

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea in Biologia Molecolare



Elaborato di Laurea

**La fosfatidil-mio-inositolo dimannoside aciltransferasi PatA è essenziale per
la crescita di *Mycobacterium tuberculosis* *in vitro* ed *in vivo***

Tutor: Prof.ssa Roberta Provvedi

Dipartimento di Biologia

Co-tutor: Dott.ssa Marta Conflitti

Dipartimento di Medicina Molecolare

Laureando: Matteo D'Urso

Anno Accademico 2021-2022

INDICE

ABSTRACT	7
1. STATO DELL'ARTE: <i>Introduzione al problema biologico</i>	10
1.1 La tubercolosi: epidemiologia, patogenesi e trattamento.	10
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : caratteristiche ed organizzazione della parete.	12
1.3 Pathway biosintetico dei fosfatidil-mio-inositolo mannosidi.	13
2. APPROCCIO SPERIMENTALE: <i>Materiali e metodi</i>	15
2.1 Ceppo batterico e mezzo di coltura.	15
2.2 Costruzione del ceppo mutante condizionale di <i>Mtb</i> , TB506.1	15
2.3 Estrazione dell'RNA e RT-PCR.	18
2.4 Estrazione dei lipidi e caratterizzazione del profilo lipidico mediante cromatografia su strato sottile (TLC).	19
2.5 Infezione dei macrofagi.	20
2.6 Infezione intranasale di topo.	21
3. RISULTATI E DISCUSSIONE:	22
3.1 Il silenziamento di <i>patA</i> in colture axeniche è battericida.	22
3.2 L'assenza di <i>patA</i> influenza sensibilmente la biosintesi dei PIMs.	24
3.3 <i>patA</i> è essenziale in <i>Mtb</i> per l'infezione dei macrofagi.	25
3.4 <i>patA</i> è essenziale per la crescita di <i>Mtb</i> in topo.	26
4. CONCLUSIONI	27
5. BIBLIOGRAFIA	28

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) è un batterio appartenente al genere *Mycobacterium*. La caratteristica cardine di questa categoria di microorganismi è la composizione prettamente lipofila della parete cellulare dovuta alla presenza di lipoglicani e lipidi che rende i micobatteri particolarmente resistenti nei confronti di farmaci idrofili, facendo sì che il trattamento della tubercolosi sia ostico; inoltre la recente diffusione di ceppi multi-farmaco resistenti (MDR-TB) ed ampiamente farmaco resistenti (XDR-TB), rende imperativo lo sviluppo di nuovi e sofisticati approcci terapeutici per contrastare questo patogeno.

La trattazione che segue ha come oggetto PatA, enzima transmembrana chiave per *Mtb*, coinvolto nelle prime fasi della via biosintetica dei fosfatidil-mio-inositolo mannosidi (PIMs), glicolipidi componenti la parete di *Mtb* e precursori di lipomannani e lipoarabinomannani, fattori di virulenza direttamente implicati nell'interazione ospite-patogeno. L'essenzialità dell'enzima per la fisiologia del microorganismo è stata dimostrata generando un mutante condizionale mediante il sistema TetR/PipOFF, che permette di regolare finemente l'espressione del gene posto sotto il suo controllo, ivi rappresentato da *rv2611c*, codificante l'aciltransferasi (PatA), aggiungendo ATc al mezzo di crescita.

La funzionalità dell'enzima si è rivelata fondamentale in diversi ambiti quali crescita, virulenza e resistenza ai farmaci del batterio *in vitro* ed *in vivo*. Questo studio mira a caratterizzare i processi fisiologici propri di *Mtb* attraverso un approccio di genetica inversa e a identificare gli effettori di tali processi, i quali rappresentano bersagli per nuovi metodi terapeutici.



The Phosphatidyl-*myo*-Inositol Dimannoside Acyltransferase PatA Is Essential for *Mycobacterium tuberculosis* Growth *In Vitro* and *In Vivo*

Francesca Boldrin,^a Itxaso Anso,^b Sogol Alebouyeh,^c Iker A. Sevilla,^d Mariví Geijo,^d Joseba M. Garrido,^d Alberto Marina,^b Laura Cioetto Mazzabò,^a Greta Segafreddo,^a Marcelo E. Guerin,^{b,*} Riccardo Manganelli,^a Rafael Prados-Rosales^e

^aDepartment of Molecular Medicine, University of Padova, Padua, Italy

^bCenter for Cooperative Research in Biosciences (CIC bioGUNE), Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Spain

^cDepartment of Preventive Medicine and Public Health and Microbiology, Autònoma University of Madrid, Madrid, Spain

^dAnimal Health Department, NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Derio, Spain

^eKEKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain

ABSTRACT *Mycobacterium tuberculosis* comprises an unusual cell envelope dominated by unique lipids and glycans that provides a permeability barrier against hydrophilic drugs and is central for its survival and virulence. Phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides (PIMs) are glycolipids considered to be not only key structural components of the cell envelope but also the precursors of lipomannan (LM) and lipoarabinomannan (LAM), important lipoglycans implicated in host-pathogen interactions. Here, we focus on PatA, a membrane-associated acyltransferase that transfers a palmitoyl moiety from palmitoyl coenzyme A (palmitoyl-CoA) to the 6-position of the mannose ring linked to the 2-position of inositol in PIM₁/PIM₂. We validate that the function of PatA is vital for *M. tuberculosis* *in vitro* and *in vivo*. We constructed a *patA* conditional mutant and showed that silencing *patA* is bactericidal in batch cultures. This phenotype was associated with significantly reduced levels of Ac₁PIM₂, an important structural component of the mycobacterial inner membrane. The requirement of PatA for viability was also demonstrated during macrophage infection and in a mouse model of infection, where a dramatic decrease in viable counts was observed upon silencing of the *patA* gene. This is reminiscent of the behavior of PimA, the mannosyltransferase that initiates the PIM pathway, also found to be essential for *M. tuberculosis* growth *in vitro* and *in vivo*. Altogether, the experimental data highlight the significance of the early steps of the PIM biosynthetic pathway for *M. tuberculosis* physiology and reveal that PatA is a novel target for drug discovery programs against this major human pathogen.

IMPORTANCE Tuberculosis (TB) is the leading cause of death from a single infectious agent. The emergence of drug resistance in strains of *M. tuberculosis*, the etiologic agent of TB, emphasizes the need to identify new targets and antimicrobial agents. The mycobacterial cell envelope is a major factor in this intrinsic drug resistance. Here, we have focused on the biosynthesis of PIMs, key virulence factors and important components of the cell envelope. Specifically, we have determined that PatA, the acyltransferase responsible for the first acylation step of the PIM synthesis pathway, is essential in *M. tuberculosis*. These results highlight the importance of early steps of the PIM biosynthetic pathway for mycobacterial physiology and the suitability of PatA as a potential new drug target.

KEYWORDS tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, conditional mutant, acyltransferase, glycolipid, mycobacterium

Mycobacterium tuberculosis, the etiologic agent of tuberculosis (TB), is the second most deadly infectious agent in the world after HIV. In 2018, there were about 10 million new cases and 1.2 million deaths from TB, with an estimated one-quarter of

Citation Boldrin F, Anso I, Alebouyeh S, Sevilla IA, Geijo M, Garrido JM, Marina A, Mazzabò LC, Segafreddo G, Guerin ME, Manganelli R, Prados-Rosales R, 2021. The phosphatidyl-*myo*-inositol dimannoside acyltransferase PatA is essential for *Mycobacterium tuberculosis* growth *in vitro* and *in vivo*. *J Bacteriol* 203:e00439-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00439-20>.

Editor Laurie E. Comstock, Brigham and Women's Hospital/Harvard Medical School
Copyright © 2021 American Society for Microbiology. All rights reserved.

Address correspondence to Riccardo Manganelli, riccardo.manganelli@unipd.it, or Rafael Prados-Rosales, rafael.prados@uam.es.

Received 30 July 2020

Accepted 30 December 2020

Accepted manuscript posted online 19 January 2021

Published 8 March 2021

1. STATO DELL'ARTE: *INTRODUZIONE AL PROBLEMA BIOLOGICO.*

1.1 La tubercolosi: epidemiologia, patogenesi e trattamento.

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), agente eziologico della tubercolosi, è un batterio appartenente al gruppo MTBC (“*Mycobacterium tuberculosis complex*”), costituito da cinque specie del genere *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. bovis*), le quali, accumulate da un'elevata omologia di sequenza genomica, sono in grado di causare la tubercolosi nell'uomo ed in altri animali, mediante l'iniziale infezione dei macrofagi alveolari.

