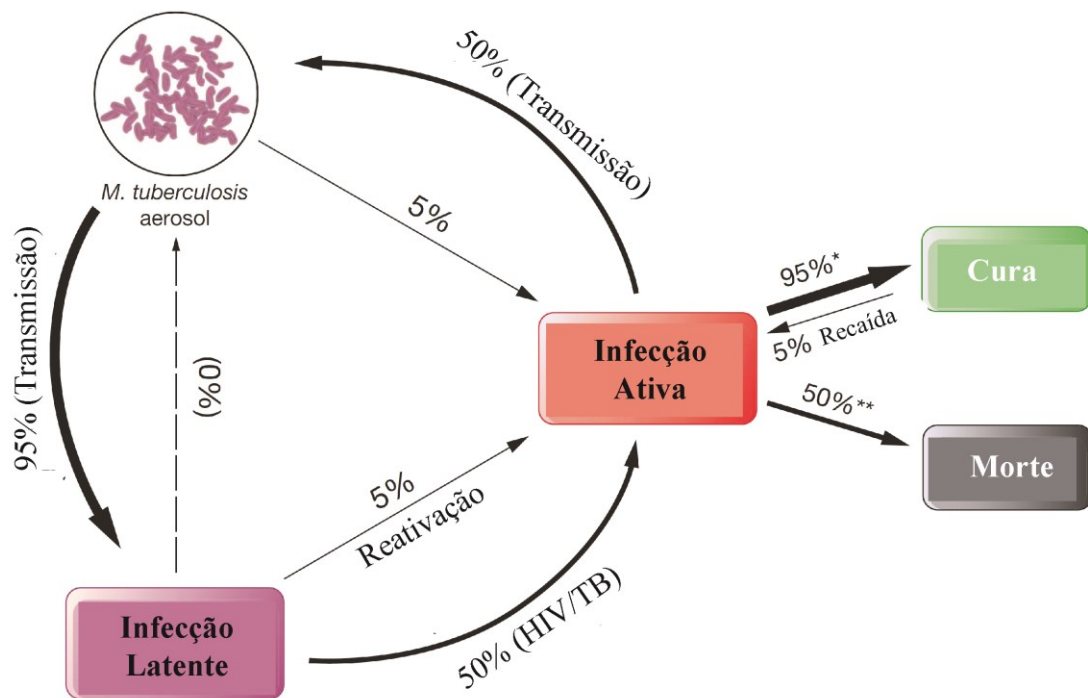


Figura 1.2 Estágios da infecção pelo *M. tuberculosis*. Após a transmissão e contágio via aerossol a TB pode progredir para uma forma da doença denominada TB latente ou para a TB ativa. Uma porção dos indivíduos que desenvolveram a forma latente da infecção anos depois podem sofrer a reativação da doença. A TB latente é comumente reativada por uma imunossupressão como no caso do HIV. Nos casos de cepas susceptíveis* as drogas há cura em 95% dos casos. Se não tratada a TB tem alta taxa de mortalidade**. Figura adaptada de [17].

Após a fagocitose o bacilo pode ser destruído pela ação de enzimas lisossomais e intermediários reativos do oxigênio e nitrogênio sendo os macrófagos o principal constituinte da resposta inata contra a bactéria [22], [13]. Porém, já bem descrito na literatura, o *Mtb* possui mecanismos de evasão desta resposta imune, por exemplo, inibindo a fusão e formação do fagolisossoma [23]. Posteriormente, células dendríticas presentes no parênquima pulmonar fagocitam alguns bacilos e migram para linfonodos adjacentes e apresentam antígenos micobacterianos aos linfócitos T naive, dando início a uma resposta imune adaptativa [24].

A produção de citocinas como IL-12, TNF- α e diversas quimiocinas pelos macrófagos após a infecção, recrutam outras células para o sítio da infecção. Dentre estas células estão neutrófilos, células NK e os linfócitos T auxiliares específicos e

citotóxicos que foram ativados pelas células dendríticas. A citocina IL-12 atua na proliferação dos linfócitos e induz a produção de IFN- γ , que potencializará a atividade microbicida dos macrófagos [25], [26]. A migração desses diversos tipos celulares e a presença de TNF- α , culminará na formação da estrutura celular denominada granuloma, numa tentativa de contenção do patógeno [27].

Para a formação do granuloma, os macrófagos se diferenciam em células epitelióides e se fundem formando células gigantes. Essas células vão circundar os macrófagos infectados, juntamente com alguns neutrófilos e linfócitos, dando origem ao granuloma primário. Com o decorrer da infecção, ocorre a proliferação de fibroblastos que irão encapsular o granuloma primário, dando origem ao granuloma tardio. Por estímulo das células epitelióides da região central, os fibroblastos produzem colágeno e elastina, fortalecendo a estrutura do granuloma [28]. Nessa fase, ocorre a formação de novos vasos sanguíneos, porém, a nutrição só ocorre nas camadas mais externas do granuloma. Este fato contribui para a formação de necrose do tipo caseosa no centro do granuloma, este fenômeno pode facilitar a sobrevivência e disseminação do bacilo, o que torna controversa a formação da granuloma como um mecanismo de proteção do hospedeiro [29], [30]. Esse processo é regulado pela ação de linfócitos T e B que se encontram na periferia do granuloma, formando um halo linfocitário, que modulam a ação dos macrófagos (Figura 1.3) [31], [32].

Os linfócitos T têm a sua maturação final no timo e podem se dividir em vários subtipos celulares de acordo com o tipo de citocina presente no meio. Um desses subtipos são os linfócitos Th1 (do inglês, *T helper*), que são considerados a principal e mais importante resposta na proteção contra microrganismos intracelulares, incluindo o *Mtb* [33]. As células do tipo Th1 estão envolvidas na produção de citocinas importantes e indispensáveis para a ativação de outras células do sistema imune. Uma das citocinas produzidas é o IFN- γ que ativa os macrófagos e células dendríticas, promovendo um aumento da ação microbicida destas células por meio de uma maior produção de IL-12, TNF- α e espécies reativas do oxigênio e nitrogênio [32] – [34].

Outro subtipo de linfócito T que vem se mostrando importante na ativação da resposta imune contra o *Mtb*, são os linfócitos Th17. Este subtipo tem como principal característica produzir e secretar IL-17 e quimiocinas KC/CXCL1 e MIP-2/CXCL2, que

estão diretamente relacionadas ao recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção contribuindo diretamente na formação do granuloma [35].

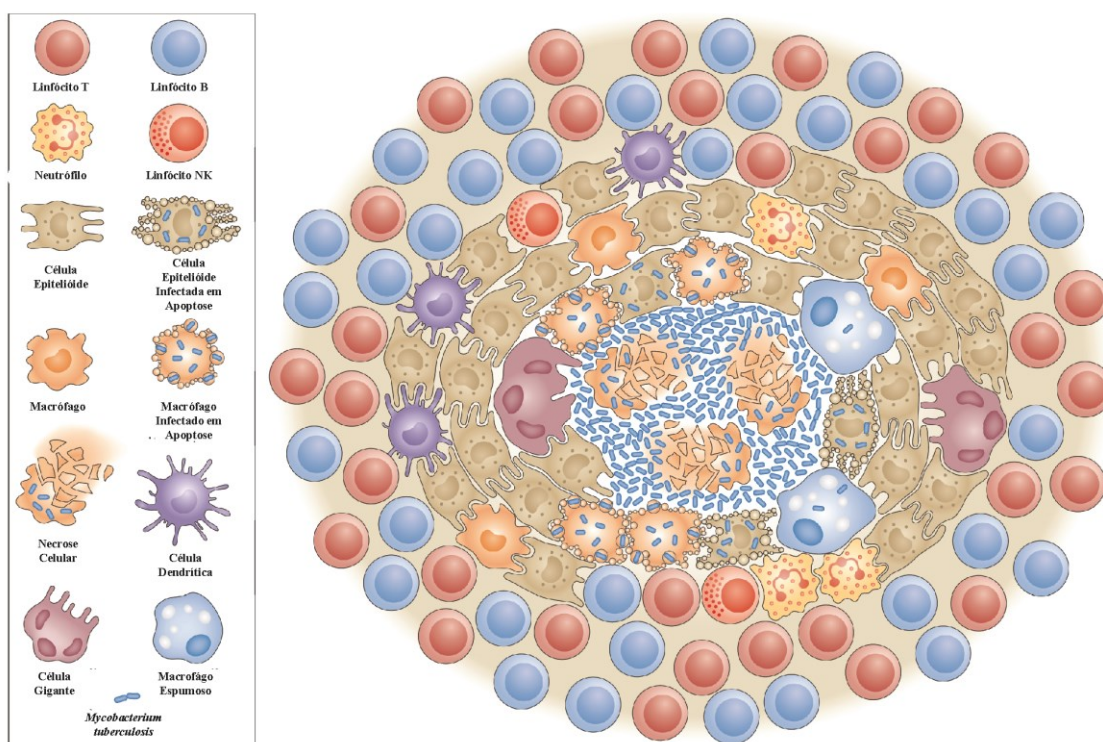


Figura 1.3 Estrutura e composição celular de um granuloma na TB. Adaptado de [31]

1.4 - Epidemiologia

1.4.1 - Epidemiologia Mundial

No início do século XX, a tuberculose já era considerada a doença infectocontagiosa que promovia o maior número de mortes. O melhoramento nas condições de vida durante o decorrer do século, a introdução na década de 40 da antibioticoterapia eficaz, permitiram o controle da tuberculose no mundo desenvolvido. Na década de 70 alguns países como os Estados Unidos, chegaram a acreditar na eliminação da TB [36].

Ao decorrer dos anos houve uma queda contínua da TB nos países industrializados até a década de 80, onde a partir desse período a TB se elevou e depois recuou. Essa condição está relacionada a vários fatores como, a epidemia da Síndrome

da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS), o surgimento de cepas de *Mtb* resistentes aos antimicobacterianos e por problemas políticos e econômicos [37].

Mesmo com essa redução nos casos de TB no mundo, acredita-se que atualmente um terço da população mundial está infectada pelo *Mtb* e com risco de desenvolver a doença. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2013 foram diagnosticados e notificados 9 milhões de novos casos de TB no mundo e 1.5 milhões de mortes. No Brasil o índice anual de TB foi de 70.047 mil novos casos em 2012 situando o país na 17ª posição entre os 22 países responsáveis por 82% do total de tuberculose do mundo. O maior número de casos novos de TB ocorreu na Ásia (58% de casos) e África (27% de casos) e o menor número de casos foram apresentados na região do leste Mediterrâneo (8% de casos), região Européia (4% de casos) e na região das Américas (3% de casos) como demonstrado na Figura 1.4 [1].



Figura 1.4 Mapa mundial demonstrando em verde os 22 países responsáveis por 82% da tuberculose mundial. Adaptado de [1].

1.4.2 - Epidemiologia no Brasil

Estima-se que no Brasil, 57 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Mtb*. No ano de 2012, o Brasil apresentou 70047 novos casos de TB, o que equivale a um coeficiente de incidência de 36.1 casos por 100 mil habitantes [1], [38]. O valor da incidência de TB nos homens (49.6 casos/100000 habitantes) é o dobro em relação às mulheres (24.6 casos/100000 habitantes). A faixa etária mais atingida pela TB no Brasil é a que vai dos 20 aos 49 anos, responsável por cerca de 63% dos casos novos em 2009

[39]. Segundo o Ministério da Saúde [8], em 2012 a região Sudeste apresentou a maior quantidade de casos de TB, e em todos os anos avaliados a região líder nos casos de TB foi a Norte apresentando as maiores taxas de incidência. Em 2011, os estados que apresentaram as maiores taxas de incidência de TB do país foram o Amazonas (65.7) e Rio de Janeiro (57.6), enquanto Goiás (15), Distrito Federal (13.4) e Tocantins (13) as menores [38], [39] como demonstrado na figura 1.5.

TB é uma doença que têm cura e pode ser evitada, porém em 2011 ela foi responsável por 4600 de mortes no Brasil e 1.4 milhões de mortes no mundo. No Brasil a taxa de mortalidade foi de 2.9 óbitos por 100 mil habitantes, apesar do alto índice, o Brasil já alcançou a meta estipulada pela OMS de diminuir pela metade o índice de mortalidade por TB quando comparada com o índice de mortalidade de 1990. A região Sudeste concentrou o maior número de óbitos por TB, mas a líder foi a região Nordeste apresentando as maiores taxas de mortalidade entre os anos de 2001 a 2010. Em 2010, os estados do Rio de Janeiro (5.6 óbitos/100000 habitantes) e de Pernambuco (4.0 óbitos/100000 habitantes) apresentaram as maiores taxa de mortalidade do país, enquanto Goiás (0.8 óbitos/100000 habitantes) e Distrito Federal (0.5 óbitos/100000 habitantes) as menores [38].

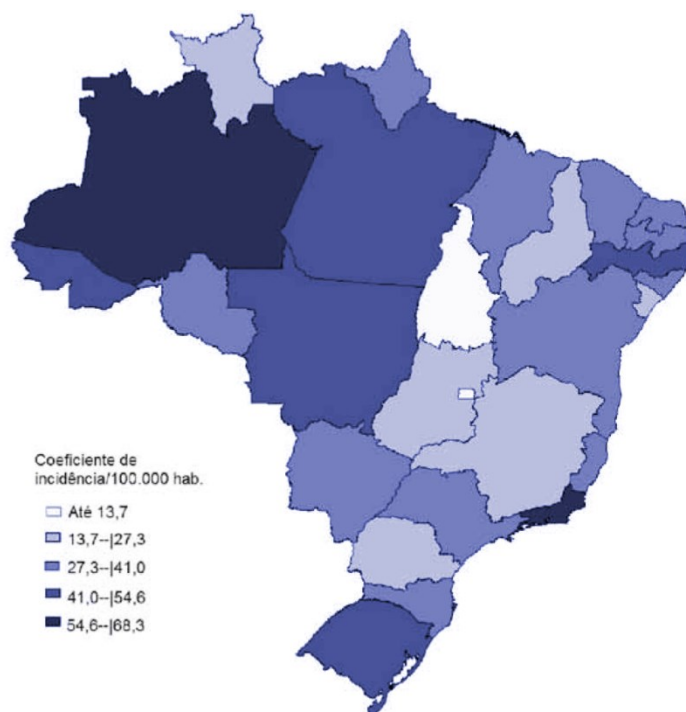


Figura 1.5 Mapa do Brasil, demonstrando o coeficiente de incidência de tuberculose por 100.000 habitantes. Adaptado de [38]

1.5 - Diagnóstico

A detecção precoce do *Mtb* em amostras clínicas torna-se cada vez mais importante no controle da tuberculose, tanto para o tratamento clínico de indivíduos infectados quanto para a identificação de indivíduos expostos [40]. Desde a descoberta do *Mtb* por Robert Koch em 1882, a microbiologia convencional foi o sustentáculo do diagnóstico da TB, principalmente em países de baixa renda. Desde então o mundo científico busca pelo desenvolvimento de testes de diagnósticos para a TB mais confiáveis, sensíveis e rápidos [41], [42].

No Brasil, o diagnóstico presuntivo da TB pode ser realizado em pacientes que procuram os serviços de saúde, apresentando sinais e sintomas respiratórios como tosse, expectoração há mais de três meses e perda de peso. Sendo então necessário confirmação da doença que é alcançada através da baciloscopia e/ou cultura [42] - [44].

Em grande parte do mundo, principalmente em países emergentes como o Brasil, a baciloscopia é o método primário escolhido para o diagnóstico laboratorial da tuberculose. Este método é um exame direto que para o diagnóstico da TB pulmonar. Ele utiliza escarro, lavado brônquico, aspirado traqueal ou gástrico, que depois de fixado e corado é capaz de revelar o *Mtb*. A coloração utilizada na baciloscopia pelos serviços de saúde pública do Brasil é a de Ziehl-Neelsen (ZN) por ser um método simples, seguro, específico e por ter um menor custo. Esta coloração tem princípio baseado na capacidade das micobactérias reterem o corante fucsina após descoloração com álcool-ácido. Visualizados no microscópio óptico, os bacilos da TB, possuem uma morfologia em forma de bastonetes, levemente curvados, corados de vermelho, por estas características são considerados bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) [42], [44]-[46].

Como a baciloscopia possui grande variabilidade na sua sensibilidade, atualmente o exame padrão ouro para o diagnóstico da TB é o isolamento do *Mtb* por cultura. As vantagens do diagnóstico por cultura inclui sua alta acurácia, ter um custo baixo e de apresentar um índice de contaminação menor. As desvantagens estão relacionadas com o crescimento lento do *Mtb*, que acarreta em um prazo de até quatro semanas para o isolamento da bactéria e de oito semanas para a identificação da espécie e realização de teste de sensibilidade aos anti-tuberculínicos. Além disso, a necessidade

de sofisticados métodos de biossegurança, maior infra-estrutura do laboratório e técnicos especializados podem ser citados como dificuldades para se utilizar a cultura como método de diagnóstico [40] - [46].

1.6 - Prevenção

O bacilo de Calmette e Guérin (BCG) é a vacina usada mundialmente na prevenção da TB e é constituída de uma cepa de *Mycobacterium bovis* que foi atenuada através de uma série de passagens em meio contendo batata, bile e glicerol por 13 anos. Essas sucessivas passagens promoveram a atenuação da BCG pela perda de algumas regiões cromossômicas. Uma análise genômica comparativa entre a cepa BCG atenuada e o *Mtb* demonstrou que a BCG tem ausente mais de 100 fases de leituras abertas (do inglês *Open Reading Frame* - ORF). Entre as sequências gênicas perdidas na vacina BCG, estão as regiões de diferenciação (RD) que em sua maioria estão relacionadas a fatores de virulência [47], [48]. Entre as RDs perdidas através da atenuação da BCG, está a RD1. A RD1 está ausente em todas as cepas de BCG e presente em *M. africanum*, *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Esta região têm aproximadamente 9455 pares de bases (pb) e abrange nove ORFs (Rv3871 à Rv3879c). Estas ORFs codificam para proteínas que compõem um complexo de secreção chamado de sistema de secreção tipo VII além do antígeno secretado precocemente de 6 kDa (do inglês: *Early Secreted Antigenic Target 6 kDa* - ESAT-6) e da proteína de filtrado de cultura de 10 kDa (do inglês: *10k Da culture filtrate protein* - CFP-10) [49], [50].

Em 1921, a primeira criança foi imunizada com a BCG desenvolvida por Calmette e Guérin e os ensaios clínicos que se seguiram, na França e na Bélgica, mostraram que a vacina foi muito eficaz na proteção de TB em crianças. Logo depois, as campanhas de vacinação foram implementadas em toda a Europa. Após a Segunda Guerra Mundial, a OMS recomendou a expansão das campanhas de vacinação para fora da Europa. Hoje, a vacina BCG é obrigatória em áreas endêmicas de tuberculose e é a vacina mais utilizada no mundo [47].

O sucesso da BCG é primariamente devido à sua eficácia na prevenção da meningite tuberculosa e tuberculose miliar em crianças. Nestes, casos a vacina tem eficácia girando entre 52 a 100%. Além disso, possui baixo custo de fabricação e pode

ser facilmente utilizada em muitas partes do mundo, incluindo regiões com baixo índice de desenvolvimento. Por outro lado, a eficácia da BCG na prevenção da tuberculose pulmonar ativa em adultos tem sido contestada por vários estudos clínicos, com o menor nível de proteção observado em países com a maior incidência de TB. Nestes casos a vacina tem eficácia muito variável, indo de 0 a 80% [47], [51], [52].

Vários fatores podem contribuir para a variação na eficácia da vacina BCG. Dentre os fatores levantados pela comunidade científica podemos citar a exposição do indivíduo a micobactérias ambientais que influenciariam o efeito da vacina. A perda de genes durante a atenuação da cepa BCG poderia ser outro fator que resultaria na ausência de expressão de antígenos importantes para estimulação da resposta imune protetora. Além disso, a variação gênica das cepas utilizadas para produzir a BCG nos diferentes países podem produzir propriedades antigênicas variadas e diferentes daquela cepa original utilizada por Calmette e Guérin e a própria variação genética das populações em que essa vacina é aplicada pode ser um fator determinante na resposta imune variável à vacinação. Outros fatores como a viabilidade da vacina, dose utilizada, via de administração, estado nutricional do paciente e outras infecções também são apontados como responsáveis pela variação na eficácia da vacina BCG [53]. Neste cenário, os índices epidemiológicos da tuberculose continuam alarmantes e a vacina utilizada atualmente não produz uma resposta protetora eficiente contra a tuberculose pulmonar em jovens e adultos. Sendo assim, surge a necessidade de se desenvolver uma nova vacina com maior capacidade protetora a fim de prevenir a principal forma clínica da doença.

1.6.1 - Novas vacinas contra a TB

Explorando os benefícios da nova tecnologia de vacinas, têm surgido novos métodos para melhorar ou substituir a vacina BCG existente. Isso porque a BCG, que é a única vacina recomendada e autorizada para a proteção contra a TB, apresenta várias limitações já citadas em relação à sua eficácia além do fato de não impedir a reativação da TB latente e ser contraindicada em pacientes infectados pelo HIV ou que apresentem outro tipo de imunodeficiência. Nas últimas décadas, tem sido desenvolvida uma grande quantidade de pesquisas relacionadas à prevenção da TB. Estes estudos focam no

desenvolvimento de uma vacina viva pelo melhoramento de cepas da BCG através de engenharia genética ou na construção de uma vacina de subunidade que possa substituir a BCG, sendo mais segura, por exemplo, quando administrada em pacientes com HIV.

1.6.1.1 - Vacinas micobacterianas vivas

O desenvolvimento de vacinas micobacterianas vivas pode ser realizado por diversas estratégias como, por exemplo, pela atenuação do *Mtb* e modificação genética da BCG inserindo/deletando genes importantes para virulência, imunogenicidade ou que codifiquem outras proteínas que não são expressas por micobactérias [54]. Vacinas bacterianas vivas teriam a vantagem de que muitos antígenos poderiam agir simultaneamente para induzir uma resposta imune mais eficaz. Além disso, é esperado que essas vacinas permaneçam em tecidos por períodos prolongados, possibilitando ao sistema imune maiores chances de apresentação de antígenos, podendo gerar uma memória imunológica eficiente [55]. Tem sido sugerido que a eficiência da BCG poderia ser aumentada com a reintrodução de alguns dos muitos genes que foram perdidos durante a atenuação ou pela super-expressão de proteínas imunodominantes. Por exemplo, em estudos onde foi desenvolvida uma BCG recombinante (rBCG) que super expressava a proteína Antígeno 85A, verificou-se que esta rBCG promoveu uma proteção eficiente no modelo de TB pulmonar em cobaias [56]. No entanto, estas diferentes abordagens são sempre complicadas pelo risco em potencial de aumentar a virulência da cepa vacinal, possível indução de doença mediante situações de imunossupressão e nenhum dos mutantes testados até agora promoveram níveis de proteção maiores do que a BCG em animais [54], [57]. Assim é necessária uma nova abordagem na recombinação de cepas de BCG, visando genes diferentes envolvidos com a virulência e metabolismo destas bactérias, tornando a vacinação mais segura para pacientes imunocomprometidos, até mesmo aumentando a imunogenicidade e proteção gerada pela BCG.

1.6.1.2 - Vacinas de subunidades

A estratégia de desenvolvimento de vacinas de subunidade é uma tecnologia moderna que apresenta algumas vantagens sobre o uso de vacinas vivas. Dentre essas vantagens, os quesitos de segurança e facilidade de padronização/produção reprodutível seriam os principais. Vacinas de subunidade são baseadas no pressuposto de que apenas alguns antígenos do patógeno são suficientes para induzir e manter uma resposta imune protetora. A partir de 1988, o sequenciamento do genoma do *Mtb* foi um importante recurso para auxiliar na busca de proteínas candidatas para vacinas dentre os aproximadamente 4000 genes anotados [54].

Entre os estudos realizados com proteínas do *Mtb* podemos citar como promissores, a vacina de subunidade proteica contendo os antígeno 85B e ESAT-6. Esta construção foi segura e eficaz na proteção contra o *Mtb* em modelos animais, incluindo primatas não humanos, além de induzir uma resposta imune forte e persistente do tipo Th1 antígeno-específico [58]. Outros trabalhos mostraram a eficácia em modelo animal e estudos clínicos das vacinas M72/AS01, M72/AS02 e Mtb72F, compostas pela fusão dos de dois antígenos do *Mtb* juntamente com diferentes adjuvantes. Os antígenos que compõe estas vacinas são a proteína Mtb32a, uma protease codificada pelo gene Rv0125 e a proteína Mtb39a (Rv1196) uma proteína da família PPE de serino $\alpha\beta$ -hidrolases com função ainda por ser determinada. Os resultados são esperançosos, pois mostraram um bom nível de segurança utilizando esta construção juntamente com uma boa resposta humoral e celular, sendo que ambas as respostas imunes permaneceram por seis meses após a última dose. Algumas já estão em testes clínicos em humanos, como a M72/AS02 que atualmente está em ensaios clínicos de fase II, realizados na África do Sul e Gâmbia [59] – [64].

1.7 - Tratamento

A tuberculose é uma doença que pode apresentar cura em até 95 % dos casos sensíveis aos anti-tubercúlicos, desde que as medidas básicas da terapia com os fármacos sejam obedecidos. Estas medidas envolvem a adequada associação dos medicamentos, administração de doses apropriadas e o uso por um tempo ininterrupto de seis meses, evitando assim, a persistência da bactéria e a disseminação de cepas

resistentes aos anti-tuberculínicos. O tratamento dos pacientes bacilíferos é a prioridade no controle da tuberculose, pois esta medida consegue interromper o ciclo de transmissão da doença. No Brasil o tratamento atual da TB é realizado com doses fixas e combinadas de 150 mg de rifampicina, 75 mg de isoniazida, 400 mg de pirazinamida e 275 mg de etambutol nos 2 primeiros meses, chamada fase de ataque. Após esta primeira fase, se indica o uso de 150 mg de rifampicina e 75 mg de isoniazida nos 4 meses seguintes, chamada de fase de manutenção [65], [66]. Contudo, o longo período de tratamento, os graves efeitos colaterais da combinação de múltiplas drogas e principalmente o surgimento de cepas multirresistentes vem se tornando um obstáculo no tratamento da TB.

1.7.1 - MDR-TB

Linhagens de *Mtb* resistentes a múltiplas drogas (MDR-TB) já são comuns em todo mundo, só em 2012, estima-se cerca de 450 mil novos casos [1]. Com o surgimento de cepas resistentes às drogas de primeira linha têm que se recorrer a drogas de segunda linha, mais dispendiosas e com efeitos colaterais graves, fatores que muitas vezes impedem o tratamento eficaz da doença. Contudo, em vários países já foram isoladas cepas extensivamente resistentes (XDR-TB), resistentes às drogas de primeira e segunda linha (Figura 1.6). Quando isso ocorre não se tem muitas alternativas para o tratamento e na maioria dos casos, como agravante, essas cepas são isoladas em pacientes com HIV [67]. O surgimento da TB na sua forma resistente é fator de grande preocupação, não só pela possibilidade da disseminação de cepas multirresistentes, como também pelas dificuldades de se estabelecer esquemas terapêuticos eficazes e efetivos para o controle da doença. Com o surgimento, em 1981, da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida, vem-se observando, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, um crescente número de casos notificados de tuberculose com surgimento das cepas resistentes a múltiplas drogas. Por isso, se torna cada vez mais necessário o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da tuberculose.

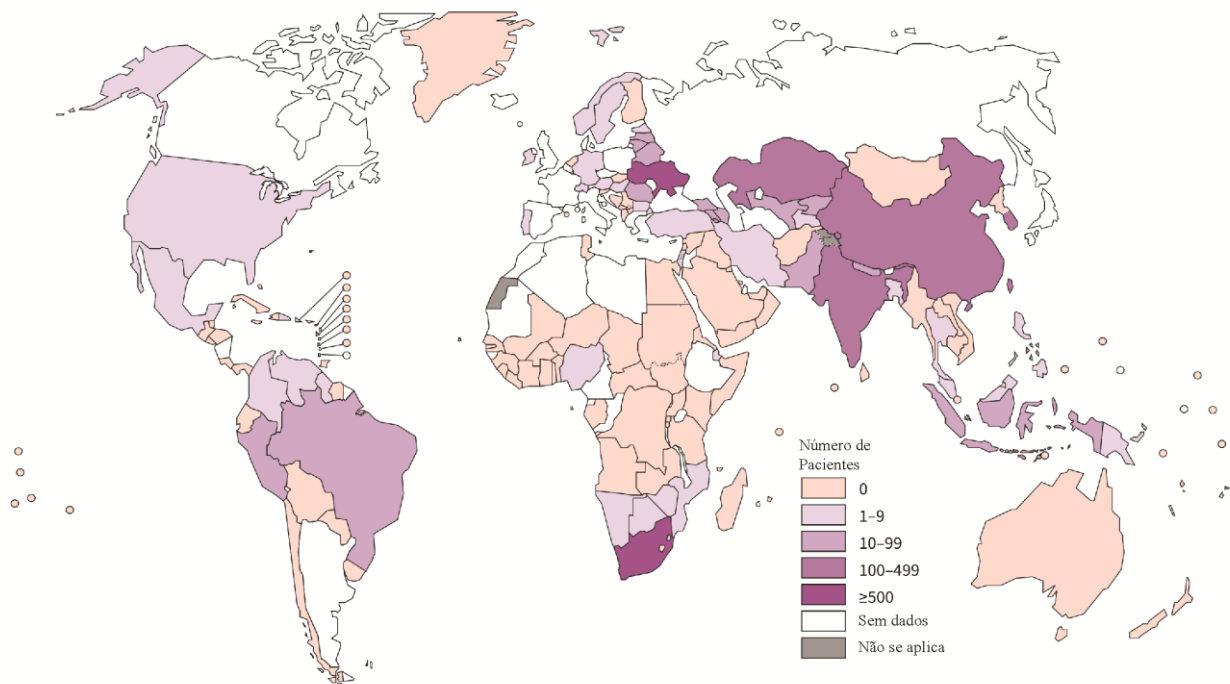


Figura 1.6 Número de pacientes em tratamento com confirmação laboratorial de XDR-TB. Adaptado da referência [1].

1.7.2 - Desenvolvimento de novas drogas

Nos últimos anos, a epidemia de TB tem ganhado impulso com o surgimento de cepas MDR-TB e XDR-TB, em contrapartida temos cada vez menos opções de tratamento, área onde os avanços estão há décadas em atraso. A última droga com um novo mecanismo de ação aprovada para o tratamento da TB foi a rifampicina, descoberta em 1963. Além do número de medicamentos, alta dosagem e longo tempo do tratamento, outro importante obstáculo no tratamento da TB está na co-administração de algumas drogas disponíveis para o tratamento da TB com certos medicamentos anti-HIV e outros usados no controle da diabetes. Essa interação medicamentosa, por vezes diminui a eficácia do tratamento como no caso da co-infecção TB/HIV onde a rifampicina aumenta a atividade do complexo CYP450 levando a maior metabolização e decréscimo das concentrações terapêuticas dos medicamentos anti-HIV.

Assim, a pesquisa por novas drogas anti-TB vem buscando novos alvos para suprir as deficiências do tratamento convencional. É desejado que uma nova droga tenha um alvo diferente dos medicamentos já disponíveis, com intuito de evitar a

resistência cruzada e ser uma opção no tratamento de cepas multirresistentes. Outras dificuldades no tratamento poderiam ser amenizadas com drogas que encurtassem o período de tratamento, diminuísse a quantidade de doses e de combinações de medicamentos além de não interferir no metabolismo das drogas utilizadas no tratamento do HIV e diabetes.

Os avanços na identificação de novos alvos para drogas no tratamento da tuberculose têm sido amplamente dirigidos pela disponibilidade da sequência genômica do *M. tuberculosis*. Dentre os compostos que já estão em fase de testes clínicos, os principais alvos são inibidores da síntese proteica, drogas que agem na parede celular, inibidores de DNA girase e ATP sintase. Com isso, a nossa linha de pesquisa visa à identificação e caracterização de novos alvos potenciais para a quimioterapia da tuberculose, visto que os tratamentos convencionais vêm perdendo sua eficácia. As proteases são o principal enfoque da nossa pesquisa, uma vez que participam de processos biológicos fundamentais para a viabilidade e virulência de patógenos [17].

Referências Bibliográficas

1. WHO | Global tuberculosis report 2014. WHO.
2. **Napoli AER, Mendes FDR, Lino CMG, Dias HCR, Reis LGP, Reis LFA, Dias A.** 2011. Tuberculose urogenital: um diagnóstico desafiador. *Comun. ciênc. saúde* **22**:11–20.
3. **Rosemberg J.** 1999. Tuberculose - Aspectos históricos, realidades, seu romantismo e transculturação.
4. **Daniel TM.** 2000. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **4**:395–400.
5. **Couto Sant’Anna C, Mourgues LV, Ferrero F, Balanzat AM.** 2002. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children: an updated review of an old problem. *Jornal de Pediatria* **78**:205–214.
6. **Daniel TM.** 2006. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine* **100**:1862–1870.
7. **Maciel M de S, Mendes PD, Gomes AP, Siqueira-Batista R.** 2012. A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria. *Rev. Soc. Bras. Clín. Méd* **10**.

8. **Sant'Anna CC.** 2002. Tuberculose na infância e na adolescência. Atheneu, São Paulo.
9. **Leite CQF, Telarolli Junior R.** 1997. Aspectos epidemiológicos e clínicos da tuberculose. Rev. ciênc. farm **18**:17–28.
10. **Ellis SDP, Carthy ER.** 2013. Book Review: The New Paradigm of Immunity to Tuberculosis. Front Immunol **4**.
11. **Stanley SA, Cox JS.** 2013. Host-pathogen interactions during *Mycobacterium tuberculosis* infections. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **374**:211–241.
12. Publicações. Portal da Saúde – Ministério da Saúde – www.saude.gov.br.
13. **Raja A.** 2004. Immunology of tuberculosis. Indian J. Med. Res. **120**:213–232.
14. **Collins HL, Kaufmann SH.** 2001. The many faces of host responses to tuberculosis. Immunology **103**:1–9.
15. **Wayne LG.** 1994. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **13**:908–914.
16. **Lin PL, Flynn JL.** 2010. Understanding Latent Tuberculosis: A Moving Target. J Immunol **185**:15–22.
17. **Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K.** 2011. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. Nature **469**:483–490.
18. **Aderem A, Underhill DM.** 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. Annu. Rev. Immunol. **17**:593–623.
19. **Doherty TM, Arditi M.** 2004. TB, or not TB: that is the question -- does TLR signaling hold the answer? J. Clin. Invest. **114**:1699–1703.
20. **Ernst JD.** 1998. Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. **66**:1277–1281.
21. **Andersen P.** 2007. Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. Trends Microbiol. **15**:7–13.
22. **Nicholson S, Bonecini-Almeida M da G, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie QW, Mumford R, Weidner JR, Calaycay J, Geng J, Boechat N, Linhares C, Rom W, Ho JL.** 1996. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. J. Exp. Med. **183**:2293–2302.
23. **Deretic V, Singh S, Master S, Harris J, Roberts E, Kyei G, Davis A, de Haro S, Naylor J, Lee H-H, Vergne I.** 2006. *Mycobacterium tuberculosis* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. Cell. Microbiol. **8**:719–727.

24. **Ernst JD.** 2012. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* **12**:581–591.
25. **Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A, Jamieson A, Juarrero MG, Diefenbach A, Raullet DH, Turner J, Orme IM.** 2003. NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J. Immunol.* **171**:6039–6045.
26. **Sano K, Haneda K, Tamura G, Shirato K.** 1999. Ovalbumin (OVA) and *Mycobacterium tuberculosis* bacilli cooperatively polarize anti-OVA T-helper (Th) cells toward a Th1-dominant phenotype and ameliorate murine tracheal eosinophilia. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**:1260–1267.
27. **Ulrichs T, Kaufmann SHE.** 2006. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J. Pathol.* **208**:261–269.
28. **Wangoo A, Johnson L, Gough J, Ackbar R, Inglut S, Hicks D, Spencer Y, Hewinson G, Vordermeier M.** 2005. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *J. Comp. Pathol.* **133**:223–234.
29. **Dannenbergh AM.** 1991. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol. Today* **12**:228–233.
30. **Saunders BM, Cooper AM.** 2000. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol. Cell Biol.* **78**:334–341.
31. **Ramakrishnan L.** 2012. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat. Rev. Immunol.* **12**:352–366.
32. **Flynn JL, Chan J.** 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **19**:93–129.
33. **Schluger NW.** 2001. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir. Res.* **2**:157–163.
34. **Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR.** 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* **175**:1111–1122.
35. **Cooper AM, Khader SA.** 2008. The role of cytokines in the initiation, expansion, and control of cellular immunity to tuberculosis. *Immunol. Rev.* **226**:191–204.
36. **Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, Geiter LJ, Horsburgh CR, Good**

- RC.** 1993. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* **31**:767–770.
37. **Monteiro CA.** 1995. Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças. Editora Hucitec.
38. **Júnior JBS.** SVS/MS 2013 Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico, março 2012.
39. Publicações. Portal da Saúde – Ministério da Saúde – www.saude.gov.br.
40. **Carpentier E, Drouillard B, Dailloux M, Moinard D, Vallee E, Dutilh B, Maugein J, Bergogne-Berezin E, Carbonnelle B.** 1995. Diagnosis of tuberculosis by Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test: a multicenter study. *J Clin Microbiol* **33**:3106–3110.
41. **Weyer K, Carai S, Nunn P.** 2011. Viewpoint TB Diagnostics: What Does the World Really Need? *J Infect Dis.* **204**:S1196–S1202.
42. **Ferreira AA de A, Queiroz KC de S, Torres KP, Ferreira MÂF, Accioly H, Alves M do SCF.** 2005. Os fatores associados à tuberculose pulmonar e a baciloscopia: uma contribuição ao diagnóstico nos serviços de saúde pública. *Revista Brasileira de Epidemiologia* **8**:142–149.
43. **Bento J, Silva AS, Rodrigues F, Duarte R.** 2011. Métodos diagnósticos em tuberculose. *Acta Med Port* **24**:145–154.
44. Publicações. Portal da Saúde – Ministério da Saúde – www.saude.gov.br.
45. **Ramsay A, Harries AD.** 2009. The clinical value of new diagnostic tools for tuberculosis. *F1000 Med Rep* **1**.
46. **Michelon CT.** 2008. Detecção do DNA de *Mycobacterium tuberculosis* através de hibridização em microplacas.
47. **Delogu G, Fadda G.** 2009. The quest for a new vaccine against tuberculosis. *The Journal of Infection in Developing Countries* **3**.
48. **Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST.** 2002. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol. Microbiol.* **46**:709–717.
49. **Meher AK, Bal NC, Chary KVR, Arora A.** 2006. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ESAT-6-CFP-10 complex formation confers thermodynamic and biochemical stability. *FEBS J.* **273**:1445–1462.
50. **Majlessi L, Brodin P, Brosch R, Rojas M-J, Khun H, Huerre M, Cole ST, Leclerc C.** 2005. Influence of ESAT-6 secretion system 1 (RD1) of

- Mycobacterium tuberculosis* on the interaction between mycobacteria and the host immune system. *J. Immunol.* **174**:3570–3579.
51. **Centers for Disease Control (CDC)**. 1988. Use of BCG vaccines in the control of tuberculosis: a joint statement by the ACIP and the Advisory Committee for Elimination of Tuberculosis. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **37**:663–664, 669–675.
 52. **Tidjani O, Amedome A, ten Dam HG**. 1986. The protective effect of BCG vaccination of the newborn against childhood tuberculosis in an African community. *Tubercle* **67**:269–281.
 53. **Kaufmann SHE**. 2005. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends in Immunology* **26**:660–667.
 54. **Andersen P**. 2001. TB vaccines: progress and problems. *Trends Immunol.* **22**:160–168.
 55. **Andersen P, Doherty TM**. 2005. The success and failure of BCG — implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nat Rev Micro* **3**:656–662.
 56. **Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maslesa-Galic' S**. 2000. Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**:13853–13858.
 57. **Da Costa AC, Nogueira SV, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP**. 2014. Recombinant BCG: innovations on an old vaccine. Scope of BCG strains and strategies to improve long-lasting memory. *Front. Immunol.* **5**:152.
 58. **Weinrich Olsen A, van Pinxteren LA, Meng Okkels L, Birk Rasmussen P, Andersen P**. 2001. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85b and esat-6. *Infect. Immun.* **69**:2773–2778.
 59. **Reed SG, Coler RN, Dalemans W, Tan EV, Cruz ECD, Basaraba RJ, Orme IM, Skeiky YAW, Alderson MR, Cowgill KD, Prieels J-P, Abalos RM, Dubois M-C, Cohen J, Mettens P, Lobet Y**. 2009. Defined tuberculosis vaccine, Mtb72F/AS02A, evidence of protection in cynomolgus monkeys. *PNAS* **106**:2301–2306.
 60. **Day CL, Tameris M, Mansoor N, van Rooyen M, de Kock M, Geldenhuys H, Erasmus M, Makhethhe L, Hughes EJ, Gelderbloem S, Bollaerts A, Bourguignon P, Cohen J, Demoitié M-A, Mettens P, Moris P, Sadoff JC,**

- Hawkridge A, Hussey GD, Mahomed H, Ofori-Anyinam O, Hanekom WA.** 2013. Induction and regulation of T-cell immunity by the novel tuberculosis vaccine M72/AS01 in South African adults. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188**:492–502.
61. **Thacher EG, Cavassini M, Audran R, Thierry A-C, Bollaerts A, Cohen J, Demoitié M-A, Ejigu D, Mettens P, Moris P, Ofori-Anyinam O, Spertini F.** 2014. Safety and immunogenicity of the M72/AS01 candidate tuberculosis vaccine in HIV-infected adults on combination antiretroviral therapy: a phase I/II, randomized trial. *AIDS* **28**:1769–1781.
62. **Leroux-Roels I, Forgue S, De Boever F, Clement F, Demoitié M-A, Mettens P, Moris P, Ledent E, Leroux-Roels G, Ofori-Anyinam O, M72 Study Group.** 2013. Improved CD4⁺ T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* in PPD-negative adults by M72/AS01 as compared to the M72/AS02 and Mtb72F/AS02 tuberculosis candidate vaccine formulations: a randomized trial. *Vaccine* **31**:2196–2206.
63. **Jaime Montoya JAS.** 2013. A Randomized, Controlled Dose-Finding Phase II Study of the M72/AS01 Candidate Tuberculosis Vaccine in Healthy PPD-Positive Adults. *Journal of clinical immunology*.
64. **Von Eschen K, Morrison R, Braun M, Ofori-Anyinam O, De Kock E, Pavithran P, Koutsoukos M, Moris P, Cain D, Dubois M-C, Cohen J, Ballou WR.** 2009. The candidate tuberculosis vaccine Mtb72F/AS02A: Tolerability and immunogenicity in humans. *Hum Vaccin* **5**:475–482.
65. **Sanchez DA, Rodrigues OMM, Rocha JL, Trajman A.** MS/PNCT 2011 Ministério da Saúde, Programa Nacional de Controle da Tuberculose maio 2011. Recomendações para o controle da tuberculose, Guia rápido para profissionais de saúde.
66. **Kritski AL, Junior AGR, Netto AR, Durovni B, Sant’Anna CC, Lima DS, Barreira D, Filho ETV, Melo FF, Filho GG, Braga JU, Jamal L, Conde M, Dalcolmo MMP, Penna ML, Cardoso NC, Rodrigues R, Hallal R, Pereira SM, Rolla VC.** MS/SVS/PNCT 2010 Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de Controle da Tuberculose 2010. Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil.
67. WHO | Global tuberculosis control 2011. WHO.

