

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LAISA QUADROS BARSÉ

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE-PEROXIDASE (KatG) DE  
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* FRENTE AO COMPOSTO IQG-607

Porto Alegre  
2020

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

LAÍSA QUADROS BARSÉ

**Caracterização da atividade da enzima catalase-peroxidase (KatG) de  
*Mycobacterium tuberculosis* frente ao composto IQG-607**

Porto Alegre

2020

LAÍSA QUADROS BARSÉ

**Caracterização da atividade da enzima catalase-peroxidase (KatG) de  
*Mycobacterium tuberculosis* frente ao composto IQG-607**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Valim Bizarro

Porto Alegre

2020

## **Ficha Catalográfica**

B282c Barsé, Laísa Quadros

Caracterização da atividade da enzima catalase-peroxidase  
(KatG) de *Mycobacterium tuberculosis* frente ao composto IQG-607 /  
Laísa Quadros Barsé . – 2020.

63.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Valim Bizarro.

1. Isoniazida. 2. IQG-607. 3. KatG. 4. *Mycobacterium tuberculosis*. I.  
Bizarro, Cristiano Valim. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

LAÍSA QUADROS BARSÉ

**Caracterização da atividade da enzima catalase-peroxidase (KatG) de  
*Mycobacterium tuberculosis* frente ao composto IQG-607**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Biologia Celular e Molecular.

Aprovada em: 17 de janeiro de 2020.

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes

---

Profa. Dra. Maria Martha Campos

---

Profa. Dra. Rosane Souza da Silva

Porto Alegre  
2020

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, especialmente à minha mãe, por todo o apoio ao longo de todos os anos da minha graduação e pós-graduação. Sem ela, não seria possível chegar aonde eu cheguei. Obrigada.

Ao meu orientador Cristiano Valim Bizarro por ter me aceitado como orientanda. Sou muito grata por todos os ensinamentos passados e principalmente por acreditar em mim nesses anos.

Aos colegas do CPBMF e a Quatro G. Vocês ajudaram a tornar mais leve essa etapa. Esse apoio foi essencial em todo meu crescimento profissional.

Aos meus amigos que aguentaram todos os meus momentos difíceis e por viverem comigo essa jornada. A parceria e a paciência de vocês foram indescritíveis.

Ao meu companheiro Vitor, por me dar suporte e estar do meu lado sempre, nunca duvidando de mim. Te amo.

À CAPES e ao BNDES pelo apoio financeiro.

*“It is far harder to kill a phantom than a reality.”*

Virginia Woolf em The Death of the Moth and Other Essays

## RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) e é responsável por milhões de mortes. Além disso, novas cepas de *Mtb* resistentes aos medicamentos para TB estão surgindo e se espalhando. Em particular, o principal fármaco de primeira linha para a TB, a isoniazida (INH), precisa ser ativada dentro das células micobacterianas pela enzima catalase-peroxidase KatG para exercer sua atividade antimicrobiana, e as mutações no gene *katG* são uma das principais causas de resistência a INH. O IQG-607 é um composto metálico análogo da INH que foi desenvolvido para inibir o mesmo alvo de INH, a enzima do sistema FAS-II enoil-ACP-redutase (InhA), sem a necessidade de ativação pela KatG. No entanto, foi mostrado recentemente que, dentro das células micobacterianas, a atividade do IQG-607 também depende da KatG. Portanto, assim como a INH, esse composto também pode se comportar como um pró-fármaco, necessitando de ativação pela KatG para poder inibir a InhA. Para testar essa hipótese, foi avaliada a capacidade de uma KatG recombinante de *Mtb* (MtKatG) em utilizar o IQG-607 como substrato em reações de oxidação e na formação de adutos com NAD<sup>+</sup>. A MtKatG recombinante foi produzida em *E. coli* e, posteriormente, purificada em um protocolo de três etapas para obter uma proteína homogênea. Um método baseado em HPLC foi otimizado para monitorar os produtos de oxidação e formação de adutos, e nosso sistema de ensaio foi validado por meio de reações controle usando INH como substrato. Foi observado que o composto IQG-607 não é um substrato para a MtKatG recombinante em todas as condições testadas. Com base nesses resultados, sugere-se que o composto IQG-607 possa se comportar como um pré-profármaco, liberando a porção INH dentro das células micobacterianas, que, por sua vez, atuaria como um pró-fármaco, requerendo a ativação da KatG para formar o aduto ativo INH-NAD.

**Palavras-chave:** Isoniazida. IQG-607. KatG. *Mycobacterium tuberculosis*.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused mainly by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) and is responsible for millions of deaths. Moreover, new *Mtb* strains resistant to TB drugs are emerging and spreading. In particular, the main first-line TB drug, isoniazid (INH), must be activated inside mycobacterial cells by the catalase-peroxidase enzyme KatG to exert its antimicrobial activity, and mutations on the *katG* gene are a major cause of INH resistance in clinics. The metal-containing compound IQG-607 is an INH analogue that was developed to inhibit the same target of INH, the FASII enzyme enoyl-ACP-reductase (InhA), without requiring activation by the KatG. However, we showed recently that inside mycobacterial cells the activity of IQG-607 is also dependent on KatG. Hence, this compound might also be activated by KatG, requiring its activation to inhibit InhA. Therefore, we evaluated the ability of recombinant MtKatG to use IQG-607 as a substrate in oxidation reactions and for adduct formation with NAD<sup>+</sup>. A recombinant MtKatG was produced in *E. coli* and purified in a 3-step protocol to obtain a homogenous protein. An HPLC method was optimized to monitor both oxidation and adduct products, and our assay system was validated by performing control reactions using INH as a substrate. We found that the metal-based compound IQG-607 is not a substrate for recombinant MtKatG under all tested conditions. Based on our results, we suggest that IQG-607 might behave as a pre-prodrug, releasing the INH moiety inside mycobacterial cells, which then requires KatG activation to form the active INH-NAD adduct.

**Keywords:** Isoniazid. IQG-607. KatG. *Mycobacterium tuberculosis*.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Índices de incidência estimados para tuberculose em 2018 .....	9
Figura 2 – Fórmula estrutural da INH .....	12
Figura 3 – Mecanismo de ação proposto para a INH .....	13
Figura 4 – Sistema FAS-II .....	14
Figura 5 – Estrutura da enzima catalase-peroxidase KatG .....	15
Figura 6 – Esquema proposto para a ativação da INH pela KatG .....	17
Figura 7 – Fórmula estrutural do IQG-607 .....	19
Figura 8 – Mecanismo proposto para a formação do complexo de inibição da InhA por via não enzimática .....	20

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
1.1	Tuberculose .....	9
1.2	Isoniazida (INH).....	11
1.2.1	Mecanismo de ação da INH.....	12
1.3	A enzima KatG .....	15
1.3.1	Mutações da KatG associadas à resistência a INH.....	16
1.4	O composto IQG-607 .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>23</b>
2.1	Geral .....	23
2.2	Específicos.....	23
<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>

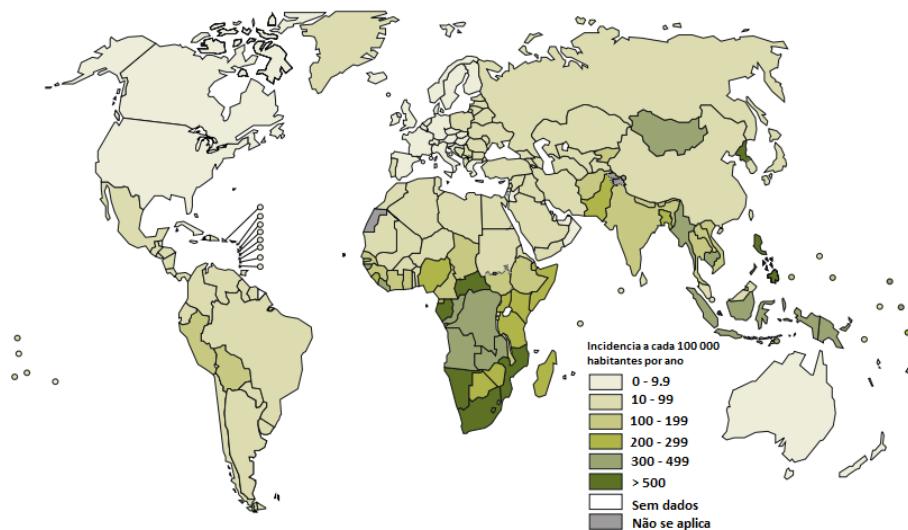
## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa bastante conhecida, causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), uma bactéria patogênica aeróbia que infecta os pulmões (RILEY et al., 1959) descoberta por Robert Koch em 1882 (KOCH, 1882). A TB foi responsável por milhões de mortes quando não existiam tratamentos adequados para os pacientes e ainda é a responsável pelo maior número de mortes causado por um único agente infeccioso (LAWSON et al., 2012; MINION et al., 2013).

Segundo dados recentes da OMS (Global Tuberculosis, 2019), a TB é uma das 10 causas principais de morte no mundo. Só em 2018, 10 milhões de pessoas adoeceram com TB e 1,2 milhões morreram da doença (dessas, 0,2 milhões de pessoas infectadas com HIV). Em pessoas soropositivas, a TB é a principal causa de morte: 55% das mortes em portadores do vírus HIV foram causadas pela TB. A Figura 1 ilustra os índices de incidência da doença em diferentes países no ano de 2018.

Figura 1 – Índices de incidência estimados para tuberculose em 2018



Fonte: Adaptado de Global Tuberculosis (2018).

Nota: O Brasil se encontra na faixa de 10 – 99 casos a cada 100 000 habitantes por ano.

Atualmente, o tratamento padrão da TB consiste em uma fase inicial intensiva, com duração de dois meses, e uma fase contínua por mais quatro meses. Sugere-se que o tratamento para novos pacientes de TB consista em uma fase de dois meses utilizando isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) e o etambutol (EMB), seguido por uma fase de mais quatro meses com INH e RIF (Global Tuberculosis, 2019). Alternativamente, a fase de continuação pode ser estendida para seis meses de INH e EMB. A TB é uma doença curável e boa parte dos pacientes que fazem o uso das medicações de maneira correta consegue obter sucesso com o tratamento. Porém, o surgimento e disseminação de cepas resistentes aos fármacos de primeira linha representam um dos principais desafios da atualidade no tratamento da TB.

Os longos períodos de tratamento, somados aos efeitos adversos dos fármacos de primeira linha, resultam em altas taxas de abandono do tratamento, que contribuem para a seleção e disseminação de cepas resistentes. A resistência aos fármacos na TB está geralmente relacionada à aquisição de mutações cromossômicas pelo bacilo *Mtb*, tais como inserções, deleções ou substituições de nucleotídeos, geralmente ocorrendo em enzimas que são envolvidas na ativação dos medicamentos ou como alvo final de inibição (DRLICA; ZHAO, 2007).

Cepas resistentes à INH e RIF são classificadas como multirresistentes (MDR-TB, do inglês *multidrug-resistant*) (Global Tuberculosis, 2018). Pacientes com MDR-TB necessitam de terapias alternativas que utilizam fármacos de segunda-linha. Como exemplos, estão as fluoroquinolonas orais e fármacos injetáveis, como amicacina, canamicina e capreomicina. No entanto, esses fármacos possuem custo mais elevado, são menos efetivos e apresentam maior toxicidade. Além disso, também é necessário um maior período de tratamento (no mínimo 18 meses).

Em alguns casos, pode ocorrer também o desenvolvimento de cepas extensivamente resistentes a medicamentos (XDR-TB, do inglês *extensively drug resistant*), definidas como cepas MDR-TB que são resistentes às fluoroquinolonas orais e a pelo menos um dos fármacos injetáveis de segunda-linha, dificultando ainda mais o tratamento da TB e tornando mais complicada a erradicação da doença (UNISSA et al., 2016).

Curiosamente, isolados clínicos que possuem resistência à INH são encontrados em uma frequência significativamente aumentada (1 em  $10^6$  bacilos)

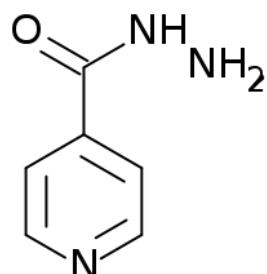
em comparação com cepas resistentes a outros fármacos (NACHEGA; CHAISSON, 2003). A resistência à INH, isoladamente ou em combinação com outros fármacos, é o segundo tipo mais comum de resistência observada entre os pacientes com TB, sendo o primeiro tipo a resistência isoladamente por rifampicina (RR-TB). Por ser o medicamento mais usado na clínica, a resistência à INH representa um dos principais desafios atuais no tratamento da TB (CATTAMANCHI et al., 2009). Revisões sistemáticas e metanálises sujerem que a monorresistência à INH está associada à probabilidade reduzida de resultados terapêuticos bem-sucedidos para pacientes que recebem tratamento padrão e a um maior risco de adquirir resistência adicional aos demais medicamentos usados na terapia combinada (MENZIES et al., 2009).

## **1.2 Isoniazida (INH)**

A INH, sintetizada e descrita pela primeira vez em 1912 numa tese de doutorado (MEYER; MALLY, 1912), teve sua atividade antituberculosa descoberta somente em 1952 (FOX, 1952). Fox combinou quimicamente a nicotinamida, que apresentou atividade anti-TB em cobaias (CHORINE, 1945), e tiossemicarbazonas. Ao substituir o anel benzeno da tibiona pelo anel da nicotinamida, sintetizou compostos meta- e para-piridilaldeídos de tiossemicarbazonas. Desses compostos, um dos intermediários (a INH) apresentou atividade antimicobacteriana muito superior a qualquer composto e demonstrou notável seletividade para micobactérias, inclusive sendo posteriormente testado contra cepas resistentes à estreptomicina, ácido para-amino salicílico (PAS) e amitiozona, apresentando alta eficiência (LONG, 1958).

A INH possui uma estrutura simples, constituída de um grupamento hidrazida e um anel piridínico, sendo esses dois componentes essenciais para sua atividade (Figura 2). A hidrazida do ácido benzóico (seu análogo estrutural) e a hidrazida do ácido nicotínico (um regioisômero da INH) são muito menos efetivos que a INH. A isonicotinamida e o ácido isonicotínico, derivados da INH, são metabolicamente inativos.

Figura 2 – Fórmula estrutural da INH



Fonte: O autor (2019).

A alta atividade bactericida, o baixo custo, a alta biodisponibilidade, a excelente penetração intracelular e o estreito espectro de ação fazem da INH um dos agentes antimicrobianos mais efetivos (WHITNEY; WAINBERG, 2002).

### 1.2.1 Mecanismo de ação da INH

Até hoje, muitos grupos de pesquisa tentam determinar todos os mecanismos farmacológicos e moleculares de ação da INH. De 1953 a 1980, alguns mecanismos de ação foram propostos para a INH: envolvimento na inibição da síntese de ácidos nucléicos (GANGADHARAM, P R J, HAROLD, F, M, SCHAEFER, W, 1963; ITO; YAMAMOTO; KAWANISHI, 1992; MCCLATCHY, 1971), inibição da síntese de proteínas (TSUKAMURA, M., TSUKAMURA, 1963), inibição da síntese lipídica (WINDER, 1982) e inibição da síntese de carboidratos (WINDER; ROONEY, 1970). Dada a simplicidade estrutural da INH, acredita-se que ela pode estar envolvida na inativação de vários processos celulares.

Um avanço no entendimento do mecanismo de ação da INH ocorreu em 1970, quando foi demonstrado que a INH inibe a síntese dos ácidos micólicos, componentes cruciais da parede celular micobacteriana (WINDER; COLLINS, 1970a). Os ácidos micólicos são ácidos graxos ramificados de cadeia extremamente longa, β-insaturados, que contribuem para a impermeabilidade do envelope celular. Eles são confinados essencialmente a micobactérias e, portanto, são considerados alvos seletivos para drogas anti-TB (SLAYDEN; BARRY, 2000).