La tubercolosi (TB), infatti, è una malattia a trasmissione respiratoria molto antica, caratterizzata dalla comparsa, in seguito all'infezione primaria, di lesioni polmonari tipiche, note come “tubercoli”, costituite da un core di necrosi caseosa, circondato da macrofagi fusi tra loro nel formare le cosiddette “cellule giganti di Langhans”, da linfociti Th1 e da cellule epitelioidi, sempre derivanti dall'attivazione dei macrofagi.

Un'efficace risposta immunitaria cellulo-mediata dell'ospite contro *Mtb* determina la risoluzione dell'infezione primaria, la calcificazione delle lesioni granulomatose e l'instaurarsi della forma latente e asintomatica della malattia; in caso contrario, invece, essa evolve da locale a sistemica (si parla, in particolare, di “tubercolosi miliare”), con la diffusione del micobatterio a livello di fegato, reni, tessuto osseo, linfonodi, cute e SNC (sviluppo di meningite tubercolare). Questa seconda casistica si riscontra tipicamente in situazioni di immunodepressione, derivanti, ad esempio, dalla compresenza dell'AIDS, da trattamenti prolungati con corticosteroidi o dalla somministrazione di chemioterapia.

L'incidenza della tubercolosi nel mondo è altamente variabile ed inversamente proporzionale alla qualità delle condizioni igienico-sanitarie dei singoli Paesi, nonostante, in generale, l'incidenza della malattia si sia notevolmente ridotta a partire dagli anni Quaranta del secolo scorso, grazie all'introduzione dei primi farmaci contro il batterio ed alla progressiva vaccinazione della popolazione. In tempi più recenti, invece, nel 2020, secondo il report annuo stilato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (**Figura 1**), le Nazioni con il maggior numero di casi di tubercolosi (oltre 500 ogni 100.000 abitanti) sono state Repubblica Centrafricana, Corea del Nord, Gabon, Lesotho, Filippine e Sudafrica; nei continenti americano ed europeo, invece, la maggior parte dei Paesi presentava un tasso di incidenza di TB basso (meno di 10 casi ogni 100.000 abitanti). È interessante notare come il 56% dei casi di infezione da *Mtb* riportati nel 2020 siano stati uomini, contro le percentuali del 33% e dell'11%, rispettivamente per donne e bambini, a testimonianza di come gli adulti di sesso maschile siano più suscettibili alla malattia.

Nel 2019, sempre secondo l'OMS [1], *Mtb* è stato l'agente infettivo responsabile del maggior numero di morti annue, titolo fino ad allora conteso con HIV; nel 2020, poi, il numero di morti a causa dell'infezione da *Mtb* (1.3 milioni) è stato quasi il doppio del numero di vittime di HIV/AIDS (0.68 milioni), anche se, quell'anno,

l'agente infettivo con la maggiore mortalità è stato SARS-CoV-2. Il suo impatto sulla lotta contro la tubercolosi, inoltre, è stato pesante: mentre, dal 2005 fino al 2019, si era osservata una costante diminuzione del numero di morti annue da TB, nel 2020 questa tendenza in discesa è stata interrotta, con una mortalità di TB pari a quella calcolata nel 2017.

Se non trattata, la tubercolosi è una malattia ad elevata mortalità: ad oggi, fortunatamente, per contrastarla si hanno a disposizione un vaccino profilattico, il BCG (“Bacillo di Calmette e Guerin”, dal nome dei due studiosi francesi che, nel 1913, lo hanno prodotto per la prima volta in Francia, mediante l’attenuazione di un ceppo di *M. bovis*) e numerosi farmaci antitubercolari, distinti in farmaci di prima linea (isoniazide, etambutolo, rifampicina e pirazinamide) e farmaci di seconda linea (fluorochinoloni, acido para-aminosalicilico, streptomina, capreomicina ed etionamide). Molti di essi inibiscono l’attività di enzimi coinvolti nella biosintesi della parete di *Mtb*, struttura essenziale per la sopravvivenza del micobatterio: l’isoniazide, ad esempio, blocca la sintesi degli acidi micolici [2].

I farmaci di prima linea vengono somministrati in modo combinato, regolare e per 6 mesi per trattare infezioni in atto, sostenute da ceppi di *Mtb* sensibili ai farmaci, mentre quelli di seconda linea vengono utilizzati contro ceppi micobatterici più virulenti, in quanto resistenti ai farmaci di prima linea: si tratta, in particolare, dei ceppi MDR-TB (“Multidrug-resistant TB”) ed XDR-TB (“Extensively drug-resistant TB”), sviluppati a causa di terapie antitubercolari interrotte prematuramente o condotte in modo scostante. Più nello specifico, i ceppi MDR-TB sono insensibili al trattamento con isoniazide e rifampicina, i farmaci antitubercolari di prima linea più efficaci, motivo per cui devono essere trattati con farmaci di seconda linea per un lungo periodo di tempo (fino a due anni); i ceppi XDR-TB, invece, sono resistenti anche ai farmaci di seconda linea più potenti, per cui una loro infezione ha tipicamente un esito fatale.

Dal momento che i ceppi MDR-TB ed XDR-TB rappresentano tutt’ora un grande ostacolo per la sconfitta definitiva della tubercolosi, è fondamentale la ricerca e la caratterizzazione di strutture o pathways metabolici del micobatterio da sfruttare come targets di nuove terapie farmacologiche.

Estimated TB incidence rates, 2020

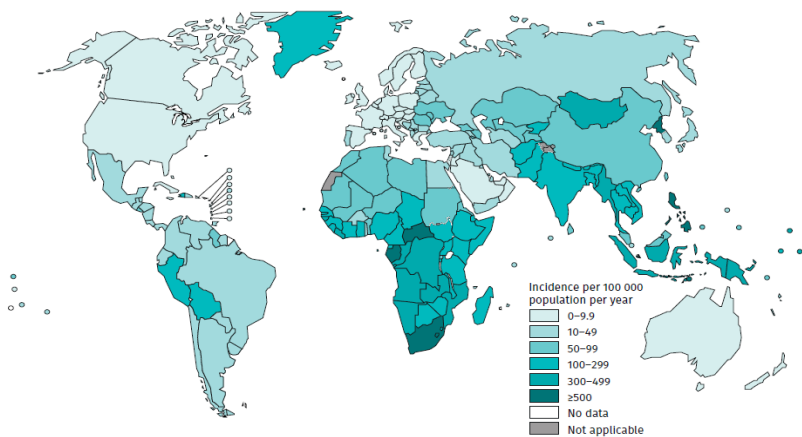


Figura 1)
Distribuzione dei casi di tubercolosi nel mondo (numero di casi ogni 100.000 abitanti/anno)[1].

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*: caratteristiche ed organizzazione della parete.

Il successo di *Mtb* come patogeno dipende da numerosi fattori: in primis, il fatto che il batterio è in grado di infettare e sopravvivere per decenni all'interno dei macrofagi, sfuggendo sia alle difese immunitarie dell'ospite, sia all'azione degli antibiotici. In ciò *Mtb* è favorito dalla peculiare composizione della sua parete cellulare (**Figura 2**), una struttura complessa ed unica nel suo genere, formata da glicolipidi, polisaccaridi, peptidoglicano e cere, che, in virtù della loro marcata idrofobicità, non permettono l'ingresso di farmaci idrofilici all'interno della cellula e la proteggono dall'ambiente battericida presente nei macrofagi.

La parete cellulare di *Mtb*, fondamentale per la patogenesi e per l'evasione dalle difese dell'ospite, è costituita da diversi strati, il primo dei quali è rappresentato dalla membrana interna, o plasmatica, del micobatterio, formata principalmente da fosfolipidi contenenti glicerolo, soprattutto fosfatidiletanolamine, e da fosfatidilinositol-mannosidi, il cui pathway biosintetico verrà discusso in questa tesi.

Al di sopra della membrana plasmatica si estende lo spazio del periplasma, formato principalmente da lipomannani (LM) e lipoarabinomannani (LAM), dove questi ultimi costituiscono un gruppo eterogeneo di lipopolisaccaridi fosforilati, ancorati alla membrana plasmatica, che si estende per tutto lo spessore della parete cellulare, fungendo da fattore di virulenza per *Mtb*.

Legati non covalentemente alle componenti del periplasma si trovano dei complessi arabinogalattano-peptidoglicano (AGP): le molecole di peptidoglicano, unite tra loro da legami peptidici, conferiscono alla parete micobatterica forma, rigidità ed anche resistenza agli stress osmotici; le molecole di arabinogalattano, formate da monomeri di arabinosio e di galattosio, sono unite covalentemente al peptidoglicano ed, espandendosi per tutto lo spessore della parete, arrivano ad interagire con gli acidi micolici, presenti in abbondanza nello strato più superficiale della parete stessa, rappresentato dalla membrana esterna.