Capítulo 2

Proteases

As proteases são enzimas que estão envolvidas na hidrólise das ligações peptídicas de proteínas ou de fragmentos peptídicos causando modificações de seus substratos com consequências importantes para os sistemas biológicos, sendo amplamente distribuídas na natureza. Elas podem ser consideradas potenciais alvos terapêuticos devido às suas importantes funções nos ciclos de vida dos parasitos, envolvidas no seu metabolismo e diferenciação, assim como em muitos aspectos da interação do parasito com o seu hospedeiro. No *Mtb* há mais de 100 genes que codificam proteases, porém poucos já foram estudados. Contudo, estudos de alguns destes genes demonstram a importância dessas enzimas e seu potencial como alvos para novas drogas anti-TB e construção de novas vacinas. Iremos sumarizar, de acordo com a natureza química de seu sitio catalítico, o estudo de algumas destas proteases.

2.1 - Nomenclatura e classificação

As proteases, também chamadas de peptidases, são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas e cadeias polipeptídicas [1]. Essas enzimas estão presentes em todos os sistemas biológicos, desde vírus até os eucariotos superiores, sendo essenciais para a homeostase celular além de desempenharem um papel fundamental na regulação de diversos processos biológicos como digestão, coagulação sanguínea, processamento hormonal, processamento de precursores relacionados à síntese de colágeno, renovação proteica, morte celular programada dentre outros processos biológicos [2], [3].

Como produto biotecnológico, as peptidases são utilizadas em vários processos industriais como na produção de detergentes, na indústria alimentícia e também na indústria farmacêutica. Visando desenvolver tecnologias que não agridam o meio ambiente, o tratamento de couro e processos de biorremediação vem sendo desenvolvidos com a utilização de proteases. Estas enzimas também são usadas extensivamente na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de medicamentos, como exemplo podemos citar o Botox®. Os métodos de produção são variados, proteases que são utilizadas na indústria alimentícia e na fabricação de detergentes são preparadas em grandes quantidades e usadas como preparações brutas, enquanto aquelas que são usadas na medicina são produzidas em pequenas quantidades, exigindo extensa purificação antes de serem utilizadas [4].

De acordo com o ponto da cadeia peptídica onde exercem sua ação catalítica, as enzimas proteolíticas podem ser classificadas como exopeptidases ou endopeptidases [5], [6] (Figura 2.1). As exopeptidases catalisam a clivagem de seus substratos a partir de suas extremidades. Carboxipeptidases clivam resíduos na porção carboxi-terminal e as aminopeptidases realizam a catálise na extremidade amino-terminal da cadeia polipeptídica [7]. As endopeptidases, também chamadas de proteinases, catalisam a clivagem de ligações peptídicas entre resíduos de aminoácidos internos de uma cadeia polipeptídica [8]. Contudo, algumas peptidases possuem tanto atividade exopeptídica quanto endopeptídica. Existem também as omega-peptidases, que não necessitam de um resíduo livre N- ou C-terminal do substrato. Elas hidrolisam peptídeos ou dipeptídeos que são ligados por pontes isopeptídicas em ambas as extremidades, como exemplo, as piroglutamil peptidases e ubiquitinil hidrolases [9].

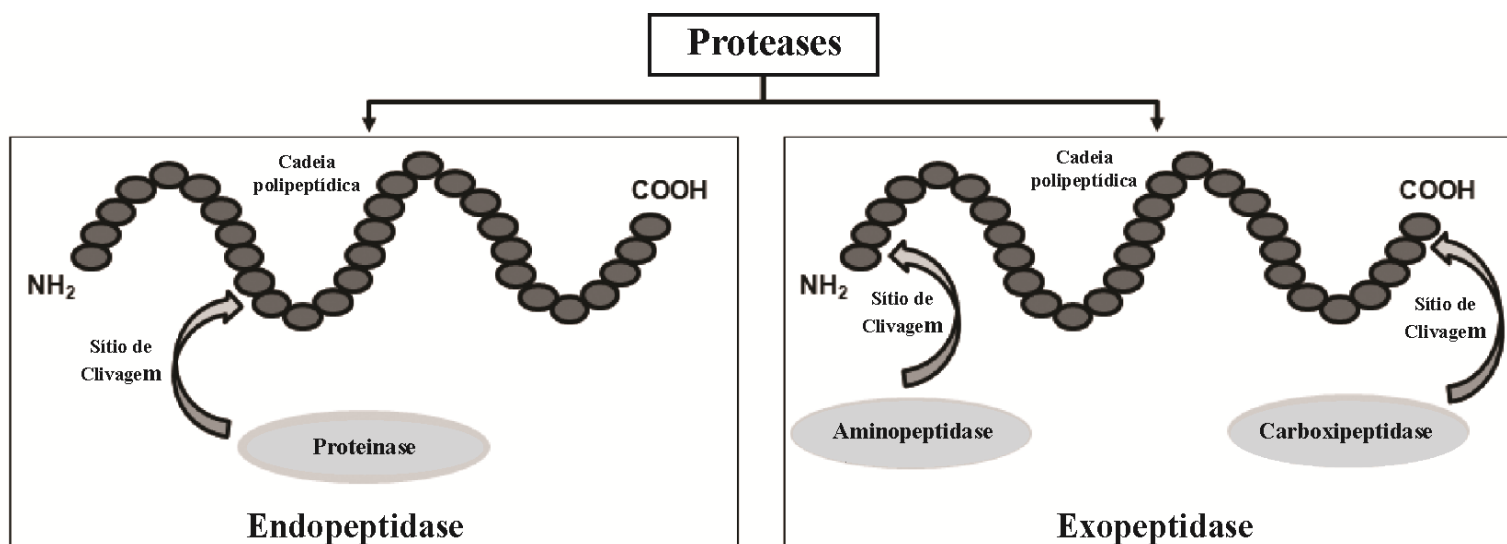


Figura 2.1 Esquema de classificação das proteases de acordo com local onde clivam a cadeia peptídica.

As peptidases também podem ser classificadas quanto à sua especificidade pelo substrato, seu mecanismo catalítico e suas relações evolutivas [10]. Dois sistemas para a classificação das enzimas proteolíticas estão sendo usados: o sistema EC (Enzyme Commission) da IUBMB (Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) e o sistema MEROPS de famílias e clãs de peptidases [11]. No sistema EC, as enzimas estão divididas em seis classes: (1) Oxidoredutases, (2) Transferases, (3) Hidrolases, (4) Liases, (5) Isomerases e (6) Ligases. As peptidases são classificadas como hidrolases e formam a subclasse 3.4 [11].

Levando em conta o mecanismo catalítico, que está relacionado ao principal resíduo funcional do grupo químico envolvido no processo de hidrólise da ligação peptídica, as proteases eram classificadas como aspártico-proteases, cisteíno-proteases, serino-proteases ou metalo-proteases (Figura 2.2) [12], [13]. Atualmente, existem nove tipos de proteases dentro desta forma de classificação. Os tipos das treonino-proteases [14], das glutâmico-proteases [15] e das asparargino-proteases foram adicionados recentemente, juntamente com o grupo de peptidases de processo catalítico desconhecido e o daquelas que apresentam mecanismo misto. Além disso, o sistema EC relaciona a especificidade do substrato com o mecanismo catalítico [10].

O sistema MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) de classificação de peptidases foi desenvolvido em 1993 [16] e publicado em 1996 como um banco de dados na rede mundial de computadores [17]. Nele, as proteases são identificadas, classificadas e distribuídas de forma hierárquica em clãs e famílias, baseado na relação evolutiva e na estrutura das enzimas [16]. Cada peptidase possui um código identificador que começa com uma letra indicadora do tipo catalítico da enzima (A: aspártico, C: cisteíno, G: glutâmico, M: metalo, N: asparargino, S: serino, T: treonino, U: desconhecido ou P: misto). O identificador do clã é complementado por uma segunda letra adicional, escrita em sequência (Ex: clã MA). O identificador da família é complementado por um número (Ex: família M1). No banco de dados do MEROPS, o identificador de cada protease começa com o identificador da família e é completado com um número decimal (Ex: M08.001) [17].

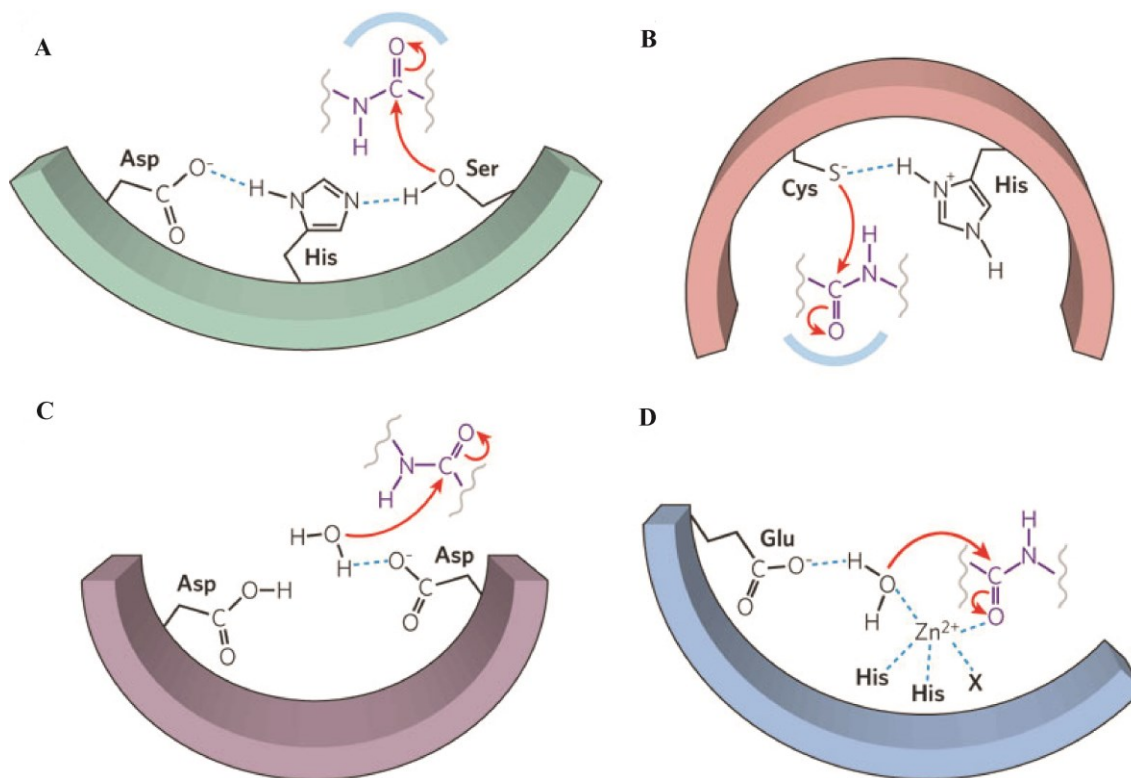


Figura 2.2 Mecanismo catalítico das principais classes de proteases. (A) Serino-proteases, (B) Cisteíno-proteases, (C) Aspártico-proteases e (D) Metalo-proteases. [13]

2.2 - Serino-proteases

O grupo das serino-proteases é o mais estudado dentre as proteases, estas enzimas se caracterizam por conter um resíduo de serina no sítio ativo [18]. Nelas, o

ataque nucleofílico à ligação peptídica se inicia pelo resíduo de serina do sítio ativo, formando-se um éster como intermediário covalente. A tríade catalítica característica das serino-proteases é formada pelas cadeias laterais dos resíduos de serina, histidina e aspartato (Figura 2.2A). As maiores famílias desta classe são a S1, a S8 e a S9, representadas pela quimotripsina, subtilisina e prolil oligopeptidase, respectivamente. Elas apresentam atividade máxima em ambientes com pH neutro ou levemente alcalino e são inibidas por Diisopropilfluorofosfato (DFP). Muitas apresentam sensibilidade a Fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), aprotinina, n- α -Tosil-L-Lisina clorometil cetona (TLCK) e n- α -Tosil-L-Fenilalanina clorometil cetona (TPCK) [19]. A família S1 é formada por enzimas proteolíticas envolvidas nos processos digestivos de mamíferos, como a tripsina, a quimotripsina e a elastase. Outras enzimas que participam da cascata de coagulação sanguínea e do sistema complemento estão incluídas nesta família [20]. A família S8 é composta por enzimas bacterianas, como a subtilisina, e por peptidases relacionadas encontradas em fungos, plantas e animais [20]. Elas têm papel no processamento de peptídeos sinalizadores como os hormônios adrenocorticotrópicos humanos [10]. As serino-proteases também participam de vários outros processos fisiológicos e patológicos. Por exemplo, o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) está envolvido em processos importantes como dissolução de coágulos sanguíneos, remodelamento da matriz extracelular, angiogênese, cicatrização de feridas, invasão de tumor e metástase [21].

2.2.1 - Serino-proteases no *Mtb*

2.2.1.1 - ClpP1/P2: *Caseinolytic protease*

As Clp proteases (ClpP) são enzimas altamente conservadas e estão presentes em uma ampla gama de bactérias bem como em plantas e mamíferos. Estas proteínas contribuem para homeostase celular e participam em um mecanismo controle de qualidade pela degradação de proteínas más enoveladas e agregados proteicos que podem ser tóxicos. A degradação de proteínas não funcionais é útil para proteção da célula, mas também serve como uma via eficiente de reciclagem de recursos que são limitados. Além disso, as Clp proteases desempenham papel em vários processos regulatórios via proteólise controlada de proteínas regulatórias chave. A holoenzima Clp é estruturalmente similar ao complexo 26s do proteassoma eucariótico, composta por uma subunidade catalítica e uma regulatória. O *Mtb* possui duas subunidades ClpP, a

ClpP1 e ClpP2, ambas essenciais para o crescimento e virulência. O componente proteolítico central do complexo é formado por dois discos heptaméricos sobrepostos, compostos pelas proteínas ClpP1 e ClpP2. Porém as proteínas ClpP sozinhas possuem atividade limitada, assim elas se unem a Clp ATPases formando o complexo de degradação proteica ativa. [22] – [28]

2.2.1.2 - Hip1: *Hydrolase important for pathogenesis 1*

Hip1 é uma proteína imunomodulatória chave que previne a ativação de macrófagos seguida da infecção pelo *Mtb* e também controla o início e a magnitude da resposta pró-inflamatória induzida pela bactéria. Esta estratégia de atenuação das respostas pró-inflamatórias precoces pode ser vantajosa para o patógeno, permitindo-lhe escapar da detecção pelo sistema imune. Além disso, a Hip1 do *Mtb* e seu ortólogo em *M. smegmatis* são importantes para manter a integridade do envelope celular e conferir resistência a estresses dirigidos à parede bacteriana. Hip1 possui a tríade catalítica S228, D463, H490, presente nos membros da família de alfa\beta hidrolases, incluindo esterases, lipases e proteases. Contudo, a presença de 11 resíduos de cisteína e 5 possíveis ligações dissulfeto dentro da proteína, tornam esforços para purificar e caracterizar esta proteína complicados. Alguns estudos mostraram que Hip1 é uma serino-protease com atividade contra proteínas e peptídeos. No *Mtb* a proteína GroEL2, que codifica uma chaperona com atividade imunomoduladora, é um dos substratos da protease Hip1. Curiosamente, a clivagem de GroEL2 pela enzima Hip1, converte esta proteína uma de forma multimérica para uma forma monomérica. Assim, no *Mtb* mutante para Hip1 a proteína GroEL2 permanece não clivada causando atenuação desta cepa. A expressão ectópica de monómeros GroEL2 clivados dentro da cepa mutante Hip1 restaura os níveis de citocinas produzidas em macrófagos infectados. Desta forma, a proteólise de substratos específicos pela proteína Hip1 é um novo mecanismo regulatório que auxilia o *Mtb* responder à mudanças do sistema imune do hospedeiro durante a infecção. [29] – [32]

2.2.1.3 - HtrA: *high-temperature requirement A serine protease*

As proteases HtrA formam uma família de serino-proteases presente em quase todas formas de vida, incluindo humanos. Essa família de proteases é responsável pela

manutenção do proteoma de células pela degradação de proteínas com dobramento incorreto, de proteínas provenientes de lesões de membranas e também podem agir como chaperonas. A estrutura das HtrA proteases é bem similar e composta por um domínio catalítico altamente conservado e um domínio PDZ de interação proteína-proteína que facilita a ligação com o substrato. Apesar de apresentarem estrutura similar, as funções e substratos das HtrA são diversificados e dependem não dos domínios conservados, mas de diferentes conformações de outros domínios que compõem o sítio catalítico. Em várias espécies de bactérias os genes *htrA* foram descritos como importantes na viabilidade e com papel na virulência. O genoma do *Mtb* codifica três proteases que pertencem à família das HtrA serino-proteases importantes na fisiologia e patogenicidade, são elas a HtrA1 (Rv1223), HtrA2 (Rv0983) e HtrA3 (Rv0125). O gene *htrA1* é essencial para o *Mtb* e a proteína HtrA1 é encontrada em frações da membrana. As proteínas HtrA2 e HtrA3 podem estar também ligadas a membrana celular e há evidências de que seriam secretadas. O gene *htrA2* apesar de não essencial é importante para a virulência da bactéria, já que cepas nocautes mostraram-se atenuadas em modelo murinho de infecção. Contudo, a deleção do gene *htrA3* parece não alterar o fenótipo da cepa mutante. Visto isso, drogas que agiriam nas proteínas HtrA1 e HtrA2 poderiam ser promissoras no tratamento da tuberculose. [33] – [37]

2.2.1.4 - LepB: *the sole type I signal peptidase*

Várias proteínas bacterianas desempenham suas funções tanto dentro do envelope celular quanto no ambiente extracelular, para isso, elas precisam ser direcionadas do local onde são sintetizadas para seu destino final, sendo secretadas. Uma nova via que vem sendo usada como alvo para antibióticos são os sistemas de secreção bacterianos, incluindo as proteínas da maquinaria de translocação Sec e as peptidases sinais que são importantes enzimas no processamento e translocação de proteínas através da membrana celular. As peptidases sinal do tipo I (SPase I ou LepB) desempenham um papel chave na secreção de proteínas clivando um peptídeo sinal na porção N-terminal liberando a proteína madura da membrana citoplasmática. Sua atividade é essencial para viabilidade de todas as espécies bacterianas já testadas, incluindo o *M. tuberculosis*. LepB é um promissor alvo para drogas anti-TB, pois o *Mtb* possui apenas uma cópia deste gene que é essencial para seu crescimento. Inibidores específicos para a proteína LepB levam à morte tanto de micobactérias replicantes como

não replicantes, sugerindo que estas drogas poderiam diminuir a persistência e encurtar o tratamento da tuberculose. [38] – [40]

2.2.1.5 - MarP: Rv3671c *transmembrane serine protease*

MarP é uma serino protease está localizada no periplasma com papel importante na homeostase do pH intracelular e persistência do *M. tuberculosis* no ambiente hostil do fagossoma, protegendo a bactéria do estresse oxidativo e acidez. Entendendo as vias proteolíticas que envolvem esta enzima podem levar ao desenvolvimento de novas quimioterapias anti-TB. [41], [42]

2.2.1.6 - Micosins: *subtilisin-like serine proteases*

O *Mtb* possui cinco sistemas de secreção do tipo VII codificados pelos loci *esx1* ao *esx5*, nomeados assim pelo principal antígeno secretado pelo sistema, o ESAT-6. Cada locus contém proteínas envolvidas na formação de um sistema de secreção dedicado, incluindo proteínas das famílias PE, PPE, CFP-10, proteases e proteínas ligantes de ATP. As proteases codificadas nesses loci são membros da família das serino-proteases semelhantes à subtilisina, comumente chamadas de micosinas. Essas proteases seriam secretadas ou associadas à parede celular, podendo também estar presentes na membrana plasmática. Diferentemente da LepB, os substratos do sistema de secreção tipo VII não possuem peptídeo sinal como alvo da atividade proteolítica, embora seja proposto que as micosinas possam modificar seus substratos antes da secreção. O *Mtb* possui cinco micosinas, MycP1 a MycP5, sendo algumas delas importantes para a virulência. Por exemplo, a proteína MycP1 é requerida para o crescimento do *Mtb* em camundongos, sendo que a perda deste gene resulta em uma cepa atenuada tanto na fase aguda, quanto crônica da infecção. Contudo, o único gene predito como essencial é o que codifica a MycP3 e mesmo não havendo sobreposição de funções dos sistemas de secreção pode haver redundância na função de algumas micosinas. Pela importância na virulência, essas proteases são atrativos alvos para drogas. Porém um medicamento deveria inibir as cinco enzimas simultaneamente, já que por não serem essenciais e haver redundância, a resistência cruzada poderia ser um obstáculo em se usar as micosinas como alvo. [43] – [48]

2.3 - Cisteíno-proteases

As cisteíno-proteases formam um grupo de enzimas que contém um resíduo de cisteína localizado no sítio ativo que é composto normalmente pela tríade catalítica Cys-His-Asn (Figura 2.2B), onde um intermediário covalente é formado após a ação de ativação do resíduo de cisteína por um resíduo de histidina em um nucleófilo [11]. Geralmente são proteínas citoplasmáticas, podendo estar em compartimentos lisossomais de diversos tecidos de animais, plantas e microrganismos. Como exemplo, em células de mamíferos as caspases e a calpaína localizam-se no citoplasma enquanto as enzimas da família das catepsinas e da legumaína encontram-se alojadas em compartimentos lisossomais [49] – [51]. A grande maioria é de endopeptidase [52] porém algumas podem ser classificadas como carboxipeptidases [53].

As principais famílias do grupo são de importância médica tais como: família C1 da papaína que está relacionada à osteoporose, resposta imune, progressão e metástase do câncer; família C3 da picornaína que está envolvida na hepatite e na poliomielite; família C13 da legumaína que está associada com a apresentação de antígenos; família C14 das caspases que possuem papel crucial como mediadoras de apoptose; família C10 da streptopaína e C25 da gingipaína, importantes nas doenças infecciosas [11], [54] – [56]. As calpaínas (família C2), enzimas dependentes de cálcio, apresentam estruturas altamente conservadas e são encontradas em animais vertebrados e invertebrados. Além disso, mostram alta homologia em sua região C-terminal com a família das calmodulinas em consequência da presença de um sítio de ligação ao cálcio, responsável pelo efeito do cálcio na atividade [10]. Essa classe de enzimas proteolíticas é fortemente inibida por cloromercuriobenzoato (pCMB) e L-trans-epoxisuccinilleucilamido (4-guanidino)-butano (E-64), além de outros agentes tais como iodoacetamida, leupeptina, cistatina e quimostatina [19].

2.3.1 - Cisteíno proteases no *Mtb*

2.3.1.1 - RipA: *resuscitation-promoting factor interaction protein*

O crescimento e a divisão celular bacteriana requerem síntese e hidrólise coordenadas da parede celular, permitindo a remoção e expansão dos componentes da parede. Sem uma coordenação correta a hidrólise pode resultar em lise celular. No *Mtb* o *resuscitation promoting factor B* (RpfB), uma transglicosilase, interage com a *Rpf*

interacting protein A (RipA), uma endopeptidase, para hidrolisar o peptidoglicano (PG). RipA (Rv1477) pertence a família de D-glutamate-diaminopimelic acid endopeptidase, que cliva as pontes de pentapeptídeos do PG removendo os crosslinks da parede celular. A determinação da estrutura da RipA do *Mtb* revelou que ela é produzida como um zimogênio e precisa ser ativada para participar no processo de divisão celular. Em *M. smegmatis* a deleção de RipA causa uma severa inibição do crescimento levando a um fenótipo de crescimento em longas cadeias. Entretanto, no *Mtb* o gene é essencial. Essas características tornam a RipA um excelente candidato a alvo para drogas anti-TB. [57] – [60].

2.4 - Aspártico-proteases

As aspártico-proteases formam um grupo de enzimas que possuem o aparato catalítico composto por dois resíduos de ácido aspártico. As enzimas desta classe atuam sobre ligações peptídicas flanqueadas por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. O mecanismo catalítico não envolve o uso de ataques nucleofílicos por um grupo funcional das enzimas. Assim, uma molécula de água aparece fortemente ligada entre o par de resíduos de ácido aspártico (Figura 2.2C). Por apresentar atividade ótima em pH ácido sugere-se que os grupos carboxilas estão diretamente envolvidos no mecanismo catalítico destas enzimas [61].

Esta classe é formada geralmente por enzimas extracelulares encontradas principalmente em organismos eucariotos, e em menor número em algumas bactérias e vírus. Neste grupo aparecem enzimas digestivas como a pepsina, quimosina, renina e a retropepsina. Suas massas moleculares variam entre 30 a 40 kDa, podendo chegar até a 80 kDa, como é o caso da Catepsina E, e são inibidas especificamente por pepstatina A ou por compostos de diazoacetil [10]. A catepsina D, integrante bem conhecida desta classe, participa da digestão de proteínas e peptídeos localizados nos compartimentos ácidos dos lisossomos [62] e também está envolvida no processamento de hormônios, neuropeptídeos e antígenos, funcionando como um alvo que permite modular doenças auto-imunes [62] – [64].

2.4.1 – Aspártico-proteases no *Mtb*

2.4.1.1 - LspA: *lipoprotein signal peptidase II*

O *Mtb* possui cerca de 90 genes que codificam lipoproteínas, estas proteínas são sintetizadas como pro-lipoproteínas no citoplasma e transcoladas através da membrana plasmática via a maquinaria Sec ou *twin-arginine*. Na parede celular recebem modificações lipídicas seguidas pela remoção do peptídeo sinal pela peptidase sinal de lipoproteínas II (LspA). No *Mtb* a LspA não é um gene essencial para o crescimento *in vitro* e sua deleção não altera a morfologia da colônia bacteriana e da parede celular. Porém, o mutante para o gene LspA se mostrou atenuado no modelo de infecção murino, com baixa carga bacteriana e ausência de lesões no pulmão dos camundongos infectados. Contudo, o mecanismo que leva a atenuação pela deficiência em LspA ainda precisa ser elucidado. Estudos mostraram que não está relacionado à maturação do fagolisossoma, podendo ser devido a maior suscetibilidade do mutante à agentes antimicrobianos causada por modificações funcionais na parede celular. As peptidases sinal II são proteínas ancoradas à membrana plasmática com seu sítio catalítico voltado para a porção extracelular se tornando mais acessíveis a inibidores, além disso, não possuem homólogos em eucariotos sendo assim bons alvos para drogas [65] – [67].

2.5 - Treonino-proteases

O grupo das treonino-proteases foi descrito em 1995 e é formado por poucas famílias. O mecanismo catalítico dos membros desta classe parece funcionar com um resíduo de treonina N-terminal participando como um nucleófilo no ataque ao grupo carbonil da ligação peptídica. Esta classe de peptidases representa um elemento essencial na via ubiquitina-proteassoma, que é a principal cascata intracelular de degradação controlada de proteínas [68]. As treonino-peptidases estão envolvidas em muitos processos celulares fundamentais, tais como progressão do ciclo celular, divisão celular, desenvolvimento, diferenciação e apoptose. Além disso, participam da modulação da resposta imune e inflamatória [69], [70].

2.5.1 - Treonino proteases no *Mtb*

2.5.1.1 – Proteassoma

Proteassomas estão presentes em eucariotos e arqueias, mas também são encontrados apenas em algumas bactérias da ordem actinomycetales, incluindo o *M. tuberculosis*. O proteassoma é geralmente composto por dois complexos, o 20S onde as proteínas são degradadas e o 19S regulatório. No *Mtb* o complexo 20S é formado por 14 subunidades codificadas pelos genes *pcrA* e *pcrB* que juntas formam uma estrutura em barril que contem o sítio ativo para degradação proteica. Em eucariotos a ubiquitina é a marca para degradação via proteassoma, no *Mtb* existe um sistema de marcação análogo à ubiquitina, o sistema Pup. As enzimas Dop e PafA ligam o cauda Pub à proteína alvo num processo denominado pupilação. Várias proteínas já foram identificadas como substratos do proteassoma micobacteriano e outra numerosa quantidade de proteínas está sendo identificada como alvo da pupilação. A proteólise via proteassoma não é essencial para o crescimento do *Mtb*, contudo a deleção dos genes *pcrAB* causa defeitos no crescimento e maior sensibilidade a intermediários reativos de oxigênio, sendo que as cepas mutantes não persistem por tempo prolongado na fase estacionária ou em condições de privação de nutrientes *in vitro*. De forma similar, a deleção dos genes acessórios da via de degradação via proteassoma, Dop e PafA, causa sensibilidade e atenuação da virulência *in vitro* e *in vivo*. A principal dificuldade em se desenvolver um inibidor para o proteassoma é a inerente toxicidade devido o alto grau de conservação do proteassoma micobacteriano com o seu homólogo em mamíferos. Porém estudos mostraram que uma classe de compostos inibe seletivamente o proteassoma micobacteriano, cerca de mil vezes menos efetivo contra o humano. Esses compostos agem como inibidores irreversíveis causando alterações conformacionais no proteassoma bacteriano. Mais importante, eles matam o *Mtb* persistente, podendo assim ser usados no tratamento da TB latente. Apesar da homologia entre os proteassomas bacterianos e eucarióticos, as enzimas Dop e PafA não possuem homólogos em eucariotos e podem ser uma alternativa com alvo para inibir a via de degradação pelo proteassoma em micobactérias. [71] – [76]

2.6 - Glutâmico-proteases e Asparargino-proteases

A classe das glutâmico-proteases, recentemente descrita, é formada por apenas duas famílias. Seu mecanismo hidrolítico é único, com uma díade catalítica composta por um resíduo de glutamato e outro de glutamina, onde o glutamato ativa uma molécula de água nucleofílica enquanto a glutamina estabiliza um intermediário tetraédrico formado na via hidrolítica. Além disso, um resíduo de ácido aspártico também parece estar envolvido na atividade catalítica. A atividade enzimática deste grupo de peptidases é potencialmente inibida pelo composto 1,2-epoxi-3-(*p*-nitrofenoxi) propano (EPNP) [7], [15]. Porém, no genoma do *Mtb* não há nenhuma proteases anotada neste grupo.

Dentre as proteínas que possuem mecanismo catalítico envolvendo resíduos de asparargina, no *Mtb* está anotada apenas uma família a N10. Esta família é composta por proteínas que sofrem autocatálise, conhecidas como inteínas ou inteins. Um intein é um polipéptido codificado por um gene considerado parasita, ele se insere no gene de outra proteína hospedeira (o extein) interrompendo este gene e seu produto proteico. O intein é capaz de se auto-libertar da proteína hospedeira e unir as duas extremidades do extein. Assim, duas proteínas são geradas a partir de uma, o extein e o intein, num processo conhecido como splicing proteico, que é fundamental para a função tanto do intein quanto da proteína hospedeira. Dentre os genes de *M. tuberculosis* que possuem inteins, três são de extrema importância. O gene *dnaB* de uma DNA helicase, o gene *sufB* que está envolvido no metabolismo de ferro e o gene *recA* que codifica uma recombinase. Devido às proteínas destes genes que contem esses inteins serem essenciais e exercerem funções celulares não redundantes no *Mtb*, a inibição da atividade proteolítica do intein vem sendo descrita como um método promissor para novos agentes antimicobacterianos. [77] – [81]

2.7 - Metallo-proteases

As metallo-proteases formam a classe de enzimas proteolíticas que se caracterizam pela necessidade de um cátion divalente no sítio ativo, participando do mecanismo de catálise. O zinco é o íon predominante compondo o arcabouço catalítico destas enzimas, mas outros cátions metálicos como cobalto, magnésio, manganês, cálcio e níquel também são grupos funcionais comuns. O íon metálico divalente é usado para

proporcionar uma forte atração eletrofílica que ajuda no ataque hidrolítico de uma molécula de água auxiliado por cadeias laterais de resíduos de histidinas (Figura 2.2D) [11]. As famílias das metalo-proteases estão agrupadas em diferentes clãs baseados na natureza do aminoácido que completa o sítio de ligação ao metal. Por exemplo, o clã MA é composto pela sequência HEXXH-E e o clã MB corresponde ao motivo HEXXH-H [4].

Metallo-proteases são amplamente distribuídas entre procariotos e eucariotos, geralmente tem ação no meio extracelular, mas também são encontradas também no citosol, em vesículas ou associadas a membranas. Elas apresentam uma grande diversidade de sequências e estruturas, e são sensíveis a agentes quelantes de íons divalentes tais como 1,10-fenantrolina, EDTA e EGTA [19]. A classe das metalo-peptidases incluem uma grande variedade de enzimas como as colagenases de organismos superiores [82], [83], toxinas hemorrágicas presentes em veneno de cobras [84], termolisinas bacterianas [85] dentre diversos fatores de virulência em microrganismos patogênicos.

A termolisina é uma das proteínas mais bem caracterizada do clã MA. Nela, resíduos de histidina do motivo HEXXH funcionam como ligantes do zinco. Além disso, um resíduo de glutamato tem função catalítica sobre ligações peptídicas, sendo uma peptidase muito estável, com meia-vida de 1 h a 80 °C [86]. As colagenases são outras importantes metalo-proteases, tem ação muito específica atuando sobre colágeno e gelatina. Foram inicialmente descritas na bactéria anaeróbica *Clostridium histolyticum* como um componente responsável pela toxicidade. Mais tarde também encontrada sendo produzida pela bactéria aeróbica *Achromobacter iophagus* e outros organismos incluindo fungos. A elastase, produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, é outro importante membro da família de metalo-proteases atuando como um fator de virulência para este microrganismo. Outro importante grupo dentro desta classe de proteínas são as metalo-proteinases de matriz (MMP). Elas estão envolvidas na degradação da matriz extracelular durante a morfogênese de tecidos, diferenciação celular, resposta imune e cicatrização de feridas. Assim, seu estudo pode ser útil no tratamento de doenças tais como câncer e artrite [4]. Dentro da classe de metalo-proteases, as aminopeptidases formam um amplo grupo apresentando funções importantes nos sistemas biológicos, inclusive em microrganismos patogênicos [87].

2.7.1 - Metallo-proteases no *Mtb*

2.7.1.1 - FtsH protease: *filamentation temperature sensitive H protease*

FtsH é uma zinco-metallo-protease dependente de ATP ligada à membrana, membro da família AAA de ATPases com homólogos em eucariotos e procariotos. A enzima é responsável pela degradação de proteínas com montagem incorreta e por mediar resposta a diferentes condições ambientais como o choque térmico. O *Mtb* possui uma FtsH (Rv3610c) com atividade proteolítica, que é predita por ser essencial em estudos de mutagênese por transposon. Por ser uma proteína bastante conservada entre bactérias, juntamente com evidências que mostram que a proteína é essencial para adaptação e sobrevivência *in vivo*, a enzima é considerada um potencial alvo para drogas. Porém suas semelhanças com enzimas eucarióticas, inclusive humana, pode tornar o desenvolvimento de drogas, específicas para TB, um desafio. [88] – [90]

2.7.1.2 - Rip1: *regulated intramembrane proteolysis metalloprotease*

A proteólise regulada intra-membrana (RIP) é um mecanismo de transdução de sinal através da membrana que funciona pela clivagem proteolítica de substratos. No *Mtb* a enzima RIP metalloprotease 1 (Rip1) é determinante na composição do envelope celular e na virulência. A enzima media a clivagem de proteínas como fatores anti-sigma, Wag31 e PBP3 participando da resposta a várias condições de stress. O gene não é essencial para o crescimento do *Mtb*, porém sua deleção causa alterações na morfologia da colônia bacteriana e ausência da formação de corda. Além disso, em modelo de infecção murino, o mutante para Rip1 se mostrou atenuado com diminuição da carga bacteriana, atenuação do granuloma e baixa capacidade de persistência durante longo período de infecção. Assim Rip1 pode ser um alvo atrativo para novas drogas anti-TB [91] – [93].

2.7.1.3 - MetAP: *Methionine aminopeptidase*

A metionina-aminopeptidase (MetAP) é uma metallo-protease responsável pela remoção do resíduo N-terminal metionina de proteínas nascentes. A importância dessa modificação co-traducional é demonstrada pela letalidade da deleção do gene em bactérias como *E. coli* e *S. typhimurium*. O *Mtb* possui dois genes que codificam

MetAPs, anotados como *mapA* (Rv0734) e *mapB* (Rv2861c). A proteína codificada pelo gene *mapB*, chamada MtMetAP1c, foi caracterizada com sua estrutura na apoforma e complexada com o substrato metionina. A análise da estrutura revela um motivo de ligação a SH3 e potencial interação com ribossomo por esse domínio que facilitaria a excisão co-traducional da metionina. A outra MetAP, codificada pelo gene *mapA* e nomeada MtMetAP1a, é pouco menor e não possui o domínio de ligação a SH3, foi caracterizada como uma enzima ativa, porém ainda não possui estrutura determinada. As duas enzimas são expressas diferencialmente, MtMetAP1a é mais expressa na fase log de crescimento, enquanto que a MtMetAP1c na fase estacionária. Embora a enzima MtMetAP1c dispensável, a MtMetAP1a parece ser essencial para o crescimento da micobactéria em cultura. Assim, MetAPs de *Mtb* podem ser inibidas por inibidores contendo naphitoquinona, bengamidas e salicilanilidas sendo promissores alvos para o tratamento da TB [94] – [97].