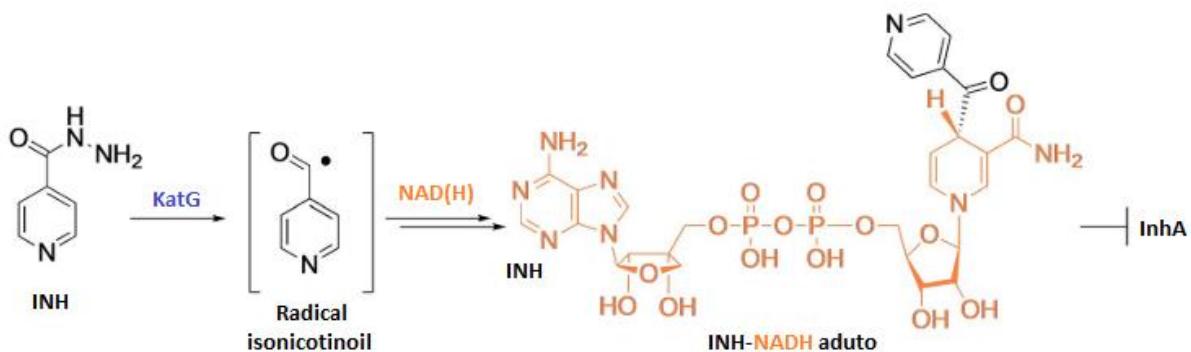
O efeito da INH nos ácidos micólicos foi posteriormente confirmado por outros pesquisadores. Takayama e colaboradores (TAKAYAMA; WANG; DAVID, 1972) foram os primeiros a demonstrar que a inibição da biossíntese de ácidos micólicos

pela INH estava correlacionada com a morte celular, secundário ao acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa dentro do bacilo e a inibição da biossíntese de ácidos graxos monoinsaturados C<sub>24</sub> e C<sub>26</sub>. Essa afirmação foi baseada na perda da resistência álcool-ácido da bactéria, na facilidade de extração de compostos de alto peso molecular em bactérias tratadas com INH e na diminuição da natureza hidrofóbica coincidente à rápida diminuição de ácidos micólicos da fração lipídica da bactéria, que já havia sido demonstrado em estudos anteriores (WINDER; COLLINS, 1970b).

Estudos também demonstram que a INH tem efeito bacteriostático nas primeiras 24 h de tratamento, tornando-se bactericida após esse período (MIDDLEBROOK, 1952a; MITCHISON, D.A., SELKON, 1956; SCHAEFER, 1954). Em 1998, postulou-se que a INH entra na bactéria por difusão passiva através de proteínas porinas existentes na parede celular (BARDOU et al., 1998) e tem efeito apenas contra bactérias ativamente em divisão.

O mecanismo atual mais difundido e estudado, que foi elucidado nos anos 90, é de que a INH atua como um pró-fármaco, ou seja, após a entrada no bacilo, necessita de uma ativação intracelular por uma enzima catalase-peroxidase (KatG) para exercer a sua atividade. Quando ativada, a INH é convertida ao seu radical isonicotinoil com capacidade de ligação com a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). Essa ligação forma o aduto INH-NAD (JOHNSSON; SCHULTZ, 1994), responsável pela inibição da enzima *trans*-2-enoil-ACP reductase dependente de NADH (InhA), envolvida na biossíntese da parede celular micobacteriana (Figura 3).

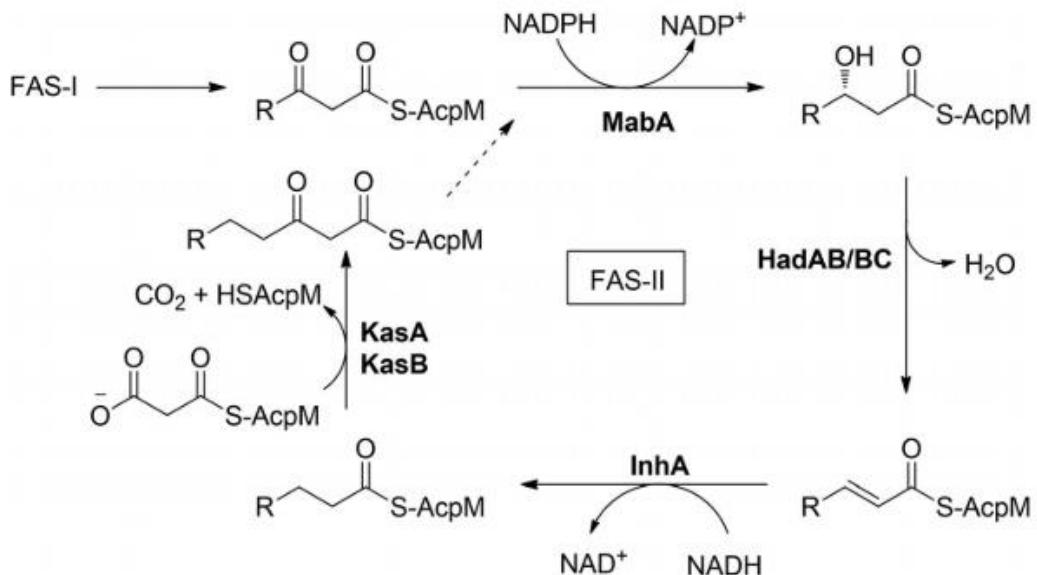
Figura 3 – Mecanismo de ação proposto para a INH



Fonte: Adaptado de Laborde, Deraeve e Bernardes-Génisson (2017).

A InhA (EC 1.3.1.9) é uma enzima essencial do sistema de síntese de ácidos graxos II (FAS-II, do inglês *fatty acid synthesis*), responsável por estender os ácidos graxos C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> do FAS-I até o C<sub>56</sub>, gerando os precursores dos ácidos micólicos, que são os principais lipídios do envelope micobacteriano (MIDDLEBROOK, 1952b; SCHAEFER, 1954). No FAS-II, InhA catalisa a redução da ligação dupla trans conjugada ao grupo carbonila de substratos graxos, utilizando NADH como doador de um íon hidreto, gerando NAD<sup>+</sup> (Figura 4). A inibição de InhA pela formação do aduto IN-NAD bloqueia o alongamento de ácidos graxos, gerando acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa, levando à morte celular (WINDER, 1982).

Figura 4 – Sistema FAS-II



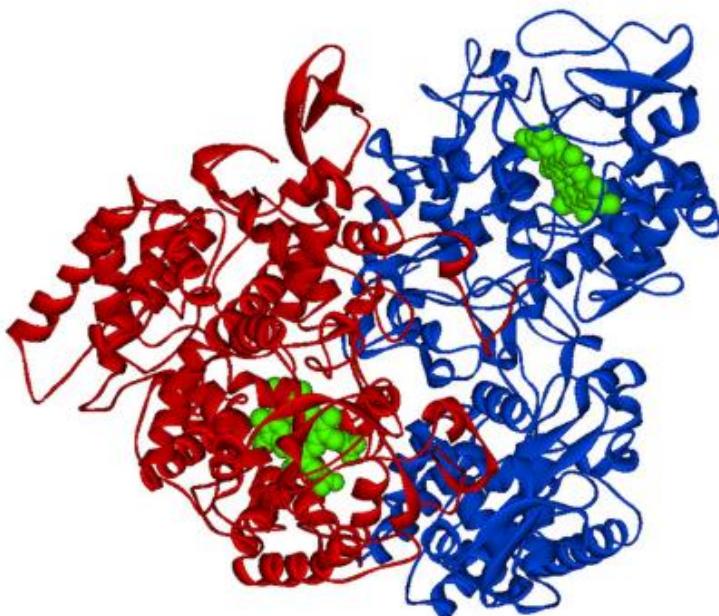
Fonte: Adaptado de Laborde, Deraeve e Bernardes-Génisson (2017).

Há algum tempo, já é reconhecido pelos pesquisadores que a resistência do *Mtb* ao INH está correlacionada com a perda das atividades de catalase e peroxidase (CP) da KatG (MIDDLEBROOK, 1952b, 1954). Algumas observações iniciais sobre a correlação da perda da atividade de CP e aquisição de resistência a INH foram reportadas (MIDDLEBROOK, 1954; WINDER, 1964, 1960) e confirmadas posteriormente. A enzima foi primeiramente purificada e descrita em 1974 e tanto a atividade de catalase quanto a de peroxidase foram encontradas e reagiram com a INH (DIAZ; WAYNE, 1974).

### 1.3 A enzima KatG

A enzima KatG (EC 1.11.1.21) é codificada pelo gene *katG* e possui 80 kDa (em torno de 744 aminoácidos), sendo conjugada com um grupo prostético heme. Esse grupamento é responsável por unir duas subunidades iguais dessa enzima, tratando-se, então, de uma proteína homodimérica com massa de aproximadamente 160 kDa (Bertrand et al., 2004) (Figura 5).

Figura 5 – Estrutura da enzima catalase-peroxidase KatG




---

Legenda: Estrutura visualizada usando o software Discovery Studio. Subunidade A em vermelho, Subunidade B em azul e o grupamento heme em verde.

Fonte: Adaptado de Unissa et al. (2016)

Sua estrutura e função a colocam na superfamília de peroxidases da classe I. É uma enzima bifuncional que exibe atividade de catalase e peroxidase de amplo espectro comparável com a das peroxidases monofuncionais (NAGY et al., 1997; JOHNSSON et al., 1997) e apresenta um *cross-link* entre os resíduos Trp 107, Tyr 229 e Met 225 (Met-Tyr-Trp). Além disso, estudos de mutagênese sítio-dirigida já demonstraram que esses resíduos unidos são os responsáveis pela atividade de catalase da enzima, mas não pela atividade de peroxidase da KatG (GHILADI; MEDZIHRADSZKY; ORTIZ DE MONTELLANO, 2005). A presença do *cross-link*

Met-Tyr-Trp na estrutura da KatG influencia sua função, que por sua vez afeta seu mecanismo de ação (GHILADI et al., 2005a).

O papel fisiológico da KatG no *Mtb* é a proteção contra o baixo pH formado dentro do ambiente oxidativo fagocitário em macrófagos humanos, onde os radicais liberados de oxigênio ( $O_2$ ) são convertidos em  $H_2O_2$  dentro do fagossoma (LOEWEN; KLOTZ; HASSETT, 2000). As funções da KatG também incluem a desintoxicação de peróxidos endógenos gerados pela respiração bacteriana de substratos não ferrosos, como os ácidos graxos, utilizados pelo *Mtb* (NG et al., 2004). A KatG, além disso, apresenta atividade de peroxinitritase (WENGENACK et al., 1999) que poderia estar envolvida na resistência aos intermediários reativos de nitrogênio (IRN), isto é, peroxinitrito (ONOO), produzido pela interação do ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e óxido nítrico (NO) (NG et al., 2004).

Na sua atividade de catalase, a KatG converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e a partir dessa reação, também é capaz de promover a oxidação de vários substratos reativos através de dois passos consecutivos de oxidação. A KatG oxidada duas vezes forma o intermediário conhecido como Composto I (Figura 6, a rota verde) e quando oxidada apenas uma vez forma o Composto II (Figura 6, a rota azul). Esses dois compostos são conhecidos em rotas tradicionais de peroxidases e o composto I também compartilha o ciclo de catalase.

Um terceiro composto (Composto III) (Figura 6, a rota vermelha) também é proposto a partir da espécie heme como um intermediário crítico no KatG ligado à ativação da INH e suscetibilidade a fármacos. Um intermediário oxi-ferroso pode ser formado *in vivo* sobre a ligação do superóxido ao sítio ativo do grupamento heme quando a KatG está em um estado de “repouso”, através da adição de dioxigênio para a forma ferrosa da enzima, ou por adição de um grande excesso de peróxido de hidrogênio ao centro do grupamento heme férrico.

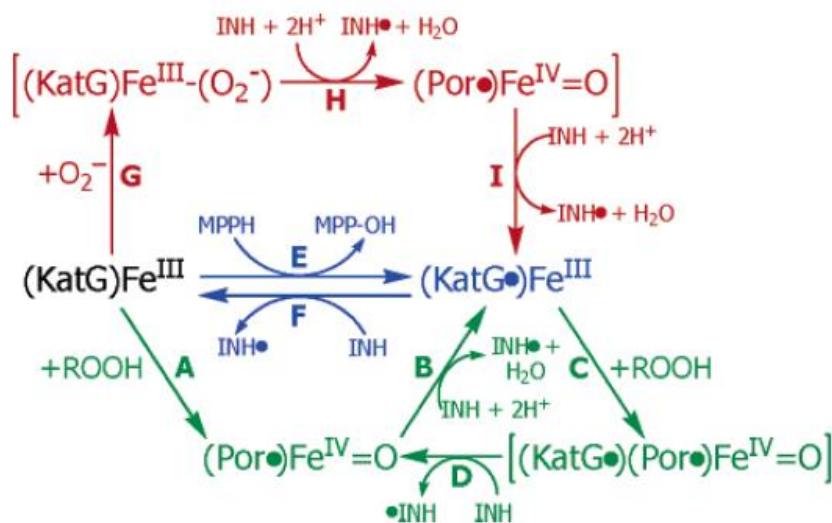
A ação da KatG, além de combater espécies reativas de oxigênio como forma de proteção intracelular, é de ativar o pró-fármaco INH.

### **1.3.1 Mutações da KatG associadas à resistência a INH**

O *Mtb* é bastante sensível à INH com uma concentração inibitória mínima (MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*) de  $0,05 \mu\text{M mL}^{-1}$ , diferentemente do *M. smegmatis* que possui um MIC 100 vezes maior (BARDOU et al., 1998). Essa

especificidade pode ser explicada pelo fato de que a KatG em *M. smegmatis* não é idêntica à do *Mtb* e isso demonstra que a ativação da INH pela KatG é um passo crucial para a atividade antimicrobiana.

Figura 6 – Esquema proposto para a ativação da INH pela KatG



Fonte: Extraído de Ghiladi et al. (2005).

Algumas mutações associadas à resistência à INH são encontradas no gene que codifica a KatG com uma frequência mais comum, como a troca de uma Serina por uma Treonina na posição 315 (S315T) (AGC para ACC). Essa mutação é encontrada em mais de 50% das populações resistentes de *Mtb* (CADE *et al.*, 2010; GHILADI *et al.*, 2005; GHILADI; CABELLI; ORTIZ DE MONTELLANO, 2004; SINGH *et al.*, 2018).

Alguns estudos *in vitro* foram realizados para entender o mecanismo de resistência à INH dependente de KatG usando a proteína mutante S315T como modelo. Wengenack e colaboradores descreveram a mutante S315T como uma catalase-peroxidase competente com uma redução relativa de seis vezes na atividade de catalase e duas vezes na atividade de peroxidase. Porém, esse mutante foi muito menos eficiente que a proteína selvagem (WT, do inglês *wild type*) na metabolização da INH (WENGENACK *et al.*, 1997). Estudos biofísicos da mesma equipe sugeriram que a adição de um único grupo metil à serina conferia resistência à INH, através de pequenas alterações no local de ligação da INH (WENGENACK *et al.*, 1997).

al., 1998). Isto é consistente com a observação de que o mutante S315T exibe uma afinidade reduzida pela INH, mas a sua capacidade de oxidar a INH foi equivalente à da enzima WT (WENGENACK et al., 2000). Juntamente com essas observações, foram encontrados MICs elevados de INH para as cepas S315T, sugerindo fortemente que pequenas alterações no local de ligação da INH são responsáveis por esse fenótipo (DEVITO et al., 2003). A capacidade dessa enzima de produzir radicais livres a partir do INH foi severamente prejudicada, e postula-se que a Serina na posição 315 forma ligações H com um dos grupos heme. Alterações nesse aminoácido modificam o acesso ao grupamento heme e a ligação da INH para ser oxidada (BERTRAND et al., 2004; CARPENA et al., 2003; KAPETANAKI et al., 2003). Essa modificação da ligação da INH à enzima mutante limita a ativação do fármaco e acaba resultando em resistência à INH (YU et al., 2003).