Quest'ultima è costituita da molecole altamente lipofile caratteristiche dei micobatteri: tra di esse si trovano in abbondanza glicolipidi contenenti acidi micolici, degli acidi grassi a catena lunga e ramificata, con un numero di atomi di carbonio compreso tra 70 e 90, legati alla porzione più distale dell'arabinogalattano, non immunogenici ed importanti per la regolazione della fluidità della membrana esterna, la quale contiene anche altre categorie di molecole lipofile, tra cui solfoglucolipidi, diaciltrealosi, poliaciltrealosi e ftioceroli dimicocerosati (cere). La membrana esterna ospita anche diverse classi di proteine, alcune delle quali, simili alle porine, sono coinvolte nell'assorbimento di nutrienti indispensabili per la sopravvivenza del batterio [3].

Al di sopra della parete batterica si trova un ulteriore strato, quello della capsula, avente una struttura piuttosto lassa e costituita prevalentemente da polisaccaridi e peptidi.

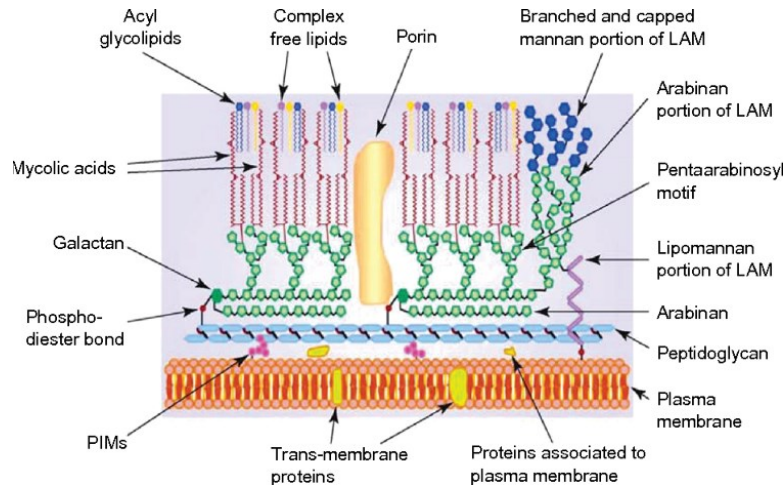


Figura 2) Organizzazione della parete di Mtb [4].

1.3 Pathway biosintetico dei fosfatidil-mio-inositolo mannosidi.

I fosfatidil-mio-inositolo mannosidi (PIMs), sono dei glicolipidi comuni a diversi micobatteri ed anche ad altri actinomiceti, presenti in grandi quantità nelle membrane interna ed esterna della parete micobatterica; la loro struttura di base è rappresentata dal fosfatidil-mio-inositolo (PI), cui possono essere aggiunti fino a 6 residui di mannosio e fino a 4 gruppi acilici.

Ac_1PIM_2 e Ac_2PIM_2 , che sono dei fosfatidil-mio-inositolo dimannosidi rispettivamente tri- e tetra-acilati, sono considerabili sia prodotti metabolici finali, in quanto presenti nelle membrane micobatteriche, sia intermedi biosintetici di altri lipoglicani esamannosidati, dei lipomannani e dei lipoarabinomannani, tutte molecole di parete che fungono da fattori di virulenza nell'interazione ospite-patogeno.

La biosintesi dei PIMs (**Figura 3**) avviene in entrambi i foglietti della membrana interna: il primo step, in particolare, avviene nel versante citoplasmatico ed è catalizzato dall'enzima PimA, una mannosiltrasferasi, che trasferisce un residuo di mannosio dal GDP-mannosio (GDP-Man) alla seconda posizione dell'anello di mio-inositolo contenuto all'interno del fosfatidilmioinositolo, determinando la formazione di fosfatidil-mio-inositolo monomannoside (PIM_1). Questa è codificata nello stesso operone comprendente anche PipA, un altro enzima coinvolto nella biosintesi dei PIMs. Successivamente una seconda mannosiltrasferasi, PimB, attua un'ulteriore mannosilazione in posizione 6 dell'anello di mio-inositolo di PIM_1 , producendo un dimannoside che, stavolta, prende il nome di PIM_2 [5].

A questo punto l'aciltransferasi PatA catalizza il trasferimento di un gruppo palmitoile dal suo cofattore, il palmitoil-coenzima A (palmitoil-CoA), al carbonio 6 del residuo di mannosio trasferito precedentemente da PimA per formare PIM_1 e PIM_2 : questa reazione di acilazione comporta, rispettivamente, la formazione di Ac_1PIM_1 e Ac_1PIM_2 .

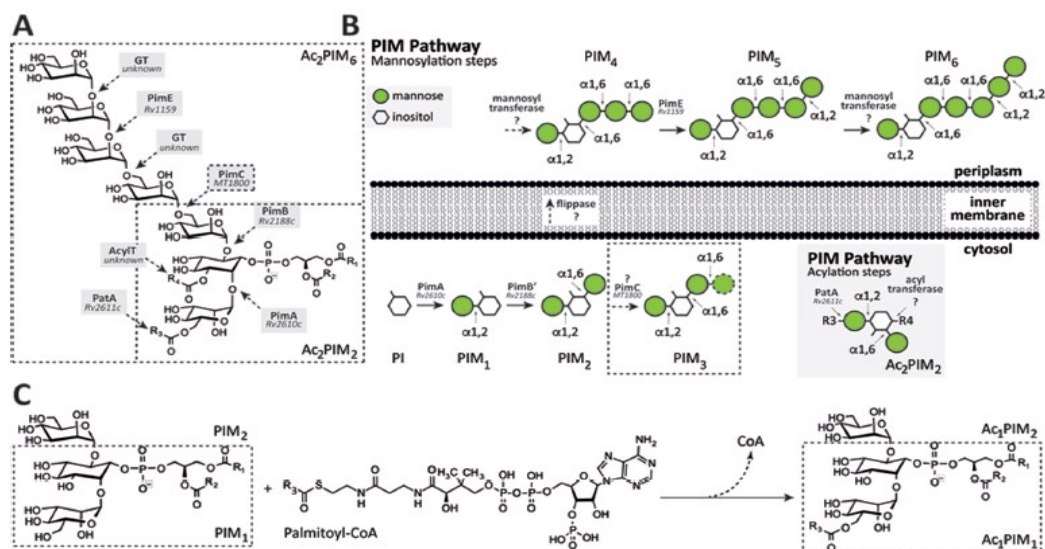


Figura 3) Struttura chimica dei PIMs (A). Modello corrente della biosintesi dei PIMs (B). Trasferimento del gruppo palmitoile, derivante dal cofattore palmitoil-CoA, in posizione 6 dell'anello di mannosio di PIM_1 e PIM_2 , da parte di PatA (C).

Per quanto riguarda la biosintesi di Ac_1PIM_2 , evidenze sperimentali suggeriscono che essa possa avvenire secondo due distinti pathways, nei quali si inverte l'ordine con cui si verificano la seconda reazione di mannosilazione e la reazione di acilazione, anche se la via principalmente sfruttata sembra essere quella descritta precedentemente.

Ac_1PIM_2 può essere ulteriormente acilato in posizione 3 dell'anello di mio-inositolo, generando Ac_2PIM_2 : l'enzima che catalizza questa reazione, così come la maggior parte delle mannosil-transferasi responsabili della sintesi di PIMs con elevati gradi di mannosilazione, deve ancora essere identificato.

Quattro enzimi si sono rilevati fondamentali *in vitro* per la sopravvivenza di *Mycobacterium smegmatis*: l'enzima fosfatidilinositolo-fosfato sintetasi (PIP), PimA, PimB e PatA [6, 7, 8, 9].

patA è parte di un operone, comprendente a monte *rv2612c* (PIP) e, a valle, altri due geni, quali *rv2609c*, codificante una GDP-mannosio idrolasi non essenziale per il batterio, e *rv2610c* (*pimA*), codificante una fosfatidil-mio-inositolo mannosiltransferasi coinvolta nei primissimi step biosintetici dei PIMs.

Il seguente studio si focalizza proprio su PatA, l'aciltransferasi responsabile del primo step di acilazione della via biosintetica vista sopra, membro di una famiglia di aciltransferasi, tra cui rientrano anche HtrB e MsbB, coinvolti negli ultimi step biosintetici del lipide A, componente fondamentale della parete dei batteri Gram-negativi.