2.8 - Proteínas que propomos estudar

Visto a importância das proteases em diversos microrganismos patogênicos e o crescente número destas proteínas descritas exercendo importantes papéis no *M. tuberculosis*, este trabalho propõe o estudo de metalo-proteases, sendo esta classe a segunda mais abundante no genoma do *Mtb* e ainda com poucos estudos descritos na literatura. São as proteínas aqui estudadas, a Gcp, a Zmp1, a Lap e a enzima Dap. Escolhidas por serem preditas como essenciais para virulência do *Mtb*.

2.8.1 - O-sialoglicoproteína endopeptidase (Gcp)

Vários sorotipos de um patógeno pulmonar bovino, *Pasteurella haemolytica*, secretam uma protease que tem alta especificidade por O-sialoglicoproteínas, ou seja, proteínas com polissacarídeos derivados do ácido siálico ligados no grupamento hidroxil da cadeia lateral de alguns aminoácidos que em sua maioria são proteínas de membrana [98], [99]. Essa protease, um fator de virulência em potencial, foi chamada de O-sialoglicoproteína endopeptidase (glicoprotease, Gcp), pois seus substratos conhecidos são glicoproteínas com grandes cadeias de resíduos de O-sialoglicanos ou sulfoglicanos conjugados, não clivando proteínas somente N-glicosiladas ou não glicosiladas [100].

Ela não possui uma sequência sinal N ou C-terminal para ser secretada, apresenta um sítio de ligação a metal e pertence à família M22 de metalo-proteases [101]. Já foi demonstrado que essa enzima interfere na agregação de plaquetas humanas [102] e que a Gcp de *P. haemolytica* oferece proteção contra a pneumonia causada por esse patógeno no gado vacinado com a proteína recombinante [103]. Além disso, a Gcp (Rv3419c) de *M. tuberculosis* demonstrou ser um gene não essencial para o crescimento da bactéria *in vitro* [104], [105], porém é necessário para sobrevivência do patógeno em macrófagos murinos, definido por mutagênese se utilizando transposons [29]. Sendo assim um potencial alvo para tratamento da tuberculose.

2.8.2 - PepO oligopeptidase (Zmp1)

A família M13 das metalo-proteases, contém o motivo de ligação a metal seguido por um ácido glutâmico com papel catalítico. As principais proteínas dessa família são a neprelisina ou endopeptidase neutra (NEP) e a enzima conversora de endotelina (ECE). Estas proteases são geralmente sintetizadas em sua forma ativa e parecem agir somente em substratos com menos de 40 resíduos de aminoácidos, como encefalinas, substância P, endotelina, bradicinina e fator atrial natriurético [106]. Assim são denominadas oligopeptidase. Dentro da família existe uma protease bacteriana homóloga à ECE, a PepO oligopeptidase, que foi primeiramente isolada do patógeno periodontal *Porphyromonas gingivalis*, o principal causador de gengivite e perda de dentes em adultos [107]. A enzima de *P. gingivalis*, a PgPepO, demonstrou agir sobre diversos peptídeos biologicamente ativos, porém seu substrato natural ainda não foi descrito. Sabe-se que ela está associada à primeira etapa da infecção auxiliando a invasão celular pelo parasito. Mutantes construídos com a retirada do gene tiveram essa etapa prejudicada, perdendo várias vezes a eficiência de invasão das células do hospedeiro [108]. A PepO de *M. tuberculosis*, nomeada Zmp1 (Zinc metalloprotease 1) e não é essencial para a sobrevivência do patógeno *in vitro* [104], porém, estudos mostraram que a deleção do gene causa atenuação da cepa mutante como incapacidade de impedir a fusão do fagolisossoma e alteração na ativação do inflamassoma, o que a tornaria um alvo potencial para quimioterapia da TB [109].

2.8.3 - Leucil-aminopeptidase (LAP) e Aspartil-aminopeptidases (DAP)

Lecil-amino peptidases já foram descritas como importantes para infecção de vários microrganismos, como *Staphylococcus aureus* [110], *Trypanosoma cruzi* [111], *Salmonella entérica* [112], *Pseudomonas putida* [113], *Vibrio cholerae* [114], *Plasmodium sp.* [115]. As aspartil aminopeptidases, já foram descritas como importantes para *P. falciparum* [116], *Pseudomonas aeruginosa* [117] e alguns fungos [118], [119]. Porém nada ainda foi descrito para *Mtb* sobre estas proteínas. Visto isso, é importante entender a importância dessas proteínas em micobactérias, como uma aminopeptidase pode alterar o curso da infecção, com que proteínas ela interage e qual sua participação na montagem da resposta imune contra o *Mtb*. No genoma do *Mtb* estão anotados os genes de duas aminopeptidases ainda não estudadas. O gene Rv2213, que codificaria uma leucil-aminopeptidase da família M17 e o Rv0800 codificando uma aspartil-aminopeptidase pertencente à família M18 de metolo-proteases. Ambas preditas como essenciais para virulência do patógeno [120].

Referências Bibliográficas

1. **Turk B.** 2006. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* **5**:785–799.
2. **Dickinson DP.** 2002. Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **13**:238–275.
3. **Choi KY, Swierczewska M, Lee S, Chen X.** 2012. Protease-Activated Drug Development. *Theranostics* **2**:156–178.
4. **Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV.** 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:597–635.
5. **Hooper NM.** 2002. Proteases: a primer. *Essays Biochem.* **38**:1–8.
6. **Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ.** 2006. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **34**:D270–272.
7. **Neil RD.** 2004. *Handbook of Proteolytic Enzymes.* Elsevier Science & Technology Books.
8. **Barrett AJ, McDonald JK.** 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem J* **237**:935.

9. **Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A.** 2010. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **38**:D227–D233.
10. **Barrett AJ, Rawlings ND.** 1991. Types and families of endopeptidases. *Biochem. Soc. Trans.* **19**:707–715.
11. 2001. *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach* Second Edition. Practical Approach Series 247.
12. **Cawston TE, Wilson AJ.** 2006. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **20**:983–1002.
13. **Erez E, Fass D, Bibi E.** 2009. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* **459**:371–378.
14. **Abadjieva A, Hilven P, Pauwels K, Crabeel M.** 2000. The yeast ARG7 gene product is autoproteolyzed to two subunit peptides, yielding active ornithine acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **275**:11361–11367.
15. **Fujinaga M, Cherney MM, Oyama H, Oda K, James MNG.** 2004. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**:3364–3369.
16. **Rawlings ND, Barrett AJ.** 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **290 (Pt 1)**:205–218.
17. **Barrett AJ, Rawlings ND, O'Brien EA.** 2001. The MEROPS database as a protease information system. *J. Struct. Biol.* **134**:95–102.
18. **Pham CTN.** 2006. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:541–550.
19. **Bond JS, Butler PE.** 1987. Intracellular Proteases. *Annual Review of Biochemistry* **56**:333–364.
20. **Barrett AJ, Rawlings ND.** 1995. Families and clans of serine peptidases. *Arch. Biochem. Biophys.* **318**:247–250.
21. **Walker B, Lynas JF.** 2001. Strategies for the inhibition of serine proteases. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**:596–624.
22. **Ollinger J, O'Malley T, Kesicki EA, Odingo J, Parish T.** 2012. Validation of the essential ClpP protease in *Mycobacterium tuberculosis* as a novel drug target. *J. Bacteriol.* **194**:663–668.
23. **Raju RM, Unnikrishnan M, Rubin DHF, Krishnamoorthy V, Kandrор O, Akopian TN, Goldberg AL, Rubin EJ.** 2012. *Mycobacterium tuberculosis*

- ClpP1 and ClpP2 Function Together in Protein Degradation and Are Required for Viability in vitro and During Infection. *PLoS Pathog* **8**:e1002511.
24. **Personne Y, Brown AC, Schuessler DL, Parish T.** 2013. *Mycobacterium tuberculosis* ClpP Proteases Are Co-transcribed but Exhibit Different Substrate Specificities. *PLoS ONE* **8**:e60228.
 25. **Parish T.** 2014. Targeting mycobacterial proteolytic complexes with natural products. *Chem. Biol.* **21**:437–438.
 26. **Akopian T, Kandror O, Raju RM, Unnikrishnan M, Rubin EJ, Goldberg AL.** 2012. The active ClpP protease from *M. tuberculosis* is a complex composed of a heptameric ClpP1 and a ClpP2 ring. *EMBO J.* **31**:1529–1541.
 27. **Benaroudj N, Raynal B, Miot M, Ortiz-Lombardia M.** 2011. Assembly and proteolytic processing of mycobacterial ClpP1 and ClpP2. *BMC Biochem.* **12**:61.
 28. **Gavriš E, Sit CS, Cao S, Kandror O, Spoering A, Peoples A, Ling L, Fetterman A, Hughes D, Bissell A, Torrey H, Akopian T, Mueller A, Epstein S, Goldberg A, Clardy J, Lewis K.** 2014. Lassomycin, a ribosomally synthesized cyclic peptide, kills *Mycobacterium tuberculosis* by targeting the ATP-dependent protease ClpC1P1P2. *Chem. Biol.* **21**:509–518.
 29. **Rengarajan J, Bloom BR, Rubin EJ.** 2005. Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:8327–8332.
 30. **Rengarajan J, Murphy E, Park A, Krone CL, Hett EC, Bloom BR, Glimcher LH, Rubin EJ.** 2008. *Mycobacterium tuberculosis* Rv2224c modulates innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**:264–269.
 31. **Lala RM, Peixoto KV, Re F, Rengarajan J.** 2011. *Mycobacterium tuberculosis* Hip1 dampens macrophage pro-inflammatory responses by limiting TLR2 activation. *Infect. Immun. IAI.* 05574–11.
 32. **Naffin-Olivos JL, Georgieva M, Goldfarb N, Madan-Lala R, Dong L, Bizzell E, Valinetz E, Brandt GS, Yu S, Shabashvili DE, Ringe D, Dunn BM, Petsko GA, Rengarajan J.** 2014. *Mycobacterium tuberculosis* Hip1 Modulates Macrophage Responses through Proteolysis of GroEL2. *PLoS Pathog* **10**:e1004132.
 33. **Mohamedmohaideen NN, Palaninathan SK, Morin PM, Williams BJ, Braunstein M, Tichy SE, Locker J, Russell DH, Jacobs WR, Sacchettini JC.** 2008. Structure and function of the virulence-associated high-temperature

- requirement A of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **47**:6092–6102.
34. **Singh N, Kuppili RR, Bose K.** 2011. The structural basis of mode of activation and functional diversity: a case study with HtrA family of serine proteases. *Arch. Biochem. Biophys.* **516**:85–96.
 35. **White MJ, He H, Penoske RM, Twining SS, Zahrt TC.** 2010. PepD participates in the mycobacterial stress response mediated through MprAB and SigE. *J. Bacteriol.* **192**:1498–1510.
 36. **White MJ, Savaryn JP, Bretl DJ, He H, Penoske RM, Terhune SS, Zahrt TC.** 2011. The HtrA-like serine protease PepD interacts with and modulates the *Mycobacterium tuberculosis* 35-kDa antigen outer envelope protein. *PLoS ONE* **6**:e18175.
 37. **Daisy P, Vijayalakshmi P, Selvaraj C, Singh SK, Saipriya K.** 2012. Targeting Multidrug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* HtrA2 with Identical Chemical Entities of Fluoroquinolones. *Indian J Pharm Sci* **74**:217–222.
 38. **Van Roosmalen ML, Geukens N, Jongbloed JDH, Tjalsma H, Dubois J-YF, Bron S, van Dijk JM, Anné J.** 2004. Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**:279–297.
 39. **Ollinger J, O'Malley T, Ahn J, Odingo J, Parish T.** 2012. Inhibition of the sole type I signal peptidase of *Mycobacterium tuberculosis* is bactericidal under replicating and nonreplicating conditions. *J. Bacteriol.* **194**:2614–2619.
 40. **Dhiman H, Dhanjal JK, Sharma S, Chacko S, Grover S, Grover A.** 2013. Resisting resistant *Mycobacterium tuberculosis* naturally: mechanistic insights into the inhibition of the parasite's sole signal peptidase Leader peptidase B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **433**:552–557.
 41. **Biswas T, Small J, Vandal O, Odaira T, Deng H, Ehrt S, Tsodikov OV.** 2010. Structural insight into serine protease Rv3671c that Protects *M. tuberculosis* from oxidative and acidic stress. *Structure* **18**:1353–1363.
 42. **Small JL, O'Donoghue AJ, Boritsch EC, Tsodikov OV, Knudsen GM, Vandal O, Craik CS, Ehrt S.** 2013. Substrate specificity of MarP, a periplasmic protease required for resistance to acid and oxidative stress in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **288**:12489–12499.
 43. **Brown GD, Dave JA, Gey van Pittius NC, Stevens L, Ehlers MR, Beyers AD.** 2000. The mycosins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: a family of subtilisin-like serine proteases. *Gene* **254**:147–155.

44. **Ohol YM, Goetz DH, Chan K, Shiloh MU, Craik CS, Cox JS.** 2010. *Mycobacterium tuberculosis* MycP1 protease plays a dual role in regulation of ESX-1 secretion and virulence. *Cell Host Microbe* **7**:210–220.
45. **Dave JA, Gey van Pittius NC, Beyers AD, Ehlers MRW, Brown GD.** 2002. Mycosin-1, a subtilisin-like serine protease of *Mycobacterium tuberculosis*, is cell wall-associated and expressed during infection of macrophages. *BMC Microbiol.* **2**:30.
46. **Frasinyuk MS, Kwiatkowski S, Wagner JM, Evans TJ, Reed RW, Korotkov KV, Watt DS.** 2014. Pentapeptide boronic acid inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* MycP1 protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**:3546–3548.
47. **Solomonson M, Huesgen PF, Wasney GA, Watanabe N, Gruninger RJ, Prehna G, Overall CM, Strynadka NCJ.** 2013. Structure of the mycosin-1 protease from the mycobacterial ESX-1 protein type VII secretion system. *J. Biol. Chem.* **288**:17782–17790.
48. **Wagner JM, Evans TJ, Chen J, Zhu H, Houben ENG, Bitter W, Korotkov KV.** 2013. Understanding specificity of the mycosin proteases in ESX/type VII secretion by structural and functional analysis. *J. Struct. Biol.* **184**:115–128.
49. **Turk D, Guncar G.** 2003. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **59**:203–213.
50. **Chen JM, Rawlings ND, Stevens RA, Barrett AJ.** 1998. Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases. *FEBS Lett.* **441**:361–365.
51. **Kirschke H, Barrett AJ, Rawlings ND.** 1995. Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* **2**:1581–1643.
52. **Barrett AJ, Rawlings ND.** 2001. Evolutionary lines of cysteine peptidases. *Biol. Chem.* **382**:727–733.
53. **Klemencic I, Carmona AK, Cezari MH, Juliano MA, Juliano L, Guncar G, Turk D, Krizaj I, Turk V, Turk B.** 2000. Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *Eur. J. Biochem.* **267**:5404–5412.
54. **McKerrow JH.** 1999. Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action. *Int. J. Parasitol.* **29**:833–837.
55. **Krepela E.** 2001. Cysteine proteinases in tumor cell growth and apoptosis.

- Neoplasma **48**:332–349.
56. **McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M.** 2006. Proteases in parasitic diseases. *Annu Rev Pathol* **1**:497–536.
 57. **Böth D, Schneider G, Schnell R.** 2011. Peptidoglycan Remodeling in *Mycobacterium tuberculosis*: Comparison of Structures and Catalytic Activities of RipA and RipB. *Journal of Molecular Biology* **413**:247–260.
 58. **Hett EC, Chao MC, Steyn AJ, Fortune SM, Deng LL, Rubin EJ.** 2007. A partner for the resuscitation-promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **66**:658–668.
 59. **Ruggiero A, Marasco D, Squeglia F, Soldini S, Pedone E, Pedone C, Berisio R.** 2010. Structure and Functional Regulation of RipA, a Mycobacterial Enzyme Essential for Daughter Cell Separation. *Structure* **18**:1184–1190.
 60. **Chao MC, Kieser KJ, Minami S, Mavrici D, Aldridge BB, Fortune SM, Alber T, Rubin EJ.** 2013. Protein Complexes and Proteolytic Activation of the Cell Wall Hydrolase RipA Regulate Septal Resolution in Mycobacteria. *PLoS Pathog* **9**:e1003197.
 61. **Hofmann T, Fink AL, Dunn BM.** 1984. Cryoenzymology of penicillopepsin; with an appendix: mechanism of action of aspartyl proteinases. *Biochemistry* **23**:5247–5256.
 62. **Fusek M, Vetvicka V.** 2005. Dual role of cathepsin D: ligand and protease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **149**:43–50.
 63. **Lkhider M, Castino R, Bouguyon E, Isidoro C, Ollivier-Bousquet M.** 2004. Cathepsin D released by lactating rat mammary epithelial cells is involved in prolactin cleavage under physiological conditions. *J. Cell. Sci.* **117**:5155–5164.
 64. **Chapman HA.** 2006. Endosomal proteases in antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **18**:78–84.
 65. **Banaei N, Kincaid EZ, Lin S-YG, Desmond E, Jacobs WR, Ernst JD.** 2009. Lipoprotein Processing Is Essential for Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to Malachite Green. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:3799–3802.
 66. **Rampini SK, Selchow P, Keller C, Ehlers S, Böttger EC, Sander P.** 2008. LspA inactivation in *Mycobacterium tuberculosis* results in attenuation without affecting phagosome maturation arrest. *Microbiology (Reading, Engl.)* **154**:2991–3001.

67. **Sander P, Rezwan M, Walker B, Rampini SK, Kroppenstedt RM, Ehlers S, Keller C, Keeble JR, Hagemeyer M, Colston MJ, Springer B, Böttger EC.** 2004. Lipoprotein processing is required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **52**:1543–1552.
68. **Mitsiades CS, Mitsiades N, Hideshima T, Richardson PG, Anderson KC.** 2006. Proteasome inhibition as a new therapeutic principle in hematological malignancies. *Curr Drug Targets* **7**:1341–1347.
69. **Wang J, Maldonado MA.** 2006. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell. Mol. Immunol.* **3**:255–261.
70. **Adams J.** 2003. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat. Rev.* **29 Suppl 1**:3–9.
71. **Hu G, Lin G, Wang M, Dick L, Xu R-M, Nathan C, Li H.** 2006. Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome and mechanism of inhibition by a peptidyl boronate. *Mol. Microbiol.* **59**:1417–1428.
72. **Pearce MJ, Arora P, Festa RA, Butler-Wu SM, Gokhale RS, Darwin KH.** 2006. Identification of substrates of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome. *EMBO J.* **25**:5423–5432.
73. **Gandotra S, Schnappinger D, Monteleone M, Hillen W, Ehrt S.** 2007. In vivo gene silencing identifies the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome as essential for the bacteria to persist in mice. *Nat. Med.* **13**:1515–1520.
74. **Gandotra S, Lebron MB, Ehrt S.** 2010. The *Mycobacterium tuberculosis* Proteasome Active Site Threonine Is Essential for Persistence Yet Dispensable for Replication and Resistance to Nitric Oxide. *PLoS Pathog* **6**:e1001040.
75. **Cerda-Maira F, Darwin KH.** 2009. The *Mycobacterium tuberculosis* proteasome: more than just a barrel-shaped protease. *Microbes Infect.* **11**:1150–1155.
76. **Lin G, Li D, de Carvalho LPS, Deng H, Tao H, Vogt G, Wu K, Schneider J, Chidawanyika T, Warren JD, Li H, Nathan C.** 2009. Inhibitors Selective for Mycobacterial versus Human Proteasomes. *Nature* **461**:621–626.
77. **Mills KV, Lew BM, Jiang S, Paulus H.** 1998. Protein splicing in trans by purified N- and C-terminal fragments of the *Mycobacterium tuberculosis* RecA intein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**:3543–3548.
78. **Du Z, Zheng Y, Patterson M, Liu Y, Wang C.** 2011. pK(a) coupling at the

- intein active site: implications for the coordination mechanism of protein splicing with a conserved aspartate. *J. Am. Chem. Soc.* **133**:10275–10282.
79. **Davis EO, Sedgwick SG, Colston MJ.** 1991. Novel structure of the *recA* locus of *Mycobacterium tuberculosis* implies processing of the gene product. *J. Bacteriol.* **173**:5653–5662.
80. **Van Roey P, Pereira B, Li Z, Hiraga K, Belfort M, Derbyshire V.** 2007. Crystallographic and mutational studies of *Mycobacterium tuberculosis* *recA* mini-inteins suggest a pivotal role for a highly conserved aspartate residue. *J. Mol. Biol.* **367**:162–173.
81. **Zhang L, Zheng Y, Callahan B, Belfort M, Liu Y.** 2011. Cisplatin inhibits protein splicing, suggesting inteins as therapeutic targets in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **286**:1277–1282.
82. **Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL.** 1985. Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase. *J. Biol. Chem.* **260**:2493–2500.
83. **Okada Y, Nagase H, Harris ED.** 1986. A metalloproteinase from human rheumatoid synovial fibroblasts that digests connective tissue matrix components. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **261**:14245–14255.
84. **Shannon JD, Baramova EN, Bjarnason JB, Fox JW.** 1989. Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin. *J. Biol. Chem.* **264**:11575–11583.
85. **Weaver LH, Kester WR, Matthews BW.** 1977. A crystallographic study of the complex of phosphoramidon with thermolysin. A model for the presumed catalytic transition state and for the binding of extended substances. *J. Mol. Biol.* **114**:119–132.
86. **Potempa J, Pike RN.** 2005. Bacterial peptidases. *Contrib Microbiol* **12**:132–180.
87. **Gonzales T, Robert-Baudouy J.** 1996. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**:319–344.
88. **Anilkumar G, Srinivasan R, Ajitkumar P.** 2004. Genomic organization and in vivo characterization of proteolytic activity of FtsH of *Mycobacterium smegmatis* SN2. *Microbiology (Reading, Engl.)* **150**:2629–2639.
89. **Srinivasan R, Anilkumar G, Rajeswari H, Ajitkumar P.** 2006. Functional characterization of AAA family FtsH protease of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**:97–105.

90. **Kiran M, Chauhan A, Dziedzic R, Maloney E, Mukherji SK, Madiraju M, Rajagopalan M.** 2009. *Mycobacterium tuberculosis* ftsH expression in response to stress and viability. *Tuberculosis (Edinb)* **89 Suppl 1**:S70–73.
91. **Sklar JG, Makinoshima H, Schneider JS, Glickman MS.** 2010. M. tuberculosis intramembrane protease Rip1 controls transcription through three anti-sigma factor substrates. *Mol. Microbiol.* **77**:605–617.
92. **Makinoshima H, Glickman MS.** 2005. Regulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis. *Nature* **436**:406–409.
93. **Mukherjee P, Sureka K, Datta P, Hossain T, Barik S, Das KP, Kundu M, Basu J.** 2009. Novel role of Wag31 in protection of mycobacteria under oxidative stress. *Mol. Microbiol.* **73**:103–119.
94. **Olaleye O, Raghunand TR, Bhat S, He J, Tyagi S, Lamichhane G, Gu P, Zhou J, Zhang Y, Grosset J, Bishai WR, Liu JO.** 2010. Methionine Aminopeptidases from *Mycobacterium tuberculosis* as Novel Antimycobacterial Targets. *Chem Biol* **17**:86–97.
95. **Lu J-P, Ye Q-Z.** 2010. Expression and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* methionine aminopeptidase type 1a. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**:2776–2779.
96. **Kanudia P, Mittal M, Kumaran S, Chakraborti PK.** 2011. Amino-terminal extension present in the methionine aminopeptidase type 1c of *Mycobacterium tuberculosis* is indispensable for its activity. *BMC Biochemistry* **12**:35.
97. **Lu J-P, Yuan X-H, Ye Q-Z.** 2012. Structural analysis of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* methionine aminopeptidase by bengamide derivatives. *Eur J Med Chem* **47**:479–484.
98. **Abdullah KM, Udoh EA, Shewen PE, Mellors A.** 1992. A neutral glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves O-sialoglycoproteins. *Infect. Immun.* **60**:56–62.
99. **Mellors A, Sutherland DR.** 1994. Tools to cleave glycoproteins. *Trends Biotechnol.* **12**:15–18.
100. **Jiang P, Mellors A.** 1998. Membrane protein proteolysis assayed by fluorescence quenching: assay of O-sialoglycoprotein endopeptidase. *Anal. Biochem.* **259**:8–15.

101. **Watt MA, Lo RY, Mellors A.** 1997. Refolding of recombinant *Pasteurella haemolytica* A1 glycoprotease expressed in an *Escherichia coli* thioredoxin gene fusion system. *Cell Stress Chaperones* **2**:180–190.
102. **Kinlough-Rathbone RL, Perry DW, Rand ML, Packham MA.** 2000. Responses to aggregating agents after cleavage of GPIb of human platelets by the O-sialoglycoprotein endoprotease from *Pasteurella haemolytica*- potential surrogates for Bernard-Soulier platelets? *Thromb. Res.* **99**:165–172.
103. **Shewen PE, Lee CW, Perets A, Hodgins DC, Baldwin K, Lo RYC.** 2003. Efficacy of recombinant sialoglycoprotease in protection of cattle against pneumonic challenge with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vaccine* **21**:1901–1906.
104. **Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ.** 2003. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **48**:77–84.
105. **Lamichhane G, Zignol M, Blades NJ, Geiman DE, Dougherty A, Grosset J, Broman KW, Bishai WR.** 2003. A postgenomic method for predicting essential genes at subsaturation levels of mutagenesis: application to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**:7213–7218.
106. **Carson JA, Ansai T, Awano S, Yu W, Takehara T, Turner AJ.** 2002. Characterization of PgPepO, a bacterial homologue of endothelin-converting enzyme-1. *Clin. Sci.* **103 Suppl** **48**:90S–93S.
107. **Awano S, Ansai T, Mochizuki H, Yu W, Tanzawa K, Turner AJ, Takehara T.** 1999. Sequencing, expression and biochemical characterization of the *Porphyromonas gingivalis* pepO gene encoding a protein homologous to human endothelin-converting enzyme. *FEBS Lett.* **460**:139–144.
108. **Ansai T, Yu W, Urnowey S, Barik S, Takehara T.** 2003. Construction of a pepO gene-deficient mutant of *Porphyromonas gingivalis*: potential role of endopeptidase O in the invasion of host cells. *Oral Microbiol. Immunol.* **18**:398
109. **Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, Springer B, Timmins GS, Sander P, Deretic V.** 2008. *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe* **3**:224–232.
110. **Singh AK, Singh R, Tomar D, Pandya CD, Singh R.** 2012. The leucine aminopeptidase of *Staphylococcus aureus* is secreted and contributes to biofilm formation. *Int. J. Infect. Dis.* **16**:e375–381.
111. **Cadavid-Restrepo G, Gastardelo TS, Faudry E, Almeida H de, Bastos IM,**

- Negreiros RS, Lima MM, Assumpção TC, Almeida KC, Ragno M, Ebel C, Ribeiro BM, Felix CR, Santana JM.** 2011. The major leucyl aminopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (LAP_{Tc}) assembles into a homohexamer and belongs to the M17 family of metallopeptidases. *BMC Biochemistry* **12**:46.
112. **Mathew Z, Knox TM, Miller CG.** 2000. *Salmonella enterica* serovar typhimurium peptidase B is a leucyl aminopeptidase with specificity for acidic amino acids. *J. Bacteriol.* **182**:3383–3393.
113. **Kale A, Pijning T, Sonke T, Dijkstra BW, Thunnissen A-MWH.** 2010. Crystal structure of the leucine aminopeptidase from *Pseudomonas putida* reveals the molecular basis for its enantioselectivity and broad substrate specificity. *J. Mol. Biol.* **398**:703–714.
114. **Behari J, Stagon L, Calderwood SB.** 2001. pepA, a gene mediating pH regulation of virulence genes in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **183**:178–188.
115. **Harbut MB, Velmourougane G, Dalal S, Reiss G, Whisstock JC, Onder O, Brisson D, McGowan S, Klemba M, Greenbaum DC.** 2011. Bestatin-based chemical biology strategy reveals distinct roles for malaria M1- and M17-family aminopeptidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**:E526–534.
116. **Kusch P, Deininger S, Specht S, Maniako R, Haubrich S, Pommerening T, Lin PKT, Hoerauf A, Kaiser A.** 2011. In Vitro and In Vivo Antimalarial Activity Assays of Seeds from *Balanites aegyptiaca*: Compounds of the Extract Show Growth Inhibition and Activity against Plasmodial Aminopeptidase. *J Parasitol Res* **2011**:368692.
117. **Natarajan S, Mathews R.** 2012. Cloning, expression, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of aspartyl aminopeptidase from the apeB gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **68**:207–210.
118. **Yuga M, Gomi K, Klionsky DJ, Shintani T.** 2011. Aspartyl aminopeptidase is imported from the cytoplasm to the vacuole by selective autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **286**:13704–13713.
119. **Lee S, Kim JS, Yun CH, Chae HZ, Kim K.** 2009. Aspartyl aminopeptidase of *Schizosaccharomyces pombe* has a molecular chaperone function. *BMB Rep* **42**:812–816.
120. **Ribeiro-Guimarães ML, Pessolani MCV.** 2007. Comparative genomics of mycobacterial proteases. *Microb. Pathog.* **43**:173–178.

Capítulo 3

Objetivos

Como justificativa para realização do presente estudo, temos que a tuberculose é uma doença cujo controle vem enfrentando uma variedade de obstáculos como a eficácia variável da vacina BCG e a aquisição de multirresistência das bactérias aos antibióticos. Com isso surge a necessidade de desenvolvimento de novas ferramentas para prevenção e tratamento da doença, como descoberta de novos alvos de fármacos com a finalidade de inibir a progressão da doença e tornar-se uma alternativa nos casos de resistência ao tratamento convencional. A proposta apresentada nesse projeto tem a finalidade de estabelecer uma plataforma para a elucidação de novos alvos no combate a doença bem como propor antígenos que possam compor uma nova vacina anti-TB.

3.1 - Objetivo Geral

Este trabalho está inserido na linha de pesquisa de nosso grupo que trata de contribuir para a identificação de alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas e para melhor compreensão da interação patógeno-hospedeiro visando à possibilidade de inovação no tratamento da infecção causada bactéria *M. tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho consiste em determinar a expressão, purificação e caracterização bioquímica de quatro metalo-proteases de *Mtb*, bem como busca por potenciais substratos fisiológicos e determinação de sua imunogenicidade. Com isso, esperamos que as enzimas objeto deste estudo possam se tornar promissores alvos para o desenvolvimento de vacinas e fármacos quimioterápicos mais específicos no combate ao *Mtb* e, conseqüentemente, para o tratamento e prevenção da tuberculose.

3.2 - Objetivos específicos

- Clonar os genes Rv3419c, Rv0198c, Rv2213 e Rv0800 e expressar as proteínas recombinante em sistema heterólogo *E. coli*;
- Purificar as enzimas recombinantes
- Caracterizar bioquimicamente as enzimas recombinantes purificadas
- Identificar possíveis substratos e função
- Testar diferentes inibidores sobre a atividade das enzimas recombinantes produzidas
- Testar a influência dos inibidores na taxa de crescimento e/ou replicação do *Mtb* *in vitro*
- Produzir anticorpos específicos contra a enzima purificada como ferramenta na identificação da proteína no *Mtb*
- Imunizar camundongos com as proteínas recombinantes e determinar a imunogenicidade
- Avaliar a proteção conferida pela imunização com as proteínas recombinantes com diferentes adjuvantes.

PARTE II

RESULTADOS

Capítulo 4

Obtenção das proteínas recombinantes

Para a caracterização bioquímica e estudos funcionais das proteínas, necessitamos de cada uma delas na sua forma purificada e ativa. A purificação das proteínas nativas do *Mtb* é um processo que poderia apresentar muitos obstáculos desde a dificuldade em cultivo e manipulação do microrganismo aos processos de separação e obtenção de quantidades razoáveis de cada uma das proteínas. Por este motivo, utilizando a tecnologia do DNA recombinante, decidimos clonar e expressar em sistema heterólogo as proteínas de interesse. Essa tecnologia oferece diversas vantagens, na obtenção e purificação de proteínas. Porém como necessitamos de obter enzimas ativas, algumas características inerentes da técnica como utilização de um forte promotor ou mesmo falta de componentes que ajudam no dobramento das proteínas recombinantes levam a expressão de enzimas sem atividade ou em corpos de inclusão. Neste sentido, o esforço inicial é a obtenção das proteínas recombinantes sendo expressas na fração solúvel celular, evitando a formação de corpos de inclusão.

4.1 - Clonagem dos genes

A partir do DNA genômico extraído da cepa de *Mtb* H37Rv (Figura 4.1B), foram realizadas PCRs para amplificação dos genes alvo do estudo. Cada primer foi desenhado sendo adicionado um sítio para enzimas de restrição que facilitaram o processo de clonagem. Os produtos de PCR para cada gene corresponderam ao tamanho esperado relativo ao banco de dados, 1.3 kbp para o gene da enzima DAP, 1.05 kbp para o gene da Gcp, 1.5 kbp para o gene da LAP e 2 kbp para o gene da enzima Zmp1 (Figura 4.1C).

Após amplificação dos genes, o produto da PCR foi ligado ao vetor de clonagem TA pCR2.1 utilizando a enzima T4 DNA ligase e a reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* DH5 α . Para confirmar a clonagem digerimos os plasmídeos, obtidos a partir da transformação, com as enzimas de restrição cujos sítios foram adicionados aos primers. Assim obtivemos no produto da digestão uma banda de 3.9 kbp correspondente ao plasmídeo pCR2.1 e a liberação do inserto com tamanho ao respectivo gene amplificado por PCR. (Figura 4.1D).

Os fragmentos excisados com as respectivas enzimas de restrição foram então purificados por eluição da banda do gel de agarose e em seguida ligados ao vetor de expressão pET28a, onde a proteína será expressa fusionada a uma cauda de histidina na sua extremidade N-terminal. A confirmação da subclonagem no vetor de expressão foi feita por análise de restrição e sequenciamento dos plasmídeos obtidos de colônias transformadas com a reação de ligação. Na análise de restrição, obtivemos uma banda com 5.3 kbp correspondente ao pET28a e a liberação do inserto com tamanho correspondente ao produto de PCR para o respectivo gene. (Figura 4.1E).

Além disso, o gene das proteínas DAP e Gcp foram clonados no plasmídeo pGEM-Teasy e subclonados nos plasmídeos de expressão pET21a, que adiciona uma cauda de histidina no C-terminal da proteína, e no pGEX4t-1 onde a proteína é expressa fusionada a GST.

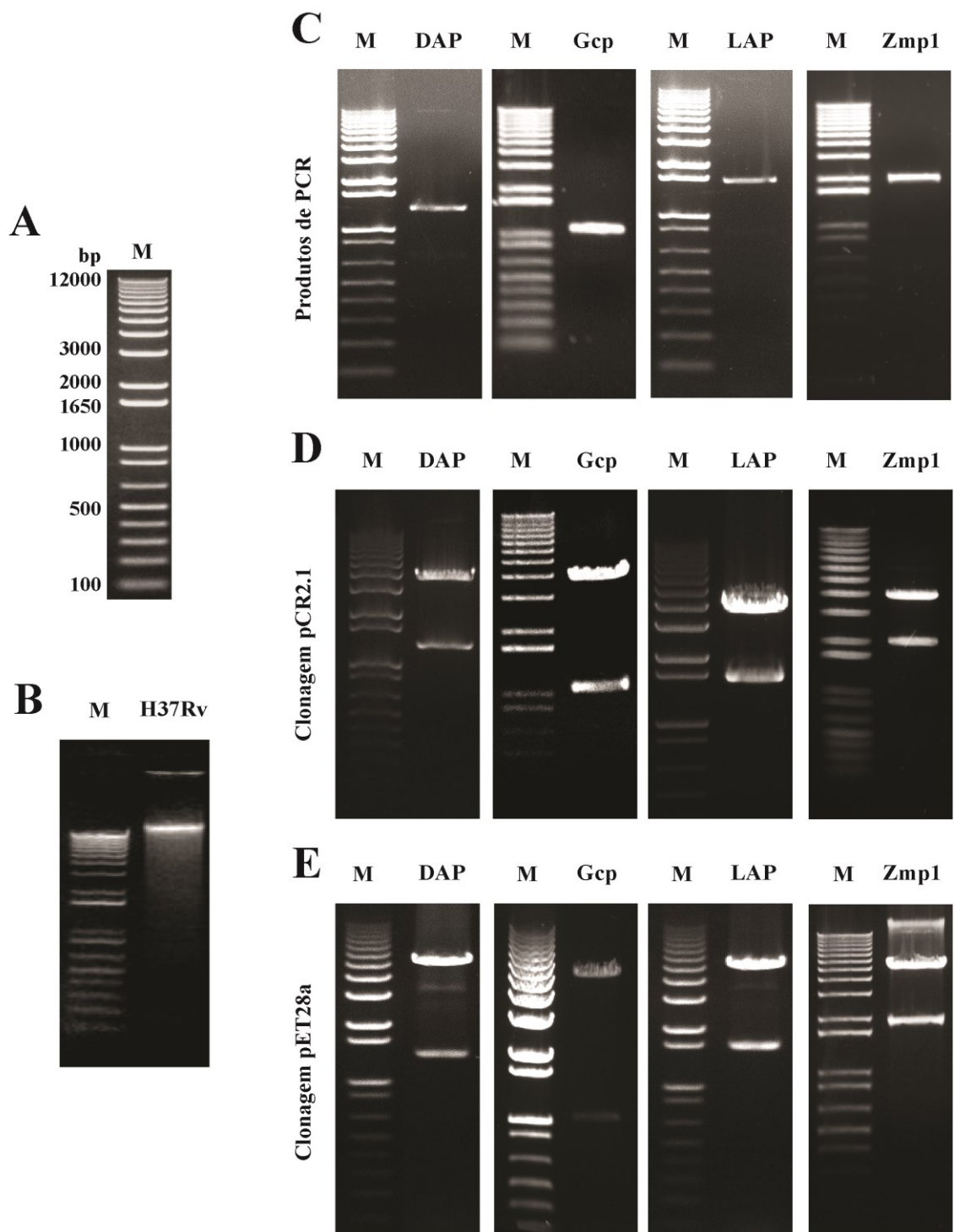


Figura 4.1 Clonagem dos genes. Eletroforese em gel agarose 0.8% contendo 1 $\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídeo. (A) Marcador de peso molecular: 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). (B) Extração de DNA genômico da cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*. (C) Amplificação dos genes por PCR utilizando a enzima de alta fidelidade pfx50. Produtos de PCR: DAP contendo 1.3 kbp, Gcp com 1,05 kbp, LAP com 1.5 kbp e Zmp1 com 2.0 kbp. (D) Confirmação da clonagem no vetor PCR2.1 por digestão com enzimas de restrição. Produtos da digestão: Fragmento correspondente ao PCR2.1 contendo 3.9 kbp e liberação do inserto nos tamanhos correspondente ao seu produto de PCR. (E) Confirmação da subclonagem no vetor pET28a por digestão com enzimas de restrição. Produtos da digestão: Fragmento correspondente ao pET28a contendo 5.3 kbp e liberação do inserto nos tamanhos correspondente ao seu produto de PCR.

4.2 - Expressão das proteínas recombinantes

Bactérias *E. coli* BL21 foram transformadas com os plasmídeos pET28a recombinantes, então selecionamos alguns clones para indução das proteínas recombinantes. A expressão de cada enzima foi induzida com 1 mM de IPTG a 37°C por 3 h. Com exceção da proteína LAP, as outras três enzimas foram expressas em corpos de inclusão (Figura 4.2A). Como o intuito do trabalho é também estudar as propriedades enzimáticas de cada proteína, nosso interesse é a obtenção das enzimas na fração solúvel do lisado bacteriano após indução, pois enzimas expressas na fração insolúvel, ou seja, em corpos de inclusão não possuem dobramento correto e dificilmente apresentarão atividade.

Para obtenção das proteínas na fração solúvel, mudamos a condição de expressão variando agora a temperatura de 30°C a 14°C, o tempo de indução de 2 a 16 h e a concentração de IPTG. A enzima Zmp1 mostrou-se solúvel quando expressa a 20°C, independente da concentração de IPTG utilizada (Figura 4.2B) e a LAP uma melhor quantidade quando expressa a essa temperatura. Para estas enzimas escolhemos o tempo de 16 h de indução para conseguir grande quantidade de enzima recombinante, já que estas não apresentaram degradação com longos períodos de indução.