Portanto, há interesse em desenvolver novos fármacos para combater o *Mtb* que sejam eficientes contra cepas resistentes, com menos efeitos adversos e menor toxicidade.

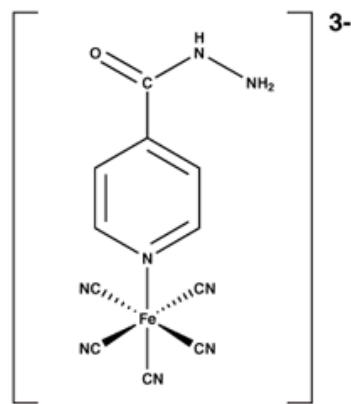
#### **1.4 O composto IQG-607**

Atualmente, compostos associados a metais com aplicações farmacológicas vêm sido desenvolvidos dado o sucesso de aprovação para uso clínico (como, por exemplo, cisplatina, carboplatina, nitroprussiato e sulfadiazina de prata) (BARRY; SADLER, 2013). O desenvolvimento de metalofármacos aumentou, sendo compostos que incluem metais devido à sua ação terapêutica e atualmente pertencem a uma classe de compostos antimicrobianos promissores, projetados para superar cepas resistentes (MONTELONGO-PERALTA et al., 2019). Como vantagens, podemos citar o potencial redox ajustável desses compostos, taxas cinéticas variáveis e acessibilidade a um número maior de isômeros estereoquímicos, quando comparados a compostos orgânicos (BRUIJNINCX; SADLER, 2008; DÖRR; MEGGERS, 2014; MEGGERS, 2009).

Há alguns anos, o composto IQG-607 vem sendo estudado pelo nosso grupo de pesquisa. O IQG-607 é uma molécula que foi racionalmente desenvolvida, análoga a INH, que possui um pentacianoferrato(II) acoplado ligado ao átomo de nitrogênio do anel heterocíclico da INH, tendo como fórmula molecular  $[Fe^{II}(CN)_5(INH)]^{3-}$  (Figura 7).

A molécula foi desenvolvida para que pudesse ser autoativada *in vivo*, dispensando a atividade da KatG. Nessa proposta, o centro metálico contendo a porção do pentacianoferrato promoveria uma transferência de elétrons e formaria o radical isonicotinoil, que mimetizaria o mecanismo de ativação enzimático promovido pela KatG (OLIVEIRA et al., 2006; SOUSA et al., 2005). Essa autoativação intramolecular do IQG-607 seria desencadeada por espécies reativas de oxigênio (ROS) que compõem o ambiente intracelular, tais como o peróxido de hidrogênio, oxidando o Fe(II) do pentacianoferrato em Fe(III); esse, por sua vez, iria promover a oxidação intramolecular da porção hidrazina da isoniazida do composto, sendo reduzido novamente à Fe(II) com a formação do radical isonicotinoil (Figura 8). A formação do radical de maneira não enzimática demonstra que esse candidato a fármaco não exigiria a necessidade da enzima KatG, surgindo como alternativa de tratamento da tuberculose contra cepas mutadas nessa enzima.

Figura 7 – Fórmula estrutural do IQG-607

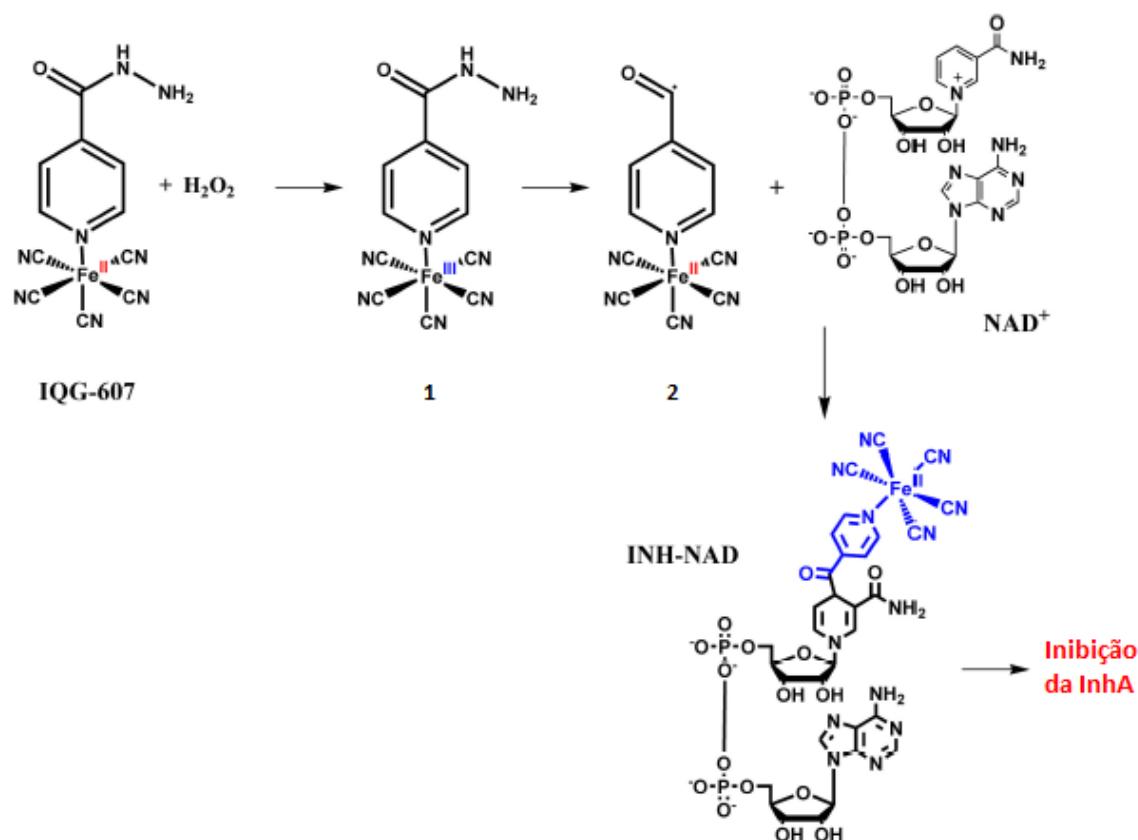


Fonte: O autor (2019)

Alguns estudos utilizando o IQG-607 já demonstraram sua atividade *in vitro* de inibição da enzima InhA WT e de alguns mutantes estruturais que são resistentes à INH (S94A, I21V e I47T) (VASCONCELOS et al., 2008), já sendo possível perceber que essa molécula possui capacidade de inibir um alvo enzimático essencial no crescimento do *Mtb*. A molécula também apresentou um MIC de 0,25 µg mL<sup>-1</sup> (0,5 µM) na cepa H37Rv de *Mtb*, similar ao MIC da INH, demonstrando uma atividade *in vitro* (RODRIGUES-JUNIOR et al., 2012). Para determinar qual o mecanismo de

ação do IQG-607, foi realizada a extração e análise de lipídeos através de estudos com radiomarcação dos ácidos micólicos, onde foi observada a inibição total da síntese dos ácidos micólicos quando aplicado o composto IQG-607, similar à INH (RODRIGUES-JUNIOR et al., 2014). Esse resultado serviu para confirmação do mesmo alvo enzimático essencial, a InhA, corroborando os ensaios enzimáticos *in vitro* realizados anteriormente (OLIVEIRA et al., 2006, 2004; VASCONCELOS et al., 2008).

Figura 8 – Mecanismo proposto para a formação do complexo de inibição da InhA por via não enzimática



Legenda: 1: forma oxidada do composto IQG-607; 2: radical isocotinoil; NAD<sup>+</sup>: forma oxidada da nicotinamida adenosina dinucleotídeo; INH-NAD: aduto isonicotinoil-NAD  
Fonte: Adaptado de ABBADI et al. (2018a).

Para avaliar se o IQG-607 teria atividade intracelular, macrófagos infectados com o *Mtb* foram utilizados, resultando em uma diminuição significativa na quantidade de bactérias em todas as concentrações em relação à INH. Também houve uma diminuição nas Unidades Formadoras de Colônias (CFU, do inglês *colony formation unit*), demonstrando a sua capacidade bactericida. Esse trabalho

demostrou que o IQG-607 tem a capacidade de atravessar a membrana do macrófago e eliminar o bacilo de forma efetiva dentro do fagossoma (RODRIGUES-JUNIOR et al., 2014).

Para o desenvolvimento de novos fármacos, é importante avaliar a toxicidade tanto *in vivo* quanto *in vitro* do composto. A citotoxicidade do IQG-607 foi avaliada *in vitro* contra RAW 264.7 e em três linhagens celulares adicionais: Vero, HaCat e HepG2. O IQG-607 não apresentou genotoxicidade, mesmo em altas concentrações e não induziu dano ao DNA em células HepG2. O IQG-607 também apresentou seu IC<sub>50</sub> (do inglês *inhibitory concentration*) > 2,000 µM (AMORIM et al., 2017). Já nos testes *in vivo* com roedores, não causou nenhuma mortalidade em ratos, mesmo em doses elevadas, obtendo-se um LD<sub>50</sub> (do inglês *lethal dose*) oral > 2,000 mg/kg, sendo que a INH apresenta um de LD<sub>50</sub> de 1,250 mg kg<sup>-1</sup> (RODRIGUES-JUNIOR et al., 2017a). Em camundongos, o valor de LD<sub>50</sub> do IQG é 1000 mg kg<sup>-1</sup> (BASSO et al., 2010), sendo que a LD<sub>50</sub> da INH é de 133 mg kg<sup>-1</sup>, mostrando novamente um perfil favorável para o IQG-607. Dentro dos estudos *in vivo* em não roedores, foram realizados testes em mini porcos por serem consideravelmente parecidos com os humanos em questões bioquímicas, anatômicas e fisiológicas. Uma dose de 220 mg kg<sup>-1</sup> de IQG-607 não causou mudanças no peso, mortalidade, morbidade, e nem alterações nas necroses, na alimentação e consumo de água (RODRIGUES-JUNIOR et al., 2017b). Portanto, na questão da toxicidade, percebemos um perfil favorável do IQG-607 em cultura de células, ratos, camundongos e mini porcos.

Um trabalho recente desenvolvido por nosso grupo de pesquisa avaliou o mecanismo de ação do IQG-607 em cepas de *Mtb* resistentes à INH (ABBADI et al., 2018b). Inicialmente, foram utilizados 9 isolados clínicos MDR-TB (com mutações S315T) e, inesperadamente, 8 isolados clínicos apresentaram resistência ao composto, com um MIC de aproximadamente 100 µg mL<sup>-1</sup>. Esse foi o primeiro resultado dentre vários que motivaram a descobrir se o IQG-607 teria uma dependência de ativação pela KatG. A partir desse resultado inicial, mutantes espontâneos resistentes ao composto IQG-607 foram isolados e tiveram seus genomas completamente sequenciados. Seis colônias mutantes apresentaram alterações no gene *katG*, sendo que em quatro delas foram detectadas deleções nesse gene, um perfil de mutações geralmente inesperado em isolados clínicos, porém comum em mutantes gerados em laboratório (BERGVAL et al., 2009;

BROSSIER et al., 2016). Esse resultado, mais uma vez, sugere que a ação antimicrobiana do composto IQG-607 depende da atividade da enzima KatG. Experimentos de genética molecular foram então conduzidos para estabelecer uma relação causal entre o fenótipo de resistência ao composto e a presença das mutações identificadas. Para tanto, uma cepa nocaute para o gene *katG* foi produzida e subsequentemente complementada com o gene *katG* selvagem (WT) ou com uma variante desse gene que codifica a KatG mutante S315T (a mutação mais frequentemente encontrada em isolados clínicos resistentes à INH). O bacilo que continha a complementação com o gene mutado aumentou em 64 vezes o seu MIC (ABBADI et al., 2018b).

Com base nesses resultados, formulamos a hipótese de que, de modo análogo à INH, o IQG-607 poderia se tratar de um pró-fármaco, também necessitando ser ativado pela enzima KatG no ambiente intracelular para poder exercer sua atividade antimicrobiana. Testar essa hipótese, investigando o composto IQG-607 e sua interação molecular com a KatG é, portanto, a principal motivação desse trabalho.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Geral:

Avaliar se o composto IQG-607 é um substrato da enzima KatG.

### 2.2 Específicos:

Realizar a expressão e purificação da enzima KatG de *Mycobacterium tuberculosis*;

Realizar os ensaios enzimáticos de catalase e peroxidase da enzima KatG e determinar seus parâmetros cinéticos;

Verificar se ocorre a oxidação do IQG pela enzima KatG, utilizando INH como controle positivo;

Verificar a formação de aduto IQG-NADH *in vitro*, utilizando INH-NADH como controle positivo.

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

O presente artigo foi submetido conforme normas da revista Journal of Inorganic Biochemistry (F.I 3.348).

**Journal of Inorganic Biochemistry** <EvideSupport@elsevier.com>  
para eu ▾

13:13 (há 1 hora) ⭐ 🔍 ⋮

Dear Miss. Barsé,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Journal of Inorganic Biochemistry

Title: Deciphering the role of the Mycobacterium tuberculosis catalase-peroxidase KatG on the antimycobacterial activity of the metal-containing isoniazid analogue IQG-607

Corresponding Author: Cristiano Valim Bizarro

Co-Authors: Laísa Barsé, Cândida Deves Roth, Adílio da Silva Dadda, Raoni Rambo, Kenia Pissinati, Pedro Ferrari Dalberto, José Eduardo Sacconi Nunes, Renata Jardim Etchart, Pablo Machado, Luiz Basso

Cristiano Valim Bizarro submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, EVISE®. If you are not already registered in EVISE®, please take a moment to set up an author account by navigating to [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL\\_ACR=JINORGBI](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=JINORGBI)

If you already have an ORCID, we invite you to link it to this submission. If the submission is accepted, your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and published with the manuscript.

To link an existing ORCID to this submission, or sign up for an ORCID if you do not already have one, please click the following link: [Link ORCID](#)

What is ORCID?

ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers.

**Deciphering the role of the *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase KatG on the antimycobacterial activity of the metal-containing isoniazid analogue IQG-607**

Laísa Quadros Barsé<sup>a,b</sup>, Candida Deves Roth<sup>a</sup>, Adilio da Silva Dadda<sup>a</sup>, Raoní Scheibler Rambo<sup>a</sup>, Kenia Pissinati<sup>a</sup>, Pedro Ferrari Dalberto<sup>a,b</sup>, José Eduardo Sacconi Nunes<sup>a,c</sup>, Renata Jardim Etchart<sup>a,b</sup>, Pablo Machado<sup>a,b</sup>, Luiz Augusto Basso<sup>a,b,c</sup>, Cristiano Valim Bizarro<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 92A TECNOPUC, 4592 Av. Ipiranga 6681, 90616-900, Porto Alegre, Brazil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

\*Corresponding author: cristiano.bizarro@pucrs.br (C. V. Bizarro)

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused mainly by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) and is responsible for millions of deaths. Moreover, new *Mtb* strains resistant to TB drugs are emerging and spreading. In particular, the main first-line TB drug, isoniazid (INH), must be activated inside mycobacterial cells by the catalase-peroxidase enzyme KatG to exert its antimicrobial activity, and mutations on the *katG* gene are a major cause of INH resistance in clinics. The metal-containing compound IQG-607 is an INH analogue that was developed to inhibit the same target of INH, the FASII enzyme enoyl-ACP-reductase (InhA), without requiring activation by the KatG. However, we recently showed that inside mycobacterial cells, the activity of IQG-607 is also dependent on KatG. Hence, this compound might also be activated by KatG, requiring its activation to inhibit InhA. Therefore, we evaluated the ability of recombinant MtKatG to use IQG-607 as a substrate in oxidation reactions and for adduct formation with NAD<sup>+</sup>. A recombinant MtKatG was produced in *E. coli* and purified in a 3-step protocol to obtain a homogenous protein. An HPLC method was optimized to monitor both oxidation and adduct products, and our assay system was validated by performing control reactions using INH as a substrate. We found that the metal-based compound IQG-607 is not a substrate for recombinant MtKatG under all conditions tested. Based on our results, we suggest that IQG-607 might behave as a pre-prodrug, releasing the INH moiety inside mycobacterial cells, which then requires KatG activation to form the active INH-NAD adduct.