La struttura di PatA è stata ricostruita mediante cristallografia, la quale ha permesso di caratterizzare il meccanismo di legame dell'enzima al donatore ed all'accettore

del gruppo acilico in presenza (i) del donatore naturale del gruppo acilico, il palmitoil-CoA, (ii) di un analogo non idrolizzabile del palmitoil-CoA e (iii) della molecola 6-O-palmitoil- α -D-mannopiranoside.

Lo studio oggetto della tesi si propone di dimostrare l'essenzialità dell'enzima PatA per *Mtb* in diversi contesti, sia in vivo, sia *in vitro*, a partire da un modello murino di tubercolosi.

2. APPROCCIO SPERIMENTALE: MATERIALI E METODI.

2.1 Ceppo batterico e mezzo di coltura.

Il ceppo di *Mtb* H37Rv è stato cresciuto a 37°C in terreno Middlebrook 7H9 o 7H10 (Difco) arricchito con Tween 80 (Sigma-Aldrich) allo 0.05% (vol/vol), glicerolo (Sigma-Aldrich) allo 0.2% (vol/vol), e ADN (soluzione al 2% di glucosio, 5% di albumina di siero bovino, 0.85% di NaCl) al 10%. Per la procedura di clonazione, il ceppo di *Escherichia coli* DH5a è stato cresciuto in terreno Luria-Bertani (LB). Quando richiesta, l'igromicina (Roche) è stata utilizzata alla concentrazione finale di 50 mg/ml per *Mtb* e di 150mg/ml per *E. coli*. Streptomicina e kanamicina (Sigma-Aldrich) sono state utilizzate alla concentrazione finale di 20mg/ml. Anidrotetraciclina (ATc) (Sigma-Aldrich) sono state utilizzate alla concentrazione finale di 500 ng/ml in *Mtb*.

2.2 Costruzione del ceppo mutante condizionale di MTB, TB506.1

La generazione del mutante condizionale per *patA* è stata effettuata utilizzando il sistema di repressione inducibile TetR/PipOFF (**Figura 4**), basato sull'utilizzo di due diversi repressori TetR e Pip, il che rende questo sistema maggiormente stringente rispetto a quelli sfruttanti un singolo repressore. Il primo repressore, Pip, responsivo alla pristamicina, agisce legandosi al promotore P_{P_{TR}}, posto a monte del gene *patA*, attuando un silenziamento genico nei confronti dello stesso. Il secondo repressore TetR, espresso costitutivamente, invece, esplica la sua funzione regolatoria legandosi ai due siti operatori tetO, presenti all'interno del promotore P_{fur102tetO}, che dirige l'espressione di *pip*.

L'inducibilità del sistema è mediata dalle ATc, composti derivati dalle tetracicline ed a ridotta attività antimicrobica, in grado di determinare il distacco di TetR dal promotore P_{fur102tetO}, permettendo così l'espressione di Pip, repressore del gene target *patA*. Un ulteriore step regolativo sfruttabile consiste nell'utilizzo della pristamicina, una molecola che agisce sequestrando Pip, permettendo di regolare la concentrazione di repressore e quindi il livello di espressione del gene target *patA*.

Il mutante condizionale per l'espressione di *patA*, denominato TB506.1, è stato ottenuto mediante un processo a più steps: si è partiti dalla manipolazione del ceppo di laboratorio H37Rv di *Mtb*, che è stato ingegnerizzato mediante il plasmide integrativo pFRA61.1, che ha permesso di veicolare nel genoma del microrganismo i geni codificanti i due repressori e quello conferente resistenza alla streptomicina, al fine di selezionare le cellule effettivamente trasformate mediante piastramento

su terreno solido 7H10 selettivo. Il ceppo così ottenuto è stato denominato TB38: esso è importante perché ha permesso di verificare che la vitalità delle cellule micobatteriche non veniva alterata dalla presenza del sistema TetR/PipOFF integrato nel loro genoma.

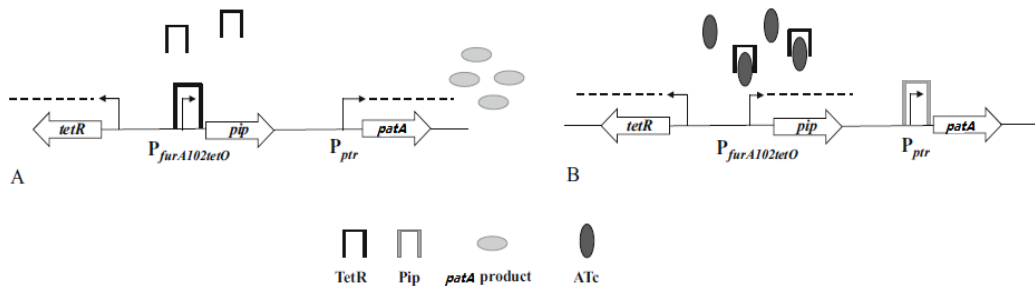


Figura 4) Rappresentazione schematica del sistema di repressione inducibile TetR/PipOFF [10].

Con lo scopo di rendere l'espressione di *patA* controllata dal promotore reprimibile, P_{Ptr}, il ceppo di laboratorio H37Rv è stato trasformato con il plasmide suicida pFRA238, ottenuto per ingegnerizzazione di pFRA50.

pFRA238 contiene al suo interno un inserto costituito dal promotore P_{Ptr}, in contiguo con le prime 620 paia di basi del gene *patA*, così da innescare un processo di ricombinazione omologa a monte di *patA* stesso, proprio in corrispondenza della sua regione promotoriale; il frammento di omologia è stato ottenuto per PCR sfruttando i primers RP1862bis e RP1889; pFRA238 contiene anche un marker di selezione in grado di fornire resistenza all'igromicina.

La metodica di trasformazione sfruttata per inserire il plasmide suicida nelle cellule di H37Rv è stata l'elettroporazione, basata sulla somministrazione di brevi impulsi elettrici causanti una temporanea instabilità strutturale della parete delle cellule, rese più prone all'acquisizione di materiale genetico esogeno.

L'inserzione del plasmide nel genoma micobatterico, invece, è avvenuta per duplicazione inserzionale mediata da un evento di ricombinazione omologa: la presenza di una singola regione di omologia tra plasmide e genoma (regione costituita dal promotore reprimibile P_{Ptr} in contiguo con le prime 620 paia di basi del gene *patA*) permette l'integrazione dell'intero plasmide a valle del sito di ricombinazione (**Figura 5**).

Il risultato è l'inserimento del promotore P_{Ptr} a monte di *patA*, *rv2610c* e *rv2609c*, mentre a monte del sito di integrazione sono presenti, a questo punto, il promotore fisiologico di *patA*, seguito dal gene *rv2612c* (*PIP*), la cui espressione non viene perciò alterata in alcun modo dal precedente evento di integrazione, e dalle prime 620pb di *patA*, codificanti un prodotto proteico tronco e quindi non funzionale.

Questa modalità di integrazione è caratterizzata da un secondo evento di ricombinazione che comporta l'escissione del plasmide integrato in due diverse

modalità, in un caso il secondo evento di ricombinazione comporta la rigenerazione del gene wild-type, nell'altro il mantenimento del gene mutato. In questo specifico caso l'evento di mutazione è rappresentato dall'integrazione della di una regione regolativa esogena.

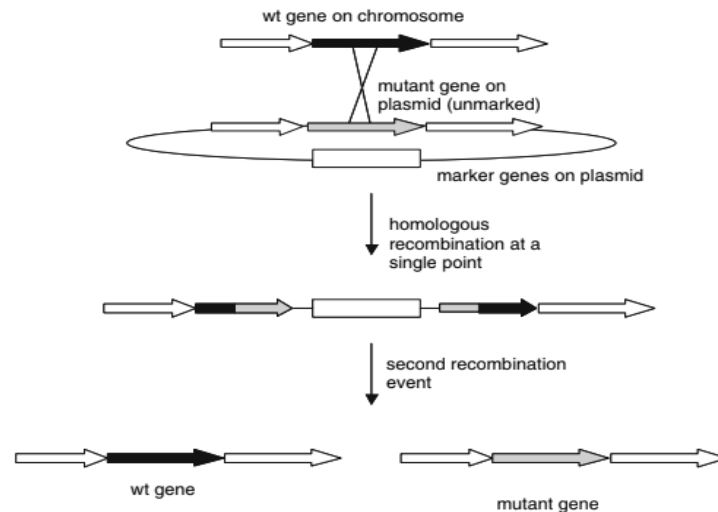


Figura 5) Meccanismo di integrazione [11].