As enzimas Gcp e DAP foram expressas somente em corpos de inclusão em todas condições testadas, não sendo detectadas na fração solúvel por nenhum dos métodos utilizados como SDS-PAGE corado com comassie, tentativa de purificação e concentração da fração solúvel. Além disso, nem mesmo por western blot, utilizando anticorpos anti-HisTag, foi detectada a presença dessas proteínas nas frações solúveis do lisado bacteriano, porém nas frações insolúveis elas estão presentes em grande quantidade (Figura 4.2C).

4.3 - Purificação das proteínas recombinantes

As proteínas foram extraídas a partir de 25 mL de cultura, centrifugados, então ressuspensos em tampão e lisados por sonicação. As frações solúveis e corpo de inclusão foram separados por centrifugação e a purificação por cromatografia de afinidade ao níquel realizada. Primeiramente, padronizamos as condições de purificação para cada enzima. Para isso, variamos a quantidade de imidazol durante a etapa de eluição da purificação com o intuito de estabelecer qual melhor concentração de

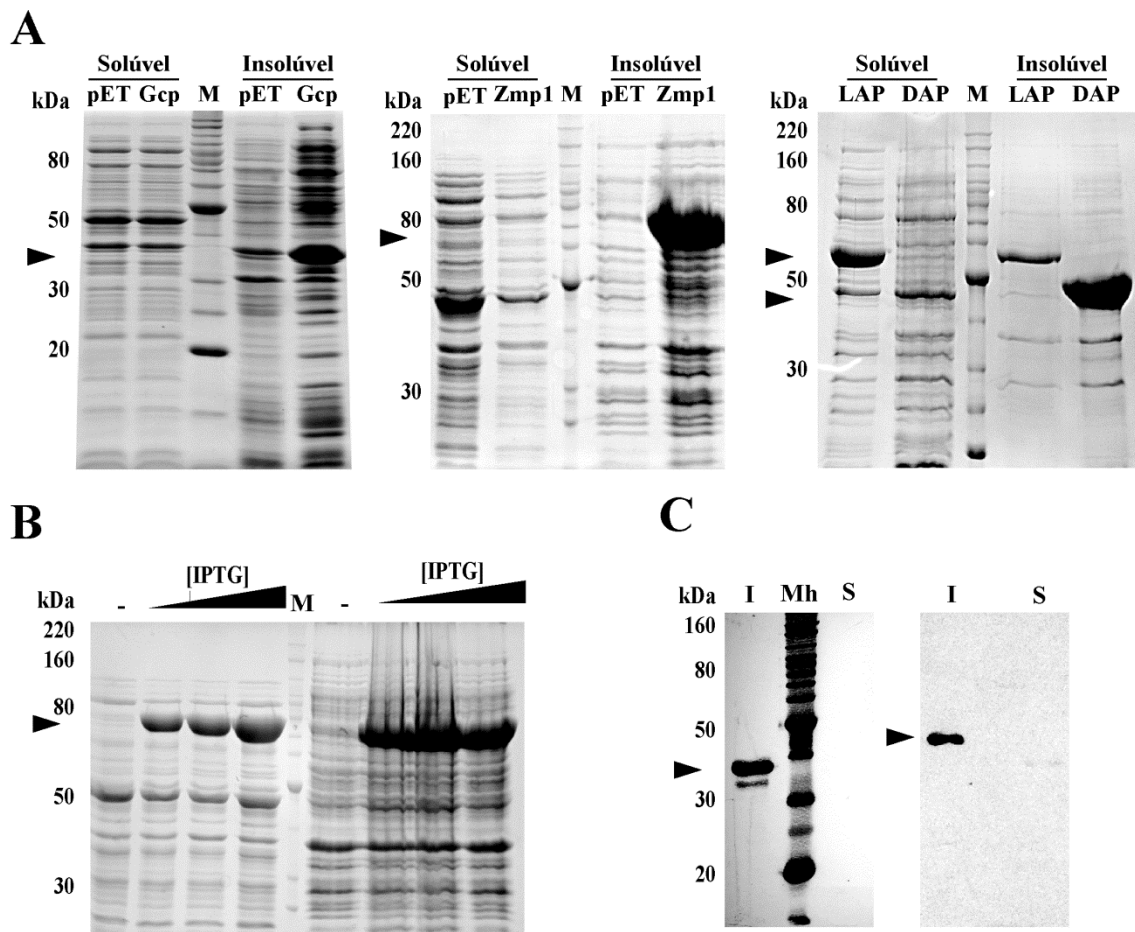


Figura 4.2 Expressão das proteínas recombinantes. (A) SDS-PAGE das frações obtidas com a indução da expressão das proteínas recombinantes em *E. coli* BL21 a 37°C por 3 h com 1 mM de IPTG. Após lise das células, foram separadas as frações solúveis e insolúveis para bactérias contendo o pET28a vazio (pET), a proteína Gcp à esquerda, a proteína Zmp1 ao centro e as proteínas LAP e DAP à direita. (B) Indução da Zmp1 a 20°C por 16 h com concentrações crescentes de IPTG (0; 0.01; 0.1; 0.5 mM). Frações solúveis (esquerda), marcador (centro) e frações insolúveis (direita). (C) Western-Blot anti-HisTag para detecção das proteínas Gcp (esquerda) e DAP (direita) nas frações solúveis (S) e insolúveis (I); M - marcador de peso molecular BenchMark Protein Ladder (Invitrogen); Mh - marcador de peso molecular BenchMark His-tagged Protein Ladder (Invitrogen). As cabeças de seta indicam a altura das proteínas de interesse.

imidazol para se utilizar no tampão de lavagem. Assim a máxima quantidade de imidazol em que a proteína se mantiver presa à resina foi utilizada posteriormente para lavagem. As proteínas LAP e Zmp1 foram purificadas em condição nativa e eluídas com gradiente crescente de imidazol (5 mM a 1 M) para determinar qual melhor condição para purificação. A LAP se manteve ligada a resina até uma concentração de 100 mM de imidazol (Figura 4.3A), concentração posteriormente utilizada para lavagem. Já a Zmp1 suportou lavagens com até 60 mM de imidazol (Figura 4.3B). As enzimas Gcp e DAP foram purificadas em condição desnaturante, com todos tampões contendo 6 M de ureia, variando de 5 mM a 1 M de imidazol nos tampões de eluição. A

proteína Gcp permaneceu ligada à resina com lavagens de até 80 mM e eluída em grande quantidade a partir de 400 mM de imidazol (Figura 4.3C), enquanto a DAP se manteve presa à coluna de purificação apenas em concentrações inferiores a 20 mM de imidazol (Figura 4.3D).

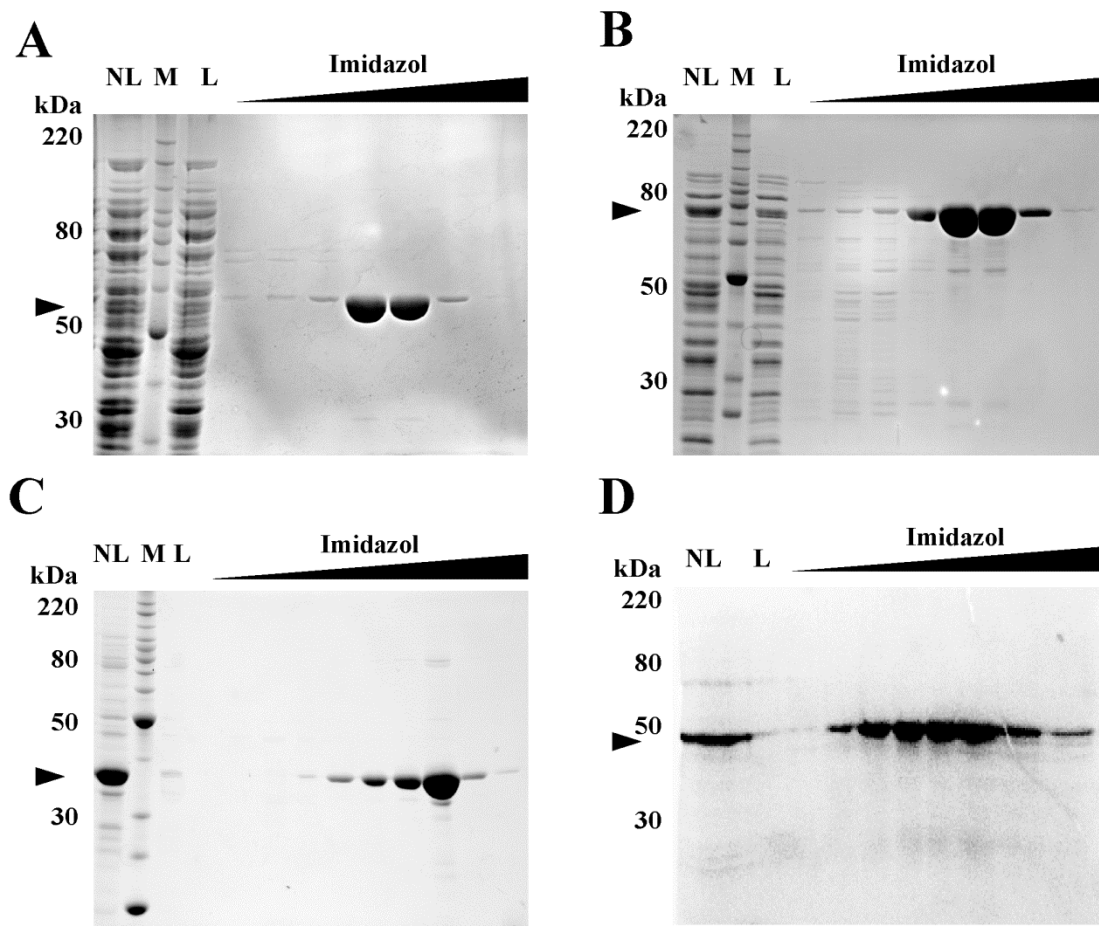


Figura 4.3 Purificação das enzimas recombinantes. (A) Purificação da LAP em condição não desnaturante: a lavagem foi feita com 10 volumes de tampão com 20 mM de imidazol seguido por eluições crescentes de 60, 80, 100, 200, 400, 800 e 1000 mM de imidazol. (B) Purificação da Zmp1 em condição não desnaturante: a lavagem foi feita com 10 volumes de tampão com 5 mM de imidazol seguido por eluições crescentes de 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400 e 800 mM de imidazol. (C) Purificação da Gcp em condição desnaturante com 6 M de ureia: a lavagem foi feita com 10 volumes de tampão com 5 mM de imidazol seguido por eluições crescentes de 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 800 e 1000 mM de imidazol. (D) Purificação da DAP em condição desnaturante com 6 M de ureia: a lavagem foi feita com 10 volumes de tampão com 5 mM de imidazol seguido por eluições crescentes de 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400 e 1000 mM de imidazol.; NL: Fração não ligada à coluna.; M: marcador de peso molecular BenchMark Protein Ladder (Invitrogen).; L: Lavagem com tampão.; As cabeças de seta indicão a altura das proteínas de interesse.

Para purificação em larga escala, foram induzidos 500 mL de cultura para cada proteína. Onde a LAP e Zmp1 foram induzidas a 20°C por 16 h, com 0,5 mM de IPTG e as enzimas DAP e Gcp induzidas a 37° C por 16 h com 0,1 mM de IPTG. Após o tempo de indução, a cultura foi centrifugada, as bactérias lisada, separado as frações solúveis e insolúveis e a purificação por cromatografia de afinidade ao níquel realizada com as condições ótimas estabelecidas na padronização. Ou seja, lavagem com 100 mM de imidazol para a LAP, 60 mM para a Zmp1, 80 mM para a Gcp e 20 mM para DAP. Para eluição, todas as enzimas foram eluídas com tampão contendo 400 mM de imidazol. As enzimas purificadas foram dialisadas, concentradas e estocadas a -20°C em 50% glicerol, para posteriores testes.

4.4 - Mudança de vetor de expressão

Para tentar obter as proteínas DAP e Gcp nas frações solúveis, decidimos mudar os vetores de expressão. Assim o gene de cada enzima foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de H37Rv (Figura 4.4A), clonado no plasmídeo pGEM-Teasy e subclonadas nos plasmídeos de expressão pET21a, que adiciona uma cauda de histidina no C-terminal da proteína, e no pGEX4t-1 onde a proteína é expressa fusionada a GST (Figura 4.4B). Não houve diferenças, em relação ao pET28a, quanto a expressão na forma solúvel das proteínas quando clonadas no pET21a. Assim as proteínas se encontravam em corpos de inclusão em todas as condições testadas de temperatura (14 a 37° C), concentrações de IPTG (0.01 a 1 mM) e tempo de indução (2 a 16 h) (Figura 4.4C).

Já quando no pGEX-4t1, expressas fusionadas a GST, as enzimas apresentaram um pequena porção expressa na fração solúvel, mesmo a 37° C, porém grande parte ainda estava presente em corpos de inclusão (Figura 4.4D). Diminuindo a temperatura ou a concentração do indutor apenas reduziu a quantidade de proteína expressa, tanto na fração solúvel, quanto insolúvel. A presença das proteínas Gcp e DAP na fração solúvel talvez se deva à grande solubilidade da proteína GST [1], sendo que após sua retirada as enzimas de interesse do estudo poderiam voltar a formar corpos de inclusão. Desta forma não obtivemos quantidade satisfatória de proteína expressa na forma solúvel.

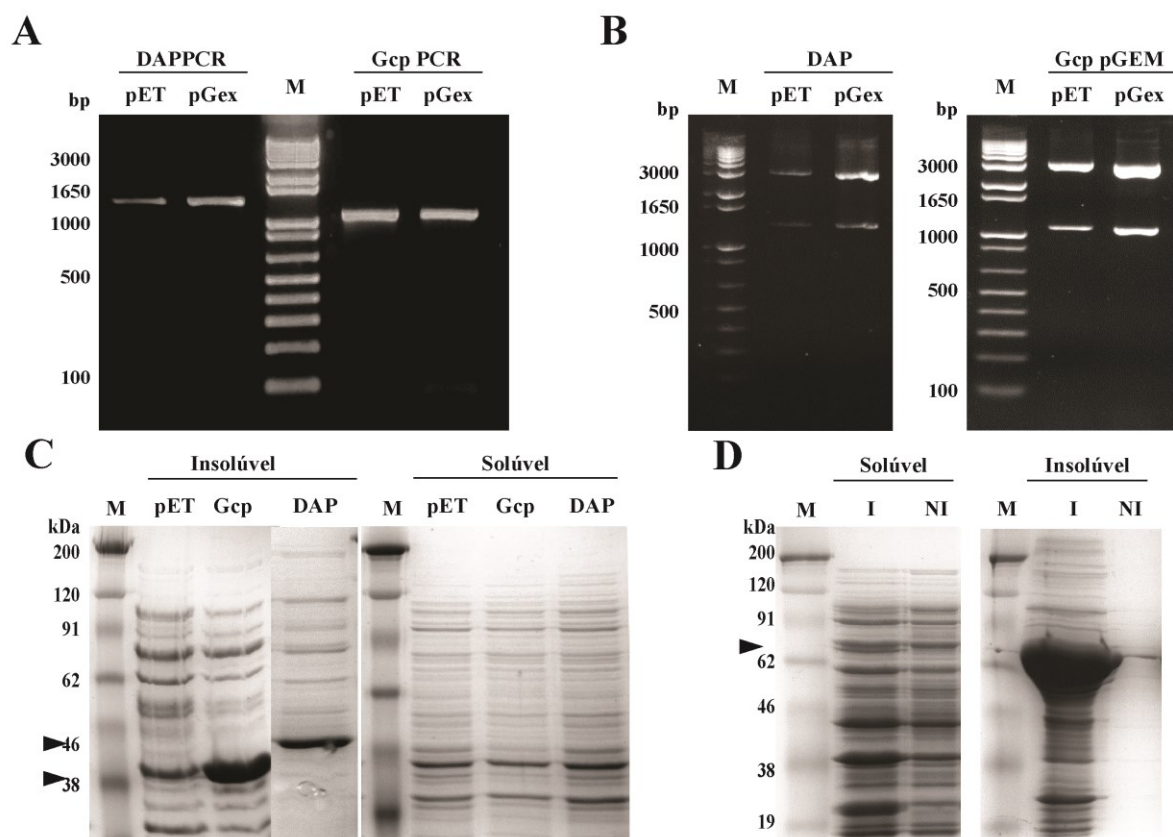


Figura 4.4 Clonagem da DAP e Gcp nos vetores de expressão pET21a e pGEX4t-1. (A) Amplificação dos genes por PCR. (B) Clonagem no vetor pGEM-T easy: Gel agarose 0.8% mostrando o produto da digestão dos plasmídeos obtidos de colônias transformadas com a ligação do produto de PCR. São observadas bandas de 3 kbp correspondentes os pGEM e liberação do inserto no tamanho correspondente ao produto de PCR. (C) SDS-Page das frações proteicas obtidas da indução da expressão das proteínas rDAP e rGCP clonadas no pET21a. (D) SDS-Page das frações proteicas obtidas da indução da expressão da proteína rDAP fusionada a GST, clonada no vetor pGEX4t-1 em bactérias não induzidas (NI) e induzidas com 1 mM de IPTG (I). M - Marcador de peso molecular: 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen) e BlueStep Broad Range protein ladder (Amresco).

4.5 - Produção das enzimas pelo *M. tuberculosis*

Camundongos foram imunizados separadamente com as proteínas recombinantes purificadas e obtivemos soro destes animais. A presença de anticorpos no soro, capazes de reconhecer as proteínas recombinantes, foi determinada por ELISA. Quando pouco diluído, os anticorpos presente no soro se ligam as proteínas alvo e controle de maneira inespecífica. Porém, em concentrações menores o soro dos animais

mostrou-se capaz de reconhecer a proteína alvo com especificidade, inclusive em grande porção de diluição, não se ligando de forma cruzada a proteína utilizada como controle. (Figura 4.5A). Assim obtivemos soro com anticorpos específicos para cada proteína alvo e capazes de detecção com boa sensibilidade.

Para determinar se as enzimas são realmente produzidas pelo *Mtb*, se são secretadas ou citosólicas, utilizamos o soro produzido nos camundongos para detectar as proteínas no lisado celular e sobrenadante de cultura filtrado (CFP) da cepa H37Rv em ensaio de western-blot (Figura 4.5B). As proteínas DAP, LAP e Zmp1 foram detectadas no lisado celular, mostrando que a bactéria produz estas proteínas nas condições testadas. A proteína Zmp1, além da presença no lisado, estava presente também no sobrenadante de cultura. Isto demonstra que a proteína é secretada pela bactéria e a não detecção das enzimas DAP e LAP no sobrenadante, mostra que estas são proteínas citoplasmáticas e que não há presença de proteínas proveniente da lise de bactérias no CFP. Já a enzima Gcp não foi detectada em nenhuma das frações, provavelmente a enzima não é produzida pelo *Mtb* nas condições testadas ou está contida em um pseudo-gene.

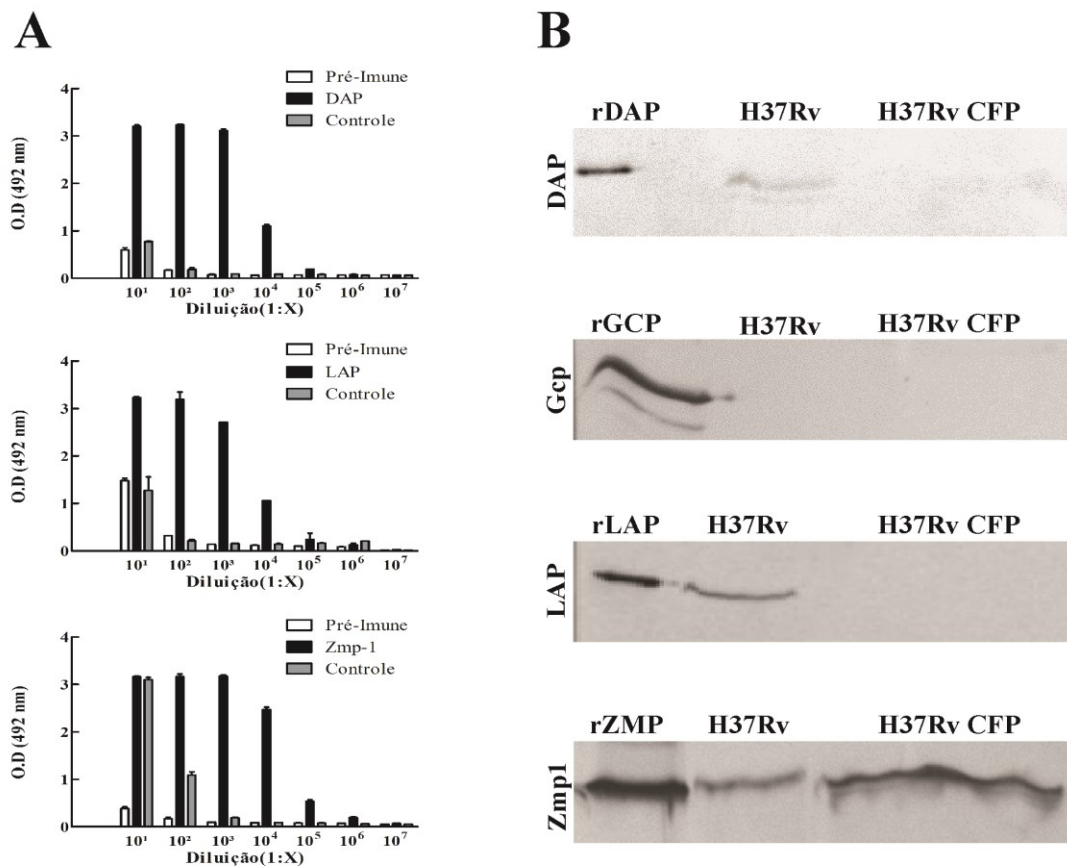


Figura 4.5 Detecção das enzimas no *Mtb*. (A) Titulação de anticorpos no soro de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes: Soro anti-DAP (acima), anti-LAP (cento) e anti-Zmp1 (abaixo). (B) Western-blot do lisado celular total (H37Rv), sobrenadante de cultura (H37Rv CFP) e como controle utilizamos as proteínas recombinantes purificadas para cada um dos ensaios.

4.6 - Considerações

Feito o esforço para obtenção das proteínas recombinantes, apenas duas das quatro enzimas selecionadas no estudo foram expressas e purificadas em condições não desnaturantes e podem apresentar atividade enzimática. Assim as proteínas LAP e Zmp1, expressas como proteínas solúveis, foram selecionadas para realizar testes bioquímicos relacionados à sua atividade como enzima proteolítica. As proteínas DAP e Gcp, só foram expressas na forma solúvel quando fusionadas a GST, porém em quantidade insatisfatória para posteriores estudos. Além disso, para a realização de ensaios bioquímicos, a retirada da cauda GST poderia ocasionar precipitação das proteínas recombinantes fusionadas a ela. Assim, os estudos relacionados à atividade destas enzimas não foram possíveis neste trabalho, pois quando expressas em corpos de inclusão as proteínas não possuem sua estrutura terciária ou quaternária adequada. Portanto, a conformação estrutural de uma proteína, geralmente é fundamental para sua atividade como enzima. A tentativa de *refolding* destas enzimas foi descartada, pois poderia ocasionar um dispêndio de tempo excessivo e não apresentar resultados satisfatórios [2]. Contudo, estas proteínas foram purificadas em condições desnaturantes e podem ser utilizadas para análise imunogênica, já que a capacidade de gerar uma resposta imune não está necessariamente relacionada à estrutura da proteína como um todo.

*Nota técnica: A proteína DAP foi cedida a outro integrante do nosso grupo de pesquisa. Assim, seu estudo neste trabalho cessa aqui.

4.7 - Material e Métodos

4.7.1 - Amplificação dos genes por PCR

Celulas de *M. tuberculosis* H37Rv foram centrifugadas a 5000 x g por 10 min, e o DNA genômico foi extraído seguindo protocolo previamente descrito [3]. A partir de buscas no banco de dados do GenBank, os genes Rv0198c, Rv0800, Rv2213 e Rv3419c, foram amplificados pela técnica de PCR (reação de polimerização em cadeia) a partir do DNA genômico extraído da cepa *M. tuberculosis* H37Rv. Para isso, foram construídos e utilizados oligonucleotídeos sintéticos específicos, com sítios de restrição

das enzimas *Bam*HI, *Eco*RI, *Nde*I e *Xho*I, para amplificar a fase aberta de leitura (ORF) dos genes. Os oligonucleotídeos utilizados estão listados na tabela 4.1.

Tabela 4.1. Oligonucleotídeos

Sequência (5' – 3')	Proteína/ Sentido do primer	Plasmídeo Alvo	Enzima de restrição
TGGCCATATGACACTTGCCATCCC	Zmp1/S	pET28a	<i>Nde</i> I
GGTCTCGAGCTAGTTCCAGATCCGGA	Zmp1/R	pET28a	<i>Xho</i> I
GGACCCCATATGACGACAGTCTTGG	Gcp/S	pET28a/ pET21a	<i>Nde</i> I
ATGCTCGAGTCACCGCACCTGCC	Gcp/R	pET28a	<i>Xho</i> I
GTTGCATATGACCACCGAACCGGT	LAP/S	pET28a	<i>Nde</i> I
GGCGGATCCCTACCCGTTCTTCGCGAT	LAP/R	pET28a	<i>Bam</i> HI
CCATATGGCAGCCACGGCACACGGC	DAP/S	pET28a/ pET21a	<i>Nde</i> I
CGCGGATCCCTATGCCTCGGATAGCTC	DAP/R	pET28a	<i>Bam</i> HI
TTTTGAATTCATGACGACAGTCTTGGGCATCG	Gcp/S	pGEX4t1	<i>Eco</i> RI
GCAATGCTCGAGTAACCGCACCTGCC	Gcp/R	pET21a/ pGEX4t1	<i>Xho</i> I
AGACATGGATCCATGGCGGCCACGGCACAC	DAP/S	pGEX4t1	<i>Bam</i> HI
TACCGCCTCGAGCTATGCCTCGGATAGC	DAP/R	pGEX4t1	<i>Xho</i> I
TACCGCCTCGAGCAATGCCTCGGATAGC	DAP/R	pET21a	<i>Xho</i> I

S- para oligonucleotídeos no sentido direto
R- para oligonucleotídeos no sentido reverso

Cada PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo em suas fórmulas, em concentrações finais, 100 ng de DNA genômico, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 200 nM de cada oligonucleotídeo, 1.25 µL de Platinum® Taq DNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen®) e tampão de reação diluído em água milli-Q q.s.p 50 µL. O programa no qual as reações foram submetidas foi adaptado para as condições dos oligonucleotídeos: desnaturação inicial a 94°C por 3 min seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s, extensão a 72°C por 1 - 2 min. Por fim, as reações foram estendidas por mais 10 min a 72°C.

4.7.2 - Clonagem dos genes amplificados nos vetores de expressão

Os produtos amplificados correspondentes aos genes foram clonados diretamente no vetor pCR®2.1-TOPO® (Invitrogen®) os quais foram transformados

em células competentes de *E. coli* da linhagem DH5 α . As amostras foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), IPTG (100 mM) e X-Gal (25 mg/mL) e incubadas durante a noite a 37°C. As colônias brancas de cada placa foram coletadas e adicionadas em tubos contendo 1 mL de meio LB líquido e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. As colônias foram crescidas a 37°C sob agitação constante, durante a noite e uma alíquota de 100 μL da cultura foi estocada a 4°C. Os 900 μL restantes foram centrifugados por 5 min a 7000 rpm, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuscitadas em 70 μL de água milli-Q. Após adição de 80 μL de fenolclorofórmio (1:1), rápida homogeneização e nova centrifugação a 15000 rpm por 10 min, o DNA total dos possíveis clones foram extraídos. O perfil das amostras foi analisado em gel de agarose 0.8%, onde 10 μL da fase superior de cada amostra foram aplicados no gel. Aquelas que apresentaram plasmídeo com tamanho maior foram cultivadas a partir das alíquotas de 100 μL previamente reservadas. Desta forma, as amostras selecionadas foram cultivadas em 10 mL de meio LB contendo ampicilina, o DNA plasmidial foi extraído por lise alcalina (*PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit, Invitrogen®*) e submetido à análise por PCR, nas mesmas condições utilizadas para a amplificação dos genes a partir do DNA genômico. Ao mesmo tempo, o material extraído foi digerido com as enzimas de restrição, conforme instruções do fabricante, para a liberação dos insertos. As amostras digeridas foram aplicadas em gel de agarose 0.8% e as bandas liberadas dos vetores correspondentes aos insertos foram excisadas do gel e eluídas (*ilustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit, GE Healthcare®*). Os genes purificados foram ligados ao vetor de expressão pET28a (Novagen®) previamente linearizado nos sítios de clonagem das enzimas *restrição*. As ligações dos fragmentos de DNA ao vetor foram realizadas com a T4 DNA ligase (Invitrogen®), de acordo com as orientações do fabricante. Os produtos de ligação foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* da linhagem BL21(DE3), a qual é própria para a produção de proteínas recombinantes quando induzidas. As células submetidas ao processo de transformação foram plaqueadas em meio LB sólido com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina e crescidas a 37°C durante a noite. As placas foram submetidas à varredura por meio da coleta e crescimento das colônias em LB líquido. O DNA total foi extraído por fenolclorofórmio, como descrito anteriormente, e as amostras foram analisadas em gel de agarose 0.8%. Os clones que apresentaram padrão plasmidial com tamanhos maiores que aqueles do controle (vetor pET28a vazio) foram selecionados como positivos. O DNA plasmidial dos mesmos foi extraído, como descrito anteriormente, e

analisado por digestão com as respectivas enzimas de restrição. Os clones também foram testados por amplificação com a técnica de PCR a partir do uso de iniciadores do promotor T7 e os respectivos oligonucleotídeos específicos de cada gene, sintetizados inicialmente para amplificar os genes do DNA genômico. Amostras de 500 ng do DNA plasmidial dos clones foram sequenciadas com o emprego dos iniciadores do promotor T7 (5'- TAATACGACTCACTATAGGG -3') e do terminador T7 (5'- TATGCTAGTTATTGCTCAG -3') para analisar a qualidade das sequências

4.7.3 - Expressão das proteínas recombinantes

Os clones positivos contendo os plasmídeos de expressão foram cultivados para expressão das proteínas recombinantes fusionadas à cauda de histidina. Células BL21(DE3) foram transformadas por choque térmico com os clones e plaqueadas em meio LB sólido contendo antibiótico. Colônias foram selecionadas para expressão das proteínas recombinantes. A indução foi feita em diferentes condições para cada proteína. O extrato total de bactérias de cada clone foi obtido após centrifugação da cultura, 10 min a 5000 rpm, e descarte dos sobrenadantes. Então, o sedimento de células correspondente foi ressuspenso em tampão de lise (Binding Buffer – Tris-HCl 20 mM pH 7.9, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM). A seguir, as células foram sonicadas para a lise de suas membranas e obtenção das proteínas solúveis e insolúveis. Os extratos foram centrifugados a 15000 rpm por 10 min a 4°C, e então as frações solúveis e insolúveis foram separadas e analisadas em SDS-PAGE 10%.

4.7.4 - Purificação das enzimas recombinantes

Células *E. coli* a partir de volume de 500 mL de cultura previamente induzida por IPTG foram obtidas por centrifugação e ressuspendidas em 20 mL de tampão de lise (Binding Buffer – Tris-HCl 20 mM pH 7.9, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM). Em seguida, as células foram submetidas a 3 ciclos de sonicação, no gelo, com um processador ultra-sônico Vibra-Cell VC130 (Sonics®). Os ciclos apresentavam duração total de 2 min, segmentados em pulsos de 5 s, com potência de 10 W. Um intervalo de 2 min era respeitado entre cada ciclo aplicado nas amostras, visando evitar o aquecimento da mesma e uma possível degradação das proteínas contidas do extrato total. O material foi centrifugado a 15000 rpm por 10 min a 4°C e a porção solúvel contendo a proteína

recombinante foi designada de extrato total. O extrato total foi aplicado à coluna de níquel (1 mL de resina) com afinidade pela histidina (His Bind Purification Kit®, Novagen®), previamente lavada com 3 volumes de água milli-Q, tratada com 5 volumes de NiSO₄ (Charge Buffer) e equilibrada com 3 volumes de tampão de ligação (Binding Buffer – Tris-HCl 20 mM pH 7.9, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM). Após a passagem da amostra, a coluna foi lavada com 10 volumes de tampão de ligação e, em seguida, pela aplicação de 10 volumes de tampão de lavagem (Wash Buffer – Tris-HCl 20 mM pH 7.9, NaCl 500 mM, imidazol 20 - 100 mM). As enzimas retidas na coluna foram eluídas com 4 volumes de tampão de eluição (Elute Buffer – Tris-HCl 20 mM pH 7.9, NaCl 500 mM, imidazol 400 mM) em frações de 0.5 mL e estocadas a -20°C em 50% glicerol. Alíquotas de todos os passos da purificação foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE.

4.7.5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida

Para analisar a separação das proteínas do extrato total, monitorar o padrão de migração da protease recombinante purificada bem como estimar sua massa molecular, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. O tampão de amostra utilizado foi composto por 0.1% de SDS e 50 µM de β-mercaptoetanol; as amostras foram aplicadas no gel com fervura prévia. Após eletroforese, os géis foram corados com azul de Coomassie para a visualização das bandas e estimativa da massa molecular da proteína utilizando-se de marcadores comerciais como referência (BenchMark Protein Ladder®).

4.7.6 - Produção de anticorpo

As enzimas recombinantes purificadas foram utilizadas para a imunização de camundongos. Foram utilizados 50 µg de proteína por animal, em uma primeira imunização com 50% (v/v) de adjuvante de Freud completo, seguida por dois reforços a cada 14 dias com 50 µg de proteína e 50% (v/v) de adjuvante de Freud incompleto. O sangue dos animais foi coletado 10 dias após a última imunização, o soro separado e estocado. Os anticorpos foram caracterizados por immunoblot/ELISA e posteriormente utilizados para estudos de citolocalização e detecção das enzimas nativas.

4.7.7 - ELISA

Para determinação dos níveis séricos de anticorpos contra as proteínas recombinantes, foi realizado um ELISA. Placas de poliestireno (Nunc®) de 96 poços foram inicialmente sensibilizadas com 10 µg/mL de proteína recombinante purificada, diluída em 0.05 M de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0.05 M (pH 9.6) e incubadas a 4°C por 16 horas. Posteriormente, a placa foi lavada e incubada por uma hora a 37°C com tampão carbonato de sódio (PBS) contendo 1% de gelatina. A partir dessa etapa seguiu-se a adição dos soros, com posterior incubação de 1 hora a 37°C. O anticorpo conjugados à biotina Biotin-XX Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Novex®), diluídos a 1:5000, foram adicionados e as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Foi adicionada a estreptoavidina peroxidase, diluída a 1:1000 e as placas foram novamente incubadas por 1 hora a 37°C. A reação foi então revelada com o substrato ortofenilenodiamina (OPD) e bloqueada adicionando-se ácido sulfúrico a 4 N. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 492 nm em leitor de ELISA (Multiskan Thermo Labsystems®). Entre cada uma das etapas, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS tween 20 0.05%.

4.7.8 - Western Blot

O lisado celular e o sobrenadante de cultura do *Mtb* H37Rv foi preparado a partir de bactérias cultivadas em meio Sauton que não possui albumina adicionada como nos meios Middlebrook. As bactérias foram cultivadas em 200 mL de meio Sauton até atingir a fase log. A cultura foi centrifugada 2000 ×g por 20 min. O sedimento contendo as bactérias foi ressuspenso em PBS e submetido a sonicação para lisar as células bacterianas. O sobrenadante de cultura foi transferido para um novo tubo e filtrado através de membrana 0.2 µm. O CFP foi concentrado pelo protocolo de precipitação de proteínas por acetona [5] e solubilizado em tampão de amostra para SDS-PAGE. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE em gel 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó, sem gorduras dissolvido em PBS, e então incubada com soro anti-Zmp1, anti-LAP, anti-DAP ou anti-Gcp separadamente. As membranas foram lavadas com PBS e então incubadas com anticorpos secundários anti-mouse IgG conjugados com fosfatase

alcalina(Sigma-Aldrich). O complexo antígeno-anticorpo foi detectado via adição do sistema de substrato líquido BCIP/NBT (Sigma-Aldrich).

Referências Bibliográficas

1. **Kaelin WG, Krek W, Sellers WR, DeCaprio JA, Ajchenbaum F, Fuchs CS, Chittenden T, Li Y, Farnham PJ, Blunar MA.** 1992. Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* **70**:351–364.
2. **Watt MA, Lo RY, Mellors A.** 1997. Refolding of recombinant *Pasteurella haemolytica* A1 glycoprotease expressed in an *Escherichia coli* thioredoxin gene fusion system. *Cell Stress Chaperones* **2**:180–190.
3. **Amaro A, Duarte E, Amado A, Ferronha H, Botelho A.** 2008. Comparison of three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Letters in Applied Microbiology* **47**:8–11.
4. **Sambrook J, Russell DW.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press.
5. **Wessel D, Flügge UI.** 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**:141–143.

Capítulo 5

Endothelin system has a significant role in the pathogenesis and progression of *Mycobacterium tuberculosis* infection.

Andre F. Correa,^{a,d} Alexandre M. Bailao,^b Izabela M. D. Bastos,^a Ian M. Orme,^c Célia M. A. Soares,^b Andre Kipnis,^d Jaime M. Santana^{a#} and Ana Paula Junqueira-Kipnis^{d#}

Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil^a; Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil^b; Colorado State University, Fort Collins, CO, USA^c; Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil^d

Running Head: ET1 antagonism increases lung *Mtb* bacterial load

#Corresponding authors: Ana Paula Junqueira-Kipnis, apkipnis@gmail.com and Jaime Martins de Santana, jsantana@unb.br

INTRODUCCION

Tuberculosis (TB) remains a major global health problem. In 2012, an estimated 8.6 million people developed TB and 1.3 million died from the disease (1). However, infection with *M. tuberculosis* (*Mtb*) does not necessarily lead to TB disease. Less than 10% of immunocompetent individuals that are infected will progress towards active disease during their life-time (2). It is unknown if infected individuals are able to eradicate the bacteria following primary pulmonary infection. Although it is very well known that the adaptive immune Th1 and Th17 responses are important to control the disease, there is also evidence that suggests that early innate as well as adaptive immune defense mechanisms play a role in *Mtb* elimination. There is still little knowledge about the initial control of *Mtb*, although early IFN- γ production induced by cytokines such as IL-12 and TNF- α appears to be essential in initiating adequate immune response to control the disease (3-7).

Proteases produced by bacteria have been implicated as important virulence factors (8), but only a few of these enzymes have been characterized in mycobacteria. Recently, an endopeptidase named Zmp1 with homology to human endothelin-converting enzyme 1 was described as required for *Mtb* virulence and survival in macrophages (9), but a direct mechanism of action or a natural substrate remains unknown.

The endothelins are a family of 21 amino acid vasoactive peptides, of which 3 distinct isoforms are known. Endothelin-1 (ET-1) is the most abundant and the best characterized isoform. The endothelin precursor known as Big Endothelin (Big ET-1, 37-41 aa) is mainly produced by endothelial cells, and the vasoactive peptides are generated after cleavage by the endothelin converting enzymes (ECE). Its activity contributes to endogenous tonic vasomotor maintenance by homeostatically balancing the vasodilation activity of NO. In addition, ET-1 is also produced by many cell types and released during various injurious stimuli, whereas atrial natriuretic peptide, prostacyclin and nitric oxide (NO) inhibit its synthesis and release (10, 11). ET-1 binds to two distinct subtype receptors (ETA and ETB), which are presented in several cell types. Imbalances in these systems are associated with many diseases including cardiovascular, pulmonary, renal system, and carcinogenesis and has effects on the pathophysiology of the immune system (12-14). In this regard, endothelin receptors

antagonists (ERA) are already being used to treat some associated diseases (i.e. pulmonary hypertension) and several antagonists are under clinical trials (15).

Although many studies have investigated these physiological responses, there is little information linking endothelins and infectious diseases. In Chagas disease, for example, data provided evidence of a role for ET-1 in the pathogenesis of chronic cardiomyopathy (16), because ET-1 cooperatively activates *Trypanosoma cruzi*-mediated myocardial production of inflammatory mediators (17). Endothelin or ETR genes are also regulated during HIV (18-20), other viral infections (21, 22) and correlate with the severity of disease in patients with community acquired pneumonia (23).