**Keywords:** Isoniazid, *Mycobacterium tuberculosis*, IQG-607, KatG, Metal-containing compound.

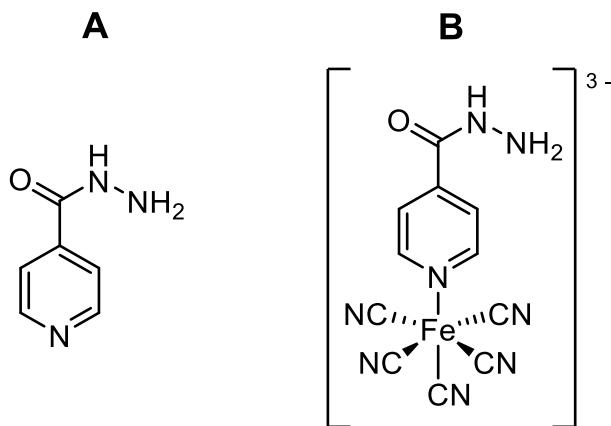
## 1. Introduction

Tuberculosis (TB) is a well-known infectious disease, mainly caused by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), an aerobic pathogenic bacterium that primarily infects the lungs [1]. TB was responsible for millions of deaths when there were no adequate treatments for patients and even today it is responsible for the highest number of deaths caused by a single infectious agent [2,3]. According to recent WHO data [4], TB is one of the 10 leading causes of death in the world. In 2018 alone, 10 million people fell ill with TB and 1.2 million died from the disease. Currently, standard TB treatment consists of an intensive initial phase lasting two months and a continuous phase for an additional four months. The suggested treatment for new TB patients consists of a two-month phase using isoniazid (INH), rifampicin (RIF), pyrazinamide (PZA) and ethambutol (EMB), followed by a four-month phase with INH and RIF [4]. Alternatively, the continuation phase may be extended to six months of INH and EMB [4]. TB is a curable disease, and most patients that follow the treatment are cured successfully. However, the emergence and spread of *Mtb* strains resistant to first-line drugs represent one of the main challenges in the treatment of TB today.

Long treatment periods coupled with the adverse effects of first-line drugs result in high treatment dropout rates, which contribute to the selection and dissemination of resistant strains [5]. *Mtb* strains resistant to both INH and RIF are classified as multidrug-resistant (MDR strains). Patients affected by TB caused by MDR strains (MDR-TB) need alternative therapies using second-line drugs. Examples are fluoroquinolones and injectable drugs such as amikacin, kanamycin and capreomycin. However, second-line drugs are more expensive, less effective, and more toxic. In addition, a longer treatment period (at least 18 months) is also required. In some cases, extensively drug resistant (XDR-TB) strains, defined as MDR-TB strains that are resistant to fluoroquinolones and at least one of the second-line injectable

drugs, may also occur, making TB treatment even more difficult and the eradication of the disease more complicated [6].

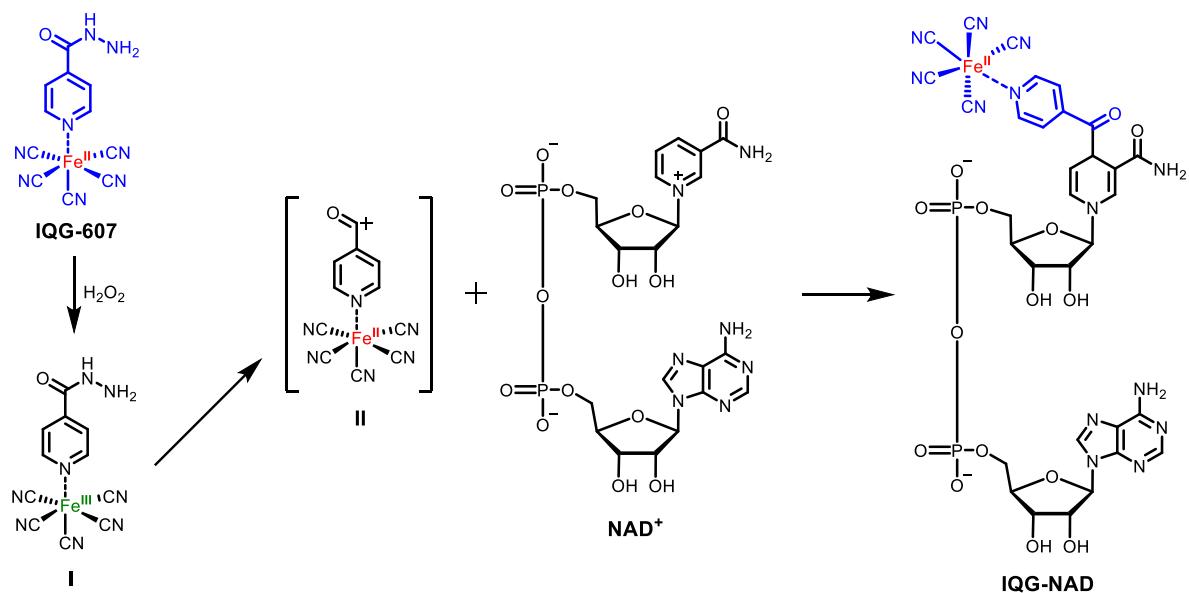
INH resistance, alone or in combination with other drugs, is the second most common type of resistance observed among TB patients, with rifampicin resistance alone (RR-TB) being the first one. As the most commonly used drug in the clinic, INH resistance represents one of the main current challenges in the treatment of TB [7]. INH has a simple structure consisting of a hydrazide group bounded to a pyridine ring, these two components being essential for its activity (Figure 1a). High bactericidal activity, low cost, high bioavailability, excellent intracellular penetration and narrow spectrum of action make INH one of the most effective antimicrobial agents to treat TB [8]. The most accepted mechanism of action for INH, described in the 1990s, posits that INH acts as a prodrug, requiring intracellular activation of a catalase peroxidase (MtKatG) to exert its activity. When activated, INH is converted to an isonicotinoyl radical, which reacts with nicotinamide adenine dinucleotide ( $\text{NAD}^+$ ), leading to the INH-NAD adduct [9]. This adduct in turn is presumably the active compound that inhibits the NADH-dependent trans-2-enoyl-ACP reductase enzyme (InhA). InhA is an essential enzyme involved in mycobacterial cell wall and fatty acid biosynthesis, and its inhibition blocks fatty acid elongation, leading to accumulation of long chain fatty acids, and to cell death [10]. Some of the most frequent mutations found in clinical isolates associated with INH resistance are in the gene that encodes KatG. One in particular (S315T) is found in more than 50% of *Mtb* resistant populations [11–14].



**Figure 1.** Structure of isoniazid (A) and IQG-607 (B).

There is an urgent need to develop a new drug with anti-tubercular action mainly against resistant strains, with low toxicity; and able to shorten treatment of latent TB infection [15]. Metal-based drugs approved for clinical use (cisplatin, nitroprusside, silver sulfadiazine and others) [16] share some advantages when compared to organic compounds, such as adjustable redox potential and the ability to build new structures due to a larger number of stereoisomers [17–19]. IQG-607 is a metal-based compound containing a pentacyanoferrate (II) attached to the nitrogen atom of the heterocyclic ring of INH, having the molecular formula  $[Fe^{II}(CN)^5(INH)]^{3-}$  (Figure 1b). IQG-607 has been evaluated in several studies and we observed a favorable IQG-607 profile in cell culture cytotoxicity without genotoxicity, even at high concentrations, did not induce DNA damage in HepG2 cells and demonstrated an advantage over INH in rats, mice and mini pigs [15,20–22]. This molecule was rationally developed to undergo autoactivation *in vivo*, eliminating the need of MtKatG activity, as required for INH prodrug activation. In this proposal, the metal center containing the pentacyanoferrate portion would promote electron transfer and form the isonicotinoyl radical, mimicking the activation mechanism of MtKatG [23,24]. This intramolecular autoactivation of IQG-607 would be triggered by reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide, which would oxidize Fe(II) to Fe(III) (I in Figure 2) and this, in turn, would promote intramolecular oxidation of the isoniazid moiety to isonicotinoyl radical, with Fe(III) being

reduced back to Fe (II) (II in Figure 2). Conceivably, the non-enzymatic formation of the isonicotinoyl radical from IQG-607 would circumvent the need for *MtKatG* activity inside Mtb cells, as required for INH activation. By this way, this compound could be used as an effective INH surrogate to treat TB cases caused by INH-resistant strains whose mechanism of resistance lies on mutations on *katG* gene.



**Figure 2.** Proposed mechanism through a non-enzymatic oxidative route of IQG-607 in the formation of the isonicotinoyl radical and formation of complex which inhibits InhA.

Some studies have shown that IQG-607 inhibits *in vitro* both the InhA WT enzyme and some structural mutants (S94A, I21V and I47T), known to confer resistance to INH [15,24–26]. Moreover, lipid extraction and radiolabeling analysis of mycolic acids were performed to study its mechanism of action. Total inhibition of mycolic acid synthesis was observed when IQG-607 was used, similar to what was found when Mtb cells were treated with INH [25]. This result confirmed that the target consisted of the InhA enzyme, corroborating the previously performed *in vitro* enzyme assays [24,26].

Recent work from our research group evaluated the mechanism of action of IQG-607 in INH-resistant *Mtb* strains [27]. Initially, 9 MDR-TB clinical isolates were treated with IQG-607. Unexpectedly, the isolates carrying the *katG*(S315T) mutation (8 out of 9 treated) were found to be resistant to this compound, with MICs ranging from 25 to >100 µg mL<sup>-1</sup> [27]. Moreover, six spontaneous mutants resistant to the IQG-607 compound were isolated and found to have alterations in the *katG* gene, four of them with a mutation profile generally unexpected in clinical isolates, but common in laboratory-generated mutants [28,29]. Molecular genetics experiments were then conducted to establish a causal relationship between the compound resistance phenotype and the presence of identified mutations. A knockout strain for the *katG* gene was produced and subsequently complemented with the wild type (WT) *katG* gene or a variant of that gene encoding the mutant KatG S315T (the mutation most often found in INH-resistant clinical isolates). Bacteria complemented with *katG*(S315T) gene increased its MIC by 64-fold [27]. Taken together, these results strongly suggest that, inside mycobacterial cells, the antimicrobial action of compound IQG-607 depends on the activity of the MtKatG enzyme, in disagreement to the autoactivation model.

Based on these results, we hypothesized that, similarly to INH, IQG-607 needs to be activated by the MtKatG enzyme in the intracellular environment in order to exert its antimicrobial activity. Therefore, in this study, we evaluated whether IQG-607 could be used as a substrate for MtKatG under different experimental conditions. For this purpose, KatG from *Mycobacterium tuberculosis* was produced in recombinant form and biochemically characterized. Moreover, analytical methods were developed to detect species formed from INH and IQG-607 compounds under different reaction conditions. The enzymatic assays were performed in the absence (air-only background control) or in the presence of peroxides as exogenous oxidants (t-BuOOH and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Contrary to our expectations, we found that IQG-607 is not a substrate for MtKatG under the *in vitro* conditions tested. Based on these results,

we propose that IQG-607 could be a pre-prodrug, being first converted to INH and then activated by MtKatG inside mycobacterial cells.

## **2. Materials and methods**

### ***2.1 Cloning and expression of MtKatG***

The *M. tuberculosis* catalase-peroxidase (MtKatG) coding gene *katG* was synthesized by FastBio Ltda and was cloned into the pET23a(+) expression vector using the NdeI and HindIII restriction enzymes. *E. coli* BL21 (DE3)pLysS cells transformed with pET23a(+)::*katG* were grown on Lysogenic Broth (LB) agar plates containing 50 mg mL<sup>-1</sup> ampicillin and 34 mg mL<sup>-1</sup> chloramphenicol. A single colony was cultivated overnight in 50 mL of LB at 37 °C and 180 rpm. After that, 10 mL of the culture were inoculated into 500 mL of LB medium with the same concentrations of antibiotics and grown at 37 °C and 180 rpm until an OD<sub>600</sub> of 0.5. To induce MtKatG expression, IPTG was added to a final concentration of 1 mM, together with 30 mg L<sup>-1</sup> of Hemin, to ensure stoichiometric incorporation of the heme prosthetic group. Cells were harvested by centrifugation at 11 000 g for 30 min at 4 °C and stored for several months at - 20 °C.

### ***2.2 Purification, oligomeric state and mass spectrometry identification of recombinant MtKatG***

A 3-step purification protocol was developed to obtain homogenous recombinant MtKatG. Briefly, 2 g of frozen cells were resuspended in 20 mL of 50 mM Tris HCl pH 7.6 (buffer A) containing 0.2 mg mL<sup>-1</sup> of lysozyme and stirred for 30 min. Cells were disrupted by sonication (10 pulses of 10 s each at 60% amplitude) and centrifuged at 38 900 g for 30 min. The supernatant was incubated with 1% (v/v) of streptomycin sulfate for nucleic acid removal and gently stirred for 30 min. The solution was centrifuged at 38 900 g for 30 min. The supernatant was dialyzed two times against 2 L of buffer A using a dialysis tubing with a

molecular weight exclusion limit of 12 000 – 14 000 Da. After the dialysis, the solution was centrifuged at 38 900  $g$  for 30 min and the supernatant was loaded on a Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) pre-equilibrated with buffer A. The column was washed with 5 column volumes (CV) of the same buffer, and adsorbed proteins were eluted with a linear gradient (0–100%) of 15 CV of 50 mM Tris HCl pH 7.6 containing 1 M NaCl (buffer B) at 3 mL min $^{-1}$  flow rate. The recombinant MtKatG protein eluted between 250 and 330 mM of NaCl concentration. Fractions containing the target protein were pooled and ammonium sulfate was added to a final concentration of 1 M, clarified by centrifugation at 38 900  $g$  for 30 min, and the resulting supernatant was loaded on a HiLoad 16/10 Phenyl Sepharose High Performance (GE Healthcare) pre-equilibrated with 50 mM Tris HCl pH 7.6 containing 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (buffer C). This hydrophobic column was washed with 5 CVs of buffer C and the adsorbed material eluted with 20 CVs of a linear gradient (0–100%) of buffer A at 1 mL min $^{-1}$  flow rate. The protein eluted between 425 mM and 342 mM of buffer C. The fractions containing the KatG protein were pooled, concentrated down to 5 mL using an Amicon ultrafiltration cell (molecular weight cutoff of 30 000 Da), and loaded on a size exclusion column HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare), which was previously equilibrated with 100 mM potassium phosphate pH 7.5 (buffer D). Proteins were isocratically eluted with 1 CV of buffer D at a flow rate of 0.5 mL min $^{-1}$ . FPLC was performed using the AKTA system (GE Healthcare) and all purification steps were carried out at 4 °C and sample elution monitored by UV detection at 215, 254 and 280 nm simultaneously.