Per verificare l'esito dell'integrazione è stata effettuata una PCR, usando il primer RP1908, complementare ad una porzione del promotore $P_{P_{tr}}$, ed il primer RP1909 (Tabella 1), complementare ad una regione a valle rispetto a quella di omologia. Il ceppo risultante dalla trasformazione di H37Rv con il plasmide pFRA238 è stato nominato TB498; in seguito, esso è stato trasformato anche con il plasmide pFRA61.1 (veicolante il sistema TetR/PipOFF), ottenendo il ceppo TB499 (Tabella 2).

Al fine di rendere la repressione di *pata* l'unica variabile imputabile al fenotipo osservato nell'esperimento, i due geni presenti a valle dello stesso sono stati amplificati per PCR dal ceppo H37Rv, sfruttando i primers RP1890 e RP1891, e l'amplicone ottenuto è stato clonato nel plasmide replicativo pMV261, conferente resistenza alla kanamicina.

L'inserto è stato posto a valle del promotore costitutivo P_{hsp60} , in seguito il plasmide così ottenuto è stato usato per trasformare il ceppo TB499, il quale, in questo modo, è stato dotato di un sistema di complementazione che mantiene funzionali i geni *rv2609c* e *rv2610c* nel corso della repressione di $P_{P_{tr}}$.

La complementazione è stata indotta in *trans* dato che il plasmide in questione non si integra nel genoma e presenta un'origine di replicazione autonoma che gli permette di dirigere la propria replicazione e segregazione indipendentemente dal genoma dell'ospite.

La ricezione del plasmide contenente l'inserto, nominato pFRA247, da parte del ceppo TB499 è stata indotta attraverso elettroporazione, producendo il ceppo TB506.1, sul quale è stato svolto lo studio oggetto di questa tesi.

Tabella 1) Primers, loro sequenza ed utilizzo.

Primer superiore	Sequenza	Primer inferiore	Sequenza	Utilizzo
RP1862bis	5'-CCAATGCATATTGCCGGCCTTAAGGGCT-3'	RP1889	5'-AGGCCTCAGACCACTCGGTTGTCCT-3'	Generazione inserto (prime 620pb di <i>patA</i>)
RP1908	5'-CGACCTGACCGCGGAGAAAT-3'	RP1909	5'-CAGCAATGTGTGGGCAGCAA-3'	PCR, controllo avvenuta integrazione
RP1890	5'-AGGCCTCTCGGATCGGCATGATTTGC-3'	RP1891	5'-GTCGACCGACTTTTCTAAGCGGTCCA-3'	Generazione inserto (<i>rv2610c</i> , <i>rv2609c</i>)

Tabella 2) Ceppi di *Mtb* usati in questo studio.

Nome ceppo	Ceppo di provenienza	Descrizione	Fonte
TB38	H37Rv	Sistema TetR/pipOFF	19
TB498	H37Rv	<i>PptrpatA_pimA_rv2609c</i>	Questo articolo
TB499	TB498	<i>PptrpatA_pimA_rv2609c</i> , sistemaTetR/pipOFF	Questo articolo
TB506.1	TB499	TB499(pFRA247, plasmide derivato da pMV261)	Questo articolo
TB99	H37Rv	<i>PptrpimA_rv2609c</i> , sistema TetR/pipOFF	18
TB513	TB99	TB99(pFRA247)	Questo articolo

2.3 Estrazione dell'RNA e RT-PCR.

Al fine di valutare l'effettiva complementazione di *pimA* e l'espressione di *patA* in assenza di tetracicline è stata effettuata un'estrazione dell'RNA dai ceppi TB99 e TB506.1, knock down condizionali rispettivamente per *pimA* e *patA*, in presenza ed in assenza di ATc nel mezzo di coltura durante la crescita del batterio.

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata sulle colture cellulari prelevate durante la fase di crescita esponenziale, centrifugate a $4500 \times g$ a temperatura ambiente per 5 minuti; il pellet derivante è stato congelato in ghiaccio secco. In seguito, esso è stato risospeso nel reagente TRIzol, costituito da fenolo e guanidina isotiocianato, ed incubato in un tubino insieme a beads in silicio, sfruttate per rompere l'involucro cellulare; in seguito, ad un'ulteriore centrifugazione, si è recuperato il solo surnatante e lo si è trasferito in una soluzione di cloroformio e acido isoamilico (24:1). Dopo un'ulteriore centrifugazione si è recuperata la fase acquosa, ove si pongono i soli acidi ribonucleici in presenza di una soluzione acida, cui vengono addizionati 300 μ l di isopropanolo. Sono seguiti un'incubazione overnight, una centrifugazione ed un successivo lavaggio del pellet mediante etanolo al 75%. Infine, dopo l'essiccamento del pellet, questo è stato risospeso in acqua, trattato con DNasi I e purificato in colonnine per la purificazione dell'RNA [12].

L'RNA estratto è stato retrotrascritto, utilizzando esanucleotidi casuali come innesco e la MULV-RT, enzima derivante dal retrovirus causante il leucoblastoma in topo, così da produrre la libreria di cDNA poi utilizzata come template nella PCR quantitativa.

Quest'ultima tecnica permette di valutare, mediante un'amplificazione lineare, la quantità di uno specifico template target attraverso la rilevazione, ciclo per ciclo, del segnale di fluorescenza emesso dal legame del SYBR Green, fluoroforo interagente col dsDNA, all'amplicone prodotto. Al termine della procedura di amplificazione viene valutata la curva del melting point, verificando così l'eventuale amplificazione di aspecifici.

SigA mRNA è stato utilizzato per la normalizzazione, dato che il gene codifica per un fattore di trascrizione ubiquitario il cui promotore, essendo costitutivo, dovrebbe garantire il mantenimento di un livello costante di espressione genica, indipendentemente dalla condizione analizzata [13].

2.4 Estrazione dei lipidi e caratterizzazione del profilo lipidico mediante cromatografia su strato sottile (TLC).

L'estrazione dei lipidi è stata attuata sul ceppo TB506.1, mutante condizionale per *pata*, posto in coltura in terreno liquido 7H9 a 37°C, in presenza o in assenza di ATc: ad intervalli regolari di 120 ore i batteri venivano prelevati, sottoposti ad estrazione lipidica e posti in terreno fresco; questa procedura è stata ripetuta per tre volte.

Il campione raccolto è stato sottoposto a centrifugazione a 3500rpm per 5 minuti ed il pellet così ottenuto è stato inattivato con trattamento al calore a 100°C per un'ora. Successivamente il pellet è stato trattato mediante un solvente di estrazione bifasico (5ml di soluzione 2:1 di cloroformio-metanolo (vol/vol)) nel quale è stato incubato a temperatura ambiente per 12 ore in costante agitazione, al fine di solubilizzare le membrane ed estrarne i lipidi che si pongono nella fase organica.

Questo approccio di estrazione è noto come metodo di Folch e viene utilizzato per piccoli volumi. L'estratto organico è stato poi sottoposto a centrifugazione (1000 × g, per 5 minuti, a temperatura ambiente) e decantato. La procedura sopra descritta è stata ripetuta nuovamente e l'estratto organico è poi stato sottoposto ad essiccamento attraverso un flusso di nitrogeno gassoso, per poi essere lavato in 2.1 ml di solvente bifasico di Folch (acqua-cloroformio-metanolo 4:2:1). Infine, la fase organica è stata raccolta ed essiccata per essere poi sottoposta a separazione cromatografica (**Figura 6**).

In sede di analisi, il campione è stato risospeso in 4 µl di soluzione 2:1 (vol/vol) di cloroformio-metanolo per milligrammo di peso secco dell'estratto. Quattordici microlitri di ciascun campione (tre trattati con ATc e tre di controllo) sono poi stati caricati sul supporto in gel di silicio 60 F254, mentre la fase mobile utilizzata in questa cromatografia su strato sottile (TLC, "Thin Layer Chromatography") è stata una soluzione di cloroformio-metanolo-idrossido di ammonio-acqua (65:25:0.5:4). La tecnica prevede l'immersione della base del gel in silicio (fase stazionaria), sul quale è stato precedentemente posto il campione, nella soluzione di fase mobile, la quale risalendo per capillarità, porta ad una separazione dei diversi componenti del campione in base alle loro caratteristiche chimico-fisiche: da esse, infatti, dipende

la distribuzione differenziale del campione tra fase mobile e fase stazionaria [14]. La procedura viene effettuata in camera chiusa in modo da mantenere l'ambiente saturo di vapori del solvente.