Mtb produces an endothelin converting enzyme homologue, but to our knowledge no work has directly addressed if there is any impact on the endothelin pathway after *Mtb* infection; here we show that Zmp1 from *Mtb* appears to have a role in the host physiology and this might contribute to *Mtb* pathogenicity. Here we report that Zmp1 from *Mtb* presents proteolytic activity that does not cleave Big ET-1 to release ET-1 peptide, but is able to degrade ET-1. By applying endothelin receptor antagonism, we show a role for ET-1 in TB progression and inflammatory cell recruitment. In addition, we show here that ETR antagonism increased the numbers of lung lesions and increased bacterial burdens, whereas this could be reversed to some degree by exogenous supply of ET-1

MATERIALS AND METHODS

Mice. Specific pathogen-free 5–8 week old C57BL/6 female mice from the animal care facility of the Institute of Tropical Pathology and Public Health at UFG or iNOS knockout mice from Universidade de São Paulo were maintained in isolators in class 3 biosafety level (BL3) cabinets with water and food provided ad libitum. The temperature was maintained between 20–24°C with the relative humidity set between 40–70%, and 12h light/dark cycles. The use of mice was conducted in accordance with the guidelines of the Brazilian Society of Animal Science Laboratory (SBCAL/COBEA). The work was approved by CEUA-UFG (Comissão de Ética no Uso

de Animais: Committee on the Ethics of Animal Experiments from Universidade Federal de Goiás) numbers: 229/11 and 27/14.

Bacterial strains and growth conditions. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv was grown at 37°C in Middlebrook 7H9 broth or 7H11 agar supplemented with 10% oleic acid-albumin-dextrose (OAD), 0.5% glycerol, and 0.05% Tween 80. *Escherichia coli* strain XL1-Blue (Stratagene) was used for cloning and plasmid propagation. *E. coli* BL21 (Invitrogen) cells were used as expression-competent hosts. *E. coli* strains were maintained in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C with or without the addition of kanamycin (50 µg/ml) or Ampicillin (100 µg/ml) when required for plasmid selection. Solid medium was prepared by the addition of 1.5% agar to the LB medium.

Molecular cloning and recombinant protein expression. *M. tuberculosis* Zmp1 gene (Rv0198c; <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList>) was subcloned into PCR2.1 TOPO vector (Invitrogen) using a PCR amplified product from the *M. tuberculosis* H37Rv genome. The recombinant PCR2.1 vector was digested to release the gene. After agarose gel elution, the released gene was ligated into the pET28a expression vector (Novagen). The recombinant pET28a construct containing the Zmp1 gene had its sequence checked with a BI 3130 capillary DNA sequencer (Applied Biosystems) and was then inserted into the expression host *E. coli* BL21. Bacteria containing the recombinant expression vector were grown at 37°C. When the bacterial cells reached OD₆₀₀ measurements of 0.6, the expression of the fusion protein was induced by the addition of isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 0.5 mM, and the incubation continued at 20°C for 16 h. The bacterial cells were collected by centrifugation (10,000 × g for 5 min), and the cells were suspended in 4 ml of binding buffer (5 mM imidazole, 0.5 M NaCl, and 20 mM Tris-HCl pH 7.9). After sonication, cell lysate was centrifuged (20,000 × g for 15 min), and the supernatant was applied onto a resin column (Novagen) charged with NiSO₄ and equilibrated with binding buffer. Proteins were eluted with a concentration gradient of imidazole (10 – 1000 mM). Protein concentrations of the eluted fractions were determined by Bradford protein assay. Proteins were dialyzed against PBS and stored in 50% glycerol at -20° C. The purity of protein was analyzed by Coomassie-stained 12% SDS-PAGE gel.

Western Blot. H37Rv lysates and culture filtrate protein (CFP) were prepared from cultures grown in Sauton medium that does not have albumin enrichment present in Middlebrook media. Bacterial culture was grown in 200 ml of Sauton liquid media to late log phase. Bacteria were pelleted by centrifugation at $2,000 \times g$ for 20 min. Bacterial pellet was used to prepare H37Rv lysates by sonication. Supernatant was transferred to a fresh tube and centrifuged again before filtered through a $0.2 \mu\text{m}$ filter unit. Supernatant was concentrated by protein acetone precipitation (24) and solubilized in SDS-PAGE sample buffer. Samples were resolved by 12% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked in 5% non-fat powdered milk in PBS and probed with the anti-rZmp1 polyclonal serum produced in mice, following with the anti-mouse IgG-alkaline phosphatase secondary antibody (Sigma-Aldrich). Antigen-antibody complex was detected via BCIP/NBT liquid substrate system (Sigma-Aldrich).

Enzyme activity assay. Endopeptidase activity of rZmp1 was assayed by incubating 100 ng of purified enzyme with $20 \mu\text{M}$ ECE-1 fluorescent substrate (Sigma-Aldrich) in PBS to a final volume of $100 \mu\text{l}$. Substrate hydrolysis was measured fluorometrically with a SpectraMax M5 Microplate Reader with SoftMax Pro Data Acquisition & Analysis Software (Molecular Devices) for 15 min at 25°C . Briefly, $100 \mu\text{M}$ Big ET-1 (Sigma-Aldrich) or $100 \mu\text{M}$ ET-1 (Sigma-Aldrich) were incubated with or without 100 ng purified rZmp1 preparations in $100 \mu\text{l}$ PBS containing $5 \mu\text{M}$ ZnSO_4 . Samples were incubated at 37°C for 1 to 4 h and the reactions were stopped by cooling of the samples to -80°C . Cleavage of the peptides was detected by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) or liquid chromatograph-electrospray ionization (LC-ESI) sources with quadrupole/time-of-flight analyzers (Q-TOF) mass spectrometer (MS) (Synapt, Waters). Samples were spotted ($2 \mu\text{l}$) in a target plate and dried at room temperature. Next, the peptides were covered with 10 mg/ml of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in acetonitrile 50% and 0.1% trifluoroacetic acid, and dried. The mass spectra were obtained in positive reflectron mode on a MALDI-Q-TOF mass spectrometer (Synapt). For LC-ESI-Q-TOF-MS, the sample aliquots were diluted in water (1:10). The peptides were separated in a nanoACQUITY (Waters) system by using an analytical column ($1.7 \mu\text{m}$ BEH130 C18 $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$) in an acetonitrile

gradient from 7% to 40% during 60 min. The spectra were analyzed using the MassLynx software (Waters).

***Mtb* infection and treatment with ET-1 and ETR antagonists.** Mice were given 100 μ l by intranasal instillation with 1 μ M solutions of BQ123 (ETA antagonist; N=4), BQ788 (ETB antagonist; N=4), ET-1 (Sigma-Aldrich; N=4) or vehicle (0.2% DMSO in PBS; N=4) three times a week on alternate days, for 4 weeks. After the first week of treatment, the mice were infected with 10^4 *M. tuberculosis* H37Rv intranasally. As the control, 100 μ l of saline was given (N=4). The experiments were repeated three times. To enumerate the viable bacteria in the mice lungs, animals were euthanized 21 days after infection. The, anterior and middle right lung lobes were removed and homogenized in 0.05% Tween 80 in PBS, and the tissue homogenates were serially diluted in PBS and plated in duplicate onto Middlebrook 7H11 agar. The colonies were counted after 3 to 4 weeks of incubation at 37°C, and the results are presented as the mean \log_{10} CFU per mouse.

Histopathology. The posterior left lung lobe was excised from all animals, stored in 10% formalin, and then embedded in paraffin at different times. From the paraffin-embedded tissue blocks, 3 μ m sections were prepared and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The H&E stained lung sections were photographed using a microscope at 40X magnification and the area of lesions in the lung was determined using measurement tool in the AxioVision software (Carl Zeiss). Three photographs were taken by lung lobe per mouse. Total lesion area was calculated by the sum of all areas of lesions in a lung section per mouse.

Preparation of bronchoalveolar lavage and lung cell suspensions. Cells were obtained by slight modification of the method previously described (25). Mice were euthanized and the pulmonary cavities were opened. After severing the descending aorta, the blood in the lungs was cleared by perfusion through the heart right ventricle with 5 ml of PBS containing 50 U/ml of heparin (Sigma-Aldrich) until the lungs became whitish. Using an 18-gauge needle, the trachea was cannulated, and 1ml of ice

cold 5 mM EDTA in PBS was slowly injected into the lungs and then withdrawn. This procedure was repeated twice, and a total of 1.5 ml of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was collected. To obtain lung cell populations, the right bottom lobe were aseptically removed and cut into small pieces. The dissected tissue was incubated in RPMI medium 1640 (Gibco) supplemented with 1% glutamine (Sigma-Aldrich), 1% nonessential amino acids (Sigma-Aldrich), 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich) and 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich) containing collagenase XI (0.7 mg/ml; Sigma-Aldrich) and type IV bovine pancreatic DNase (30 mg/ml; Sigma-Aldrich) during 30 min at 37°C. Then, 10 ml of RPMI medium containing 10% FBS (cRPMI) was added and digested lungs were further disrupted by gently pushing the tissue through a 70 µm nylon screen. The single-cell suspension was then washed and centrifuged at 1,000 ×g. To lyse contaminating red blood cells, the cell pellet was incubated during 5 min at room temperature with 2 ml of Gey's solution (NH₄Cl and KHCO₃). Cells were then washed with RPMI and resuspended in 1 ml of cRPMI. The amount of 10⁵ cells from BAL and 10⁶ from lung were Fc-blocked with 10% mouse serum, and then stained for 30 min at 4°C with directly conjugated antibodies using the BD Cytofix/Cytoperm kit according to the manufacturer's instructions. The mAbs specific for CD11c (N418), CD11b (M1/70), Gr-1 (RB6-8C5) and CD14 (Sa2-8) were purchased from BD Bioscience or eBioscience as direct conjugates to FITC, PE, PerCP, PerCP-cyanine 5.5, or allophycocyanin. Cell acquisition was performed with a dual-laser flow cytometer (FACSCalibur and FACSVerse; BD Biosciences). The data were analyzed using FlowJo software (ThreeStar).

Statistical analysis. Statistical significance between groups was determined by the two-tailed unpaired Student's t test or One-way ANOVA with Dunnett post test using Prism software version 5.03 (GraphPad).

RESULTS

Zmp1, a secreted mycobacterial endopeptidase. Prior to testing endopeptidase activity, the Zmp1 enzyme from *Mycobacterium tuberculosis* was cloned into the

prokaryotic expression vector pET28a. The recombinant protein (rZmp1) was expressed and purified by nickel affinity chromatography under non-denaturing conditions. SDS-PAGE analyses revealed a strong band, with high purity, corresponding to the expected size of approximately 76 kDa (Figure 1A). The native protein in the cell extract of H37Rv and also in the culture filtrate proteins (CFP) was identified by western blot using anti-rZmp1 polyclonal serum produced in mice (Figure 1B). Extracellular Zmp1 presence was not due to nonspecific bacterial lysis because the culture supernatants were probed for a mycobacterial cytoplasmic enzyme, Rv2213, which was not detected (Figure S1). Thus, despite having no signal sequence (9), protein Zmp1 was secreted by the bacterium. In order to evaluate if the recombinant protein remained functional, ECE-1 fluorescent substrate was used to show that the enzyme was active (Figure 1C), and lost its activity when subjected to high temperatures.

Zmp1 does not generate ET-1 from Big ET-1. ECE-1 is involved in proteolytic processing of Big ET-1 precursors, with an estimated mass of 4281 Da, to produce biologically active ET-1 peptide with 2491 Da. To test whether the Zmp1 mediates this same activity, the active recombinant protein was incubated with the Big ET-1 peptide and the reaction product was analyzed by mass spectrometry. The spectrogram of intact peptide showed a peak of 4281 mass/charge (m/z) ratio, which matches the expected Big ET-1 mass (Figure 2A). Even after prolonged incubation, the enzyme showed low activity and the peptide remained largely intact at 4281 Da. Further analyses showed that no fragment was observed by MALDI-Q-TOF MS evaluation (Figure 2B). In addition, using LC-ESI-Q-TOF MS, no peptide Big ET-1 cleavage with ET-1 release was observed (Figure S2).

Zmp1 cleaves endothelin peptide. Since the enzyme was not able to generate ET-1 by Big ET-1 cleavage, we then investigated whether rZmp1 might instead be involved in the degradation of the mature peptide (ET-1). By LC-ESI-TOF MS analysis, the intact endothelin peptide showed a peak with a retention time of 36 min, 831 m/z three times protonated and 1246 m/z with two H⁺, which corresponds to the expected mass of 2491 Da for ET-1 (Figure 3A). After incubation of ET-1 with rZmp1, the peptide was

hydrolysed resulting in peptides of 1470 and 431 Da. Therefore, there are at least two cleavage sites between amino acids residues Y13-F14 and D18-I19 (Figure 3B).

Blocking endothelin receptor signaling during *Mtb* infection causes increased severity of lesions and bacterial loads in the lungs. Considering the production and secretion by *Mtb* of an enzyme able to degrade endothelin, which might affect lung capillary integrity, we then looked to see the consequences of lower ET-1 levels during *Mtb* infection in the lungs. For this, we used the specific endothelin receptor antagonists (ERA) BQ123 (ETA antagonist) and BQ788 (ETB antagonist), which were administered by intranasal instillation, thus reducing potential systemic effects. The administration of endothelin receptor antagonists in naive mice challenged with saline did not alter lung morphology (Figure 4A and B). However, when mice previously infected with *Mtb* were treated with ERA, a significant increase in pulmonary lesions caused by infection was observed (1.975 mm²) when compared to the infected (0.288 mm²) group treated with vehicle (Figure 4E). The main histological differences were bronchiolar and perivascular infiltrates with high concentration of lymphocytes (Figure 4D), with regions of necrosis and the presence of cells with large nuclei and bulky cytoplasm (Figure 4D, inset) present in infected mice that received the antagonist treatment. These alterations were not observed in the group treated with vehicle alone (Figure 4C). In addition, there was a significant increase in the bacterial load (~0.5 Log) in the lungs of mice that received treatment with antagonists (Figure 4F).

The ETRs' antagonism effects in the early *Mtb* infection are iNOS independent. It has been well described in the literature that a regulatory balance exists between nitric oxide and endothelin (26) and that, during the inflammatory process such as in the lungs, the main source of NO is provided by iNOS (27). Thus, the effect of the ERA treatment in *Mtb* infected mice could be mediated by changes in the expression and activity of iNOS. To answer this, iNOS knockout mice were treated with ERA and infected with *Mtb*. The animals were evaluated 21 days post infection. At this time point, iNOS knockout mice (iNOS-KO) showed similar lung abnormalities as wild type mice (C57BL/6). There were no pathological changes in the lung of mice treated with ERA (Figure 4H) compared to the vehicle group (Figure 4G). Again, endothelin

receptor antagonism increased lung inflammatory reactions to *Mtb* infection that changed from a lesion size of 0.745 mm² in the vehicle group to 3.327 mm² in the ERA treated animals (Figure 4K). Perivascular and peribronchial inflammatory infiltrates (Figure 4J), and increased areas of necrosis and presence of cells with large nuclei and long cytoplasmic processes were observed on ERA treated inflammatory reactions' (Figure 4J, inset). Large numbers of neutrophils was also observed. Nonetheless, this difference was not caused by ERA treatment (Figure 4I and 4J, insets). The increased bacterial load (~0.9 Log) caused by ERA treatment was also observed in the knockout mice group (Figure 4L).

Different cell populations expressing Gr-1 are increased by ETR antagonism during *Mtb* infection. Since the lesions and bacterial burden observed in the ERA treated *Mtb* infected mice were not associated with iNOS activity, we hypothesized that ERA treatment could affect the phenotype or cell migration to the infected lungs and consequently modulating the immune response by increasing suppressor cells and therefore increasing the bacterial load. Mice Gr1⁺ Myeloid-derived suppressor cell (MDSC) phenotype may have the morphology of various cell types such granulocytes, dendritic cells, monocytes or macrophages that expand during cancer, inflammation and infection, and that have a remarkable ability to suppress T-cell responses (28), thus we decided to question whether these cells were involved in the ERA treatment outcome. To access this heterogeneous population, using flow cytometry, cells were defined according to the expression of the Gr-1 marker. Cells expressing low levels of Gr-1 (Gr-1^{low}) were gated as R1, intermediate expressing (Gr-1^{int}) as R2 and cells expressing high levels of the Gr-1 marker were defined as Gr-1^{high} and gated as R3 (Figure S3).

Although ERA treatment alone did not change the proportions of Gr1⁺ cells in the lungs of C57BL/6 or iNOS-KO mice (Figure 5), the infection with *Mtb* only affected some of these cells populations and depending on the mice background. Looking for Gr-1^{low} cells in C57BL/6 mice, *Mtb* infection alone did not changed this population, whereas ERA treated animals showed decrease in the percentage of Gr-1^{low} cells when compared to the naive vehicle treated mice (Figure 5A). In the absence of NO, *Mtb* infection causes a small decrease of Gr-1^{low} cells in both vehicle and ERA treated mice (Figure 5B). The association of ERA treatment and infection directly affects the Gr-1^{int} cells

because of C57BL/6 and iNOS-KO showed an increase in this population, almost tripling its proportion in C57BL/6 mice (Figure 5C-D). In order to further characterize those cells, the Gr-1^{low} cells were evaluated for the expression of CD11c and CD14, and it was observed that these cells were CD11c and CD14 positive that probably identify monocytes and/or macrophages. While, the Gr-1^{int} cells expressed low levels of CD14 and were negative for CD11c that could indicate the presence of MDSC in lungs of ERA treated mice (Figure S4). Basically the same changes were observed in BAL cells obtained from these mice, with the exception of Gr-1^{low} cells that had no significant changes (Figure S5).

Additionally, ERA treatment also enhanced the Gr-1^{high} cells in C57BL/6 infected mice (Figure 5E) while, in iNOS-KO mice, the infection induced an increase in these populations that were further improved with ERA treatment (Figure 5F). These cell phenotype marker was associated with neutrophils (expressed low to intermediate levels of CD14 and were CD11c negative; Figure S4), which were observed at high content in iNOS-KO mice (Figure 4, insets).

Endothelin-1 reduces the progression of lesion severity and plays different roles through ETA and ETB receptors. As noted above, the ETR antagonism caused changes in the response to *Mtb*. Thus, we decided to analyze the consequences of increased endothelin-1 during infection and also the role of each receptor separately. For this, infected C57BL/6 mice were supplied with exogenous endothelin-1 peptide, while the BQ123 (ETA antagonist) and BQ788 (ETB antagonist) were administered separately, all by intranasal instillation. Lung *Mtb* infection at 21 days post infection presented some perivascular/perbronchial inflammatory foci and moderate alveolar damage area (Figure 6A). Further, infected mice treated with ET-1 shown a reduction in the number and size of the inflammatory reactions, with little alveolar damage compared to the mice treated with vehicle (Figure 6B and 6E). Although ET-1 treated mice presented the best histological findings, no difference was seen in the bacterial loads in the lungs compared to the controls (Figure 6F). The group that received the ETA antagonist BQ123 showed an increase of lung lesion area with more intense inflammatory foci, diffuse alveolar damage, pulmonary edema and some necrosis area (Figure 6C and 6E), but again there was no increase in the bacterial load (Figure 6F). In

contrast, blockade of ETB by treatment with BQ788 had no effect on the number or size of lesions (Figure 6D and 6E) when compared to *Mtb* infected animals treated with vehicle, however we did observe an increase in lung CFU in these animals (Figure 6F). Simultaneous ETA and ETB antagonism (ERA) induced an increase of lesions area and bacterial load in the lungs of infected mice (Figure 4, 6E and 6F).

DISCUSSION

In this study we characterized Zmp1, a metalloprotease belonging to the M13 family, as an enzyme secreted by *M. tuberculosis* that is able to cleave ET-1. In mass spectrometry analyzes no ET-1 release from Big ET-1 was observed after Zmp1 incubation. In contrast, Zmp1 efficiently hydrolyzed the ET-1 mature peptide. We then showed that blockade of ET-1 activity by antagonism during *Mtb* infection resulted in an increased number as well as severity of lung lesions as well as increases in bacterial burden. These events could be reduced somewhat by exogenous delivery of the ET-1 peptide.

Zmp1 was previously described in *M. tuberculosis* (9, 29) and in other bacteria, including *Streptococcus parasanguis* (30, 31) and *Porphyromonas gingivalis* (32) as a protease with activity on small biologically active peptides, but no activation on endothelins was seen. In *P. gingivalis*, the protease showed activity against Big Endothelin (33), but the results were controversial and ET-1 generation could not be confirmed by ELISA. Here, we found that the mycobacterial enzyme Zmp1 does not act as an ECE, that converts Big ET-1 into ET-1 mature peptide (Figure 2), but instead appears to act by hydrolyzing ET-1 (Figures 3). Like other oligopeptidases (34), Zmp-1 seems to be active on peptides with less than 30 amino acids and this preference for peptides is also confirmed by the solved X-ray crystallographic structure of Zmp1, which reveals that the active site is located at the bottom of a hydrophobic channel, likely impairing access of large macromolecular substrates in the proximity of the reaction center (35), which may explain its low activity against the large Big ET-1 peptide. Cleavages sites found in ET-1 peptide (Fig 3) were in accordance with previously identified cleavage pattern for Zmp1 on other substrates (29), showing preference for phenylalanine and isoleucine amino acids residues at the P1' position. In addition, the C-terminal as well as the N-terminal intramolecular loop structure is

especially important for endothelin activity, thereby an enzymatic system might exist as a physiological mechanism for converting ET-1 to biologically inactive forms (36, 37). Further, proteases of pathogenic bacteria, fungi and protozoa have been described to hydrolyze many human bioactive peptides (38-40).

A previous report has indicated that *Zmp1* mediated the arrest of phagosome maturation (41) and genetic inactivation of the *Zmp1* gene generated an attenuated strain that triggered activation of the inflammasome, resulting in increased IL-1 β secretion normally preempted in the *Mtb* wild-type strain (9). In addition, ET-1 is an important mediator of IL-1 β inflammatory response (42). Complementary to our findings for enzymatic peptide hydrolysis (Figure 3), these data suggest a role for *Zmp1* in the mycobacterial virulence that may involve ET-1 signaling.

As observed here, when mice treated with BQ123 were infected with *Mtb*, increased lung lesions occurred, which may be explained because the blocked receptor (ETA) is a primary vasoconstrictor and a growth-promoting receptor (13). Thus, ETA blocking may have promoted vasodilation that facilitated perfusion and infiltration of inflammatory cells inducing more tissue damage during *Mtb* infection (Figure 4 and 6). However, this inflammatory process could not control *Mtb* infection, so no bacterial load decrease was observed in the lung (Figure 6).

ERA treatment increased Gr-1^{high} cells: neutrophils (Figure 4 and 5) present at higher levels during the chronic stage of murine tuberculosis (43) and Gr-1^{int} cells, suggesting a Gr1⁺ Myeloid-derived suppressor cell phenotype. Based on previous experiments showing that Gr-1^{int} MDSC cells diminished the T-cell protective responses in a murine TB model (44, 45), our results corroborates these findings to a certain degree particularly because *Mtb* infected treated with ERA animals showed an diminished ability to control the infection. Further, ETR signaling could modulate recruiting or phenotype changes of these MDSC cells.

In contrast, ETB antagonism led to higher bacterial burdens but with no overt histological changes (Figure 6). These responses could be explained by the distinct ETR subtype functions in vascular and inflammatory responses because both ETA and ETB receptors acting on vascular smooth muscle and mediate ET-1 induced vasoconstriction (46). However, on pulmonary endothelium, ETB receptors mediate generation of NO or opening of ATP-sensitive potassium channels and NO promotes vasodilation (47, 48).

Thus, ETB antagonism could induce vasoconstriction and prevent the inflammatory cell infiltration in lung tissue. In addition to the vascular tone functions of ETB in the lungs, this receptor also acts as a clearance receptor, capturing blood-circulating ET-1 leading to the clearance of the peptide in pulmonary tissue (47, 49). In immune responses, results with knockout mice (50) and ETR antagonists (51) suggest that the pro-inflammatory effects of ET-1 are mediated by the ETB receptor, including fever (52, 42). Therefore, BQ788 can act as an anti-inflammatory mediator by directly blocking ETB receptor pro-inflammatory effects and also decreasing lung uptake of ET-1 from the circulation, leading to lowered ET-1 lung activity and in turn allowing increasing bacterial burdens in the lung tissues. In addition, we have demonstrated that exogenous administration of ET-1 can reduce *Mtb* infection lesions (Figure 6). On other hand, using whole-genome microarray gene expression analysis, ET-1 gene expression was associated with the severity of *Mtb* infection (53). Whether the increase of ET-1 expression was to counteract the effect of the *Mtb* inflammatory response or is a consequence of the infection needs to be further investigated.

Similarities in the responses of iNOS knockout and C57BL/6 mice to ERA (Figure 4 and 6), corroborates the classic ET-1 signaling pathway, where ET-1 stimulates NO production by activation of endothelial NO synthase (eNOS), instead of iNOS (54, 55). iNOS knockout infected mice however, showed increased neutrophil content (Figure 4 insets and Figure 5), tendency for higher CFU and larger lesions (Figure 4). ERA significantly increased the neutrophil population during *Mtb* infection only in wild type mice (Figure 5). iNOS deficiency in septic mice facilitated the infiltration of neutrophils into pulmonary tissue from the pulmonary microvasculature and the transendothelial neutrophil migration was attenuated by the specific presence of iNOS in neutrophils (56). So, in our murine tuberculosis model, iNOS also appears to play a role in neutrophil infiltration and endothelin signaling that may specifically affect the neutrophil iNOS. Bacterial burden and lung injury pattern in iNOS-KO mice agrees with the literature data from murine models of tuberculosis, showing a more susceptible phenotype (57). However, the antimycobacterial activity of NO *in vivo* and whether NO is critically involved in the host defense against *Mycobacterium tuberculosis* in humans is controversial (27). Nevertheless, our data suggest a vascular mechanism of control for *Mtb*. Thus, it may be that NO acts in this *Mtb* control mechanism and in neutrophil migration rather than as a bactericidal agent. Further, ET-1 could be involved in

decreased oxygen tension or hypoxia described in granulomas undergoing caseous necrosis, characterized by a lack of vascularity, in human tissue (58). Therefore, more studies must be carried out in other models because hypoxia is not usually found in the TB mouse models (59, 60).

In summary, our results show that *M. tuberculosis* produce and secrete an enzyme with ET-1 cleavage activity and may act as a virulence factor. These data demonstrate a possible role of *Zmp1* in mycobacteria host interactions. Moreover, endothelin pathways have a role in pathogenesis of *Mtb* infections and ETA or ETB receptor signaling can modulate the host response against bacilli. Thus, a balance between *Zmp1* control of ET-1 levels and ETA/ETB signaling can allow to *Mtb* adaptation and survival in lung tissue.

Author contributions: Conceived and design the experiments: AFC, JMS and APJK; Performed the experiments: AFC, APJK; Analyzed the data: AFC, AK, IMO, APJK; Contributed reagents/materials/analysis tools: APJK, AMB, IMDB, AK, JMS, CMAS; Wrote the manuscript draft: AFC; Critically revised the manuscript: All authors.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico- Brasil) grant numbers: 307186/2013-0 and 301976/2011-2, CNPq-Pronex-DF, FAPDF (Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal), Finep (Financiadora de Estudos e Projetos), FAPEG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás) e CAPES/COFECUB. AFC received a PhD fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). The funders had no rule in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

The authors thank the flow cytometry core facility of Associação de combate ao câncer do Estado de Goiás, Dr. Aline Carvalho Batista for the histopathology core facility at Faculdade de Odontologia from Universidade Federal de Goiás and LACEN-DF (Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal). Additionally the authors thank Dr. Simone Fonseca from Universidade Federal de Goiás for critically revising the manuscript.

REFERENCES

1. **WHO.** 2013. Global tuberculosis report 2013. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
2. **Barry CE, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, Schnappinger D, Wilkinson RJ, Young D.** 2009. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Micro* 7:845–855.
3. **Ottenhoff THM, Kaufmann SHE.** 2012. Vaccines against Tuberculosis: Where Are We and Where Do We Need to Go? *PLoS Pathog* 8:e1002607.
4. **Kamijo R, Le J, Shapiro D, Havell EA, Huang S, Aguet M, Bosland M, Vilcek J.** 1993. Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with *Bacillus Calmette-Guérin* and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *J Exp Med* 178:1435–1440.
5. **Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, Siegel JN, Braun MM.** 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N. Engl. J. Med.* 345:1098–1104.
6. **Altare F, Durandy A, Lammas D, Emile JF, Lamhamedi S, Le Deist F, Drysdale P, Jouanguy E, Döffinger R, Bernaudin F, Jeppsson O, Gollob JA, Meinel E, Segal AW, Fischer A, Kumararatne D, Casanova JL.** 1998. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* 280:1432–1435.
7. **Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A, Jamieson A, Juarrero MG, Diefenbach A, Raulet DH, Turner J, Orme IM.** 2003. NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J. Immunol.* 171:6039–6045.
8. **Lebrun I, Marques-Porto R, Pereira A, Pereira A, Perpetuo E.** 2009. Bacterial Toxins: An Overview on Bacterial Proteases and their Action as Virulence Factors. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 9:820–828.
9. **Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, Springer B, Timmins GS, Sander P, Deretic V.** 2008. *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe* 3:224–232.
10. **Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T.** 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide

- produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**:411–415.
11. **Comellas AP, Briva A.** 2009. Role of endothelin-1 in acute lung injury. *Transl Res* **153**:263–271.
 12. **Barton M, Yanagisawa M.** 2008. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **86**:485–498.
 13. **Kedzierski RM, Yanagisawa M.** 2001. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**:851–876.
 14. **Nett PC, Teixeira MM, Candinias D, Barton M.** 2006. Recent developments on endothelin antagonists as immunomodulatory drugs--from infection to transplantation medicine. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* **1**:265–276.
 15. **Jandeleit-Dahm KAM, Watson AMD.** 2012. The endothelin system and endothelin receptor antagonists. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **21**:66–71.
 16. **Tanowitz HB, Huang H, Jelicks LA, Chandra M, Loreda ML, Weiss LM, Factor SM, Shtutin V, Mukherjee S, Kitsis RN, Christ GJ, Wittner M, Shirani J, Kisanuki YY, Yanagisawa M.** 2005. Role of endothelin 1 in the pathogenesis of chronic chagasic heart disease. *Infect. Immun.* **73**:2496–2503.
 17. **Corral RS, Guerrero NA, Cuervo H, Gironès N, Fresno M.** 2013. *Trypanosoma cruzi* infection and endothelin-1 cooperatively activate pathogenic inflammatory pathways in cardiomyocytes. *PLoS Negl Trop Dis* **7**:e2034.
 18. **Chauhan A, Hahn S, Gartner S, Pardo CA, Netesan SK, McArthur J, Nath A.** 2007. Molecular programming of endothelin-1 in HIV-infected brain: role of Tat in up-regulation of ET-1 and its inhibition by statins. *FASEB J.* **21**:777–789.
 19. **Ehrenreich H, Rieckmann P, Sinowatz F, Weih KA, Arthur LO, Goebel FD, Burd PR, Coligan JE, Clouse KA.** 1993. Potent stimulation of monocytic endothelin-1 production by HIV-1 glycoprotein 120. *J. Immunol.* **150**:4601–4609.
 20. **Hebert VY, Crenshaw BL, Romanoff RL, Ekshyyan VP, Dugas TR.** 2004. Effects of HIV drug combinations on endothelin-1 and vascular cell proliferation. *Cardiovasc. Toxicol.* **4**:117–131.
 21. **Fernandes LB, D'Aprile AC, Self GJ, Harnett GB, Goldie RG.** 2004. The impact of respiratory syncytial virus infection on endothelin receptor function and release in sheep bronchial explants. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **44 Suppl 1**:S202–206.
 22. **Knott PG, Henry PJ, McWilliam AS, Rigby PJ, Fernandes LB, Goldie RG.** 1996. Influence of parainfluenza-1 respiratory tract viral infection on endothelin

- receptor-effector systems in mouse and rat tracheal smooth muscle. *Br J Pharmacol* **119**:291–298.
23. **Schuetz P, Stolz D, Mueller B, Morgenthaler NG, Struck J, Mueller C, Bingisser R, Tamm M, Christ-Crain M.** 2008. Endothelin-1 precursor peptides correlate with severity of disease and outcome in patients with community acquired pneumonia. *BMC Infect. Dis.* **8**:22.
 24. **Wessel D, Flügge UI.** 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**:141–143.
 25. **Gonzalez-Juarrero M, Shim TS, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP, Orme IM.** 2003. Dynamics of macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis. *J. Immunol.* **171**:3128–3135.
 26. **Bourque SL, Davidge ST, Adams MA.** 2011. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **300**:R1288–1295.
 27. **Yang C-S, Yuk J-M, Jo E-K.** 2009. The role of nitric oxide in mycobacterial infections. *Immune Netw* **9**:46–52.
 28. **Gabrilovich DI, Nagaraj S.** 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **9**:162–174.
 29. **Petrera A, Amstutz B, Gioia M, Hähnlein J, Baici A, Selchow P, Ferraris DM, Rizzi M, Sbardella D, Marini S, Coletta M, Sander P.** 2012. Functional characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* zinc metallopeptidase Zmp1 and identification of potential substrates. *Biol. Chem.* **393**:631–640.
 30. **Froeliger EH, Oetjen J, Bond JP, Fives-Taylor P.** 1999. *Streptococcus parasanguis* pepO encodes an endopeptidase with structure and activity similar to those of enzymes that modulate peptide receptor signaling in eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **67**:5206–5214.
 31. **Oetjen J, Fives-Taylor P, Froeliger E.** 2001. Characterization of a streptococcal endopeptidase with homology to human endothelin-converting enzyme. *Infect. Immun.* **69**:58–64.
 32. **Carson JA, Ansai T, Awano S, Yu W, Takehara T, Turner AJ.** 2002. Characterization of PgPepO, a bacterial homologue of endothelin-converting enzyme-1. *Clin. Sci.* **103 Suppl 48**:90S–93S.
 33. **Awano S, Ansai T, Mochizuki H, Yu W, Tanzawa K, Turner AJ, Takehara T.**

1999. Sequencing, expression and biochemical characterization of the *Porphyromonas gingivalis* pepO gene encoding a protein homologous to human endothelin-converting enzyme. FEBS Lett. **460**:139–144.
34. **Kok J, Mierau I, Monnet V.** 2013. Chapter 136 - Oligopeptidase O, p. 650–653. In Rawlings, ND, Salvesen, G (eds.), Handbook of Proteolytic Enzymes. Academic Press.
35. **Ferraris DM, Sbardella D, Petrera A, Marini S, Amstutz B, Coletta M, Sander P, Rizzi M.** 2011. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* zinc-dependent metalloprotease-1 (Zmp1), a metalloprotease involved in pathogenicity. J. Biol. Chem. **286**:32475–32482.
36. **Kimura S, Kasuya Y, Sawamura T, Shinmi O, Sugita Y, Yanagisawa M, Goto K, Masaki T.** 1988. Structure-activity relationships of endothelin: importance of the C-terminal moiety. Biochem. Biophys. Res. Commun. **156**:1182–1186.
37. **Douglas SA, Hiley CR.** 1991. Endothelium-dependent mesenteric vasorelaxant effects and systemic actions of endothelin (16-21) and other endothelin-related peptides in the rat. Br. J. Pharmacol. **104**:311–320.
38. **Schmidtchen A, Frick I-M, Andersson E, Tapper H, Björck L.** 2002. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. Mol. Microbiol. **46**:157–168.
39. **Beauvais A, Monod M, Wyniger J, Debeaupuis JP, Grouzmann E, Brakch N, Svab J, Hovanessian AG, Latge JP.** 1997. Dipeptidyl-peptidase IV secreted by *Aspergillus fumigatus*, a fungus pathogenic to humans. Infect Immun **65**:3042–3047.
40. **Bastos I, Motta F, Grellier P, Santana J.** 2013. Parasite Prolyl Oligopeptidases and the Challenge of Designing Chemotherapeutics for Chagas Disease, Leishmaniasis and African Trypanosomiasis. Current Medicinal Chemistry **20**:3103–3115.
41. **Johansen P, Fettelschoss A, Amstutz B, Selchow P, Waeckerle-Men Y, Keller P, Deretic V, Held L, Kündig TM, Böttger EC, Sander P.** 2011. Relief from Zmp1-mediated arrest of phagosome maturation is associated with facilitated presentation and enhanced immunogenicity of mycobacterial antigens. Clin. Vaccine Immunol. **18**:907–913.
42. **Fabricio ASC, Rae GA, Zampronio AR, D'Orléans-Juste P, Souza GEP.** 2006. Central endothelin ETB receptors mediate IL-1-dependent fever induced by

- performed pyrogenic factor and corticotropin-releasing factor in the rat. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **290**:R164–R171.
43. **Pedrosa J, Saunders BM, Appelberg R, Orme IM, Silva MT, Cooper AM.** 2000. Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infect. Immun.* **68**:577–583.
 44. **Obregón-Henao A, Henao-Tamayo M, Orme IM, Ordway DJ.** 2013. Gr1(int)CD11b+ myeloid-derived suppressor cells in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS ONE* **8**:e80669.
 45. **Du Plessis N, Loebenberg L, Kriel M, von Groote-Bidlingmaier F, Ribechini E, Loxton AG, van Helden PD, Lutz MB, Walzl G.** 2013. Increased frequency of myeloid-derived suppressor cells during active tuberculosis and after recent *Mycobacterium tuberculosis* infection suppresses T-cell function. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188**:724–732.
 46. **MacLean MR, McCulloch KM, Baird M.** 1994. Endothelin ETA- and ETB-receptor-mediated vasoconstriction in rat pulmonary arteries and arterioles. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **23**:838–845.
 47. **De Nucci G, Thomas R, D’Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, Vane JR.** 1988. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:9797–9800.
 48. **Hasunuma K, Rodman DM, O’Brien RF, McMurtry IF.** 1990. Endothelin 1 causes pulmonary vasodilation in rats. *Am. J. Physiol.* **259**:H48–54.
 49. **Lüscher TF, Barton M.** 2000. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* **102**:2434–2440.
 50. **Griswold DE, Douglas SA, Martin LD, Davis TG, Davis L, Ao Z, Luttmann MA, Pullen M, Nambi P, Hay DW, Ohlstein EH.** 1999. Endothelin B receptor modulates inflammatory pain and cutaneous inflammation. *Mol. Pharmacol.* **56**:807–812.
 51. **Imhof A-K, Glück L, Gajda M, Bräuer R, Schaible H-G, Schulz S.** 2011. Potent anti-inflammatory and antinociceptive activity of the endothelin receptor antagonist bosentan in monoarthritic mice. *Arthritis Res. Ther.* **13**:R97.
 52. **Fabricio ASC, Silva CAA, Rae GA, D’Orleans-Juste P, Souza GEP.** 1998.