For oligomeric state determination, analytical gel filtration was performed using a Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) column pre-equilibrated with 50 mM potassium phosphate pH 7.2 containing 150 mM NaCl at a flow rate of 0.6 mL min $^{-1}$ , with UV detection at 215, 254 and 280 nm. The LMW and HMW Gel Filtration Calibration Kits (GE Healthcare) were used to prepare a calibration curve. The elution volumes ( $V_e$ ) of standard

proteins (ferritin, aldolase, coalbumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, ribonuclease A and aprotinin) were used to calculate their corresponding partition coefficient ( $K_{av}$ , Eq. (1)). Blue dextran 2000 (GE Healthcare) was used to determine the void volume ( $V_o$ ).  $V_t$  is the total bead volume of the column. The  $K_{av}$  value for each protein was plotted against their corresponding logarithm of molecular mass.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (1)$$

Protein concentration was determined by the method of BCA using bovine serum albumin as standard (Thermo Scientific Pierce™ BCA protein Assay Kit). For mass spectrometry identification, MtKatG recombinant protein fractions were analyzed by SDS-PAGE 12% and a gel slice containing the protein was excised and submitted to in-gel digestion [30]. Tryptic digest was separated on an in-house made 20 cm reverse-phase column (5  $\mu$ m ODSAQ C18, Yamamura Chemical Lab, Japan) using a nanoUPLC (nanoLC ultra 1D plus, Eksigent, USA) and the eluted peptides transferred to a nanospray ion source connected to a hybrid mass spectrometer (LTQ-XL and LTQ orbitrap Discovery, Thermo, USA). Spectra were searched against a non-redundant *E. coli* BL21(DE3) database and MtKatG sequence with the software COMET [31] in the platform PatternLab for proteomics and the validity of the peptide-spectra matches were assessed using Paternlab's module SEPro [32] with a false discovery rate of 1% based on the number of decoys.

### **2.3 Catalase and peroxidase activity assays**

All the measurements were performed using a continuous spectrophotometric assay in quartz cuvettes using a UV-visible Shimadzu spectrophotometer UV2550 equipped with a temperature-controlled cuvette holder. Catalase assay was carried out at 37 °C in 100 mM

potassium phosphate pH 7.5. The catalase activity was measured spectrophotometrically by following the consumption of hydrogen peroxide over 60 s at 240 nm ( $\epsilon_{240} = 0.0435 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [33], with initial concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ranging from 0.1 to 5 mM, and with a fixed concentration of MtKatG of 8.8 nM. One unit of catalase will be defined as the decomposition amount of 1 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> reaction. Peroxidase assay was carried out at 37 °C in 100 mM potassium phosphate buffer pH 5. The peroxidase activity was measured by following the increase in absorbance for 1 mM ABTS ( $\epsilon_{406} = 36.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [34] in the presence of tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH) ranging from 0.25 to 25 mM over 180 s at a fixed enzyme concentration of 25 nM. One unit of peroxidase activity will be defined as the oxidation of 1 μmol ABTS min<sup>-1</sup> reaction. Specific activity will be expressed in U/mg of total protein. All assays were performed at least in duplicate. Kinetic parameters (K<sub>m</sub>, V<sub>max</sub>) were obtained from non-linear regression of Michaelis-Menten plots using Sigma Plot version 12.0.

#### **2.4 INH and IQG-607 oxidation and enzymatic adduct formation**

INH and IQG-607 oxidation and adduct formation assays were performed in triplicate at 37 °C as described on previous studies with minor modifications [14,35–37]. Briefly, the reaction sample (1 mL total volume) contained 100 mM potassium phosphate pH 7.5, 1.5 μM WT KatG, 1 mM INH (or IQG-607), 120 μM NAD<sup>+</sup> and the following oxidants (air only, 400 μM t-BuOOH or 400 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were used. Total time of reaction was 100 minutes. HPLC analyses were performed using 90 μL injection volume on a Dionex Ultimate 3000 equipped with a diode array detector (DAD) using a reversed-phase C18ec column (Macherey-Nagel, 5 μm particle size, 250 mm x 4.6 mm, Nucleosil) applying a nonlinear gradient from 0 to 15% acetonitrile in 70 mM ammonium acetate solution over 30 min using flowrate at 1 mL min<sup>-1</sup> and detection was in 260 nm. INH and IQG-607 products of oxidation and adducts were identified by their characteristic UV-visible absorption spectrum as described in the literature.

Also, the HPLC fractions containing the four INH-NAD adducts were collected, pooled and subjected to mass spectrometry analysis using a positive ion mode.

### 3 Results and Discussion

#### **3.1 Expression, purification, mass spectrometry identification and oligomeric state of recombinant MtKatG**

The recombinant protein MtKatG was produced in a soluble form with an apparent molecular mass of ~80 kDa. This result agrees with the expected molecular mass of MtKatG (80 604.87 Da). A 3-step purification protocol (anionic exchange followed by hydrophobic interaction and lastly size exclusion) was developed and yielded around 5 mg of homogenous recombinant MtKatG. MtKatG (Uniprot code: P9WIE5) identity was confirmed by mass spectrometry, with the identification of 143 unique peptides, 2087 spectral counts and sequence coverage of 91% (Figure S1). By gel filtration chromatography, the recombinant MtKatG was found to have a molecular mass of 176.6 kDa (Figure S2), indicating that this protein is a homodimer in solution, as previously found [38].

#### **3.2 Catalase and peroxidase activities of recombinant KatG**

Before performing INH and IQG-607 oxidation studies, we evaluated the catalase and peroxidase enzymatic activities of recombinant MtKatG. The kinetic parameters ( $k_{cat}$ ,  $K_m$ , and catalytic efficiency  $k_{cat}/K_m$ ) for the catalase and peroxidase activities are presented in Table I. The recombinant MtKatG exhibited saturable catalase activity when varying  $H_2O_2$  under the tested conditions, yielding a  $k_m$  of  $0.14 \pm 0.03$  mM and a  $k_{cat}$  of  $4642.93 \pm 179.16$  s<sup>-1</sup>. The  $k_m$  reported here is slightly lower than reported in other studies, which ranges from 0.6 mM to 30 mM and the  $k_{cat}$  is in agreement with values already reported, ranging from 2800 to 10000 s<sup>-1</sup> [11,39–43]. Also, the peroxidase activity for one electron oxidation using a fixed concentration of ABTS and varying t-BuOOH as substrate was performed, and values for  $K_m$

of  $18.98 \pm 5.97$  mM and  $k_{cat}$  of  $421.33 \pm 71$  s<sup>-1</sup> were obtained. The kinetic constants reported here for peroxidase assay are “apparent” values since the enzyme saturation was not reached under these conditions.

	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$K_m$ (mM)	$k_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
<b>Catalase</b>	$4642.93 \pm 179.16$	$0.14 \pm 0.03$	$33.16 \times 10^6$
<b>Peroxidase</b>	$421.33 \pm 71$	$18.98 \pm 5.97$	$22.2 \times 10^3$

**Table I.** Kinetic parameters for catalase and peroxidase activities of recombinant MtKatG.

### 3.3 INH and IQG-607 oxidation using MtKatG

As previously described, INH is a substrate of MtKatG leading to isonicotinic acid as a major product and isonicotinamide as a minor by-product [9]. These oxidized products have no antimicrobial activity against *Mtb* strains [44]. Using INH as a positive control, we showed that the recombinant MtKatG has catalytic activity to oxidize INH as expected, forming both isonicotinic acid and isonicotinamide (Figure S3a and Table II). As a catalase enzyme, MtKatG converts hydrogen peroxide into water and oxygen. As a peroxidase enzyme, it also promotes the oxidation of other compounds, such as INH, through two consecutive oxidation steps [11,39,45]. When peroxides (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or t-BuOOH) were added to the oxidation assay, the conversion of INH into isonicotinic acid and isonicotinamide was stimulated (Figure S3b and c and Table II). Peroxides were used to mimic the macrophage intracellular microenvironment experienced by infecting bacilli, since ROS are produced by both the aerobic metabolism of actively replicating *Mtb* cells and by host cells, which release large amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to combat the infection [46]. In the absence of MtKatG in the reaction, no oxidation of INH occurs, even with the addition of peroxides (Figure S4d), demonstrating that the formation of oxidation products from INH requires its enzymatic activity.

	<b>- MtKatG</b>	<b>+ MtKatG</b>
<b>Air Only</b>	ND*	42.3±0.21%
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	ND*	56.3±0.60%
<b>t-BuOOH</b>	ND*	55.8±3.99%

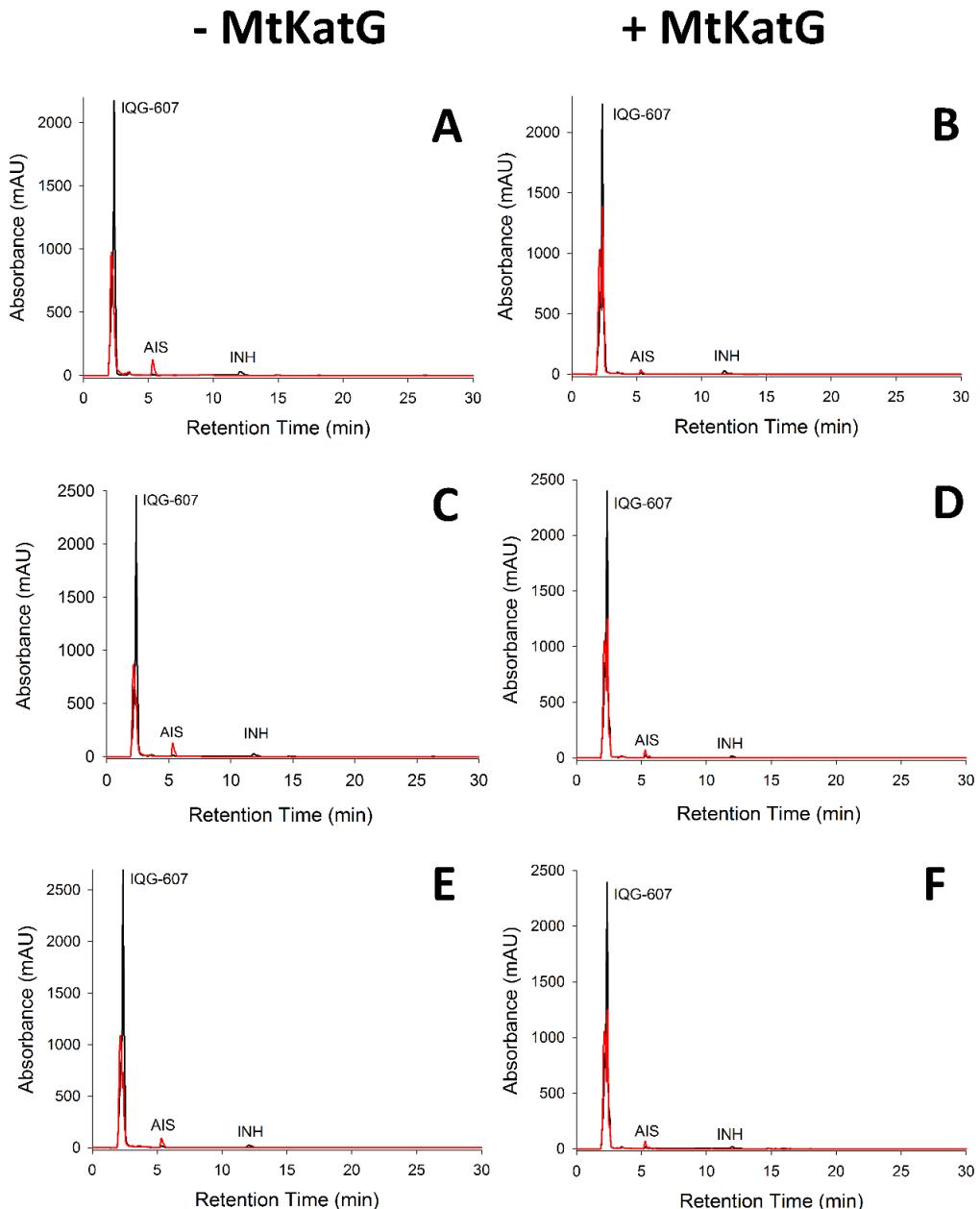
**Table II.** Percentage of degradation of INH in absence and presence of recombinant MtKatG.  
\*ND: no degradation.

Differently from the above-mentioned reactions using INH, we observed oxidation products when this compound was replaced by IQG-607 (Fig. 3). IQG-607 alone or with peroxides (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or t-BuOOH) decomposed to isonicotinic acid mainly, but not to INH. Moreover, the formation of oxidation products observed in our control reactions without the addition of MtKatG (Figures 3a,c,e and Table III) was partly suppressed by the addition of this enzyme (Figures 3b,d,f and Table III). This effect does not depend on different oxidizing agents used (Table III). Presumably, MtKatG is acting as a reactive oxygen species (ROS) scavenger, removing oxidative agents that promote IQG-607 decomposition. Based on a previous study, the coordinated pentacyanoferrate (II) favors a pathway for isonicotinic acyl radical formation, generating isonicotinic acid [47]. Also, IQG-607 demonstrate a band-shift in UV-spectra from ~445 nm to ~420 in 100 minutes of reaction and this shift was suggested to be used to monitor its degradation over time (Figure 4) [49].

### **3.4 INH and IQG-607 adduct formation with NAD<sup>+</sup> using MtKatG**

Not only isonicotinic acid and isonicotinamide are formed when INH reacts with MtKatG. In the presence of NAD<sup>+</sup>, the INH-NAD adduct is also formed, which is responsible for InhA inhibition inside *Mtb* cells, leading to cell death. When using INH as positive control, we could detect four INH-NAD adduct isomers (Figure S4a-c). In the presence of t-BuOOH, MtKatG catalyze the conversion of NAD<sup>+</sup> to ADP-Ribose (Figure S4c) and eventually to other products. However, INH-NAD adduct levels are unchanged in this

condition when compared to the correspondent levels in hydrogen peroxide or air treatments. To confirm the identity of these adduct isomers, we synthesized the INH-NAD adduct using Mn(III) pyrophosphate (Figure S3d), as previously reported [36,37].



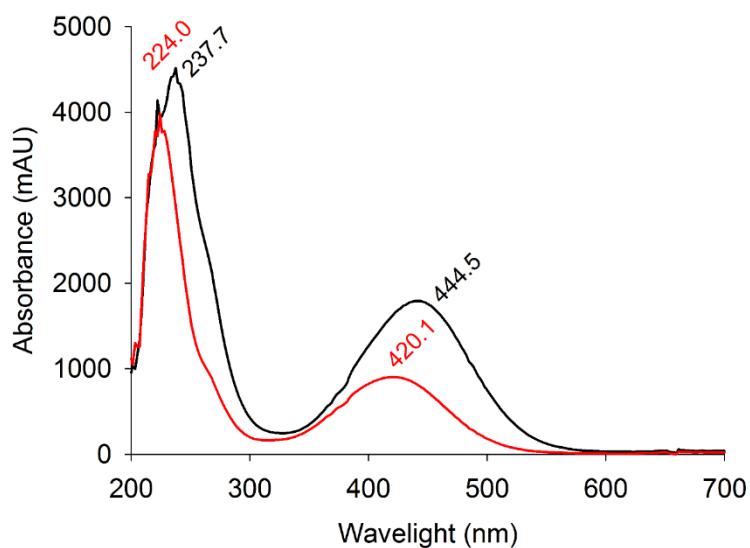
**Figure 3.** Representative chromatogram of IQG-607 with no enzyme in the reaction (- MtKatG) and addition of recombinant MtKatG (+ MtKatG). Air were used as background (a, b), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (c, d) and t-BuOOH (e, f). A major quantity of isonicotinic acid is produced in

absence of MtKatG. The black line represents  $t = 0$  of incubation and red line represents  $t = 100$  min of incubation.

The HPLC profile of synthesized INH-NAD adduct isomers was then compared to the HPLC profiles obtained from adduct isomers enzymatically obtained by using MtKatG in reactions containing INH and NAD<sup>+</sup> as substrates (Figure S5).

	- MtKatG	+ MtKatG
<b>Air Only</b>	$29.8 \pm 2.98\%$	$15.7 \pm 2.79\%$
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	$31.5 \pm 0.29\%$	$22.2 \pm 1.15\%$
<b>t-BuOOH</b>	$30.2 \pm 1.45\%$	$18.3 \pm 2.09\%$

**Table III.** Percentage of degradation of IQG-607 in absence and presence of recombinant MtKatG.



**Figure 4.** UV-spectra of IQG-607 between time. A change in absorption were observed. The black line represents  $t = 0$  of incubation and red line represents  $t = 100$  min of incubation.