La visualizzazione degli analiti è stata ottenuta utilizzando α -naftalene come colorante, contenente 10.5 ml di 1-naftalene (soluzione di etanolo al 15%), 6.5ml di acido solforico al 97%, 40.5 ml di etanolo e 4 ml di acqua. Questo sistema di colorazione permette di evidenziare la presenza dei diversi composti sottoforma di macchie di colorazione scura sulla lastra, che rimane, invece, di colorazione chiara, ottenendo infine un cromatogramma.

La tecnica è stata applicata anche in due dimensioni (2D-TLC), al fine di aumentarne il potere di risoluzione. In questo caso sono state sfruttate due diverse fasi mobili per la separazione dell'estratto derivante da un campione di 12 gg, una costituita da cloroformio, metanolo, idrossido di ammonio ed acqua (65:25:0.5:4), l'altra da cloroformio, acido acetico, metanolo ed acqua (50:60:2.3:3). Tra le due separazioni il supporto della fase stazionaria viene ruotato di 90°, ponendo così i campioni, precedentemente separati in verticale, lungo una linea orizzontale, in modo da effettuare la successiva separazione in una seconda dimensione.

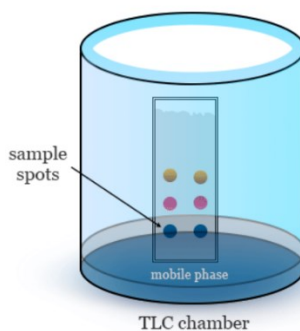


Figura 6) Rappresentazione schematica del sistema cromatografico sfruttato per la TLC [15].

2.5 Infezione dei macrofagi.

La linea monocitica THP-1 è stata prodotta nel 1980 da Tsuchiya e i suoi collaboratori, partendo da un campione di sangue umano di un soggetto affetto da leucemia monocitica acuta. Queste cellule possiedono la stessa morfologia e capacità differenziative dei monociti primari, ma sono caratterizzate da alcune vantaggiose peculiarità, quali la ridotta eterogeneità intercellulare e l'immortalità.

La linea sopra citata è stata cresciuta in sospensione a 37°C in terreno RPMI (Gibco) al 5% in CO₂, tamponato con bicarbonato e supplementato con siero fetale bovino (FBS) al 10% (vol/vol), 50 μ mol/l di β -mercaptoetanolo e 50 μ g/ml di gentamicina per ottenere una densità finale di circa 0.5×10^6 cellule/ml. La sospensione cellulare è stata inoculata nei pozzetti di una piastra da 96 (100 μ l per pozzetto) e trattata con 50 ng/ml di PMA (forbolo 12-meristato 13-acetato), fattore di crescita,

per 24 ore, inducendone così l'adesione al supporto e la differenziazione in macrofagi dei monociti di partenza.

I macrofagi così ottenuti sono stati infettati con i ceppi di *Mtb* H37Rv e TB506.1, usando un MOI (molteplicità di infezione), ovvero il rapporto tra target d'infezione ed agente infettivo, di 1:10. La piastra è stata incubata per 90 minuti a 37°C così da permette ai macrofagi di fagocitare i batteri. Sono stati poi effettuati dei lavaggi con PBS (un tampone salino contenente fosfato). al fine di rimuovere i batteri non fagocitati. Infine, è stato addizionato terreno fresco RPMI contenente 200 ng/ml di ATc ed i macrofagi sono stati prelevati 0, 2, 4 e 6 giorni dall'infezione, lisati ed il campione così ottenuto piastrato al fine di conteggiare le cellule batteriche vitali presenti.

2.6 Infezione intranasale di topo.

Al fine di mimare uno scenario di infezione maggiormente realistico, è stata condotta un'analisi *in vivo* su topo, più precisamente su quaranta esemplari femmine di sette settimane di età.

Essi, suddivisi in due gruppi, sono stati infettati, previa anestesia con 75 mg/kg di ketamina e 1 mg/kg di medetomidina e sua successiva reversione con 1 mg/kg di atipamezolo, attraverso via respiratoria intranasale rispettivamente con 10³cfu dei ceppi di *Mtb* TB38 e TB506.1 risospesi in 15 µl di PBS. Ad uno dei due gruppi sono state somministrate doxicicline (1 mg/ml), induttrici del sistema TetR/PipOFF, contenute in una soluzione acquosa al 5% di saccarosio, mentre il gruppo di controllo ha ricevuta la sola soluzione acquosa priva di antibiotico.

La procedura di eutanasia è stata condotta mediante camere a CO₂ dopo 1 giorno, 4 e 8 settimane dall'infezione, ed è stata seguita, dal prelievo dei polmoni e del fegato, al fine di stimare la carica batterica presente.

La quantificazione dei micobatteri vitali nei diversi campioni è stata attuata piastrando diluizioni dell'omogenizzato dei tessuti in terreno Middlebrook 7H11, addizionato o meno con 50 µg/ml di igromicina e 20 µg/ml di streptomina, rispettivamente per i campioni infettati dai ceppi di *Mtb* TB506.1 e TB38.

L'esperimento è stato condotto in apposite strutture dell'istituto NEIKER (Derio, Spagna), in condizioni di biosicurezza livello 3.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

L'essenzialità del gene *patA* è stata testata attraverso la generazione, mediante il sistema inducibile TetR/PipOFF, di un mutante condizionale di *Mtb* per *patA* stesso, il ceppo di *Mtb* TB506.1. Essendo *patA* parte di un operone comprendente anche *pimA* (*rv2610c*) e *rv2609c*, questi due geni sono stati clonati in trans per limitare eventuali effetti secondari.

L'impatto del silenziamento del gene sulla fisiologia del micobatterio è stato testato in diversi scenari, quali la crescita su piastre in ambiente axenico, l'infezione di cellule macrofagiche e di un modello murino.

3.1 Il silenziamento di *patA* in colture axeniche è battericida.

Al fine di testare la capacità replicativa del micobatterio privo della funzione svolta da PatA, una coltura di *Mtb* TB506.1 è stata cresciuta in terreno liquido (Middlebrook 7H9, addizionato con ADC, albumina-destrosio-catalasi) fino alla fase di crescita esponenziale. Diluizioni seriali dalla 10^{-1} alla 10^{-4} sono state piastrate su terreno solido (Middlebrook 7H10), rispettivamente in presenza ed in assenza di ATc.

Un'analisi occhiometrica evidenzia come la crescita batterica sia più limitata nelle piastre contenenti terreno addizionato con l'antibiotico (**Figura 7A**), confermando l'essenzialità di *patA* per il micobatterio.

Tuttavia, il fatto che le due diluizioni maggiori mantengano una minima capacità proliferativa, si può ricondurre alla presenza, all'interno delle loro cellule, di una quantità di enzima funzionale, precedentemente sintetizzato ed accumulato, sufficiente a supportare la crescita batterica per alcune generazioni; questo fenomeno è stato precedentemente osservato in sistemi ricombinanti sfruttanti il sistema TetR/PipOFF, ed è spiegato dalla marcata forza del promotore P_{ptr} [16, 17].

Un'ipotesi alternativa da me formulata è che l'elevata concentrazione batterica nelle diluizioni maggiori determini l'instaurarsi di dinamiche intercellulari di quorum sensing, tali per cui l'azione dell'antibiotico è inficiata, ad esempio a causa della riduzione della sua concentrazione locale al centro della colonia.

La stessa procedura è stata ripetuta anche sul ceppo di *Mtb* TB38, presentante il solo sistema inducibile TetR/PipOFF, confermando che la sola presenza dei geni codificanti i due repressori nel genoma del micobatterio non influenza la sua capacità replicativa (risultati non mostrati).

Un esperimento simile di valutazione della crescita microbica è stato condotto anche in terreno liquido Middlebrook 7H9, giungendo alle stesse conclusioni. In particolare, sono state prodotte delle curve di crescita per il mutante TB506.1, rispettivamente in presenza ed in assenza di ATc, ottenute misurando l'assorbanza delle sospensioni cellulari a 540 nm ad intervalli di tempo regolari. Tali curve di crescita non presentavano sostanziali differenze tra le due condizioni (presenza e assenza di antibiotico), così uguali volumi delle stesse, prelevati nel medesimo istante, sono stati posti nuovamente in terreno fresco Middlebrook 7H9 ed utilizzati per generare una seconda serie di curve di crescita, risultate, ancora una volta, perfettamente sovrapponibili. Il procedimento è allora stato ripetuto nuovamente e solo la terza serie di curve di crescita prodotte evidenziava differenze riconducibili alla presenza o all'assenza di ATc. Come evidenziato dalla **Figura 7B**, infatti, i profili delle due curve di crescita divergono: in particolare, quella prodotta in presenza di antibiotico raggiunge un plateau attorno ad un OD ('optical density') di 0.1, laddove, al contrario, la curva prodotta in assenza di antibiotico continua a

crescere. Questo conferma l'ipotesi precedentemente formulata per cui sono necessarie alcune generazioni affinché il fenotipo mutante si manifesti.