- Essential role for endothelin ETB receptors in fever induced by LPS (*E. coli*) in rats. *Br J Pharmacol* **125**:542–548.
53. **Subbian S, Bandyopadhyay N, Tsenova L, O'Brien P, Khetani V, Kushner NL, Peixoto B, Soteropoulos P, Bader JS, Karakousis PC, Fallows D, Kaplan G.** 2013. Early innate immunity determines outcome of *Mycobacterium tuberculosis* pulmonary infection in rabbits. *Cell Commun. Signal* **11**:60.
 54. **Liu S, Premont RT, Kontos CD, Huang J, Rockey DC.** 2003. Endothelin-1 activates endothelial cell nitric-oxide synthase via heterotrimeric G-protein betagamma subunit signaling to protein kinase B/Akt. *J. Biol. Chem.* **278**:49929–49935.
 55. **Herrera M, Hong NJ, Ortiz PA, Garvin JL.** 2009. Endothelin-1 inhibits thick ascending limb transport via Akt-stimulated nitric oxide production. *J. Biol. Chem.* **284**:1454–1460.
 56. **Razavi HM, Wang LF, Weicker S, Rohan M, Law C, McCormack DG, Mehta S.** 2004. Pulmonary neutrophil infiltration in murine sepsis: role of inducible nitric oxide synthase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **170**:227–233.
 57. **MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF.** 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:5243–5248.
 58. **Boshoff HIM, Barry CE 3rd.** 2005. Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:70–80.
 59. **Aly S, Wagner K, Keller C, Malm S, Malzan A, Brandau S, Bange F-C, Ehlers S.** 2006. Oxygen status of lung granulomas in *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *J. Pathol.* **210**:298–305.
 60. **Tsai MC, Chakravarty S, Zhu G, Xu J, Tanaka K, Koch C, Tufariello J, Flynn J, Chan J.** 2006. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell. Microbiol.* **8**:218

FIGURES

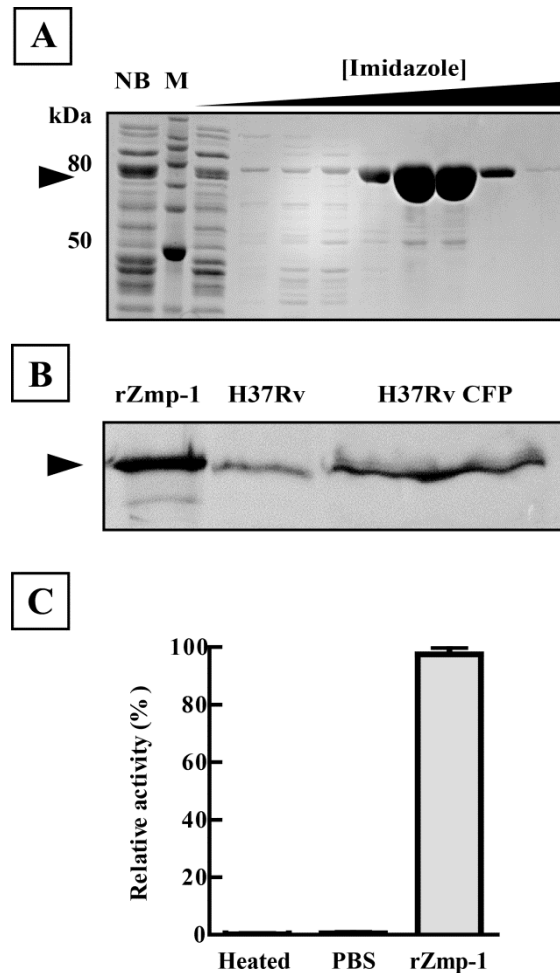


Figure 1. Zmp1 characterization. A, Purification of recombinant Zmp1 (rZmp1). IPTG-induced rZmp1 was purified by nickel affinity chromatography, resin unbound fraction (NB), molecular mass marker (M) and elution with increasing imidazole concentration ([Imidazole]) were analyzed by 12% reducing SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue. B, Localization of Zmp1 by immunoblot analysis. Lanes rZmp1, H37Rv total cell lysate (H37Rv) and H37Rv culture filtrate proteins (H37Rv CFP) were probed with rZmp1 polyclonal mouse antiserum. Arrowheads indicate Zmp1 position at 76 kDa. C, Activity of rZmp1. 100 ng of purified rZmp1, rZmp1 pre-heated for 10 min at 100°C (Heat) or PBS were incubated with 20 μ M ECE-1 substrate. Data shown represent the mean \pm SEM of relative activity to maximum fluorescence emission, n=3.

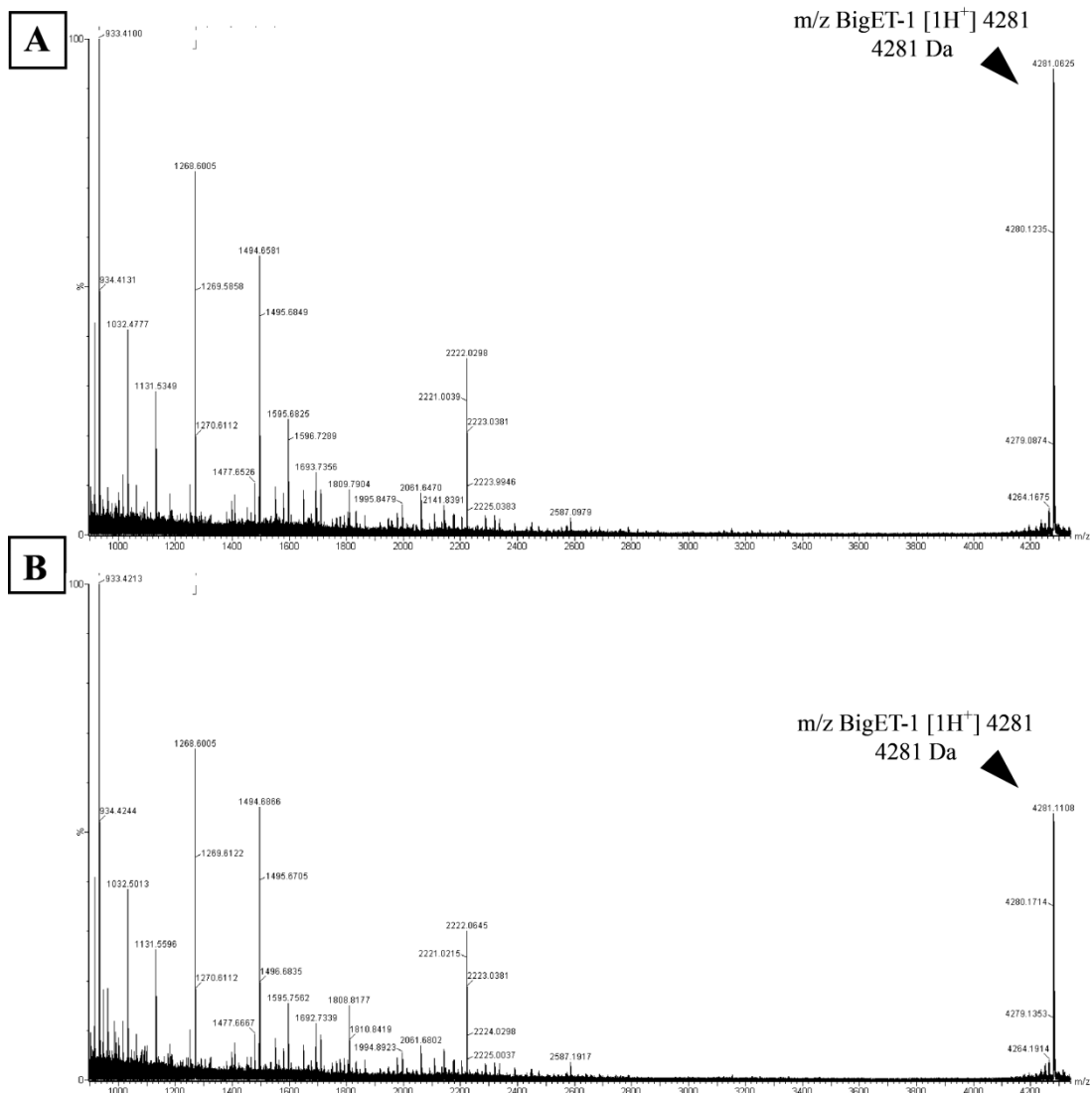


Figure 2. Hydrolysis of Big Endothelin-1 by rZmp1. A, MALDI-Q-TOF spectrum of Big Endothelin-1 peptide (Big ET-1). B, MALDI-Q-TOF spectrum of rZmp1 hydrolyzed Big ET-1 peptide. The arrowheads indicate the peaks of interest, 4281 m/z corresponding to Big ET-1 with a mass of 4281 Da.

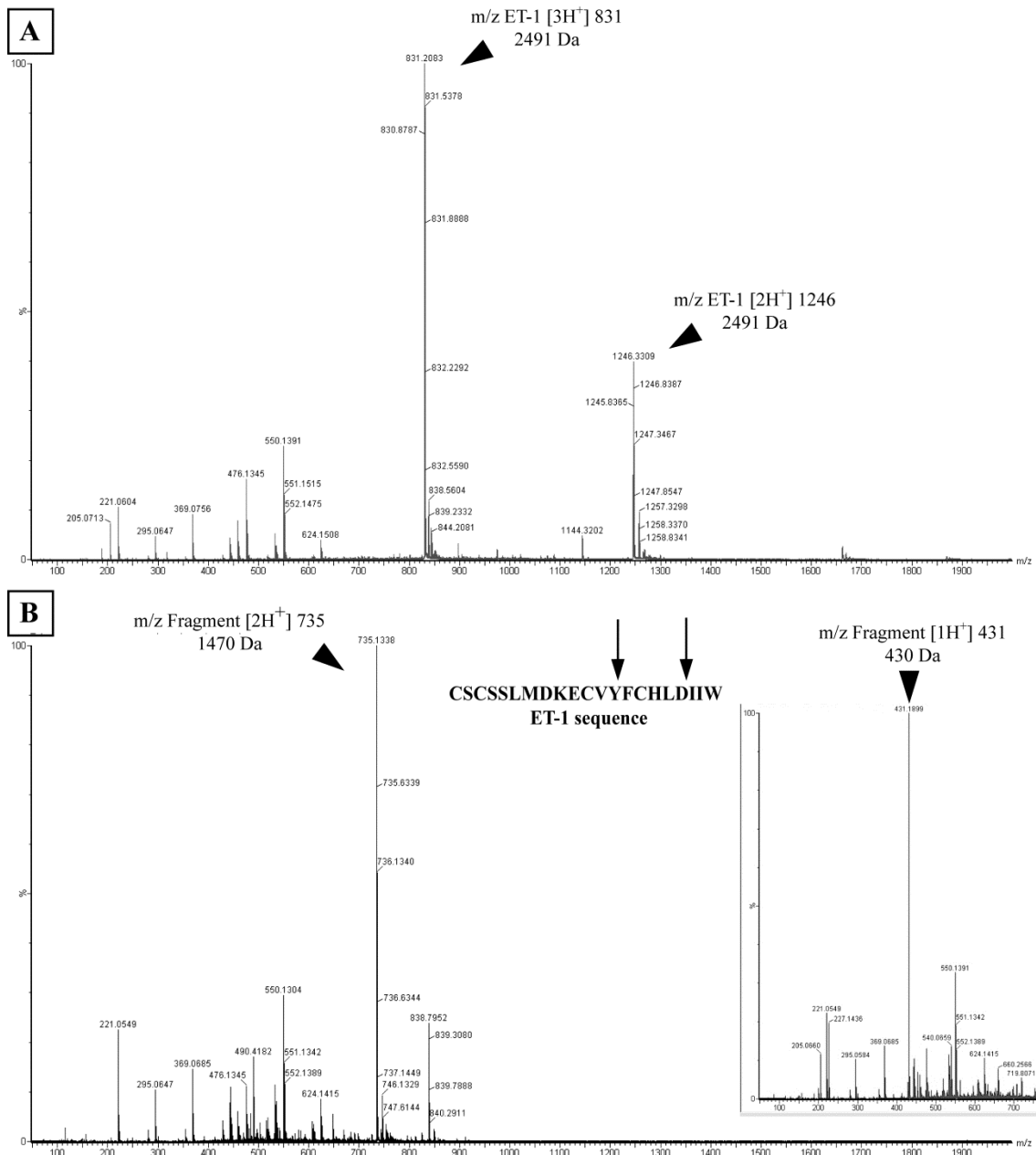


Figure 3. Hydrolysis of ET-1 by rZmp1. (A) LC-ESI-Q-TOF-MS spectrum of ET-1 peptide. Peaks of 831 m/z three times protonated (triply charged ion - $3H^+$) and 1,246 m/z doubly charged ion ($2H^+$), corresponding to ET-1 at 2,491 Da. (B) LC-ESI-Q-TOF-MS spectrum of rZmp1 hydrolyzed ET-1 peptide. Peak of 735 m/z doubly charged ion ($2H^+$) with a retention time of 9.47 min and corresponding to a 1,470 Da fragment. The inset shows a peak with a 18.18 min retention time and 431 m/z charged with one H^+ molecule. Arrows over ET-1 sequence indicate cleavage sites for rZmp1. The arrowheads indicate the peaks of interest.

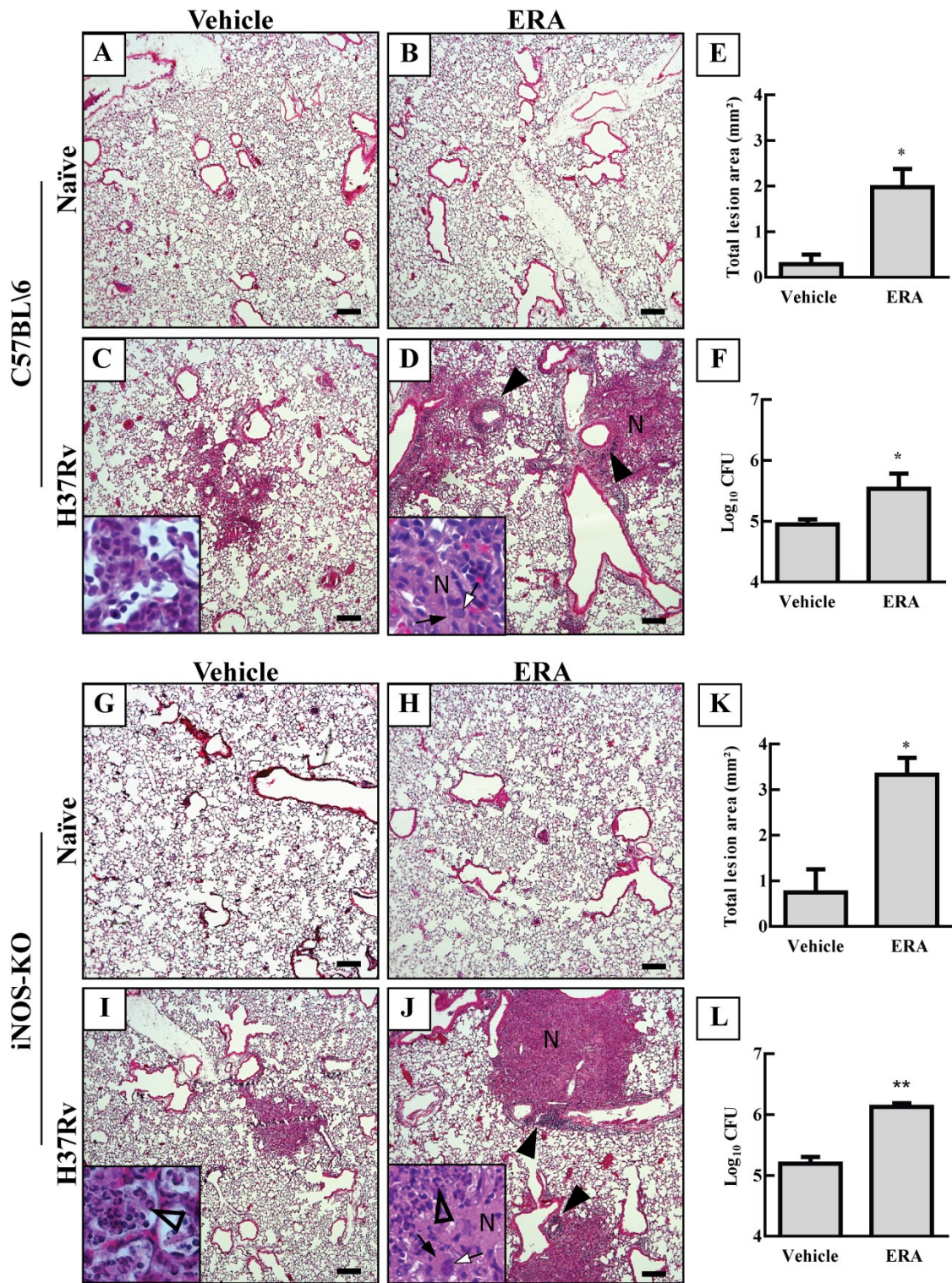


Figure 4. Effects of endothelin receptor antagonism in C57BL/6 (A to F) and iNOS-KO (G to L) mice during early *Mtb* infection. A-D and G-J, show representative lung (posterior left lobe) photomicrographs of: mice treated with vehicle (A and G) or with ERA (BQ788 and BQ123) (B and H) after 21 days of treatment; and *M. tuberculosis*

H37Rv infected mice treated with vehicle (C and I) or ERA (D and J) at 21 day post infection and under treatment. Black arrowheads indicate lymphocytic infiltrate. Insets show magnification of lesion area with necrosis (N), cells with large lateral nuclei (white arrow) and very long cytoplasmic processes (black arrow) and neutrophils (open arrowhead). Scale bars corresponds to 200 μ m. E and K show the results of the quantification of the inflammatory lesion area sizes (left bottom lobe) from C57BL/6 (E) and iNOS-KO (K) mice infected with *M. tuberculosis* and treated with vehicle or ERA (BQ123 and BQ788). F and L, Bacterial burden of lung (anterior and middle right lobes) from C57BL/6 (F) and iNOS-KO (L) mice infected with *M. tuberculosis* H37Rv at 21 days post infection, treated with vehicle or ERA. Data shown represent mean \pm SEM, n=3. *, p<0.05; **, p<0.01 by t test.

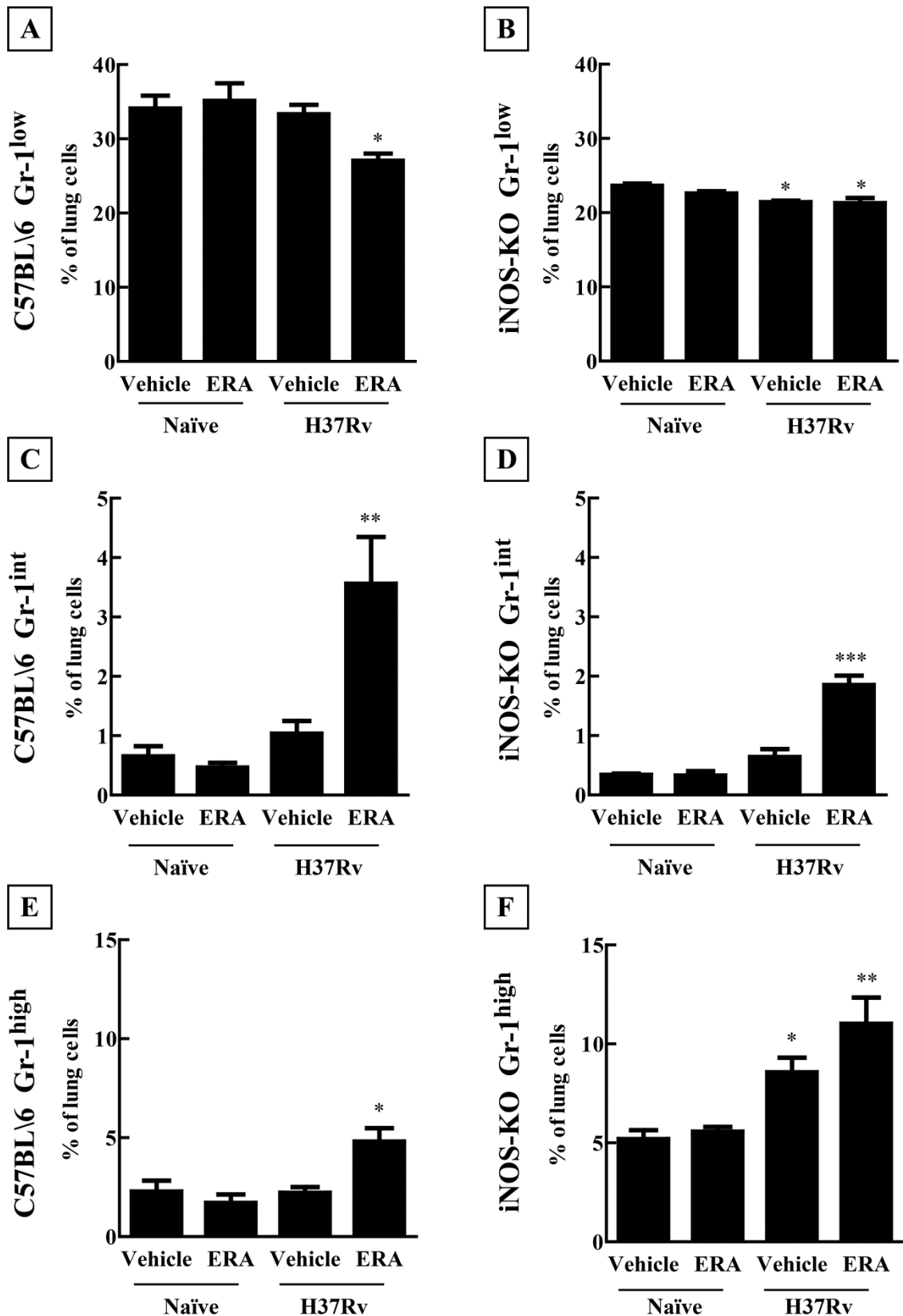


Figure 5. Cellular changes in the lungs by ET-1 receptor blockade during early *Mtb* infection. Percentage of lung cells in uninfected (naïve) or *M. tuberculosis* (H37Rv) infected mice at 21 days post challenge with vehicle or endothelin receptor

antagonists BQ123 and BQ788 (ERA) treatment. Proportion of Gr-1^{low} cells in C57BL/6 (A) or iNOS-KO (B) mice, Gr-1^{int} cells from C57BL/6 (C) or iNOS-KO (D) and Gr-1^{high} cells percent in C57BL/6 (E) or iNOS-KO (F) mice. Data shown represent mean \pm SEM, n=3. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p< 0.001; difference to the naïve vehicle treatment group by One-way ANOVA with Dunnett post test.

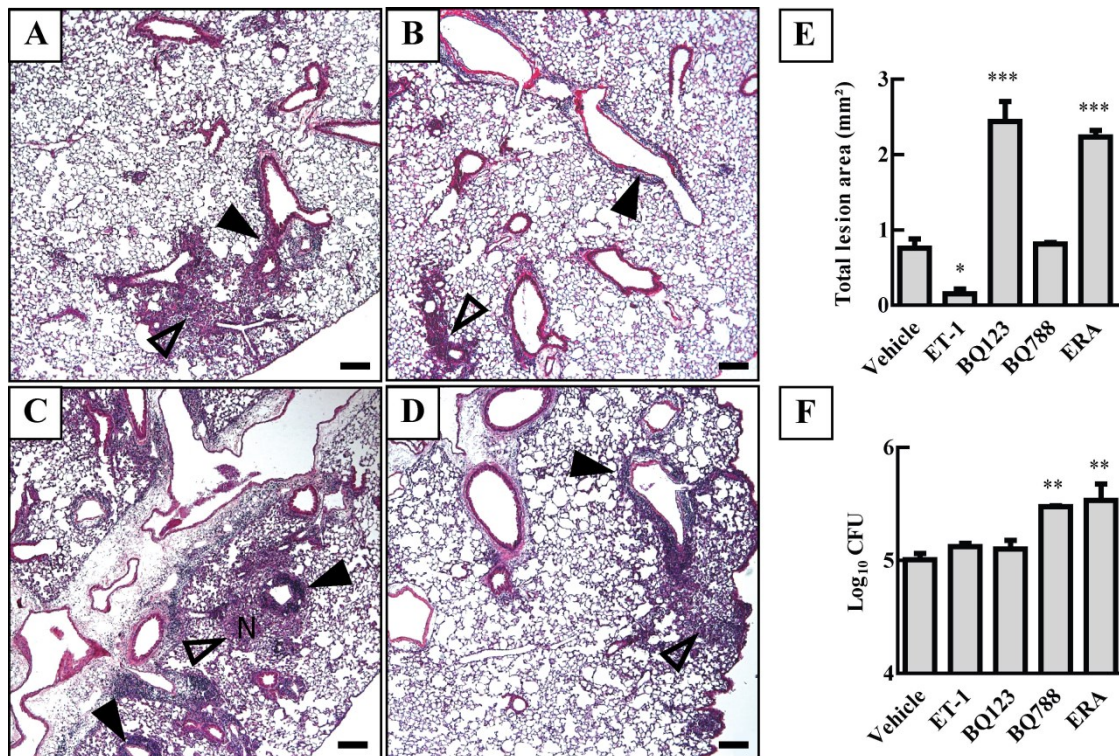


Figure 6. ET-1 promotes different responses through A and B receptors during *Mtb* infection. A-D, Representative lung sections (left bottom lobe) with HE stain of *M. tuberculosis* infected mice treated with vehicle (A), Endothelin-1 (B), ETA antagonist BQ123 (C) or ETB antagonist BQ788 (D) at 21 days post infection and under treatment. Perivascular/peribronchial inflammatory infiltrate (black arrowhead), alveolar damage (open arrowhead) and lesion area with necrosis (N). Scale bars represent 200 μ m. Results of the quantification of the inflammatory lesion area sizes (E) and bacterial burden of lung (anterior and middle right lobes) from infected mice treated with vehicle, ET-1, BQ123, BQ788 and ERA (BQ123 and BQ788) at 21 days post infection and under treatment (F). Data shown represent mean \pm SEM, n=3. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p< 0.001; difference from vehicle treatment by One-way ANOVA with Dunnett post test.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

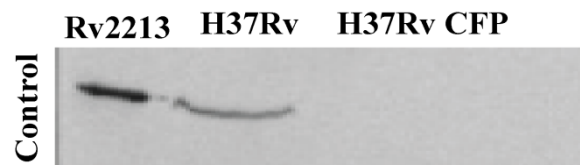


Figure S1. Nonspecific bacterial lysis immunoblot control. Lanes Rv2213 (Recombinant Rv2213 protein), H37Rv total cell lysate (H37Rv) and H37Rv culture filtrate proteins (H37Rv CFP) were probed with Rv2213 polyclonal mouse antiserum.

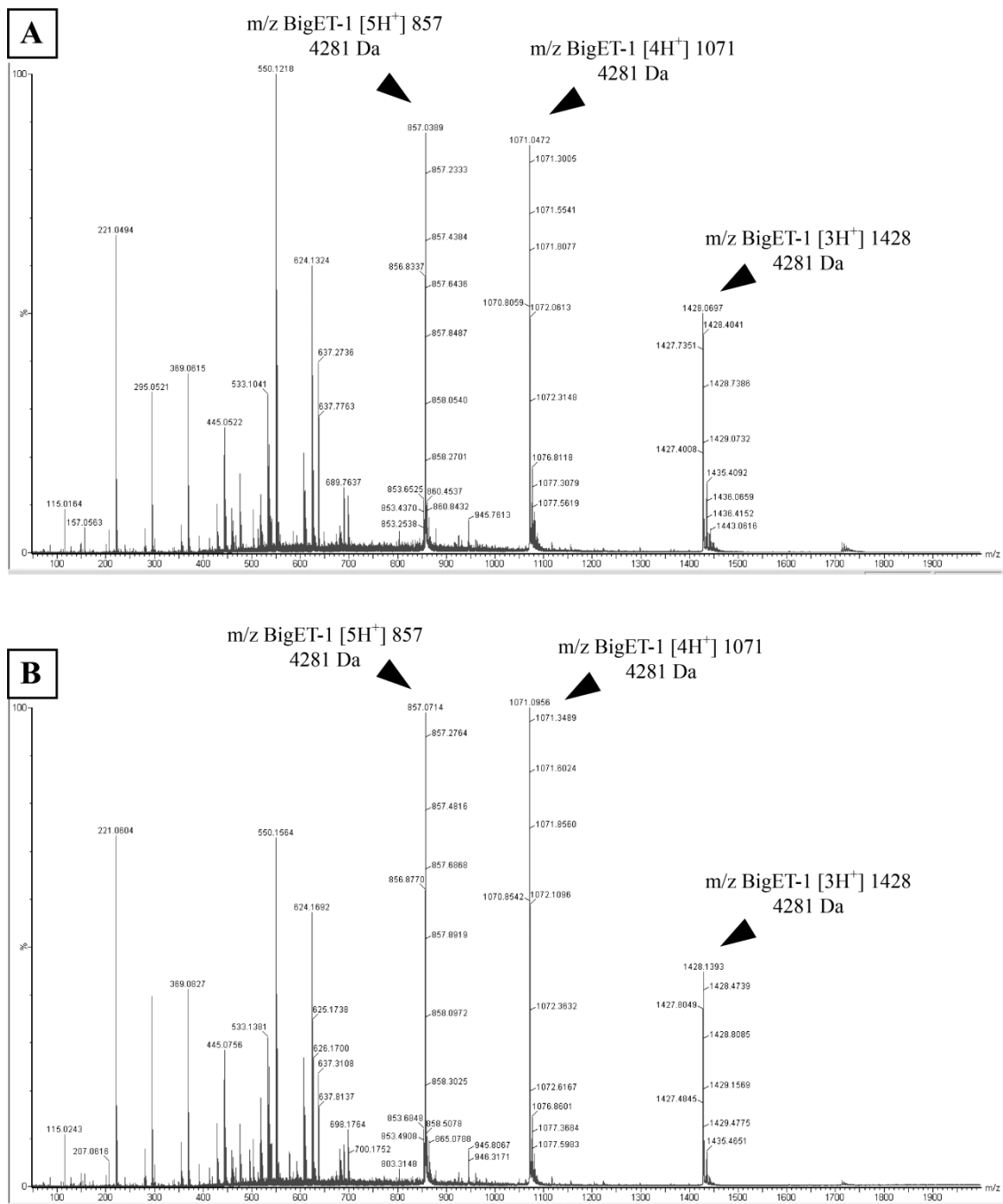


Figure S2. Hydrolysis of Big Endothelin-1 by rZmp1. A, LC-ESI-Q-TOF-MS spectrum of Big Endothelin-1 peptide (Big ET-1). B, LC-ESI-Q-TOF-MS spectrum of rZmp1 hydrolyzed Big ET-1 peptide. Peaks of 857 m/z five times protonated, 1071 m/z four times and 1428 m/z three times protonated corresponding to Big ET-1 peptide with 4281 Da. The arrowheads indicate the peaks of interest.

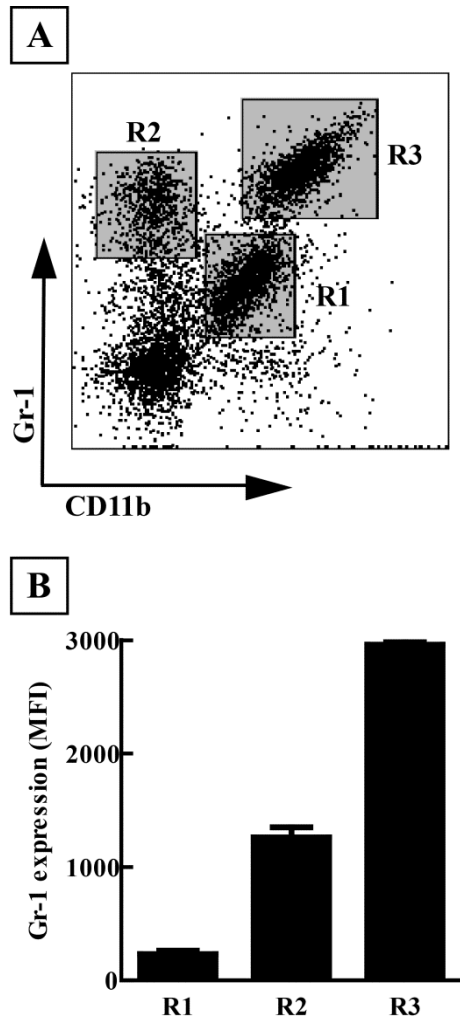


Figure S3. Representative Dot plots of lung Gr-1⁺ cells. A, Gr-1/CD11b dot plot analysis clearly identified three Gr-1 populations in the lungs. Cells expressing low levels of Gr-1 were gated as R1, intermediate expression gated as R2 and cells that had expressing high level of Gr-1 marker were gated as R3 population. B shows the mean intensity of fluorescence for the Gr-1⁺ gated populations. Data shown represent mean \pm SEM, n=3.

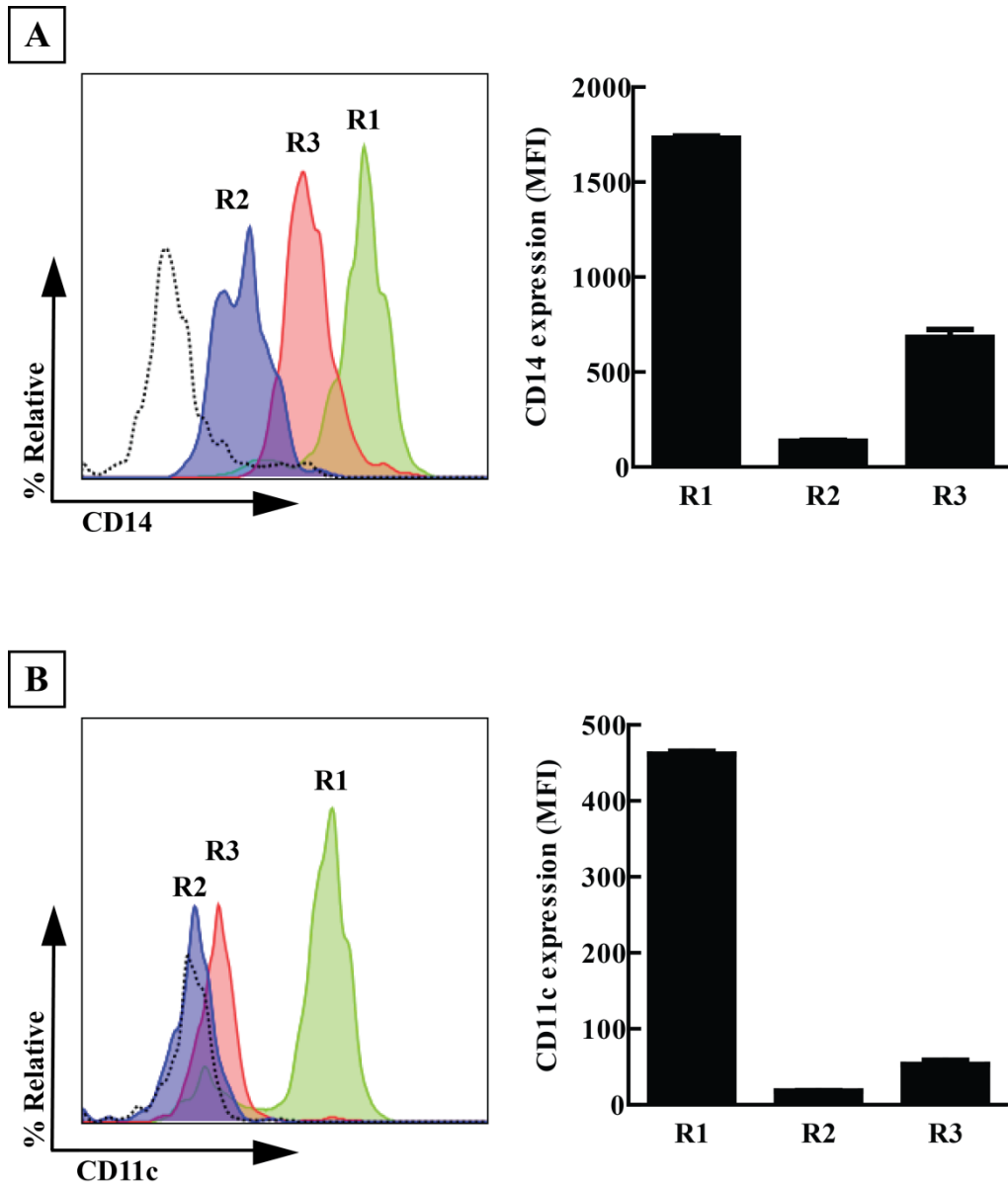


Figure S4. CD14 and CD11c expression in Gr-1⁺ cells. The histogram represents the levels of CD14 (A) and CD11c (B) expressed in R1 Gr-1^{low} (green), R2 Gr-1^{int} (Blue) and R3 Gr-1^{high} (Red). Dotted line represent the negative population. Bar graphs show the mean intensity of fluorescence for CD14 (A) and CD11c (B) in the Gr-1⁺ gated populations. Data shown represent mean \pm SEM, n=3.

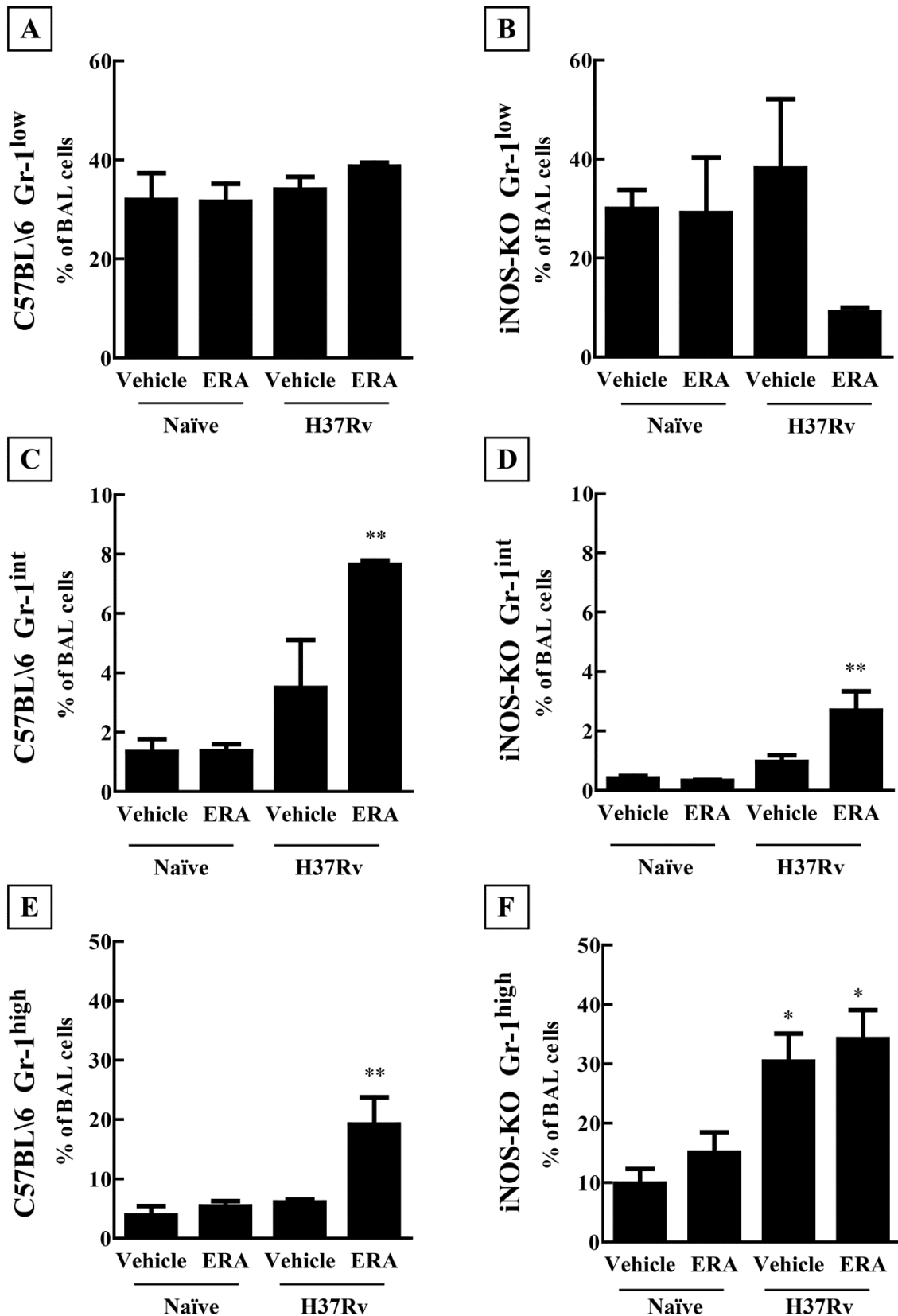


Figure S5. Cellular changes in the BAL fluid by ET-1 receptor blockade during early *Mtb* infection. Percentage of bronchoalveolar lavage (BAL) cells in uninfected (naïve) or *M. tuberculosis* (H37Rv) infected mice at 21 days post challenge with vehicle

or endothelin receptor antagonists BQ123 and BQ788 (ERA) treatment. Proportion of Gr-1^{low} cells in C57BL/6 (A) or iNOS-KO (B) mice, Gr-1^{int} cells from C57BL/6 (C) or iNOS-KO (D) and Gr-1^{high} cells percent in C57BL/6 (E) or iNOS-KO (F) mice. Data shown represent mean \pm SEM, n=3. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p< 0.001; difference to the naïve vehicle treatment group by One-way ANOVA with Dunnett post test.

Capítulo 6

The cytosolic M17 family leucine aminopeptidase of *Mycobacterium tuberculosis*: aminopeptidases as potential drug target in tuberculosis.