The absorption spectra of the INH-NAD adduct isomers from MtKatG-catalyzed reactions and synthesized adducts were very similar (Fig S5). The identities of INH-NAD adduct obtained synthetically were confirmed by MS analysis (see Methods section 2.3). As expected, a parent ion of m/z 771.1535 corresponding to INH-NAD was detected and validated by the detection of MS2 fragment ion products (Fig S7). Taken together, these results show that, apart from its catalase and peroxidase activities, the recombinant MtKatG can also produce the INH-NAD adduct in the presence of NAD<sup>+</sup> and INH.

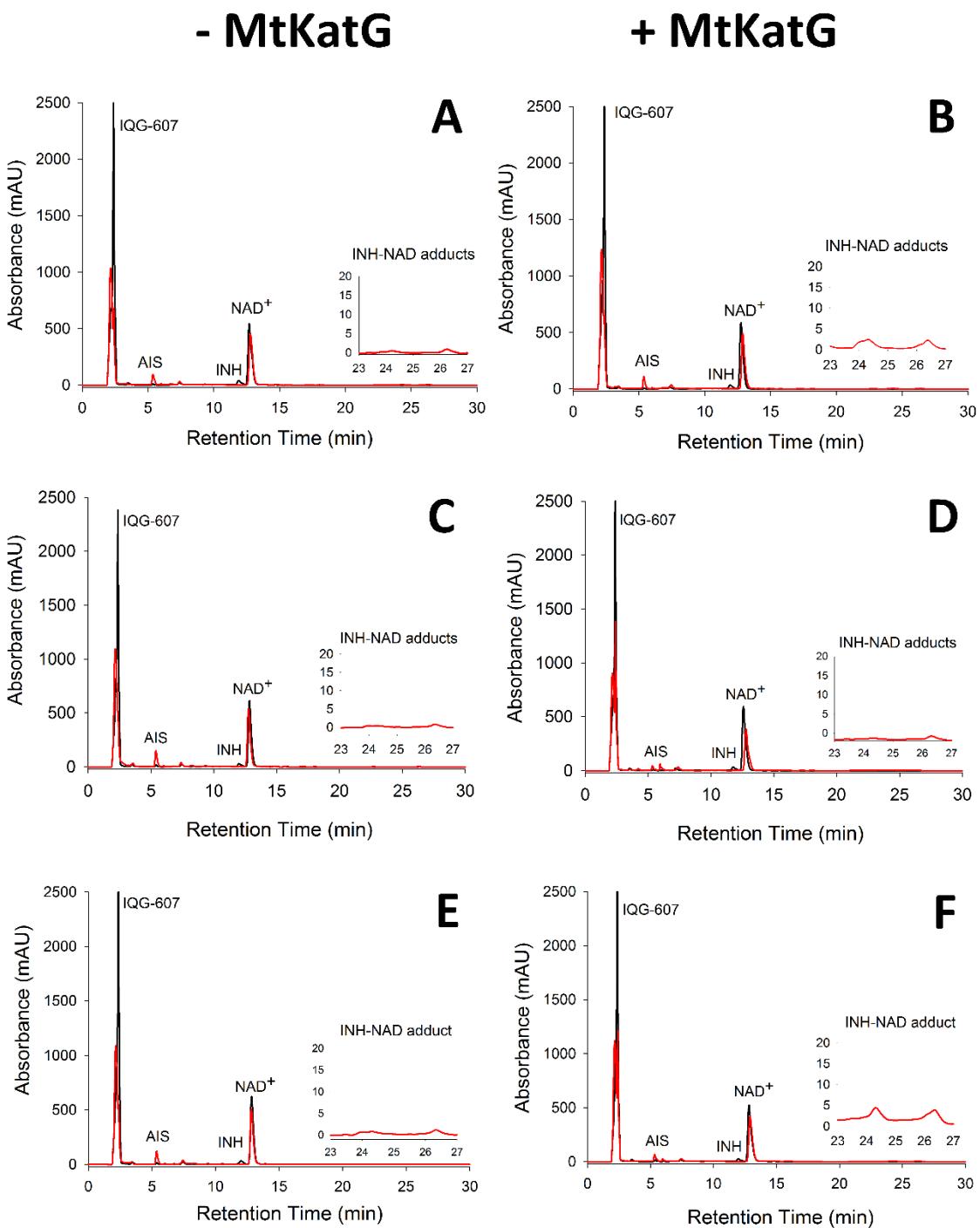
	<b>- MtKatG</b>	<b>+ MtKatG</b>
<b>Air Only</b>	ND*	1.6±0.4%
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	ND*	2.2±0.8%
<b>t-BuOOH</b>	ND*	5.8±0.9%

**Table IV.** Percentage of degradation of INH in presence and absence of recombinant MtKatG using NAD<sup>+</sup> (adduct formation). \*ND: no degradation.

In the presence of IQG-607, NAD<sup>+</sup> and without MtKatG, there is no formation of INH-NAD (Figure 5a, c, e). In reactions containing IQG-607, NAD<sup>+</sup> and MtKatG, we detected a minor formation of INH-NAD adducts, regardless the oxidizing agent used (air-only, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or t-BuOOH) (Figure 5b, d, f). Moreover, we observed again that MtKatG protects IQG-607 from decomposition (Table V), as already observed in reactions without the addition of NAD<sup>+</sup> (Table III). Interestingly, in the presence of MtKatG and NAD<sup>+</sup>, t-BuOOH protects IQG-607 from decomposition (Figure 5f and Table V). We suppose that the minor fractions of INH-NAD adduct isomers detected are derived from residual INH present in our reactions. To confirm this hypothesis, we prepared control reactions spiked with different amounts of INH (25% and 50%). Indeed, when compared to these control reactions, the amount of INH-

NAD adducts obtained in reactions without spiking was proportional to the residual INH contained in those reactions (Figure S6). It is important to notice that in IQG-607 synthesis, there is always residual INH (~2%). We tried several times to remove this residual INH from IQG-607, collecting HPLC fractions containing only IQG-607. After repeated reinjections of IQG-607, INH was always detected, suggesting the existence of a chemical equilibrium between the two compounds.

The metal-based compound IQG-607 is an INH derivative containing a pentacyanoferrate (II) attached to INH. It was developed to bypass the requirement for KatG activation during the intracellular production of the active INH-NAD adduct from the INH prodrug. Such compounds could be used eventually to treat TB infections caused by INH-resistant isolates whose resistance mechanism relies on mutations on the *katG* gene, a major cause of INH resistance in clinics. We have previously shown that inside mycobacterial cells the antimicrobial activity of the IQG-607 requires an active KatG enzyme [27]. This finding does not support the metal-based autoactivation mechanism originally envisaged for this molecule [23,24]. A possible explanation for that finding is that IQG-607 might also be activated by KatG, acting as a metallopro-drug requiring KatG activation to inhibit InhA [48].



**Figure 5.** IQG-607 and NAD<sup>+</sup> in absence (- MtKatG) or presence (+ MtKatG) of recombinant enzyme using air background only (a, b), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (c, d) or t-BuOOH (e, f). The INH-NAD adducts were detected between 23 and 27 min. The black line represents t = 0 min of incubation and red line represents t = 100 min of incubation.

	<b>- MtKatG</b>	<b>+ MtKatG</b>
<b>Air Only</b>	$29.1 \pm 1.03\%$	$26.7 \pm 1.23\%$
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	$32.9 \pm 0.93\%$	$21.5 \pm 4.91\%$
<b>t-BuOOH</b>	$25.1 \pm 2.75\%$	$10.9 \pm 4.35\%$

**Table V.** Percentage of degradation of IQG-607 in absence and presence of recombinant MtKatG using NAD<sup>+</sup>.

In this work, to test this hypothesis and understanding of the mode of action of IQG-607, we evaluated biochemically the ability of recombinant MtKatG to use this compound as a substrate in oxidation reactions and for adduct formation with NAD<sup>+</sup>. An HPLC method was optimized to monitor both oxidation and adduct products, and our assay system was validated by performing control reactions using INH as a substrate. We found that the metal-based compound IQG-607 is not a substrate for recombinant MtKatG under all conditions tested. The results obtained in this work support an alternative hypothesis to explain why IQG-607 requires KatG activation to exert its antimicrobial effects. This compound might behave as a pre-prodrug, releasing the INH moiety inside mycobacterial cells, which then requires KatG activation to form the active INH-NAD adduct. Metallodrugs are attractive therapeutic agents that are increasingly being used in a broad range of medical conditions, both for therapy and for diagnosis [16]. However, the detailed molecular mechanisms of action of these compounds are still elusive. This knowledge is instrumental in the tailoring of metallodrugs to specific therapeutic purposes. By using a combination of genetic [27] and biochemical approaches [this study], we furthered our understanding about the mechanisms underpinning the antimicrobial activities of the metal-based compound IQG-607. A similar approach could be employed to study other metallodrugs of therapeutic value as antimicrobial agents.

#### 4 Conclusion

In the title of our previous review of the compound IQG-607, we asked whether this molecule is a metallodrug or a metallopro-drug [48]. Based on the available evidences at time, we ended the study positing that IQG-607 would act as a metallopro-drug, requiring KatG enzyme to form an active drug inside mycobacterial cells. The present work adds another piece in the puzzle of IQG-607's mechanism of action. After assaying a recombinant form of MtKatG in the presence of NAD<sup>+</sup> and different oxidative agents, we found no evidence that IQG-607 could serve as a substrate for adduct formation under all conditions tested. Our results support a model in which IQG-607 is neither a metallodrug nor a metallopro-drug, but indeed a metallopre-prodrug. According to this model, IQG-607 would work as a drug carrier, releasing the prodrug isoniazid (INH) inside mycobacterial cells. Once released, INH would require MtKatG activation to produce the INH-NAD<sup>+</sup> adducts, the inhibitors of InhA enzyme. This model reconciles our findings with previous results that showed genetically that IQG-607 requires KatG to exert its antimycobacterial activity [27].

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES/FUNTEC) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDTC-CAPES), Brazil. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

## REFERENCES

- [1] R.L. RILEY, Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis a two-year study of contagion in a tuberculosis ward, Am. J. Epidemiol. 70 (1959) 185–196. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a120069.

- [2] L. Lawson, J. Zhang, M.K. Gomgnimbou, S.T. Abdurrahman, S. Le Moullec, F. Mohamed, G.N. Uzoewulu, O.M. Sogaolu, K.S. Goh, N. Emenyonu, G. Refrégier, L.E. Cuevas, C. Sola, A molecular epidemiological and genetic diversity study of tuberculosis in Ibadan, Nnewi and Abuja, Nigeria, PLoS One. 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0038409.
- [3] J. Minion, V. Gallant, J. Wolfe, F. Jamieson, R. Long, Multidrug and Extensively Drug-resistant Tuberculosis in Canada 1997-2008: Demographic and Disease Characteristics, PLoS One. 8 (2013) 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0053466.
- [4] WHO | Global tuberculosis report 2019, 2019.
- [5] K. Drlica, X. Zhao, Mutant Selection Window Hypothesis Updated, Clin. Infect. Dis. 44 (2007) 681–688. doi:10.1086/511642.
- [6] A. Unissa, S. Subbian, L. Elizabeth, N. Selvakumar, Infection, Genetics and Evolution Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, 45 (2016) 474–492. doi:10.1016/j.meegid.2016.09.004
- [7] A. Cattamanchi, R.B. Dantes, J.Z. Metcalfe, L.G. Jarlsberg, J. Grinsdale, L.M. Kawamura, D. Osmond, P.C. Hopewell, P. Nahid, Clinical Characteristics and Treatment Outcomes of Patients with Isoniazid-Monoresistant Tuberculosis, Clin. Infect. Dis. 48 (2009) 179–185. doi:10.1086/595689.
- [8] J.B. Whitney, M.A. Wainberg, Isoniazid, the frontline of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, McGill J. Med. 6 (2002) 114–123.
- [9] K. Johnsson, P.G. Schultz, Mechanistic Studies of the Oxidation of Isoniazid by the Catalase Peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994) 7425–7426. doi:10.1021/ja00095a063.
- [10] F.G. Winder, Mode of action of the antimycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of the *Mycobacteria*, Biol. Mycobact. 1 (1982) 353–438.
- [11] C.E. Cade, A.C. Dlouhy, K.F. Medzihradzky, S.P. Salas-Castillo, R.A. Ghiladi, Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* KatG: Catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities, Protein Sci. 19 (2010) 458–474. doi:10.1002/pro.324.
- [12] R.A. Ghiladi, D.E. Cabelli, P.R. Ortiz De Montellano, Superoxide Reactivity of KatG: Insights into Isoniazid Resistance Pathways in TB, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 4772–4773. doi:10.1021/ja031728t.
- [13] A. Singh, A. Singh, S. Grover, B. Pandey, A. Kumari, A. Grover, Wild-type catalase peroxidase vs G279D mutant type: Molecular basis of Isoniazid drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, Gene. 641 (2018) 226–234. doi:10.1016/j.gene.2017.10.047.
- [14] R.A. Ghiladi, K.F. Medzihradzky, P.R.O. De Montellano, Role of the Met-Tyr-Trp Cross-Link in *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG) As Revealed by KatG (M255I), (2005) 15093–15105. doi:10.1021/bi051463q
- [15] L.A. Basso, C.Z. Schneider, M.M. Campos, A.J.A.B. dos Santos, A.A. dos Santos Jr, A.A. Souto, D.S. Santos, An Inorganic Complex that Inhibits *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl Reductase as a Prototype of a New Class of Chemotherapeutic Agents to Treat Tuberculosis, 21 (2010) 1384–1389. doi:10.1590/S0103-50532010000700026.
- [16] N.P.E. Barry, P.J. Sadler, Exploration of the medical periodic table: Towards new targets, Chem. Commun. 49 (2013) 5106–5131. doi:10.1039/c3cc41143e.
- [17] P.C.P. Bruijnincx, P.P.J. Sadler, New trends for metal complexes with anticancer

- activity, Curr. Opin. Chem. Biol. 12 (2008) 197–206. doi:10.1016/j.cbpa.2007.11.013.
- [18] M. Dörr, E. Meggers, Metal complexes as structural templates for targeting proteins, Curr. Opin. Chem. Biol. 19 (2014) 76–81. doi:10.1016/j.cbpa.2014.01.005.
- [19] E. Meggers, Targeting proteins with metal complexes, Chem. Commun. (2009) 1001–1010. doi:10.1039/b813568a.
- [20] C.F. Amorim, L. Galina, N.B. Carvalho, N.D.M. Sperotto, K. Pissinate, P. Machado, M.M. Campos, L.A. Basso, V.S. Rodrigues-Junior, E.M. Carvalho, D.S. Santos, Inhibitory activity of pentacyano(isoniazid) ferrate(II), IQG-607, against promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania braziliensis*, PLoS One. 12 (2017) 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0190294.
- [21] V.S. Rodrigues-Junior, P. Machado, J.B. Calixto, J.M. Siqueira, E. Andrade, A. Bento, M.M. Campos, L.A. Basso, D.S. Santos, Preclinical safety evaluation of IQG-607 in rats: Acute and repeated dose toxicity studies, Regul. Toxicol. Pharmacol. 86 (2017) 11–17. doi:10.1016/j.yrtph.2017.02.016.
- [22] V.S. Rodrigues-Junior, L. Cintra, P. Machado, A. Dadda, L.A. Basso, A.C.C.N. Mafra, A.H. Campos, M.M. Campos, D.S. Santos, Toxicological profile of IQG-607 after single and repeated oral administration in minipigs: An essential step towards phase I clinical trial, Regul. Toxicol. Pharmacol. 90 (2017) 78–86. doi:10.1016/j.yrtph.2017.08.015.
- [23] J.S. Oliveira, E.H.S. Sousa, L.A. Basso, M. Palaci, R. Dietze, D.S. Santos, Ícaro S. Moreira, An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*, Chem. Commun. 4 (2004) 312–313. doi:10.1039/b313592f.
- [24] J. Oliveira, E. de Sousa, O. de Souza, Ícaro Moreira, D. Santos, L. Basso, Slow-Onset Inhibition of 2-trans-Enoyl-ACP (CoA) Reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an Inorganic Complex, Curr. Pharm. Des. 12 (2006) 2409–2424. doi:10.2174/138161206777698927.
- [25] V.S. Rodrigues-Junior, A.A. Dos Santos Junior, A.D. Villela, J.M. Belardinelli, H.R. Morbidoni, L.A. Basso, M.M. Campos, D.S. Santos, IQG-607 abrogates the synthesis of mycolic acids and displays intracellular activity against *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages, Int. J. Antimicrob. Agents. 43 (2014) 82–85. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.08.021.
- [26] I.B. Vasconcelos, E. Meyer, F. a M. Sales, I.S. Moreira, L. a Basso, D.S. Santos, The mode of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* wild-type and isoniazid-resistant 2-trans-enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes by an inorganic complex., Antiinfect. Agents Med. Chem. 7 (2008) 50–62. doi:<http://dx.doi.org/10.2174/187152108783329799>.
- [27] B.L. Abbadi, A.D. Villela, F.T. Subtil, P.F. Dalberto, A.P.S. Pinheiro, P. Machado, L.A. Basso, C. V Bizarro, Revisiting Activation of and Mechanism of Resistance to Compound IQG-607 in *Mycobacterium tuberculosis*, 62 (2018) 1–5. doi:10.1128/AAC.02222-17
- [28] I.L. Bergval, A.R.J. Schuitema, P.R. Klatser, R.M. Anthony, Resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* selected in vitro do not reflect the in vivo mechanism of isoniazid resistance, J. Antimicrob. Chemother. 64 (2009) 515–523. doi:10.1093/jac/dkp237.
- [29] F. Brossier, E. Cambau, E. Tessier, V. Jarlier, W. Sougakoff, The *in vitro* mechanisms of isoniazid and ethionamide resistance poorly reflect those in vivo in *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis. 101 (2016) 144–145. doi:10.1016/j.tube.2016.09.028.