Dato che la misurazione dell'assorbanza non permette la discriminazione tra cellule vitali e non vitali, sono state effettuate successive semine su terreno solido di eguali volumi della coltura liquida in fase di plateau: ciò ha messo in evidenza una progressiva riduzione della vitalità delle cellule micobatteriche nel tempo, dimostrando che la repressione di *patA* è battericida per *Mtb* (**Figura 7B**).

Per dimostrare che i fenotipi osservati fossero dovuti al silenziamento di *patA* e non all'alterazione della regolazione del gene essenziale *pimA* (*rv2609c*) situato a valle [18], si è provveduto a complementarne l'espressione, ponendola sotto il controllo del promotore costitutivo P_{hsp60} , in trans sfruttando il plasmide replicativo pFRA247, derivato da pMV261.

Per testare l'efficacia del sistema di complementazione, il ceppo di *Mtb* TB99, mutante condizionale per *pimA*, o *rv2609c*, generato con il sistema TetR/PipOFF in un precedente studio [18], è stato trasformato con il plasmide pFRA247, ottenendo TB513. In seguito all'aggiunta di ATc al mezzo di coltura, le capacità replicative del ceppo sopracitato non hanno subito alcuna influenza, dimostrando che il sistema di complementazione permette di compensare il silenziamento del gene posto sotto controllo condizionale, in questo caso *pimA*.

Come ulteriore controllo è stata performata una RT-PCR nei ceppi di *Mtb* TB99 e TB506.1, in modo da verificare l'espressione dei geni reprimibili *pimA* e *patA* in presenza ed in assenza di ATc. Si è riscontrata una quantità di mRNA paragonabile nei due ceppi per entrambi i geni in assenza dell'antibiotico, mentre in sua presenza si è osservata una significativa riduzione di *pimA* mRNA in TB99 e di *patA* mRNA in TB506.1, come ci si aspetterebbe.

Infine, bisogna sottolineare come il quantitativo di *rv2612c* (*PIP*) cDNA rimanga costante nei ceppi rispettivamente *patA* e *pimA* deficienti in presenza ed in assenza di antibiotico. Ciò è stato verificato attraverso una RT-PCR.

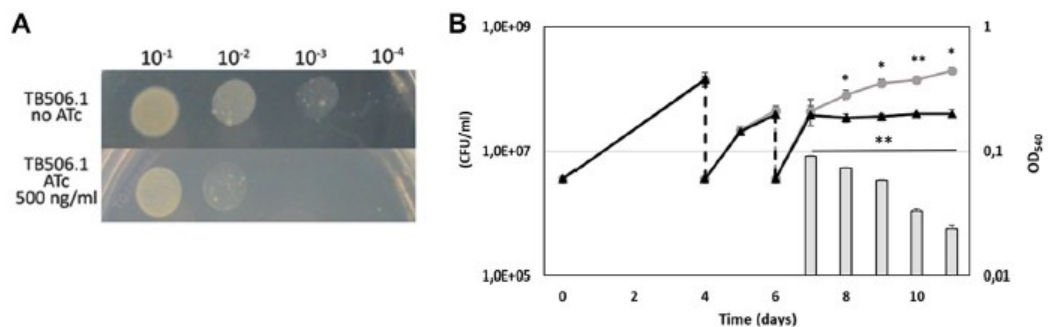


Figura 7) Valutazione della crescita di *Mtb* TB506.1 in presenza o in assenza di ATc mediante diluizioni seriali su terreno solido (A). Curve di crescita e valutazione della vitalità dei ceppi di *Mtb* TB38 e TB506.1 su terreno liquido (B).

3.2 L'assenza di *patA* influenza sensibilmente la biosintesi dei PIMs.

La valutazione delle conseguenze metaboliche del silenziamento di *patA* in *Mtb* è stata testata nei ceppi di *Mtb* TB506.1 e TB38, cresciuti in terreno liquido Middlebrook 7H9 addizionato di ATc, mediante cromatografia su strato sottile in una dimensione, effettuata ad intervalli di tempo successivi (a 0, 4 e 12 giorni) e, al dodicesimo giorno, anche mediante una cromatografia su strato sottile in due dimensioni. A questi punti temporali, una parte delle cellule della coltura è stata sottoposta ad estrazione lipidica, mentre la parte restante è stata risospesa in terreno fresco; l'estratto lipidico è stato poi messo in contatto con le fasi mobile e stazionaria del sistema cromatografico, tra le quali i diversi lipidi si sono distribuiti, sulla base delle loro proprietà chimico-fisiche.

Una volta separati sulla fase stazionaria, i diversi lipidi sono stati identificati e discriminati attraverso il calcolo del cosiddetto "fattore di ritenzione" (R_f), parametro adimensionale ottenuto dal rapporto tra la distanza percorsa dall'analita e quella percorsa dal solvente sulla fase stazionaria, a parità di tempo [20].

Dalla **figura 8A** si evince che le quantità relative dei diversi lipidi analizzati rimangono costanti nel ceppo TB38, mentre cambiano sensibilmente nelle diverse rilevazioni effettuate sul ceppo TB506.1: in particolare si osserva una rilevante diminuzione della quantità di Ac_1PIM_6 e di Ac_2PIM_6 e, a partire da giorno 4, una totale scomparsa di Ac_1PIM_2 ed un accumulo di PI, precursore di tutti i PIMs.

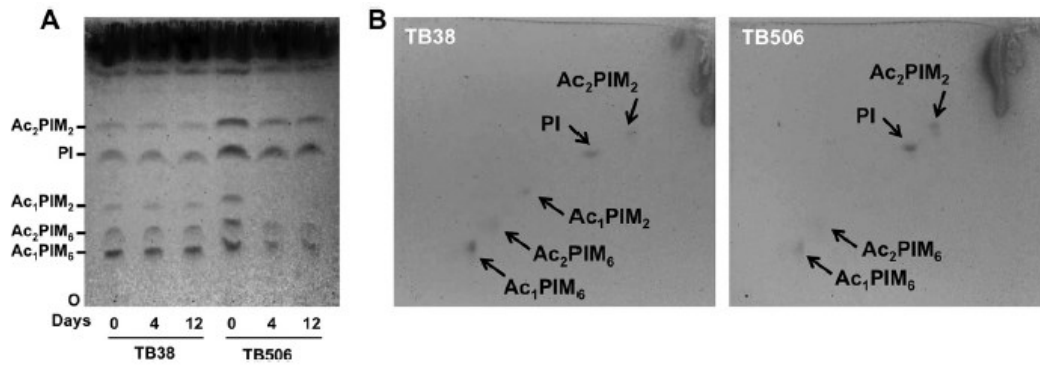
Una considerazione personale sulla **figura 8A**, inoltre, è sorta dal confronto tra le bande ottenute al giorno 0 per TB38 e quelle ottenute per TB506.1: in particolare, le seconde appaiono marcatamente più intense rispetto alle prime, ed ho attribuito ciò al fatto che, in TB38, *patA* è posto sotto il controllo del suo promotore fisiologico, mentre, in TB506.1, l'espressione del gene è regolata da P_{ptr} , un promotore forte che determina un aumento della quantità di proteina prodotta rispetto ad un contesto wild-type.

La cromatografia su strato sottile in due dimensioni, sfruttando due diversi solventi come fase mobile, ha portato agli stessi risultati, i quali sono conformi alle aspettative, considerando, infatti, che il ruolo di PatA nel pathway biosintetico dei PIMs consiste nell'acilazione dei precursori PIM1 e PIM2 e nella rispettiva genesi di Ac_1PIM_1 e di Ac_1PIM_2 .

Contrariamente alle aspettative, invece, Ac_2PIM_2 non presenta una diminuzione, il che fa supporre che, per questo fondamentale glicolipide rappresentante il 42% del peso secco della membrana micobatterica interna, vi sia un'attività aciltransferasica specifica e compensatoria che permette di mantenerne le quantità costanti anche a fronte di una perdita di funzionalità di PatA.

Questi risultati dimostrano come la mancata espressione di *patA* comporti un'alterazione della composizione glicolipidica della membrana di *Mtb*, il che rappresenta la probabile causa del fenotipo a vitalità ridotta osservato negli esperimenti descritti in questa tesi.