Andre França Correa,^{a,b} Izabela Marques Dourado Bastos,^a Andre Kipnis,^b Ana Paula Junqueira-Kipnis^b and Jaime Martins de Santana^{a#}

Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro, Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil^a; Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil^b

#Corresponding author: Jaime Martins de Santana, jsantana@unb.br

INTRODUCTION

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) is one of the most prevalent human pathogens, infecting 8.6 million people each year and leading to 1.3 million deaths [1]. In the last years, the TB treatment has become increasingly challenging owing to the emergence of multidrug resistant *Mtb* strains [2]. Thus, there is an immediate need for the development of new drugs that target novel biological pathways to avoid cross-resistance. *Mtb* has more than 100 genes encoding proteases. However, only a handful number of *Mtb* proteases have been studied. Furthermore, taken together, these studies evidence targeting proteases appears to be a promising approach and may lead to shortened and effective treatments for drug-resistant TB [3].

Proteolysis play a central role of pathogens biology since it has been demonstrated that peptidases perform processes associated such as invasion, migration, acquisition of nutrients and evasion of inflammatory and immune responses [4]-[10]. Aminopeptidases constitute a diverse set of proteolytic enzymes that selectively remove amino acids from the N-terminus of proteins. In many organisms, aminopeptidases degrade exogenous peptides, which are used as a nitrogen source. Alternatively, these enzymes accomplish key steps in many activation or inactivation pathways by liberating amino acids from the N-terminus of self-derived proteins. Early studies suggested that aminopeptidases can also play an important role in pathogenesis [11]-[17].

Aminopeptidases could be grouped according to the chemical nature of the catalytic site and substrate specificity [18]. M17 leucine aminopeptidases (LAPs) is a family of metalloproteases that is under intense investigation. LAPs comprise a diverse set of enzymes with different biochemical and biophysical properties, are found in animals, plants and microorganisms, and play important roles in diverse physiological processes [19]. Studies of M17 family members have increased in the last years due to their emergence as potential candidates for vaccine development and drug target in a number of protozoan, parasitic and bacterial diseases [20]-[24]. M17 LAP is conserved in pathogenic mycobacteria, such *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis* and *M. avium paratuberculosis* and predicted to be essential for *Mtb* in vivo survival and pathogenicity [25]. Furthermore, in bacteria LAPs have only been studied in a small number of species and there is increasing evidence that proteases may be good drug targets for bacterial infections, such tuberculosis.

Herein, we characterized a Leucine aminopeptidase of *M. tuberculosis*, belongs to M17 protease family, as a cytosolic multimeric metallo-aminopeptidase. LAP was immunogenic, but conferred no protection in mice model of TB infection. Moreover, molecular and enzymatic properties lead us to classify *Mtb* LAP as a typical member of the peptidase family M17, including inhibition susceptibility. Furthermore, bestatin could strongly inhibit LAP activity, in vitro *Mtb* growth and macrophage infection. Thus, our data suggesting LAP activity participates of an important pathway for *M. tuberculosis* survival and virulence and may be a promising target for new anti-TB drugs.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv was grown at 37°C in Middlebrook 7H9 broth or 7H11 agar supplemented with 10% oleic acid-albumin-dextrose (OAD), 0.5% glycerol, and 0.05% Tween 80. *Escherichia coli* strain XL1-Blue (Stratagene) was used for cloning and plasmid propagation. *E. coli* BL21 (Invitrogen) cells were used as expression-competent hosts. *E. coli* strains were maintained in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C with or without the addition of kanamycin (50 µg/ml) or Ampicillin (100 µg/ml) when required for plasmid selection. Solid medium was prepared by the addition of 1.5% agar to the LB medium.

Molecular cloning and recombinant protein expression. *M. tuberculosis* LAP gene (Rv2213; <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList>) was subcloned into PCR2.1 TOPO vector (Invitrogen) using a PCR amplified product from the *M. tuberculosis* H37Rv genome. The recombinant PCR2.1 vector was digested to release the gene. After agarose gel elution, the released gene was ligated into the pET28a expression vector (Novagen). The recombinant pET28a construct containing the LAP gene had its sequence checked with a BI 3130 capillary DNA sequencer (Applied Biosystems) and was then inserted into the expression host *E. coli* BL21. Bacteria containing the recombinant expression vector were grown at 37°C. When the bacterial cells reached OD₆₀₀ measurements of 0.6, the expression of the recombinant protein (rLAP) was induced by the addition of isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final

concentration of 0.1 mM, and the incubation continued at 20°C for 16 h. The bacterial cells were collected by centrifugation (10,000 × g for 5 min), and the cells were suspended in 4 ml of binding buffer (20 mM imidazole, 0.5 M NaCl, and 20 mM Tris-HCl pH 7.9). After sonication, cell lysate was centrifuged (20,000 × g for 15 min), and the supernatant was applied onto a resin column (Novagen) charged with NiSO₄ and equilibrated with binding buffer. Proteins were eluted with a concentration gradient of imidazole (40 – 1000 mM). Protein concentrations of the eluted fractions were determined by Bradford protein assay. Proteins were dialyzed against Tris-HCl pH7.5 with 250 mM NaCl and stored in 50% glycerol at -20° C. The purity of protein was analyzed by Coomassie-stained 12% SDS-gel.

Western Blot. H37Rv lysates and culture filtrate protein (CFP) were prepared from cultures grown in Sauton media that does not have albumin enrichment present in Middlebrook media. Bacterial culture was grown in 200 ml of Sauton liquid media to late log phase. Bacteria were pellet by centrifugation at 2,000 × g for 20 min. Bacterial pellet was used for H37Rv lysates by sonication. Supernatant was transferred to a fresh tube and centrifuged again then filtered through a 0.2 µm filter unit. Supernatant was concentrated by protein acetone precipitation [26] and solubilized in SDS sample buffer. Samples were resolved by 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Membranes were blocked in 5% powdered milk in PBS and probed with the anti-rLAP polyclonal serum produced in mice, following with the anti-mouse IgG-alkaline phosphatase secondary antibody (Sigma-Aldrich). Antigen-antibody complex was detected via BCIP/NBT liquid substrate system (Sigma-Aldrich).

Mice. Female specific-pathogen-free BALB/c mice aged 4–8 weeks, obtained from the Centro Multidisciplinar para investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB)-Unicamp-Campinas-Brazil, were maintained in micro isolators attached to HEPA-filtered racks for air intake and exhaustion cabinets with water and food provided ad libitum. The temperature was maintained between 20–24°C with the relative humidity set between 40–70%, and 12h light/dark cycles. The use of mice was conducted in accordance with the guidelines of the Brazilian Society of Animal Science Laboratory (SBCAL/COBEA). The work was approved by CEUA-

UFG (Comissão de Ética no Uso de Animais: Committee on the Ethics of Animal Experiments from Universidade Federal de Goiás) numbers: 229/11 and 27/14.

Immunizations. Mice were immunized three times with an interval of 21 days between immunizations. 20 micrograms of the purified rLAP protein combined with 20 µg of CpG DNA (ODN 1826, InvivoGen®) and MPL (MPL from *Salmonella enterica* serotype Minnesota Re 595; Sigma–Aldrich, L-MPL) in a volume of 100 µL were subcutaneously (sc) injected into the neck. The adjuvant control groups received 100 µL of 20 µg ODN and 20 µg MPL. Negative control mice received 100 µL of sterile saline.

Serum Collection. Serum samples were obtained 15 days after the third immunization. The samples were incubated for one hour at 37°C, centrifuged at 1,200 g at 4°C for 15 min for serum separation, and stored at –20°C.

ELISA of Mouse Samples. Ninety-six well polystyrene plates were initially coated with the rLAP protein (5 µg/mL) diluted in 0.05 M sodium carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6) and incubated at 4°C for 16 h. Subsequently, the plate was washed and incubated for one h at 37°C with sodium carbonate buffer (PBS) containing 1% skim milk. The samples were diluted 1:1.000, added to the wells and incubated for 2 h at 37°C. After several washes, 1:5.000 diluted biotin-conjugated antibody was added to the plates (anti-IgG1 and anti-mouse IgG2a; Pharmingen®). The plates were incubated for 1 h at 37°C, after which time streptavidin peroxidase diluted 1:1.000 was added, and the plates were again incubated for 1 h at 37°C. The reaction was then developed with citrate phosphate buffer containing ortho-phenylenediamine (OPD) and hydrogen peroxide and stopped after 15 min by adding 4 N sulfuric acid. The absorbance at 492 nm was read in an ELISA reader (Labsystems Multiskan Thermo®). Between each step, the plates were washed six times with PBS containing 0.05% Tween 20.

Evaluation of the Cellular and Cytokine Components of the Spleens of Immunized Mice. 45 days after the final immunization, the mice were sacrificed. The spleen was

removed aseptically, and the cells were separated using sterile tweezers. A cell suspension was prepared, and the erythrocytes were lysed with Gey's solution. The cells were washed in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum. The cell concentration was adjusted to 10^6 cells/ml, and the cells were plated in a 96-well plate. The splenocytes were stimulated with ConA (10 μ g/ml) or rLAP (10 μ g/ml) or not stimulated. After incubation for 4 h at 37°C and 5% CO₂ with monensin (eBioscience), the cells were harvested for intracellular cytokine staining. Thereafter, the cells were stained with CD4, CD8, IFN- γ and TNF- α using the BD Cytotfix/Cytoperm kit according to the manufacturer's instructions. The cells were fixed with PBS 0.05% sodium azide. Cell acquisition was performed with a dual-laser flow cytometer (FACSVerse; BD Biosciences). The data were analyzed using FlowJo software (ThreeStar).

Intravenous infection and determination of lung bacterial load. *M. tuberculosis* (strain H37Rv) was prepared and described as in [27]. Mice were infected intravenously with 100 μ L of 10^8 CFU/mL. To evaluate the bacterial load on day 1 after infection, animals were euthanized by cervical dislocation and the entire lung was homogenized in PBS with 0.05% Tween 80, and serial dilutions were plated on 7H11 agar supplemented with OAD. The plates were cultured in a CO₂ incubator and 21 days later, the colony forming units (CFU) were determined. For protection evaluation, the lung bacterial load was evaluated at 60 days after infection.

Enzyme activity assay. Aminopeptidase activity of LAP was assayed by incubating 300 ng of purified enzyme with 20 μ M fluorogenic substrates L-Leu-7-amido-4-methylcoumarin (Leu-AMC), Met-AMC, Pro-AMC, Arg-AMC and Asp-AMC, which were purchased from Sigma-Aldrich, in 100 μ l reaction buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5 and 1.5 mM NiSO₄). Enzyme activity was determined by measuring the fluorescence of AMC released by hydrolysis of the substrates as described previously [28]. Substrate hydrolysis was measured fluorometrically with SpectraMax M5 Microplate Reader with SoftMax Pro Data Acquisition & Analysis Software (Molecular Devices). Cation preference was performed using different concentrations of CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, FeCl₂, MgCl₂, MnCl₂, NiSO₄, ZnSO₄ and no metal addition, in Tris-HCl pH 7.5 at room

temperature and Leu-AMC as substrate. The optimal pH for activity was determined as described above in 25 mM AMT buffer (25 mM acetic acid-25 mM MES-25 mM Tris-HCl) adjusted to the desired pH. To assay the optimal temperature for aminopeptidase activity, reactions took place at 10 to 100°C in reaction buffer. The presence of interchain disulfide bonds, the molecular mass and the oligomeric structure of the enzyme were evaluated by electrophoresis as described previously [28]. Purified protein was subjected to 8% SDS-PAGE in the presence 0.01% SDS under non-reducing conditions with or without previous boiling and addition or not of 1.5 mM NiSO₄ in sample buffer.

LAP Inhibition pattern. Different concentrations of tosyl-lysylchloromethane (TLCK), bestatin, tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK), EDTA, L-trans-epoxysuccinylleucylamido-4-guanidino butane (E-64), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1,10-phenanthroline, leupeptin, or pepstatin A were incubated with 300 ng of purified rLAP in 100 µl reaction buffer for 5 min at room temperature before the substrate was added. Enzymatic reactions were monitored as described above. All inhibitors were from Sigma-Aldrich. Bestatin half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) and 95% confidence interval (CI) was determined by nonlinear regression, log(inhibitor) vs. normalized response with variable slope method.

Effect of bestatin on *Mtb* growth and macrophage infection. To study the effect of bestatin on *Mtb* growth, 1% of culture grown to OD₆₀₀ 0.5 was re-inoculated in Middlebrook 7H9 supplemented with 10% OAD, 0.5% glycerol, and 0.05% Tween 80 with increasing concentrations of bestatin and the OD₆₀₀ monitored per 10 days after addition of the inhibitor. Alveolar macrophages were obtained from mice bronchoalveolar lavage. Mice were euthanized and the pulmonary cavities were opened. Using an 18-gauge needle, the trachea was cannulated, and 1ml of ice cold 5 mM EDTA in PBS was slowly injected into the lungs and then withdrawn. This procedure was repeated five times and a total of 4 ml of BAL fluid was collected. The single-cell suspension was then washed and centrifuged at 1,000 × g. To lyse contaminating red blood cells, the cell pellet was incubated during 5 min at room temperature with 2 ml of Gey's solution (NH₄Cl and KHCO₃). Cells were then washed with PBS and

resuspended in RPMI medium 1640 (Gibco) supplemented with 1% glutamine (Sigma-Aldrich), 1% nonessential amino acids (Sigma-Aldrich), 1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich), 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich) and 10% FBS. The day before infection, lay down macrophage in 96 well plates (100 μ l volumes) at 10^6 cells per well. On the day of infection, macrophage monolayers was washed once with with warm (37 °C) PBS, and added 100 μ l infection media (RPMI-I) RPMI medium 1640 supplemented with 1% glutamine, 1% nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 10% FBS and 5×10^6 CFU of *Mtb* H37Rv. Infected monolayers was incubated at 37°C in 0.5% CO₂ incubator for 3 hrs. Monolayers were washed twice with warm PBS to remove extracellular bacteria and added supplemented RPMI without antibiotics containing 100 - 200 μ g/ml bestatin or PBS. 48 h after infection, media was aspirated from infected macrophage wells, and 100 μ l of ice cold sterile lysis buffer (0.05% SDS, w/v in H₂O) added to each well, lysates transfered to a new 96 well plates for serial dilutions. Triplicate wells were plated on 7H11 agar supplemented with OAD. The plates were cultured in a CO₂ incubator and 21 days later and the CFU was determined. To determine bestatin effect on macrophage *Mtb* uptake, bestatin was added in infection media and after 3 h monolayers were washed twice with warm PBS to remove extracellular bacteria, and ice cold sterile lysis buffer added to each well bacterial and load was determined as described above. Mycobacteria were prepared for macrophage infection as described in [29].

Statistical analysis. Statistical significance between groups was determined by the two-tailed unpaired Student's t test or One-way ANOVA with Dunnett post-test and grouped analyses by two-way ANOVA with Bonferroni post-test using Prism software version 5.03 (GraphPad).

RESULTS

LAP is a cytosolic protein produced by *M. tuberculosis*. To establish the kinect parameters and immunogenicity, the *Mycobacterium tuberculosis* gene Rv2213 was cloned into the prokaryotic expression vector pET28a. The recombinant protein was

expressed and purified by nickel affinity chromatography in non-denaturing conditions with increasing imidazole concentrations. In SDS- Page analyses was observed a strong band, with high purity, eluted in higher than 200 mM imidazole, corresponding to the expected protein molecular weight of approximately 55 kDa (Figure 1A). For detection and identification of the native protein anti-rLAP serum was produced in mice. By western blot analysis we verified the presence of the protein in the H37Rv cell extract, however there was no protein detection in the CFP, culture supernatant (Figure 1B). As positive control, we used another mycobacterial metalloprotease Zmp1, previous described as secreted protein [30], [31], which was detected in the same culture supernatant preparations (Figure 1B).

LAP was immunogenic but confers no protection against *Mtb* infection in mice model. To evaluate whether rLAP could be used as a subunit vaccine, mice were immunized using CpG DNA and monophosphoryl lipid A as adjuvant. BALB/c mice received three subcutaneous immunizations. The control groups were vaccinated with adjuvants or saline only. The IgG1 and IgG2a antibody levels were measured one week after each vaccination. High levels of IgG1 were observed in rLAP vaccinated group post second immunization and at lowest levels, IgG2a was also produced in response to rLAP (Figure 2A). Thus, the rLAP immunization was able to induce a specific humoral immune response in mice.

To determine whether a T-cell immune response was induced, we performed in vitro-stimulated splenocytes cultures and antigen-specific activation of CD4⁺ or CD8⁺ cells expressing IFN- γ and TNF- α were analyzed 45 days post last immunization by flow cytometry. There were no increased in percentage of antigen-stimulated CD4⁺/IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺ relative to unstimulated media control in all vaccinated groups. Cell death or anergy were ruled out by increased INF- γ and TNF- α production in ConA stimulation (Figure 2B). Similarly, no CD8 response was observed (data no show). Vaccine protection was accessed by *M. tuberculosis* H37Rv challenge 45 days afterward immunization, then lung bacterial burden analyzes 60 days post infection. Nevertheless, there was no difference in bacterial load in lung of mice rLAP or saline vaccinated (Figure 2C).

LAP of *M. tuberculosis* is a metal dependent protease. We carried out biochemical characterization of the purified rLAP and determined several enzyme kinetics parameters. Recombinant LAP activity was determined by measuring the fluorescence of AMC (7-amido-4-methylcoumarin) released by hydrolysis of the enzyme substrate Leu-AMC. However, in the first assays, incubating of substrate and enzyme in Tris-buffer without a metal ion addition, rLAP did not show activity. Because LAP belongs to the M17 family, which consists of metalloaminopeptidases with a broad range of preferences for metal ions, we decided to test enzyme metal dependence. rLAP showed enhanced activity in the presence of metal ions including Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} . However, Ca^{2+} , Cu^{2+} , and Fe^{2+} could not activate rLAP. The maximum activity was observed in the presence of 1.5 mM Ni^{2+} , followed by Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} and Mg^{2+} (Figure 3A). The influence of pH on the rLAP activity was determined. Activity against Leu-AMC was optimal at pH 7.5. At acid pHs enzyme rapidly loses activity and no substrate cleavage was observed at pH 5. Therefore, enzyme was resistant to alkaline environment with detectable activity up to pH 10 (Figure 3B). rLAP activity was determined at different temperatures in the range of 10 – 100 °C and maximal activity was observed at 50 °C. Further, at 37 °C enzyme showed 70.78 % of the recorded maximal activity observed at 50°C. At 60 °C relative activity was 60.68 % and the activity declined sharply at higher temperatures (Figure 3C).

LAP oligomeric state was affected by metal ligand. Since leucine aminopeptidase exists naturally as a homohexamer [19] and LAP has a metal dependent activity, we decided to analyze metal ion influence and LAP oligomer formation. To investigate the aminopeptidase oligomeric state, purified protein was subjected to SDS-PAGE under nonreducing conditions. 55 kDa monomeric state was predominant in gel analyses because rLAP is very sensitive to SDS and was only seen as an oligomer in the presence of detergent as low as 0.01% (Figure 3). Protein bands of about 55, 100 and over 200 kDa were revealed upon staining of the same gel (Figure 3D, lane 1 and 2). Under the same experimental conditions, sample boiling resulted in complete monomerization of LAP (Figure 3D, lanes 3 and 4). While, nickel addition in sample buffer increased the oligomer formation, as seen in more defined bands at 100 kDa and above 200 kDa (Figure 3D, lane 2) compared to the non Ni supplied sample (Figure 3D, lane 1).

LAP substrate preference and inhibition pattern. To access the enzyme substrate preference, rLAP was incubate with aminopeptidase substrates Arg-AMC, Asp-AMC, Leu-AMC, Met-AMC and Pro-AMC. Enzyme showed maximal activity against substrates with hydrophobic amino acids Leucine and Metionine. Low activity was observed against the Proline based substrate and no cleavage was detected on substrates with charged side chain Arginine and Aspartic acid amino acids residues (Figure 4A). The Michaelis-Menten constant (K_m) of rLAP were determined according to the hyperbolic regression method. The enzyme has a K_m value of $69.4 \pm 3.6 \mu\text{M}$ for Leu-AMC substrate, $61.8 \pm 4.4 \mu\text{M}$ Met-AMC and $344.8 \pm 49.2 \mu\text{M}$ Pro-AMC. LAP inhibition pattern was typical to metalloproteases. Enzyme hydrolytic activity was not sensitive to PMSF, TPCK, E-64, TLCK, leupeptin or pepstatin A, even at high concentrations. The enzymatic activity of rLAP on Leu-AMC was completely inhibited by $30 \mu\text{M}$ bestatin, while 10 mM 1,10-phenanthroline and 10 mM EDTA inactivated 86.5% and 68% of the peptidase activity, respectively (Figure 4B).

Bestatin inhibits *Mtb* growth in culture and macrophage infection. Bestatin is a potent inhibitor of LAP, as described previously [22]. The enzymatic activity of purified rLAP was measured in the presence of inhibitor. LAP activity decreased with increasing concentration of bestatin (Figure 5A). Using Leu-AMC substrate, the calculated half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was found to be 53.2 nM (95% CI - 46.48 to 60.87 nM). To test if bestatin could inhibit *Mtb* growth, we cultivated the bacteria in liquid media with different inhibitor concentrations and measured OD600 at different time points. At day seven, *Mtb* growth was inhibited 55.5% in the presence of $200 \mu\text{g/ml}$ bestatin and decreased in a dose dependent manner (Figure 5B). An earlier report strongly suggested that the LAP family of proteases may be important for survival of the pathogen during infection. We next examined the bestatin inhibition for *Mtb* survival in macrophages. *Mtb* H37Rv was used to infect mice alveolar macrophages, after infection bestatin was added to culture and bacterial viability was quantified as described in the Methods. There was a significant dose dependent reduction in colony counts with the bestatin incubation relative to PBS treatment, about only 25% bacterial recovery using $200 \mu\text{g/ml}$ of inhibitor (Figure 5C). Moreover, bestatin added during

time of infection increased bacterial uptake by the macrophages (Figure 5D). This strongly suggests that the activity of LAP may be essential for *M. tuberculosis* survival and virulence.

DISCUSSION

Leucine aminopeptidases (LAPs) are known to be important for bacterial physiology and have not yet been characterized in many pathogenic bacteria, including *M. tuberculosis*. In this study we report the identification and biochemical characterization of the *Mtb* LAP as cytosolic metalloprotease belonging to the M17 family. In mice LAP was an immunogenic protein, able to induce a specific humoral immune response. However, no protection was conferred to LAP immunized mice and no IFN- γ /TNF- α T-cell stimulation observed. Therefore, *Mtb* LAP showed high sensitivity to the inhibitor bestatin. In addition, *Mtb* growth in vitro and survival in macrophages has a significant bestatin dose dependent reduction.

LAP immunization in combination with different adjuvants confers high level of protection against some animal parasite disease through a consistent mixed IgG1/IgG2 response [32], [33]. The induction of specific IgG2a antibodies is associated with Th1 immune response due to the IFN- γ production, while the IgG1 antibodies are associated with induction of the IL-10 Th2 immune response [34], [35]. Specific antibodies can bind to mycobacteria facilitating absorption and phagocytosis, increase the microbicidal activity of macrophages, NK cells and cytotoxic T cells [36], [37]. However, the importance of antibodies in *Mtb* infection is controversial and CD4 T cells still a crucial marker in protecting mammalian hosts from *Mtb*, in particular because of its inflammatory cytokines that activate macrophage, and CD8+T cells among other cells [38]. Furthermore, several studies describing the development of new subunit vaccines against TB suggest that for a protein to be considered a good subunit candidate vaccine, it must induces specific antibodies and predominantly Th1 immune response [39]. Taken together, these findings could explain the *Mtb* LAP subunit vaccine profile. LAP immunization induces high IgG1 production and low levels of IgG2a (Figure 2A) may associated with a Th2 response. In addition, no CD4 Th1 pro-inflammatory cytokines were produced in response to LAP stimulation in the splenocytes of vaccinated mice

(Figure 2B). Thus, *Mtb* LAP confers no protection against tuberculosis (Figure 2C) in accordance with studies in humans and mice showing the Th1 response and the protective cytokines IFN- γ , IL-17 and TNF- α as mainly protection markers [40].

Aminopeptidases are widely distributed in animals, plants and microorganisms, and found in the extracellular milieu, in the cytoplasm, in many subcellular organelles, and as components of membranes [19]. M17 members produced by a number of pathogenic organisms are currently under intense investigation, in some of these cases the enzyme is secreted and act extracellularly. However, in bacteria LAP is most commonly found in the cytosol [11]. Intracellular bacterial LAPs generally function as homo-hexameric enzymes while extracellular LAPs are functional as monomers [11]. In agreement with literature, we found that the mycobacterial LAP is cytosolic (Figure 1) and probably acts as an oligomer enzyme (Figure 3D).

LAPs belong to the M17 family of metalloproteases, which mainly prefer Zn²⁺, and other aminopeptidases are dependent upon Mn²⁺, Fe²⁺, and Mg²⁺. Similar to *S. aureus* LAP [41], the *Mtb* enzyme exhibited maximum activity in the presence of Ni(II), but function with a broad range of other metals (Figure 3A). The broad metal cofactor profile of LAP may allow activity of this peptidase under in vivo conditions where some metals are limited and tightly regulated by both the host and bacteria, resulting in altered enzymatic activity under certain conditions [42], [43].

Despite conservation of amino acid sequences, M17 members show variable pH and temperature optima. Although *Mtb* LAP is active over a broad range of temperatures with optima at 55°C (Figure 3C), its activity shows a marked dependence on neutral/alkaline pH, since the enzyme is completely inactive at pH 5 (Figure 3B). This correlates with observations that recombinant members of M17 assemble into active oligomers at higher temperature and alkaline pHs [19], [28]. *Mtb* LAP showed preference for substrates with hydrophobic amino acids and not cleave substrates with charged side chains (Figure 4A). This substrate specificity profile will help in future investigations into the cellular target of *Mtb* LAP and searching for specific inhibitors.

Bestatin is a natural product dipeptide analog of actinomycetes that potently inhibits LAP M17 families [19], [44], [45] and the mycobacterial enzyme shown high sensitivity for this inhibitor (Figure 4B and 5A). Bestatin inhibited LAP enzymatic activity as well as *Mtb* in vitro growth, suggesting that LAP activity may be important

for bacterial metabolism and physiology (Figure 5B). Moreover, bestatin has been shown to inhibit in vitro growth of *S. aureus* [41] and *P. falciparum* parasites in culture and in mouse models of malaria [46]-[48]. In the present study, we observed that *Mtb* survival in macrophages was also diminished by bestatin inhibitor in a dose-dependent manner (Figure 5C). This strongly suggests LAP may act not only in bacterial physiology but also in *Mtb* virulence. Thus, the role of LAP in the TB pathogenesis needs to be further established.

In addition, bestatin enhance *Mtb* phagocytosis (Figure 5D) in accordance with literature bestatin immunomodulatory effects activating monocytes/macrophages and promoted the secretion by macrophages of the pro-inflammatory cytokines IL-1, IL-6, IFN- γ , and TNF- α , as well as the growth factors GM-CSF and G-SCF [49]-[53]. Many studies showed that bestatin could be administered with very low toxicity and with multiple effects on the immune system. They also revealed potential beneficial effects on the survival of animals with some experimental tumors. Subsequent research in human patients confirmed the immunomodulator effects of bestatin and provided encouraging results on the potential of this drug in cancer treatments. Bestatin is currently used as an immunomodulator and antitumor drug, under the trademark Ubenimex and various active stereoisomers and substituted analogs are commercially available as useful tools for in vitro and animal drug experimentation [54], [55]. Taken together with our finds, bestatin or analogues could be promising drugs on Tb treatment.

In summary, our results show that *M. tuberculosis* produce a cytosolic M17 member leucine aminopeptidase with biochemical properties shared by LAP in other species. Moreover, *Mtb* LAP was immunogenic but confers no protection in our mice model of TB. In addition, bestatin inhibition of LAP, *Mtb* growth and macrophage immunomodulatory effects highlights the aminopeptidases as potential drug target in tuberculosis.

Author contributions: Conceived and design the experiments: AFC, JMS and APJK; Performed the experiments: AFC, APJK; Analyzed the data: AFC; Contributed reagents/materials/analysis tools: APJK, IMDB, AK, JMS; Wrote the manuscript draft: AFC; Critically revised the manuscript: All authors.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the LACEN-DF (Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal).

REFERENCES

1. WHO | Global tuberculosis report 2013. WHO.
2. **Günther G.** 2014. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a review of current concepts and future challenges. *Clin Med* **14**:279–285.
3. **Roberts DM, Personne Y, Ollinger J, Parish T.** 2013. Proteases in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis: potential as drug targets. *Future Microbiol* **8**:621–631.
4. **Ingmer H, Brøndsted L.** 2009. Proteases in bacterial pathogenesis. *Res. Microbiol.* **160**:704–710.
5. **Xu J, Baldwin D, Kindrachuk C, Hegedus DD.** 2006. Serine proteases and metalloproteases associated with pathogenesis but not host specificity in the Entomophthoralean fungus *Zoophthora radicans*. *Can. J. Microbiol.* **52**:550–559.
6. **Kennan RM, Wong W, Dhungyel OP, Han X, Wong D, Parker D, Rosado CJ, Law RHP, McGowan S, Reeve SB, Levina V, Powers GA, Pike RN, Bottomley SP, Smith AI, Marsh I, Whittington RJ, Whisstock JC, Porter CJ, Rood JI.** 2010. The Subtilisin-Like Protease AprV2 Is Required for Virulence and Uses a Novel Disulphide-Tethered Exosite to Bind Substrates. *PLoS Pathog* **6**:e1001210.
7. **Santana JM, Grellier P, Schrével J, Teixeira AR.** 1997. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem. J.* **325 (Pt 1)**:129–137.
8. **Grellier P, Vendeville S, Joyeau R, Bastos IM, Drobecq H, Frappier F, Teixeira AR, Schrével J, Davioud-Charvet E, Sergheraert C, Santana JM.** 2001. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *J. Biol. Chem.* **276**:47078–47086.
9. **Bastos IMD, Motta FN, Charneau S, Santana JM, Dubost L, Augustyns K,**

- Grellier P.** 2010. Prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma brucei* hydrolyzes native collagen, peptide hormones and is active in the plasma of infected mice. *Microbes Infect.* **12**:457–466.
10. **Suarez C, Volkmann K, Gomes AR, Billker O, Blackman MJ.** 2013. The Malarial Serine Protease SUB1 Plays an Essential Role in Parasite Liver Stage Development. *PLoS Pathog* **9**:e1003811.
 11. **Gonzales T, Robert-Baudouy J.** 1996. Bacterial aminopeptidases: properties and functions. *FEMS Microbiol. Rev.* **18**:319–344.
 12. **Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P.** 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**:394–406.
 13. **Naamati A, Regev-Rudzki N, Galperin S, Lill R, Pines O.** 2009. Dual Targeting of Nfs1 and Discovery of Its Novel Processing Enzyme, Icp55. *J Biol Chem* **284**:30200–30208.
 14. **Hearn A, York IA, Rock KL.** 2009. The Specificity of Trimming of MHC Class I-Presented Peptides in the Endoplasmic Reticulum. *J Immunol* **183**:5526–5536.
 15. **Bhosale M, Kadthur JC, Nandi D.** 2012. Roles of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium encoded Peptidase N during systemic infection of Ifn γ ^{-/-} mice. *Immunobiology* **217**:354–362.
 16. **Zhang L, Jia Y, Wang L, Fang R.** 2007. A proline iminopeptidase gene upregulated in planta by a LuxR homologue is essential for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Microbiol.* **65**:121–136.
 17. **Skinner-Adams TS, Stack CM, Trenholme KR, Brown CL, Grembecka J, Lowther J, Mucha A, Drag M, Kafarski P, McGowan S, Whisstock JC, Gardiner DL, Dalton JP.** 2010. *Plasmodium falciparum* neutral aminopeptidases: new targets for anti-malarials. *Trends Biochem. Sci.* **35**:53–61.
 18. **Rawlings ND, Barrett AJ.** 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* **290**:205–218.
 19. **Matsui M, Fowler JH, Walling LL.** 2006. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol. Chem.* **387**:1535–1544.
 20. **Acosta D, Cancela M, Piacenza L, Roche L, Carmona C, Tort JF.** 2008. *Fasciola hepatica* leucine aminopeptidase, a promising candidate for vaccination against ruminant fasciolosis. *Mol. Biochem. Parasitol.* **158**:52–64.
 21. **Marcilla A, De la Rubia JE, Sotillo J, Bernal D, Carmona C, Villavicencio Z, Acosta D, Tort J, Bornay FJ, Esteban JG, Toledo R.** 2008. Leucine

- Amino-peptidase Is an Immunodominant Antigen of *Fasciola hepatica* Excretory and Secretory Products in Human Infections. *Clin Vaccine Immunol* **15**:95–100.
22. **McGowan S, Oellig CA, Birru WA, Caradoc-Davies TT, Stack CM, Lowther J, Skinner-Adams T, Mucha A, Kafarski P, Grembecka J, Trenholme KR, Buckle AM, Gardiner DL, Dalton JP, Whisstock JC.** 2010. Structure of the *Plasmodium falciparum* M17 amino-peptidase and significance for the design of drugs targeting the neutral exopeptidases. *PNAS*.
 23. **Patil V, Kumar A, Kuruppath S, Nandi D.** 2007. Peptidase N encoded by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium modulates systemic infection in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**:431–442.
 24. **Carroll RK, Robison TM, Rivera FE, Davenport JE, Jonsson I-M, Florczyk D, Tarkowski A, Potempa J, Koziel J, Shaw LN.** 2012. Identification of an intracellular M17 family leucine amino-peptidase that is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.* **14**:989–999.
 25. **Ribeiro-Guimarães ML, Pessolani MCV.** 2007. Comparative genomics of mycobacterial proteases. *Microb. Pathog.* **43**:173–178.
 26. **Wessel D, Flüggé UI.** 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **138**:141–143.
 27. **Junqueira-Kipnis AP, de Oliveira FM, Trentini MM, Tiwari S, Chen B, Resende DP, Silva BDS, Chen M, Tesfa L, Jacobs WR Jr, Kipnis A.** 2013. Prime–Boost with *Mycobacterium smegmatis* Recombinant Vaccine Improves Protection in Mice Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE* **8**:e78639.
 28. **Cadavid-Restrepo G, Gastardelo TS, Faudry E, de Almeida H, Bastos IMD, Negreiros RS, Lima MM, Assumpção TC, Almeida KC, Ragno M, Ebel C, Ribeiro BM, Felix CR, Santana JM.** 2011. The major leucyl amino-peptidase of *Trypanosoma cruzi* (LAPTc) assembles into a homo-hexamer and belongs to the M17 family of metallo-peptidases. *BMC Biochem.* **12**:46.
 29. **Koo M-S, Subbian S, Kaplan G.** 2012. Strain specific transcriptional response in *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages. *Cell Communication and Signaling* **10**:2.
 30. **Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, Springer B, Timmins GS, Sander P, Deretic V.** 2008. *Mycobacterium tuberculosis* prevents

- inflammasome activation. *Cell Host Microbe* **3**:224–232.
31. **Correa AF, Bailao AM, Bastos IMD, Orme IM, Soares CMA, Kipins A, Santana JM, Junqueira-Kipins AP.** 2014. Endothelin system has a significant role in the pathogenesis and progression of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect. Immun.* IAI.02304–14.
 32. **Maggioli G, Acosta D, Silveira F, Rossi S, Giacaman S, Basika T, Gayo V, Rosadilla D, Roche L, Tort J, Carmona C.** 2011. The recombinant gut-associated M17 leucine aminopeptidase in combination with different adjuvants confers a high level of protection against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Vaccine* **29**:9057–9063.
 33. **Changklungmoa N, Kueakhai P, Riengrojpitak S, Chaithirayanon K, Chaichanasak P, Preyavichyapugdee N, Chantree P, Sansri V, Itagaki T, Sobhon P.** 2013. Immunization with recombinant leucine aminopeptidase showed protection against *Fasciola gigantica* in mice. *Parasitol. Res.* **112**:3653–3659.
 34. **Maassen CBM, Boersma WJA, van Holten-Neelen C, Claassen E, Laman JD.** 2003. Growth phase of orally administered *Lactobacillus* strains differentially affects IgG1/IgG2a ratio for soluble antigens: implications for vaccine development. *Vaccine* **21**:2751–2757.
 35. **Flynn JL, Chan J.** 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **19**:93–129.
 36. **Thakurdas SM, Hasan Z, Hussain R.** 2004. IgG1 antimycobacterial antibodies can reverse the inhibitory effect of pentoxifylline on tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) secreted by mycobacterial antigen-stimulated adherent cells. *Clin. Exp. Immunol.* **136**:320–327.
 37. **Hoft DF.** 2008. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet* **372**:164–175.
 38. **Bold TD, Ernst JD.** 2012. CD4+ T Cell-Dependent IFN- γ Production by CD8+ Effector T Cells in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Immunol* **189**:2530–2536.
 39. **Skeiky YAW, Alderson MR, Ovendale PJ, Guderian JA, Brandt L, Dillon DC, Campos-Neto A, Lobet Y, Dalemans W, Orme IM, Reed SG.** 2004. Differential Immune Responses and Protective Efficacy Induced by Components of a Tuberculosis Polyprotein Vaccine, Mtb72F, Delivered as Naked DNA or Recombinant Protein. *J Immunol* **172**:7618–7628.

40. **Olsen AW, Andersen P.** 2003. A novel TB vaccine; strategies to combat a complex pathogen. *Immunology Letters* **85**:207–211.
41. **Singh AK, Singh R, Tomar D, Pandya CD, Singh R.** 2012. The leucine aminopeptidase of *Staphylococcus aureus* is secreted and contributes to biofilm formation. *Int. J. Infect. Dis.* **16**:e375–381.
42. **Hood MI, Skaar EP.** 2012. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**:525–537.
43. **Kehl-Fie TE, Chitayat S, Hood MI, Damo S, Restrepo N, Garcia C, Munro KA, Chazin WJ, Skaar EP.** 2011. Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* **10**:158–164.
44. **Suda H, Aoyagi T, Takeuchi T, Umezawa H.** 1976. Inhibition of aminopeptidase B and leucine aminopeptidase by bestatin and its stereoisomer. *Arch. Biochem. Biophys.* **177**:196–200.
45. **Burley SK, David PR, Lipscomb WN.** 1991. Leucine aminopeptidase: bestatin inhibition and a model for enzyme-catalyzed peptide hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:6916–6920.
46. **Nankya-Kitaka MF, Curley GP, Gavigan CS, Bell A, Dalton JP.** 1998. *Plasmodium chabaudi chabaudi* and *P. falciparum*: inhibition of aminopeptidase and parasite growth by bestatin and nitrobestatin. *Parasitol. Res.* **84**:552–558.
47. **Naughton JA, Nasizadeh S, Bell A.** 2010. Downstream effects of haemoglobinase inhibition in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **173**:81–87.
48. **Gavigan CS, Dalton JP, Bell A.** 2001. The role of aminopeptidases in haemoglobin degradation in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology* **117**:37–48.
49. **Talmadge JE, Lenz BF, Pennington R, Long C, Phillips H, Schneider M, Tribble H.** 1986. Immunomodulatory and therapeutic properties of bestatin in mice. *Cancer Res.* **46**:4505–4510.
50. **Shibuya K, Hayashi E, Abe F, Takahashi K, Horinishi H, Ishizuka M, Takeuchi T, Umezawa H.** 1987. Enhancement of interleukin 1 and interleukin 2 releases by ubenimex. *J. Antibiot.* **40**:363–369.
51. **Müller WE, Schuster DK, Zahn RK, Maidhof A, Leyhausen G, Falke D, Koren R, Umezawa H.** 1982. Properties and specificity of binding sites for the

- immunomodulator bestatin on the surface of mammalian cells. *Int. J. Immunopharmacol.* **4**:393–400.
52. **Schorlemmer HU, Bosslet K, Sedlacek HH.** 1983. Ability of the immunomodulating dipeptide bestatin to activate cytotoxic mononuclear phagocytes. *Cancer Res.* **43**:4148–4153.
53. **S Okamura FO.** 1990. Influence of bestatin on production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* **29**:795–7.
54. **Ota K.** 1991. Review of ubenimex (Bestatin): clinical research. *Biomed. Pharmacother.* **45**:55–60.
55. **Scornik OA, Botbol V.** 2001. Bestatin as an experimental tool in mammals. *Curr. Drug Metab.* **2**:67–85.