- [30] A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havli, J. V Olsen, M. Mann, In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2856–2860. doi:10.1038/nprot.2006.468.
- [31] J.K. Eng, T.A. Jahan, M.R. Hoopmann, Comet: An open-source MS/MS sequence database search tool, *Proteomics*. 13 (2013) 22–24. doi:10.1002/pmic.201200439.
- [32] P.C. Carvalho, D.B. Lima, F. V Leprevost, M.D.M. Santos, J.S.G. Fischer, P.F. Aquino, J.J. Moresco, J.R. Yates 3rd, V.C. Barbosa, Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0, *Nat. Protoc.* 11 (2016) 102–117. doi:10.1038/nprot.2015.133.
- [33] R.F. Beers, I.W. Sizer, A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR MEASURING THE BREAKDOWN OF HYDROGEN PEROXIDE BY CATALASE, *J. Biol. Chem.* . 195 (1952) 133–140. <http://www.jbc.org/content/195/1/133.short>.
- [34] R.E. Childs, W.G. Bardsley, The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen, *Biochem. J.* 145 (1975) 93 LP – 103. doi:10.1042/bj1450093.
- [35] R.A. Ghiladi, G.M. Knudsen, K.F. Medzihradszky, P.R. Ortiz De Montellano, The Met-Tyr-Trp cross-link in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG): Autocatalytic formation and effect on enzyme catalysis and spectroscopic properties, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 22651–22663. doi:10.1074/jbc.M502486200.
- [36] M. Nguyen, A. Quémard, S. Broussy, B. Meunier, J. Bernadou, Mn (III) Pyrophosphate as an Efficient Tool for Studying the Mode of Action of Isoniazid on the InhA Protein of *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 2137–2144. doi:10.1128/AAC.46.7.2137.
- [37] M. Nguyen, C. Claparols, J. Bernadou, B. Meunier, A fast and efficient metal-mediated oxidation of isoniazid and identification of isoniazid-NAD(H) adducts., *Chembiochem.* 2 (2001) 877–883. doi:10.1002/1439-7633(20011203)2:12<877::AID-CBIC877>3.0.CO;2-V.
- [38] T. Bertrand, N.A.J. Eady, J.N. Jones, Jesmin, J.M. Nagy, B. Jamart-Grégoire, E.L. Raven, K.A. Brown, Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 38991–38999. doi:10.1074/jbc.M402382200.
- [39] R.A. Ghiladi, K.F. Medzihradszky, F.M. Rusnak, P.R. Ortiz De Montellano, Correlation between isoniazid resistance and superoxide reactivity in *Mycobacterium tuberculosis* KatG, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 13428–13442. doi:10.1021/ja054366t.
- [40] F. Brossier, M. Boudinet, V. Jarlier, S. Petrella, W. Sougakoff, Comparative study of enzymatic activities of new KatG mutants from low- and high-level isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuberculosis*. 100 (2016) 15–24. doi:10.1016/j.tube.2016.06.002.
- [41] J.M. Nagy, A.E.G. Cass, K.A. Brown, Purification and characterization of recombinant catalase-peroxidase, which confers isoniazid sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 31265–31271.
- [42] N.L. Wengenack, B.D. Lane, P.J. Hill, J.R. Uhl, G.S. Lukat-Rodgers, L. Hall, G.D. Roberts, F.R. Cockerill, P.J. Brennan, K.R. Rodgers, J.T. Belisle, F. Rusnak, Purification and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* KatG, KatG(S315T), and *Mycobacterium bovis* KatG(R463L), *Protein Expr. Purif.* 36 (2004) 232–243. doi:10.1016/j.pep.2004.04.018.
- [43] K. Johnsson, W. a Froland, P.G. Schultz, Overexpression, purification, and

- characterization of the catalase-peroxidase KatG from *Mycobacterium tuberculosis*., J. Biol. Chem. 272 (1997) 2834–2840. doi:10.1074/jbc.272.5.2834.
- [44] J.C. Sacchettini, J.S. Blanchard, The structure and function of the isoniazid target in *M. tuberculosis*, Res. Microbiol. 147 (1996) 36–43. doi:[https://doi.org/10.1016/0923-2508\(96\)80201-4](https://doi.org/10.1016/0923-2508(96)80201-4).
- [45] X. Zhao, H. Yu, S. Yu, F. Wang, J.C. Sacchettini, R.S. Magliozzo, Hydrogen peroxide-mediated isoniazid activation catalyzed by *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) and its S315T mutant, Biochemistry. 45 (2006) 4131–4140. doi:10.1021/bi051967o.
- [46] V.H. Ng, J.S. Cox, A.O. Sousa, J.D. MacMicking, J.D. McKinney, Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: Countering the phagocyte oxidative burst, Mol. Microbiol. 52 (2004) 1291–1302. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04078.x.
- [47] E.H.S. Sousa, L.A. Basso, D.S. Santos, I.C.N. Diógenes, E. Longhinotti, L.G. De França Lopes, Í. De Sousa Moreira, Isoniazid metal complex reactivity and insights for a novel anti-tuberculosis drug design, J. Biol. Inorg. Chem. 17 (2012) 275–283. doi:10.1007/s00775-011-0848-x.
- [48] B.L. Abbadi, V. da S. Rodrigues-Junior, A. da S. Dadda, K. Pissinate, A.D. Villela, M.M. Campos, L.G. d. F. Lopes, C. V. Bizarro, P. Machado, E.H.S. Sousa, L.A. Basso, Is IQG-607 a potential metallodrug or metallopro-drug with a defined molecular target in *Mycobacterium tuberculosis*?, Front. Microbiol. 9 (2018) 1–21. doi:10.3389/fmicb.2018.00880.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O *Mtb* é considerado o patógeno de maior sucesso no mundo devido a sua capacidade de permanecer latente no hospedeiro. Em 2015, foi lançada pela OMS uma estratégia chamada de “End TB Strategy”, que visa reduzir as mortes por TB em até 95%, reduzir novos casos em 90% até 2035 e garantir que nenhuma família seja sobrecarregada com despesas incompatíveis com suas rendas devido à TB (WHO, 2015).

Porém, atualmente a TB continua afetando muitas pessoas, principalmente em regiões mais negligenciadas no planeta. Acrescenta-se à alta prevalência o surgimento e disseminação de cepas que apresentam resistência aos medicamentos utilizados para o tratamento da TB, diminuindo a chance de cura e aumentando ainda mais o tempo de tratamento. É evidente a necessidade de desenvolvimento de fármacos com o intuito de contornar os principais mecanismos de resistência desenvolvidos pelo *Mtb*.

Desde os anos 2000, o nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com um composto análogo à isoniazida (IQG-607), sendo um candidato promissor a fármaco. Uma porção significativa dos isolados clínicos que apresentam resistência à INH possui mutações no gene que codifica a enzima KatG, que é responsável pela oxidação e ativação intracelular da INH. A síntese racional do IQG-607 teve por objetivo produzir um composto capaz de ser ativado de modo não enzimático nas condições oxidativas experimentadas pelo bacilo no ambiente intracelular, dispensando a etapa de ativação pela KatG. Desse modo, esperava-se que o composto fosse efetivo frente a cepas resistentes a INH que apresentassem como mecanismo de resistência mutações no gene *katG*. Entretanto, quando testado frente a essas cepas resistentes (carregando mutações no gene *katG*), o IQG-607 não foi efetivo. Além disso, por meio de estudos de genética molecular utilizando cepas de *Mtb* portando o alelo codificador da KatG selvagem ou de uma variante contendo a mutação S315T, foi comprovada a necessidade da KatG ativa no *Mtb* para que o IQG-607 exercesse seu efeito antimicrobiano. Esses achados sugeriram que, ao contrário da proposta inicial, o IQG-607 poderia ser um substrato alternativo para a enzima KatG. Por isso, a importância de um estudo para avaliar *in vitro* se o

IQG-607 pode ser utilizado como substrato pela KatG para a produção de adutos contendo NAD<sup>+</sup>, de forma análoga à INH.

Os resultados obtidos nesse trabalho não são compatíveis com um modelo de ação no qual o IQG-607 se comporte como um pró-fármaco. Em todas as condições experimentais testadas, uma forma recombinante produzida da enzima MtKatG não foi capaz de catalisar a síntese de adutos contendo NAD<sup>+</sup> a partir desse composto, e tampouco a formação de produtos de oxidação. Experimentos controle foram realizados com INH, possibilitando validar os ensaios enzimáticos e demonstrar que as preparações obtidas da enzima eram ativas. Esses resultados sustentam um modelo alternativo para a ação do composto. Sugere-se que o IQG-607 possa atuar como um pré-profármaco, liberando a porção INH no interior do bacilo. Uma vez liberada, a INH atuaria como um pró-fármaco pelo mecanismo de ação já caracterizado, que envolve uma etapa de ativação pela KatG.

Com esse trabalho foi possível responder uma pergunta pendente em relação ao mecanismo de ação do IQG-607 e aprofundar ainda mais os estudos analíticos dessa molécula. O método analítico utilizando cromatografia líquida para identificação do aduto INH-NAD e um possível IQG-NAD, assim como observar se a oxidação dessa molécula ocorreria na presença da enzima, comprovando ou não ser um substrato, foram passos fundamentais para entendimento do mecanismo *in vitro* do IQG-607 e da KatG. Estes dados poderão servir como suporte para estudos de identificação do aduto INH-NAD dentro de células de *Mtb*, visando entender possíveis metabólitos formados dentro do bacilo. O método analítico utilizado durante esse trabalho pode ser otimizado para explorar essas diferentes abordagens num estudo mais avançado para o entendimento desse candidato a fármaco.

Novos experimentos deverão ser realizados para avaliar o mecanismo de ação proposto. Se de fato o composto atua como um pré-profármaco, espera-se que a administração de IQG-607 em culturas de bacilos *Mtb* deva resultar na formação intracelular do aduto INH-NAD a partir da INH liberada desse composto. A detecção desse aduto nos extratos celulares não é trivial, não tendo sido reportada na literatura.

## ANEXOS

Artigo aceito como primeira autora na revista Journal of Chemical Technology and Biotechnology (F.I 2.659)

### Research Article



Received: 23 March 2018

Revised: 19 June 2018

Accepted article published: 26 July 2018

Published online in Wiley Online Library: 22 August 2018

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jctb.5782

# Production and optimization of isopropyl palmitate via biocatalytic route using home-made enzymatic catalysts

Laísa Q Barsé,<sup>a</sup> Natália G Graebin,<sup>a</sup> Eliane P Cipolatti,<sup>b</sup> Julia M Robert,<sup>b</sup> Martina CC Pinto,<sup>b,c</sup> Jose CCS Pinto,<sup>c</sup> Denise MG Freire<sup>b</sup> and Rafael C Rodrigues<sup>a\*</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** This study investigated the use of core–shell biocatalysts, synthesized using recombinant lipase B from *Candida antarctica* (CALB), for the production of isopropyl palmitate and the optimization of this biocatalytic route.

**RESULTS:** Initially, three distinct core–shell biocatalysts, were evaluated for the production of isopropyl palmitate and the CALB-P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB) biocatalyst (biocatalyst made of polystyrene-co-divinylbenzene core–shell particles) was the most suitable biocatalyst for this purpose. The effect of organic solvents – n-hexane, isoctane, n-heptane and cyclohexane – in the ester conversion was evaluated, and the most suitable solvent was the isoctane. The optimal reaction conditions were pursued conducting an optimization statistical analysis. The most suitable reaction conditions were identified: reaction temperature, 55°C; substrate molar ratio, 1:1.42 (palmitic acid: isopropyl alcohol); biocatalyst content, 24% w/w. Finally, the reuse of the biocatalyst was evaluated and the relative enzymatic activity remained up to 50% after the fourth cycle.

**CONCLUSION:** Results were compared with commercial biocatalyst and the home-made enzymatic biocatalyst (CALB-P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB) showed promise for application in the synthesis of isopropyl palmitate. The optimization study improved reaction conversion from 30% to 78%. The home-made biocatalysts exhibited better performance for the synthesis of isopropyl palmitate compared with the commercial Novozym 435, using the same enzymatic activity.  
 © 2018 Society of Chemical Industry

**Keywords:** isopropyl palmitate; biocatalyst route; home-made biocatalyst; optimization

Artigo aceito como coautora na revista Process Biochemistry (F.I 2.883)

Process Biochemistry 71 (2018) 101–108



Contents lists available at ScienceDirect

## Process Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/procbio](http://www.elsevier.com/locate/procbio)



### Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates of dextranase from *Leuconostoc mesenteroides* B-512F



Natália G. Graebin, Diandra de Andrade, Laísa Quadros Barsé, Rafael C. Rodrigues,  
Marco A.Z. Ayub\*

*Biotechnology, Bioprocess, and Biocatalysis Group, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil*

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Dextranase  
Cross-linked enzyme aggregates  
Dextran layer  
Glutaraldehyde  
Oligosaccharides

#### ABSTRACT

We describe the development of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of dextranase of *Leuconostoc mesenteroides* B-512 F. Treatments of enzyme preparation using dextranase were evaluated varying incubation time to remove the dextran layer involving the enzyme molecule, turning it suitable for immobilization. Results showed 21 days of treatment as the best outcome. Subsequently, we tested different water-miscible organic solvents as precipitants, the reaction and centrifugation times, and the concentration of cross-linker agent (glutaraldehyde) in the preparation of CLEA. Optimal conditions were: the use of isopropanol as solvent, 30 min of centrifugation time, 3 h of cross-linking time, and 100 mM of glutaraldehyde. A central composite design was carried out to optimize conditions to obtain the highest enzymatic activity, testing the pH (3.0–7.0) and temperature (20 °C–60 °C). Results showed that dextranase CLEA operate at optimal pH of 3.0 and temperature of 60 °C. The operational stability of the immobilized biocatalyst showed up to 30% of residual activity after 10 cycles of reuse, in a solution of 100 mM of sucrose and 600 mM of maltose. The preparation of dextranase CLEA is described for the first time and results suggest that this novel immobilized biocatalyst has potential in many industrial applications.