FIGURES

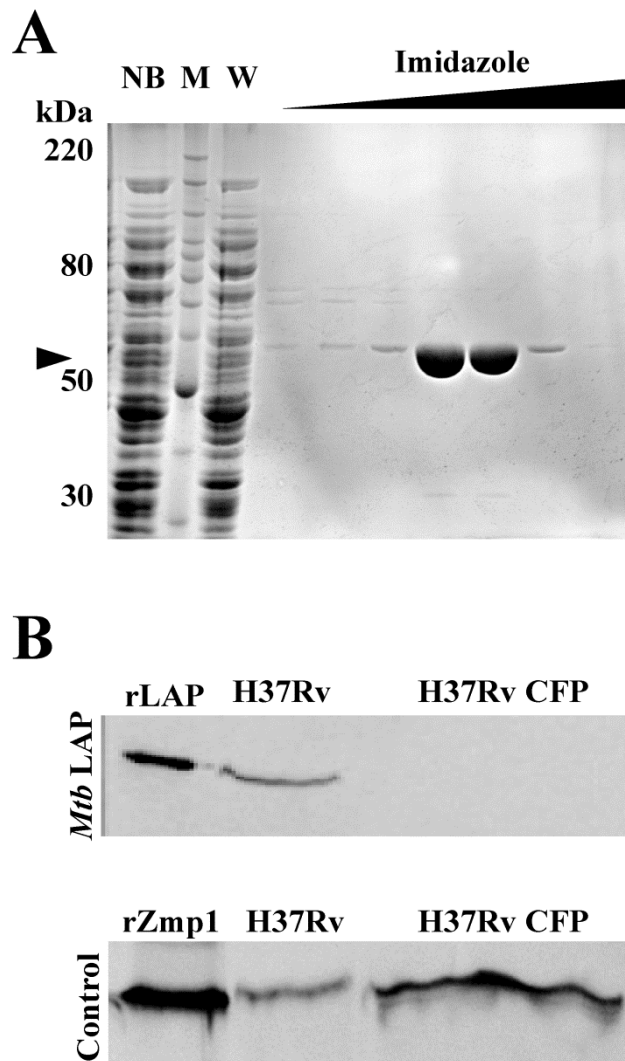


Figure 1. Purification and subcellular localization of *Mtb* LAP. A, Purification of recombinant LAP (rLAP). IPTG-induced rLAP was purified by nickel affinity chromatography, resin unbound fraction (NB), molecular mass marker (M), wash (W) and elution with increasing imidazole concentration (Imidazole) were analyzed by 12% reducing SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue. Arrowheads indicate rLAP position at 55 kDa. B, Localization of LAP by immunoblot analysis (up) and control of non-specific lysis (down). Lanes: recombinant proteins (rLAP) and (rZmp-1), H37Rv total cell lysate (H37Rv) and H37Rv culture filtrate proteins (H37Rv CFP) were probed with rLAP (up) or rZmp1 (down) polyclonal mouse antiserum.

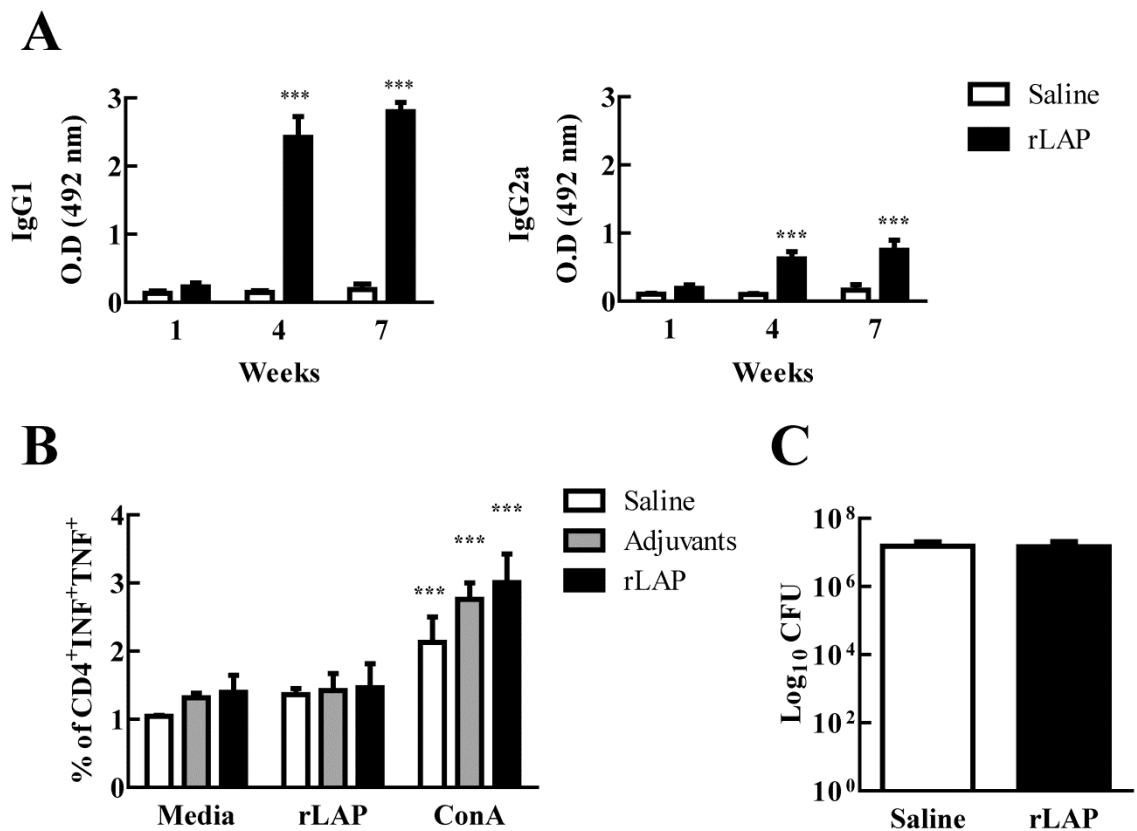


Figure 2. *Mtb* LAP immunogenic characterization. A, Lap induces a specific humoral response. Mice were immunized three times with the rLAP protein; One week after the each immunization, serum samples were collected from the mice, and the levels of IgG1 (left) and IgG2a (right) antibodies were evaluated. Data shown mean \pm SEM. n=4. ***, p< 0.001; difference to the saline group by 2-way ANOVA with Bonferroni posttests. B, Specific cellular responses to ex vivo stimulation with rLAP. Four weeks after the last immunization splenocytes were stimulated with rLAP, ConA or unstimulated (Media) prior to flow cytometry acquisition. The frequency of T CD4⁺ lymphocytes expressing IFN- γ ⁺ and TNF- α ⁺ are demonstrated. Data shown mean \pm SEM. n=4. ***, p< 0.001; difference to the media unstimulated group by 2-way ANOVA with Bonferroni posttests. C, Bacterial load in the lungs of *Mtb*-challenged mice. Groups of mice vaccinated with saline or rLAP were challenged with *Mtb* 45 days after immunization. Thirty days after infection, their lungs were collected and CFU counted. Data shown mean \pm SEM. n=3.

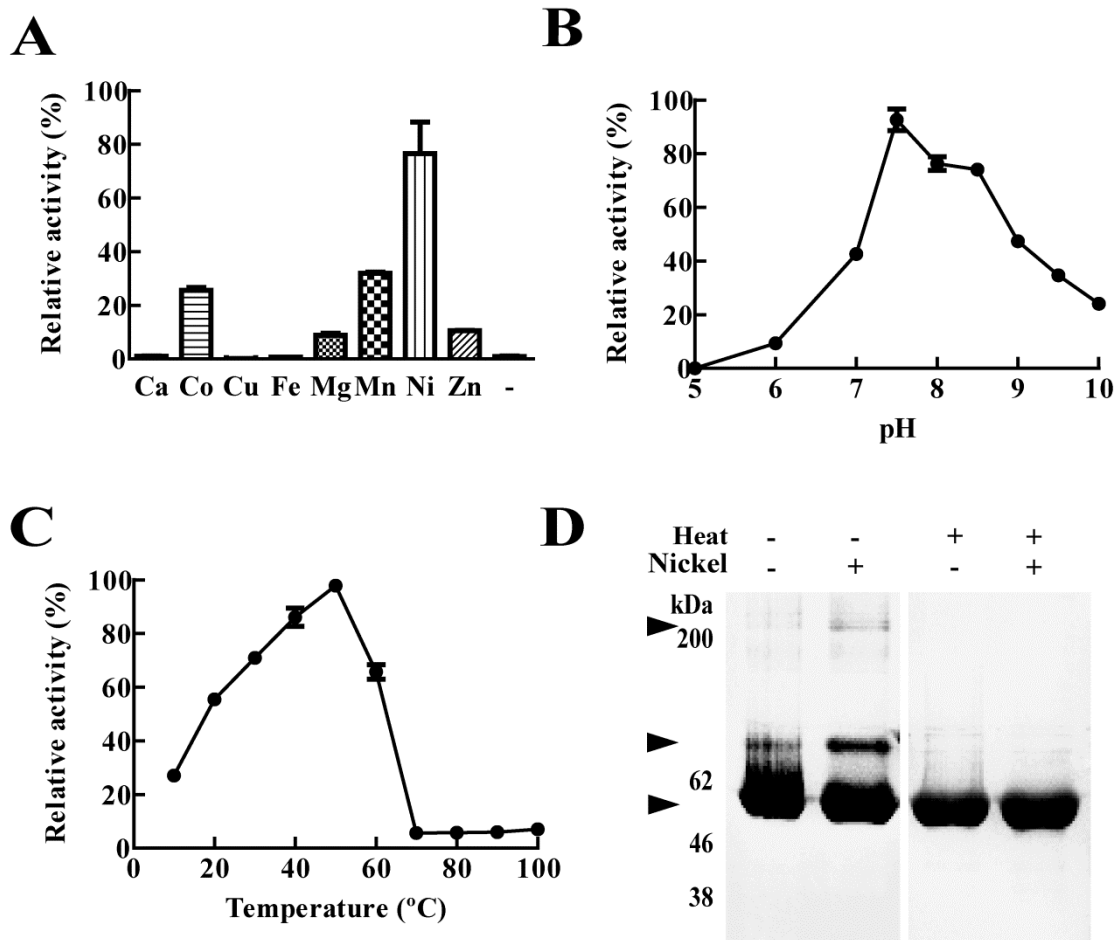


Figure 3. Biochemical characterization of LAP. A, Effect of metal ions on rLAP activity: Activity was assayed in the presence of different metal ions (1.5 mM concentration) and no metal addition (-). B, Effects of pH on rLAP activity: the experiments were performed over the pH range 5–10 in 25 mM AMT with 1.5 mM NiSO₄ and 20 μM substrate. C, Effects of temperature on rLAP activity: the experiments were carried out in 25 mM Tris–HCl buffer pH 7.5 over a temperature range of 10–100°C with 1.5 mM NiSO₄ and 20 μM substrate. Data shown mean ± SEM. n=3. D, Analysis of rLAP oligomeric state: the recombinant enzyme was subjected to 8% SDS-PAGE in the presence of 0.01% SDS, with (+) or without (-) nickel addition and previous boiled (+) or not (+). Arrowheads indicate 100 and over 200 kDa oligomeric and 55 kDa monomeric forms of the enzyme. Data shown mean ± SEM, relative to maximal activity obtained. n=3.

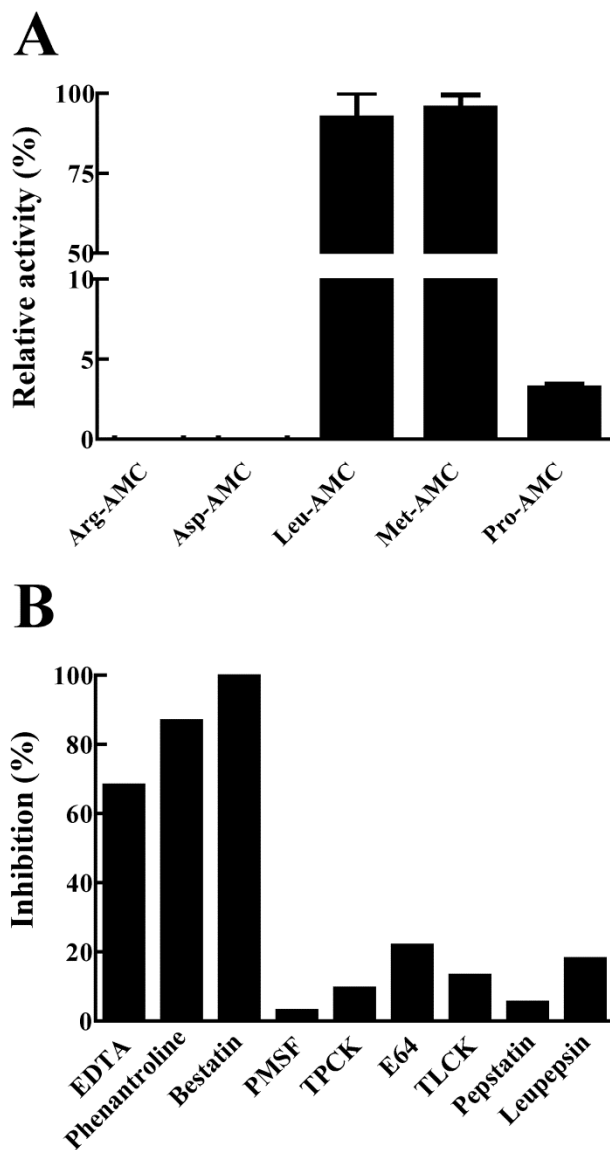


Figure 4. LAP substrate preference and inhibition pattern. A, Activity of rLAP against different amino acids: the experiments were carried out in 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 with 1.5 mM NiSO₄ and 20 μM of each indicate substrate. Data shown mean ± SEM, relative to maximal activity obtained. n=3. B, Effect of different inhibitor in rLAP activity: the experiments were carried out in 25 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 with 1.5 mM NiSO₄, 20 μM of Leu-AMC and different inhibitors. 10 mM EDTA, 10 mM phenantroline, 30 μM bestatin, 5 mM PMSF, 100 μM TPCK, 5 μM E64, 500 μM TLCK, 25 μM pepstatin A and 100 μM leupepsin. Data shown relative activity to the reaction without inhibitors.

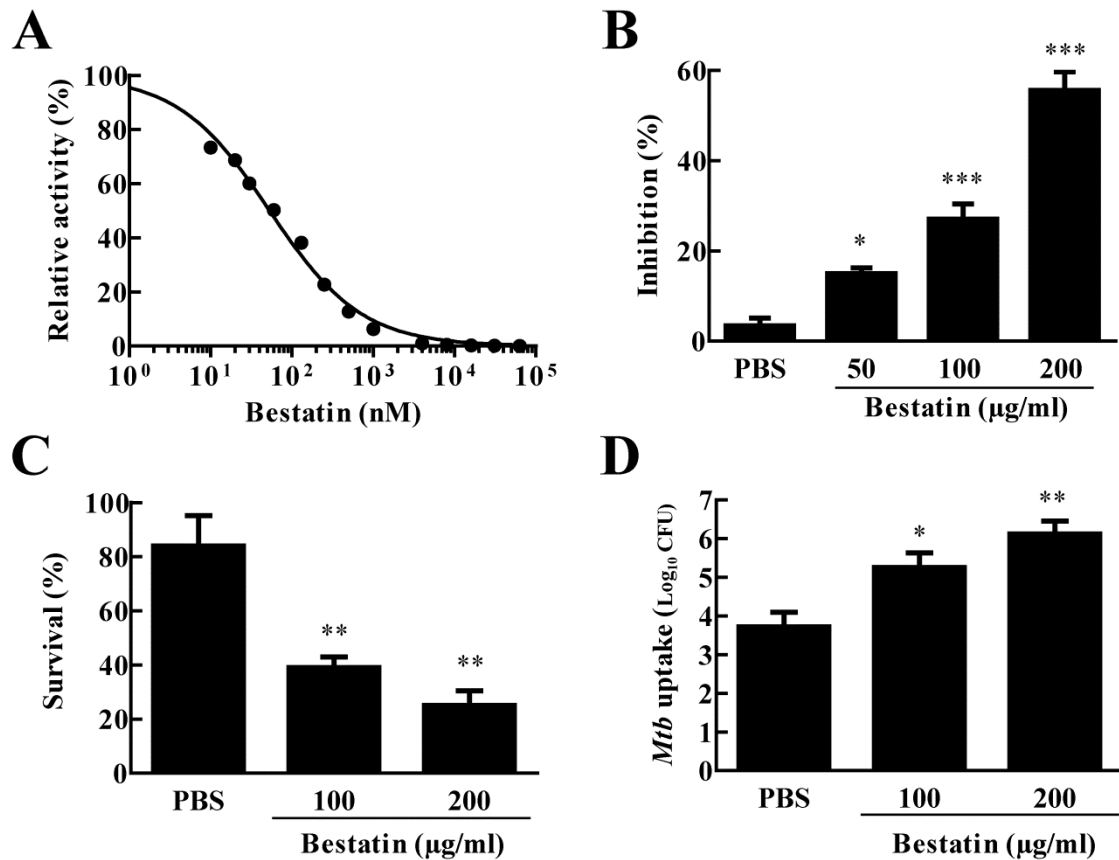


Figure 5. Bestatin inhibits LAP activity, growth of *M. tuberculosis* and macrophage infection. (A) Bestatin inhibits the enzymatic activity of rLAP: the experiments were carried out by pre-incubation of rLAP with different concentrations of bestatin. Curve of inhibition by nonlinear regression log (inhibitor) vs. normalized response with variable slope method. (B) Bestatin inhibits the growth of *Mtb* in vitro: *M. tuberculosis* was incubated with or without (PBS) different concentrations of bestatin at 37 °C, and growth was monitored by measuring OD600 every day after addition of the inhibitor. Inhibition at day seven relative to the non-inhibitor (PBS) maximal growth. (C) *Mtb* survival in macrophages: after macrophage infection bestatin or PBS was added in culture and *Mtb* survival was determined by CFU obtained relative to the PBS group. (D) Macrophage *Mtb* phagocytosis: different concentrations of bestatin or PBS were added with bacteria in macrophage culture and phagocytosis was determined by CFU counting after 3h. Data shown represent mean \pm SEM, n=3. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p< 0.001; difference from PBS group by One-way ANOVA with Dunnett post test.

Capítulo 7

Imunização

Neste capítulo, serão apresentados resultados preliminares referentes à imunogenicidade e proteção conferida pela imunização de camundongos com as proteínas Gcp e Zmp1. A análise constitui a verificação da capacidade destas proteínas gerarem células de memória que induzam a produção de citocinas pro-inflamatórias do tipo Th1. Além disso, para conferirem proteção, as proteínas quando utilizadas como vacina, devem conter a multiplicação do *Mtb*, reduzindo a carga bacteriana no pulmão dos camundongos desafiados. Relembrem que os estudos com a proteína LAP foram apresentados no capítulo anterior e os da proteína DAP estão sendo conduzidos por um de nossos colaboradores.

7.1 - Imunogenicidade das proteínas recombinantes

As duas proteínas se mostraram imunogênicas em camundongos vacinados com a enzima recombinante purificada, o soro desses animais apresentou anticorpos IgG1 e IgG2a, em níveis semelhantes, específicos para cada uma das proteínas (Dados não mostrados). Sendo a proteína reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro, ela poderia ser utilizada como vacina. Vários estudos mostraram que as vacinas que produziram melhores graus de proteção contra o *Mtb* são as que induzem uma resposta imune do tipo Th1, onde principalmente são produzidas as citocinas interferon-gama (INF- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) [1] – [3]. Desta forma analisamos a produção destas duas citocinas por esplenócitos de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes.

Os animais foram imunizados três vezes com intervalos de 21 dias entre as imunizações. As doses eram compostas pela proteína recombinante purificada e os adjuvantes CpG DNA (ODN 1826) e MPL (Monofosforil Lipídeo A). Após 45 dias da última imunização os animais foram sacrificados e o baço coletado para obtenção de células. Os esplenócitos foram estimulados com as proteínas recombinantes para análise da produção INF- γ e TNF- α por linfócitos CD4 e CD8, através da técnica de citometria de fluxo. Como controle negativo as células foram mantidas em meio sem estímulo e como controle positivo foram estimuladas com Concanavalina A (ConA). A proteína Gcp não foi capaz de estimular a produção destas citocinas pro-inflamatórias por células CD4+ ou CD8+, sendo os níveis de células duplo positivas (INF+/TNF+) semelhantes ao das células não estimuladas (Figura 7.1A e B).

Já a proteína Zmp1, induziu de maneira específica a produção de TNF- α e INF- γ . Assim o nível de células CD4+ INF+/TNF+ dobrou, indo de aproximadamente 1.3% nas células não estimuladas para 2.6% nas estimuladas com a proteína Zmp1 (Figura 7.1A). Nas células CD8 obtivemos o mesmo perfil de resposta, sendo que nas células não estimuladas a proporção de duplo positivas era de 7.5%, com estímulo subiu para 16% (Figura 7.1B). Assim a proteína Zmp1 foi capaz de gerar uma resposta imune com células produtoras de INF- γ e TNF- α .

7.2 - Proteção

Para analisar a proteção conferida pela imunização com as proteínas recombinantes, desafiamos os camundongos com *Mtb* via endovenosa 45 dias após a última imunização. 60 dias após o desafio, os camundongos foram eutanasiados e analisamos a carga bacteriana pulmonar. Nos camundongos imunizados com a proteína Gcp não houve diferença significativa da carga bacteriana em relação ao grupo de animais imunizados apenas com salina. Esse dado que mostra a falta de proteção conferida pela imunização com esta proteína vai de acordo com os resultados da imunogenicidade, pois tanto a proteína Gcp não foi capaz de induzir uma resposta celular do tipo Th1. Apesar de a proteína Zmp1 ter sido capaz de induzir uma resposta imune com maior proporção de células produtoras de INF- γ e TNF- α , não houve diferença estatística da carga bacteriana no pulmão dos camundongos imunizados com a proteína recombinante com o grupo imunizado com salina (Figura 7.1C).

7.3 - Considerações

Os dados parecem indicar que as proteínas não seriam boas candidatas como vacinas de subunidade. Porém, uma análise mais detalhada deve ser feita, antes de descartá-las. Por exemplo, nenhuma morte foi causada pela infecção do *Mtb* no grupo vacinado com a proteína Zmp1, enquanto no grupo imunizado apenas com salina ou a proteína Gcp observamos mortes. Além disso, uma análise histopatológica do pulmão dos camundongos imunizados com as proteínas poderia ser comparada com os não imunizados com o intuito de observar uma possível redução das lesões pulmonares, causada pelo *Mtb*, conferida pela imunização. E claro, comparar os parâmetros gerados pela imunização com as proteases com os da vacina BCG. Porém apresentamos dados preliminares com um pequeno número de animais testados, assim pretendemos aumentar o número de animais para dados mais consistentes e para melhorar a taxa de proteção, testar diferentes formulações da proteína com adjuvantes diferentes e até mesmo combinação de proteínas em uma mesma imunização.

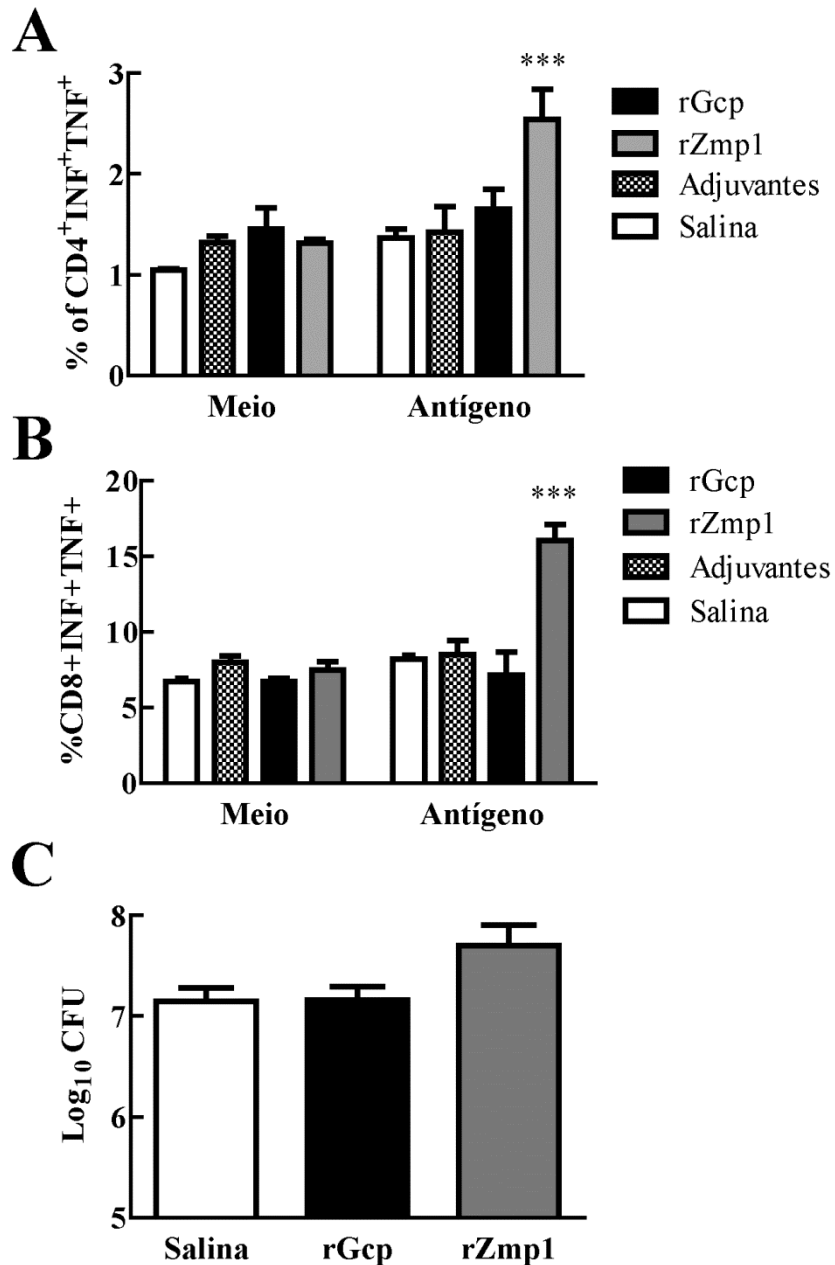


Figura 7.1 Imunogenicidade e proteção conferida pela imunização com as proteínas Gcp e Zmp1 recombinantes. Porcentagem de células CD4 (A) e CD8 (B) produtoras de INF- γ e TNF- α . Células obtidas dos camundongos imunizados com as proteínas rGcp e rZmp1 foram estimuladas com 10 μ g/ml de proteína recombinante (Antígeno) e as células dos grupos de animais imunizados com Adjuvantes e Salina foram estimuladas com 10 μ g/ml de cada proteína recombinante. *** $p < 0.001$ pelo teste ANOVA e pos-teste Bonferroni, demonstrando a diferença dos grupos para o grupo Salina. N=3. C, Carga bacteriana no pulmão dos camundongos imunizados com Salina, rGcp e Zmp1.

7.4 - Materiais e métodos

7.4.1 - Imunização

Vinte e oito camundongos BALB/c foram distribuídos em quatro grupos de sete camundongos: Salina, Adjuvantes, rGcp e rZmp1. Os camundongos receberam três imunizações com intervalo de 21 dias entre elas. O primeiro grupo foi imunizado com salina, no segundo grupo cada animal foi imunizado com 20 µg de adjuvante LIPID-A e 20 µg de GpG DNA (Sigma®). Os grupo rGcp e r Zmp1 foram imunizados com 20 µg de cada adjuvante mais 20 µg da proteína recombinante purificada correspondente.

7.4.2 - Obtenção do soro para realização de ELISA

O sangue dos camundongos imunizados que receberam as imunizações, foi coletado 15 dias após a última imunização para obtenção do soro. O sangue coletado foi incubado por uma hora a 37°C, centrifugado a 1.200 g a 4°C por 15 minutos para separação do soro, e posteriormente estocado a -20°C.

7.4.3 - ELISA

Para determinação dos níveis séricos de anticorpos contra as proteínas recombinantes da classe IgG1 e IgG2a, foi realizado um ELISA. Placas de poliestireno (Nunc®) de 96 poços foram inicialmente sensibilizadas com 10 µg/mL de proteína recombinante purificada, diluída em 0,05 M de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,05 M (pH 9.6) e incubadas a 4°C por 16 horas. Posteriormente, a placa foi lavada e incubada por uma hora a 37°C com tampão carbonato de sódio (PBS) contendo 1% de gelatina. A partir dessa etapa seguiu-se a adição dos soros, com posterior incubação de 1 hora a 37°C. Os anticorpos conjugados à biotina (anti-IgG1 e anti-mouse IgG2a; Pharmingen®), diluídos a 1:5000, foram adicionados e as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Foi adicionada a estreptoavidina peroxidase, diluída a 1:1000 e as placas foram novamente incubadas por 1 hora a 37°C. A reação foi então revelada com o

substrato ortofenilenodiamina (OPD) e bloqueada adicionando-se ácido sulfúrico a 4N. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 492 nm em leitor de ELISA (Multiskan Thermo Labsystems®). Entre cada uma das etapas, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS tween 20 a 0.05%.

7.4.4 - Obtenção das células do baço

Para obtenção das células, o baço de três camundongos de cada grupo foi coletado após 45 dias da última imunização, passado em filtro de 70 µm para células (BD Biosciences®, Lincoln Park, NJ) e posteriormente, as mesmas foram ressuspensas em meio Roswell Park Memorial Institute medium GIBCO™ (RPMI medium GIBCO™). Os eritrócitos foram lisados com solução de lise (0.15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃), depois as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI completo (cRPMI) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 0.15% de bicarbonato de sódio, 1% de L-glutamina (200 mM Sigma®) e 1% de aminoácidos não essenciais 100X (Sigma®). Posteriormente, as células foram contadas utilizando a câmara de Neubauer e ajustadas para concentração de 1x10⁶ células/mL. [4]

7.4.5 - Avaliação da produção celular de citocinas

Para determinar a produção de citocinas pelas células do baço, foram distribuídos 200 µL de suspensão celular destes órgãos em placa de cultura celular de 96 orifícios (Cell Wells™). As células foram cultivadas sem estímulo (meio), ou estimuladas com 10 µg/ml de proteína recombinante (antígeno) em estufa de CO₂ a 5% a 37°C por 1 hora. Como controle positivo as células foram estimuladas com 10 µg/ml de Concanavalina A (Sigma). Após este período, foi acrescentado um inibidor de transporte de proteínas, a monensina na concentração de 3 µM (eBioscience®), e então, as culturas foram submetidas à nova incubação por 4 horas. Logo, as células foram marcadas com anticorpos anti: PercP-CD4 (BD PharMingen®); PE-CD8 (eBioscience®); FITC-TNF-α (eBioscience®); APC-IFN-γ (eBioscience®) por 30 minutos, lavadas com PBS contendo 0.1% de ácida sódica, fixada e permeabilizada com

Perm Fix/ Perm Wash (BD PharMingen®). Todas as análises foram realizadas com aquisição de 50000 eventos no citômetro de fluxo BD Biosciences FACSCalibur ou BD FACSVerse e os dados foram analisados com o software FlowJo 10. Os linfócitos foram selecionados baseado nas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC).

7.4.6 - Infecção intravenosa com *Mtb*

Sessenta dias após a última imunização os animais foram desafiados com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv por via endovenosa. A cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv fornecida pelo Laboratório Central de Goiás (LACEN-GO) foi cultivada em meio 7H9 suplementado com OADC, contendo tween 80 a 0.05% até a fase log de crescimento, e em seguida foram alíquotadas e mantidas no freezer -80°C. O estoque foi plaqueado e quantificado um mês após o congelamento. Diluições centesimais do estoque foram plaqueadas em meio 7H11 suplementado com OADC e as unidades formadoras de colônias foram contadas. No dia da infecção, o inóculo foi diluído em PBS tween 80 a 0.05% na concentração de 10^8 CFU/mL, então foi administrado 100 µL deste pela via intravenosa (via plexo retro-orbital), sendo inoculado, portanto 10^7 CFU/animal. Um dia após a infecção foi eutanasiado um camundongo por grupo para análise da carga bacteriana pulmonar. Com 60 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados para análise da eficácia protetora das vacinas. [4]

7.4.7 - Determinação da carga bacilar no pulmão

Para avaliar a eficácia protetora das vacinas, após 60 dias de infecção, camundongos desafiados com *Mtb* foram eutanasiados, para coleta dos lobos pulmonares, os quais foram homogeneizados e plaqueados em meio Middlebrook 7H11 suplementado com OADC para determinação da carga bacilar a partir da contagem de CFU, após 21 dias de incubação a 37°C.

7.4.8 - Análise Estatística

Os resultados obtidos foram tabulados usando o Software Prism (versão 5.0, GraphPad). A comparação entre os grupos foi dada pela análise de variância (ANOVA). Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Referências Bibliográficas

1. **Ottenhoff THM, Kaufmann SHE.** 2012. Vaccines against Tuberculosis: Where Are We and Where Do We Need to Go? PLoS Pathog **8**:e1002607.
2. **Kamijo R, Le J, Shapiro D, Havell EA, Huang S, Aguet M, Bosland M, Vilcek J.** 1993. Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with Bacillus Calmette-Guérin and subsequent challenge with lipopolysaccharide. J Exp Med **178**:1435–1440.
3. **Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, Siegel JN, Braun MM.** 2001. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. N. Engl. J. Med. **345**:1098–1104.
4. **Junqueira-Kipnis AP, de Oliveira FM, Trentini MM, Tiwari S, Chen B, Resende DP, Silva BDS, Chen M, Tesfa L, Jacobs WR Jr, Kipnis A.** 2013. Prime–Boost with *Mycobacterium smegmatis* Recombinant Vaccine Improves Protection in Mice Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS ONE **8**:e78639.

PARTE III

CONCLUSÃO

Capítulo 8

Considerações finais

Neste trabalho foi realizada a clonagem e expressão de quatro metaloproteases de *M. tuberculosis*. Porém apenas duas destas, as enzimas LAP e Zmp1, foram expressas ativas e então selecionadas para realizar testes de caracterização bioquímicos e funcionais. Estas proteínas, juntamente com enzimas expressas em corpos de inclusão foram utilizadas para análises de imunogenicidade e proteção. Neste capítulo serão compilados os principais resultados e perspectivas a respeito de estudos futuros nesta linha de pesquisa.

8.1 - Conclusões

Os genes Rv3419c, Rv0198c, Rv2213 e Rv0800 foram clonados a partir do DNA genômico de *Mtb* e as proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli*. As proteínas LAP e Zmp1 foram purificadas com atividade, enquanto as proteínas DAP e Gcp foram purificadas a partir de corpos de inclusão, sem apresentar atividade. Identificamos no lixado celular da cepa H37Rv as proteínas LAP, DAP e Zmp1 e no sobrenadante de cultura apenas a enzima Zmp1 pode ser detectada, sendo ela secretada pelo *Mtb*. Já a proteína Gcp não pode ser identificada em nenhuma das frações testadas, colocando em questão se o *Mtb* realmente produz a proteína codificada por este gene.

Realizamos a caracterização bioquímica da proteína LAP, como uma aminopeptidase com atividade ótima em pH levemente alcalino, temperatura em torno de 50 °C e dependente de íons metálicos, sendo o níquel o principal ativador. A enzima mostrou um amplo espectro de possíveis substratos, sendo difícil determinar qual seria um possível substrato *in vivo*. A LAP de *Mtb* foi inibida por inibidores clássicos de metalo-proteases como EDTA e fenantrolina, além disso, se mostrou fortemente sensível ao inibidor bestatina. Nos testes realizados, a bestatina também foi capaz de inibir, de maneira dose dependente, o crescimento do *Mtb* em cultura e diminuir a carga bacilar em macrófagos murinos infectados. Sendo assim a proteína LAP um promissor alvo para desenvolvimento de drogas anti-TB, como por exemplo, a própria bestatina ou compostos análogos.

A proteína Zmp1 teve sua caracterização bioquímica publicada por outro grupo de pesquisa, assim decidimos não repetir estes experimentos. Aqui identificamos o peptídeo vasoativo endotelina como um possível substrato fisiológico para a proteína Zmp1. Ademais, demonstramos que a via de sinalização pelos receptores para endotelina podem desempenhar um importante papel na patogênia e progressão da tuberculose. Estes resultados ajudam a melhor compreender os aspectos da interação patógeno-hospedeiro para desenvolvimento de terapias mais eficazes. Assim, tratamentos que possam manipular a resposta imune do hospedeiro com intuito de aumentar o combate ao patógeno em questão, podem contribuir e facilitar o tratamento da tuberculose.

A utilização das enzimas como vacina de subunidade não demonstraram resultados promissores nos ensaios preliminares. Apesar de imunogênicas, gerando uma boa resposta humoral e até mesmo celular, como a proteína Zmp1, nenhuma das enzimas

testadas conferiu proteção diminuindo a carga bacilar no pulmão dos camundongos imunizados. Porém é necessária uma análise, mais detalhada para descartar o uso destas proteínas em uma possível nova vacina contra a tuberculose.

Apesar de entraves técnicos que impossibilitaram seguir adiante em alguns dos pontos almejados, em vista dos objetivos propostos, concluímos este trabalho com grande êxito nos resultados alcançados.

8.2 - Perspectivas

Para as enzimas que não conseguimos obter na forma ativa, Gcp e DAP, o intuito é tentar produzi-las em outros sistemas heterólogos, como por exemplo, micobactérias de crescimento rápido como o *M. smegmatis* e assim pela proximidade filogenética e fisiológica com o *Mtb* facilitar a obtenção destas enzimas com conformação correta e possivelmente ativas. Já para a enzima Gcp, que não conseguimos identificar a produção pelo *Mtb in vitro*, outras abordagens como PCR em tempo real do gene durante a infecção podem ajudar a verificar se a bactéria produz esta proteína em outras condições não testadas. Para as enzimas Zmp1e LAP a busca por inibidores específicos podem ajudar a entender melhor o seu papel durante a infecção e reafirmar seu potencial como alvo para drogas contra a tuberculose.

Já os estudos utilizando as proteínas como vacinas de subunidade precisam ser aprofundados, principalmente com novas abordagens, tentando associar mais de uma das enzimas durante a imunização e até mesmo associando as proteínas deste estudo com proteínas já descritas na literatura, podendo gerar uma resposta de memória que cominada com a de outras proteínas seria protetora. O uso de diferentes e novos adjuvantes também é uma estratégia a ser considerada, já que estes compostos podem modular a resposta imune a determinado antígeno. Neste sentido, podemos utilizar adjuvantes que propiciariam uma melhor resposta imune contra a tuberculose. Outra possível abordagem seria utilizar vacinas vivas, como um BCG recombinante que superexpresse algumas dessas enzimas ou até mesmo um *Mtb* mutante para as enzimas estudadas que seria atenuado e melhor estimulasse a resposta imune.

Para o estudo funcional das enzimas do *Mtb* e mesmo para desenvolvimento de novas vacinas vivas como as citadas acima, é de extrema importância a utilização de ferramentas de biologia molecular para nocaute, inserção e recombinação de genes.

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos para elaboração de técnicas genéticas em várias espécies de bactérias como *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Dentre essas técnicas o uso de AES (*allelic exchange substrates*) para substituição e deleção de regiões do DNA bacteriano é bastante utilizada para o estudo da função de diversos genes. Os AESs contêm regiões homólogas as que flanqueiam o gene alvo com uma marca de seleção. A recombinação homóloga facilita a substituição do gene alvo pela marca de seleção, resultando em uma cepa mutante. Uma variedade de estratégias vem sendo usada para esse tipo de manipulação genética em muitas espécies de bactérias, entretanto está não é uma tarefa fácil na maioria das micobactérias. Em algumas espécies de micobactérias de crescimento rápido com o *M. smegmatis*, o uso das técnicas tradicionais de mutagênese tem resultados satisfatórios. Porém no *Mtb* vários estudos mostram que pode haver muita dificuldade no uso de técnicas simples como a substituição gênica.

O controle da TB enfrenta uma variedade de obstáculos como a ineficácia da vacina BCG e a aquisição de multirresistência das bactérias aos antibióticos. Com isso, surge a necessidade da descoberta e desenvolvimento de novas vacinas e alvos para fármacos com a finalidade de inibir a progressão da doença e tornar-se uma alternativa nos casos de resistência ao tratamento. Devido à dificuldade na manipulação genéticas em micobactérias, a principal perspectiva é a de estabelecer uma plataforma com ferramentas de biologia molecular para desenvolvimento de novas vacinas e elucidção de novos potenciais alvos de drogas para a quimioterapia da tuberculose. Sendo as proteases importantes proteínas em diversos microrganismos patogênicos utilizaremos as ferramentas de biologia molecular para nocautear/inserir genes em micobactérias visando a entender a importância destes genes na virulência e patogenia da tuberculose.