Artigo aceito como coautora na revista Enzyme and Microbial Technology (F.I 3.63)

[Enzyme and Microbial Technology 134 \(2020\) 109468](#)



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

## Enzyme and Microbial Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/enzmictec](http://www.elsevier.com/locate/enzmictec)



### Cloning and expression of the *Bacillus amyloliquefaciens* transglutaminase gene in *E. coli* using a bicistronic vector construction



Lovaine Silva Duarte<sup>a</sup>, Laísa Quadros Barsé<sup>b</sup>, Pedro Ferrari Dalberto<sup>b</sup>, William Tadeu Santos da Silva<sup>a</sup>, Rafael Costa Rodrigues<sup>a</sup>, Pablo Machado<sup>b</sup>, Luiz Augusto Basso<sup>b</sup>, Cristiano Valim Bizarro<sup>b</sup>, Marco Antônio Záchia Ayub<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Biotechnology, Bioprocess, and Biocatalysis Group, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 92A TECNOPUC Building, 4592 Av. Bento Gonçalves, ZC 90650-001, Porto Alegre, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Transglutaminase  
Microbial transglutaminase  
Protein cross-linking  
Food enzymes  
*Bacillus amyloliquefaciens*

#### ABSTRACT

Transglutaminases (TGases) are a class of transferases widely used in the food and biotechnology industries. In this work, we describe the production of recombinant *Bacillus amyloliquefaciens* TGase in *Escherichia coli*, obtaining the protein in its soluble and active form. In order to reduce TGase activity inside host cells and consequently its toxicity, we constructed a bicistronic plasmid containing the *B. amyloliquefaciens* TGase gene fused to the inhibitory *Streptomyces caniferus* prodomain. To make the enzyme active and avoid the need of prodomain removal *in vitro*, we also cloned the 3C protease gene into the same plasmid. After a fast single-step purification protocol, we obtained a partially purified recombinant TGase with 37 mU/mg protein activity, that crosslinked bovine serum albumin (BSA). This is the first report on the expression of *B. amyloliquefaciens* TGase in *E. coli* in its mature and active form.

## REFERÊNCIAS

- ABBADI, Bruno L. et al. Is IQG-607 a potential metallodrug or metallopro-drug with a defined molecular target in *Mycobacterium tuberculosis*? **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. MAY, p. 1–21, 2018. a.
- ABBADI, Bruno L. et al. Revisiting Activation of and Mechanism of Resistance to Compound IQG-607 in *Mycobacterium tuberculosis*. [s. l.], v. 62, n. 2, p. 1–5, 2018. b.
- AMORIM, Camila F. et al. Inhibitory activity of pentacyano(isoniazid) ferrate(II), IQG-607, against promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania braziliensis*. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 1–13, 2017.
- BARDOU, Fabienne et al. Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, [s. l.], v. 144, n. 9, p. 2539–2544, 1998.
- BARRY, Nicolas P. E.; SADLER, Peter J. Exploration of the medical periodic table: Towards new targets. **Chemical Communications**, [s. l.], v. 49, n. 45, p. 5106–5131, 2013.
- BASSO, Luiz A. et al. An Inorganic Complex that Inhibits *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl Reductase as a Prototype of a New Class of Chemotherapeutic Agents to Treat Tuberculosis. [s. l.], v. 21, n. 7, p. 1384–1389, 2010.
- BERGVAL, Indra L. et al. Resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* selected in vitro do not reflect the in vivo mechanism of isoniazid resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 515–523, 2009.
- BERTRAND, Thomas et al. Crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 279, n. 37, p. 38991–38999, 2004.
- BROSSIER, Florence et al. The in vitro mechanisms of isoniazid and ethionamide resistance poorly reflect those in vivo in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, [s. l.], v. 101, p. 144–145, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2016.09.028>>
- BRUIJNINCX, Pieter Ca Pca; SADLER, Pj Peter J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 197–206, 2008.
- CADE, Christine E. et al. Isoniazid-resistance conferring mutations in *Mycobacterium tuberculosis* KatG: Catalase, peroxidase, and INH-NADH adduct formation activities. **Protein Science**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 458–474, 2010.
- CARPENA, Xavi et al. Catalase-peroxidase KatG of *Burkholderia pseudomallei* at 1.7 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 327, n. 2, p. 475–489, 2003.
- CATTAMANCHI, Adithya et al. Clinical Characteristics and Treatment Outcomes of Patients with Isoniazid-Monoresistant Tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 179–185, 2009.

CHORINE, V. Action de l'amide nicotinique sur les bacilles du genre *Mycobacterium*. **CR Acad Sci (Paris)**, [s. l.], v. 220, p. 150–151, 1945.

DEVITO, Joseph A. et al. Exploring the Structure and Function of the Mycobacterial KatG Protein Using trans -Dominant Mutants Exploring the Structure and Function of the Mycobacterial KatG Protein Using trans -Dominant Mutants. [s. l.], v. 47, n. 1, p. 188–195, 2003.

DIAZ, G. A.; WAYNE, L. G. Isolation and characterization of catalase produced by *Mycobacterium tuberculosis*. **Am Rev Respir Dis**, [s. l.], v. 110, n. 3, p. 312–319, 1974.

DÖRR, Markus; MEGGERS, Eric. Metal complexes as structural templates for targeting proteins. **Current Opinion in Chemical Biology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 76–81, 2014.

DRLICA, K.; ZHAO, X. Mutant Selection Window Hypothesis Updated. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 681–688, 2007.

FOX, H. Herbert. Lthough T E E Vividly Descriptive. [s. l.], 1952.

GANGADHARAM, P R J, HAROLD, F, M, SCHAEFER, W, B. Selective Inhibition of Nucleic Acid Synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* by Isoniazid. **Nature Publishing Group**, [s. l.], v. 198, n. 4881, p. 712–714, 1963.

GHILADI, Reza A. et al. The Met-Tyr-Trp cross-link in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG): Autocatalytic formation and effect on enzyme catalysis and spectroscopic properties. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 280, n. 24, p. 22651–22663, 2005. a.

GHILADI, Reza A. et al. Correlation between isoniazid resistance and superoxide reactivity in *Mycobacterium tuberculosis* KatG. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 127, n. 38, p. 13428–13442, 2005. b.

GHILADI, Reza A.; CABELLI, Diane E.; ORTIZ DE MONTELLANO, Paul R. Superoxide Reactivity of KatG: Insights into Isoniazid Resistance Pathways in TB. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 126, n. 15, p. 4772–4773, 2004.

GHILADI, Reza A.; MEDZIHRADSZKY, Katalin F.; ORTIZ DE MONTELLANO, Paul R. Role of the Met-Tyr-Trp cross-link in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) as revealed by KatG(M255I). **Biochemistry**, [s. l.], v. 44, n. 46, p. 15093–15105, 2005.

**Global Tuberculosis.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>>

ITO, Kimiko; YAMAMOTO, Koji; KAWANISHI, Shosuke. Manganese-Mediated Oxidative Damage of Cellular and Isolated DNA by Isoniazid and Related Hydrazines: Non-Fenton-Type Hydroxyl Radical Formation. **Biochemistry**, [s. l.], v. 31, n. 46, p. 11606–11613, 1992.

JOHNSSON, Kai; SCHULTZ, Peter G. Mechanistic Studies of the Oxidation of Isoniazid by

the Catalase Peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of the American Chemical Society**, [s. l.], v. 116, n. 16, p. 7425–7426, 1994.

KAPETANAKI, Sofia et al. Conformational differences in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase KatG and its S315T mutant revealed by resonance raman spectroscopy. **Biochemistry**, [s. l.], v. 42, n. 13, p. 3835–3845, 2003.

KOCH, Robert. I. Die Aetiologie der Tuberkulose: Nach einem in der physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 24. März cr. gehaltenen Vortrage. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie**, [s. l.], v. 251, n. 3, p. 287–296, 1882. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0174303182800991>>

LAWSON, Lovett et al. A molecular epidemiological and genetic diversity study of tuberculosis in Ibadan, Nnewi and Abuja, Nigeria. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 6, 2012.

LOEWEN, P. C.; KLOTZ, M. G.; HASSETT, D. J. Catalases -an “old” enzyme that continues to surprise us. **ASM News**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 76–82, 2000.

LONG, ER. **The chemistry and chemotherapy of tuberculosis, 3rd ed.** [s.l.: s.n.].

MCCLATCHY, J. K. Mechanism of Action of Isoniazid on *Mycobacterium bovis* Strain BCG. **Infection and immunity**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 530–4, 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC16190/>>

MEGGERS, Eric. Targeting proteins with metal complexes. **Chemical Communications**, [s. l.], n. 9, p. 1001–1010, 2009.

MENZIES, Dick et al. Standardized treatment of active tuberculosis in patients with previous treatment and/or with mono-resistance to isoniazid: A systematic review and meta-analysis. **PLoS Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 9, 2009.

MEYER, Hans; MALLY, Josef. Über Hydrazinderivate der Pyridincarbonsäuren. **Monatshefte für Chemie und verwand Teile anderer Wissenschaften; gesammelte Abhandlungen aus den Sitzungsberichten der Kaiserlichen Akademie der**, [s. l.], v. 2493, n. 1898, p. 393–414, 1912.

MIDDLEBROOK, G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazide and the incidence of variants resistant to the drug in vitro. **American review of tuberculosis**, [s. l.], v. 65, n. 6, p. 765–767, 1952. a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14924201>>

MIDDLEBROOK, G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazide and the incidence of variants resistant to the drug in vitro. **American review of tuberculosis**, [s. l.], v. 65, n. 6, p. 765–767, 1952. b.

MIDDLEBROOK, G. Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli; a preliminary report. **Am. Rev. Tuberc.**, [s. l.], v. 69, p. 471, 1954.

MINION, Jessica et al. Multidrug and Extensively Drug-resistant Tuberculosis in Canada 1997-2008: Demographic and Disease Characteristics. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–8, 2013.

MITCHISON, D.A., SELKON, J. B. The bactericidal activities of antituberculous drugs. **Am. Rev. Tuberc.**, [s. l.], v. 74, p. 109–116, 1956.

MONTELONGO-PERALTA, L. Z. et al. Antibacterial Activity of combinatorial treatments composed of transition-metal/antibiotics against *Mycobacterium tuberculosis*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 5471, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-019-42049-5>>

NACHEGA, Jean B.; CHAISSON, Richard E. Tuberculosis Drug Resistance : A Global Threat. [s. l.], v. 21231, n. Suppl 1, 2003.

NG, Vincent H. et al. Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: Countering the phagocyte oxidative burst. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 1291–1302, 2004.

OLIVEIRA, Jaim et al. Slow-Onset Inhibition of 2-trans-Enoyl-ACP (CoA) Reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an Inorganic Complex. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 12, n. 19, p. 2409–2424, 2006.

OLIVEIRA, Jaim S. et al. An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemical Communications**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 312–313, 2004.

RILEY, R. L. et al. AERIAL DISSEMINATION OF PULMONARY TUBERCULOSIS A TWO-YEAR STUDY OF CONTAGION IN A TUBERCULOSIS WARD1. **American Journal of Epidemiology**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 185–196, 1959. Disponível em: <<https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.aje.a120069>>. Acesso em: 2 set. 2018.

RODRIGUES-JUNIOR, Valnês S. et al. Activity of IQG-607, a new orally active compound, in a murine model of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 182–185, 2012.

RODRIGUES-JUNIOR, Valnês S. et al. IQG-607 abrogates the synthesis of mycolic acids and displays intracellular activity against *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 82–85, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.08.021>>

RODRIGUES-JUNIOR, Valnês S. et al. Preclinical safety evaluation of IQG-607 in rats: Acute and repeated dose toxicity studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 86, p. 11–17, 2017. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.02.016>>

RODRIGUES-JUNIOR, Valnês S. et al. Toxicological profile of IQG-607 after single and repeated oral administration in minipigs: An essential step towards phase I clinical trial. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 90, p. 78–86, 2017. b. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.yrph.2017.08.015>>

SCHAEFER, W. B. The effect of isoniazid on growing and resting tubercle bacilli. **Am. Rev. Res. Dis.**, [s. l.], v. 69, p. 125–127, 1954.

SINGH, Aishwarya et al. Wild-type catalase peroxidase vs G279D mutant type: Molecular basis of Isoniazid drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Gene**, [s. l.], v. 641, n. October 2017, p. 226–234, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.10.047>>

SLAYDEN, Richard A.; BARRY, Clifton E. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 659–669, 2000.

SOUSA, Eduardo H. S. et al. Electron transfer kinetics and mechanistic study of the thionicotinamide coordinated to the pentacyanoferate(III)/(II) complexes: A model system for the in vitro activation of thioamides anti-tuberculosis drugs. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 368–375, 2005.

TAKAYAMA, K.; WANG, L.; DAVID, H. L. Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 29–35, 1972.

TSUKAMURA, M., TSUKAMURA, S. Isotopic studies on the effect of isoniazid on protein synthesis of mycobacteria. **Jap. J. Tuber. Chest Dis.**, [s. l.], v. 11, p. 14–27, 1963.

VASCONCELOS, I. B. et al. The mode of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* wild-type and isoniazid-resistant 2-trans-enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes by an inorganic complex. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 50–62, 2008.

WENGENACK, N. L. et al. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* KatG(S315T) is a competent catalase-peroxidase with reduced activity toward isoniazid. **The Journal of infectious diseases**, [s. l.], v. 176, n. 3, p. 722–727, 1997.

WENGENACK, N. L. et al. Evidence for differential binding of isoniazid by *Mycobacterium tuberculosis* KatG and the isoniazid-resistant mutant KatG(S315T). **Biochemistry**, [s. l.], v. 37, n. 45, p. 15825–15834, 1998.

WENGENACK, N. L. et al. *Mycobacterium tuberculosis* KatG is a peroxynitritase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 256, n. 3, p. 485–487, 1999.

WENGENACK, N. L. et al. Redox potential measurements of the *Mycobacterium tuberculosis* heme protein KatG and the isoniazid-resistant enzyme KatG(S315T): Insights into isoniazid activation. **Biochemistry**, [s. l.], v. 39, n. 37, p. 11508–11513, 2000.

WHITNEY, James B.; WAINBERG, Mark A. Isoniazid, the frontline of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **McGill Journal of Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 114–123, 2002.

WHO. World Health Organization. The End TB Strategy. (2015). WHO, Geneva, Switzerland. [http://www.who.int/tb/post2015\\_TBstrategy.pdf](http://www.who.int/tb/post2015_TBstrategy.pdf) (Accessed 23rd April 2018). **World Health Organization**, [s. l.], 2015.

WINDER, F. The antibacterial action of streptomycin, isoniazid and PAS. **Chemotherapy of Tuberculosis**, [s. l.], p. 111–149, 1964.

WINDER, F. G. Mode of action of the antimycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of the mycobacteria. **Biol. Mycobact.**, [s. l.], v. 1, p. 353–438, 1982.

WINDER, F. G.; COLLINS, P. B. Inhibition by Isoniazid of Synthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of General Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 41–48, 1970. a. Disponível em: <<http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-63-1-41>>

WINDER, F. G.; COLLINS, P. B. Inhibition by Isoniazid of Synthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of General Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 41–48, 1970. b.

WINDER, F. G.; ROONEY, S. A. The effects of isoniazid on the carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis* BCG. **J Gen Microbiol**, [s. l.], v. 177, p. 355–368, 1970.

WINDER, Frank. Catalase and Peroxidase in Mycobacteria 1, 2: Possible Relationship to the Mode of Action of Isoniazid. **American Review of Respiratory Disease**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 68–78, 1960.

YU, Shengwei et al. Reduced affinity for isoniazid in the S315T mutant of *Mycobacterium tuberculosis* KatG is a key factor in antibiotic resistance. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 278, n. 17, p. 14769–14775, 2003.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria de Graduação  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [prograd@pucrs.br](mailto:prograd@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br](http://www.pucrs.br)