Figura 8) Separazione degli estratti lipidici ottenuti rispettivamente da TB38 e TB506 a 0, 4 e 12 giorni dalla semina su terreno liquido, mediante cromatografia su strato sottile (TLC) in 1D (A) e 2D (B).



3.3 *patA* è essenziale in *Mtb* per l'infezione dei macrofagi.

Al fine di ricreare un contesto di infezione e testare le capacità replicative intracellulari di *Mtb* privo di PatA, è stata infettata una coltura di macrofagi, derivati dal differenziamento di cellule della linea monocitica THP-1 da parte dei ceppi di *Mtb* TB38 e TB506.1, in presenza ed in assenza di ATc. Il ceppo TB38, dotato del solo sistema TetR/PipOFF, è stato usato come controllo.

La vitalità batterica è stata valutata piastrando i batteri sopravvissuti dopo 2, 4 e 6 giorni dall'infezione in terreno solido privo di antibiotico.

Come si evince dal grafico (Figura 9A), il ceppo di *Mtb* TB506.1 presenta una riduzione della vitalità, misurata in cfu/ml, statisticamente significativa nel campione ottenuto al quarto giorno di infezione. D'altra parte, la sopravvivenza del ceppo di *Mtb* TB38 non sembra risentire della presenza di ATc nel mezzo di coltura e mostra un fenotipo paragonabile in assenza e presenza ATc (Figura 9B), con una vitalità simile al ceppo TB506.1 cresciuto in assenza di antibiotico.

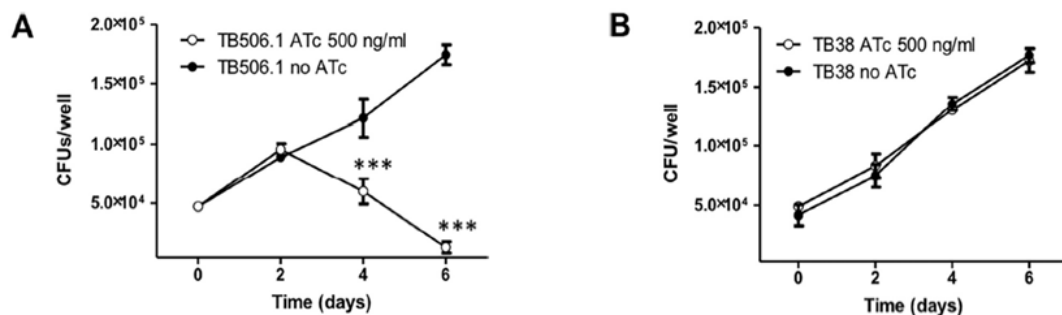


Figura 9) Vitalità, in presenza ed in assenza di antibiotico ed in seguito ad un'infezione intracellulare di macrofagi, dei ceppi di *Mtb* TB506.1 (A) e TB38 (B).

Date le precedenti evidenze sperimentali, PatA sembra avere un ruolo fondamentale nel dirigere le capacità infettive di *Mtb*: l'alterazione delle quantità relative dei diversi glicolipidi all'interno della membrana interna influenza sensibilmente la sopravvivenza del micobatterio all'interno dei macrofagi.

3.4 *patA* è essenziale per la crescita di *Mtb* in topo.

La funzione di *patA* è stata testata anche *in vivo*, al fine di mimare un quadro d'infezione quanto più simile a quello reale. Ciò è stato ottenuto attraverso l'infezione per via respiratoria intranasale di un modello murino, da parte dei ceppi di *Mtb* TB38 (gruppo di controllo) e TB506.1 (gruppo oggetto di studio). Le cavie infettate sono poi state ulteriormente suddivise in quattro sottogruppi riceventi o meno doxicicline somministrate attraverso una soluzione acquosa al 5% di saccarosio.

Si è poi proceduto alla preparazione di estratti di polmoni e fegato prelevati al giorno 1 ed alla settimana 4 ed 8 dall'avvenuta infezione per valutarne la carica microbica. Dal grafico (**Figura 10A**) si evince un'importante diminuzione della vitalità del micobatterio nel tessuto polmonare degli esemplari infettati con il ceppo TB506.1 e riceventi doxicicline, rispetto ai dati ottenuti, rispettivamente, dai topi infettati con lo stesso ceppo in assenza di antibiotico e da quelli infettati da *Mtb* TB38, sia in presenza che in assenza di antibiotico; quest'ultimi, invece, presentano delle cariche microbiche simili tra loro e più elevate.

Un'analogha tendenza è stata riscontrata nei campioni di origine epatica (**Figura 10B**), sia a 4 che ad 8 settimane, sostenendo l'ipotesi che *patA* è essenziale per garantire l'infettività di *Mtb* nel corso delle fasi acuta e latente dell'infezione.

Le **figure 10A e 10B** evidenziano una diminuzione della carica microbica tra la quarta e l'ottava settimana del ceppo TB506.1, infettante i topi sottoposti a trattamento con doxicicline, ciò potrebbe essere riconducibile ad una sua maggior suscettibilità all'azione di componenti del sistema immunitario innato ed acquisito, causata dall'alterazione della composizione glicolipidica della membrana del microorganismo.

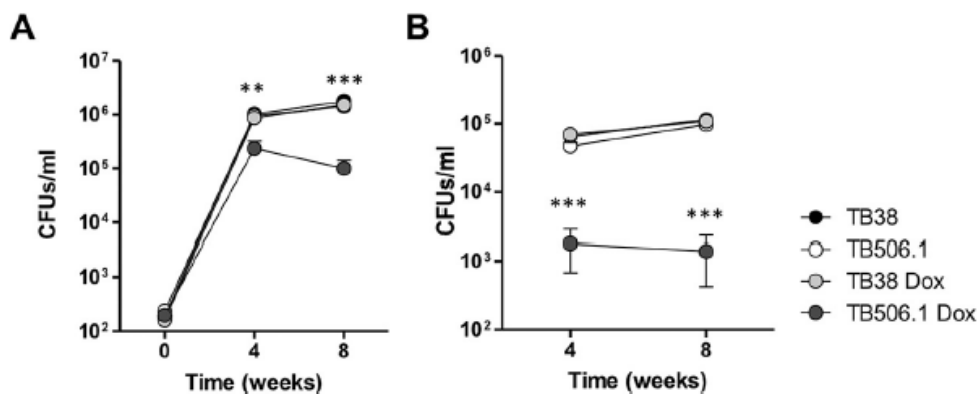


Figura 10) Valore medio, espresso in CFU/ml, del numero di micobatteri derivanti dai campioni polmonari (A) ed epatici (B), di topi infettati con TB38 o TB506.1. I risultati rappresentano la media di cinque topi per gruppo.

4. CONCLUSIONI

La trattazione fin qui attuata ha dimostrato l'essenzialità dell'enzima PatA per la fisiologia e l'integrità strutturale di *Mtb* mediante multipli e differenti approcci sperimentali, sia *in vitro* che *in vivo*.

Inoltre, questo studio ha messo in luce le potenzialità del sistema inducibile TetR/PipOFF nel caratterizzare il ruolo di geni essenziali implicati nella fisiologia del microorganismo oggetto di studio, comportandone una maggior comprensione ed una conseguente miglior manipolabilità. Il vantaggio di un sistema a due repressori si esprime nell'efficacia e nella flessibilità del meccanismo regolativo attuabile, il che lo rende affidabile e versatile per diverse finalità.

Per concludere, le evidenze fin qui accumulate identificano PatA come papabile bersaglio per la messa in atto di studi su larga scala volti allo sviluppo di innovativi approcci terapeutici antitubercolari, al fine di eradicare la tubercolosi umana definitivamente.

5. BIBLIOGRAFIA

Boldrin F, Anso I, Alebouyeh S, Sevilla IA, Geijo M, Garrido JM, Marina A, Cioetto Mazzabò L, Segafreddo G, Guerin ME, Manganelli R, Prados-Rosales R. The Phosphatidyl-myo-Inositol Dimannoside Acyltransferase PatA Is Essential for *Mycobacterium tuberculosis* Growth *In Vitro* and *In Vivo*. *J Bacteriol.* 2021 Mar 8;203(7):e00439-20.

1. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
2. Bhat ZS, Rather MA, Maqbool M, Lah HU, Yousuf SK, Ahmad Z. Cell wall: A versatile fountain of drug targets in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomed Pharmacother.* 2017 Nov;95:1520-1534.
3. Wang Q, Boshoff HIM, Harrison JR, et al., PE/PPE proteins mediate nutrient transport across the outer membrane of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 2020;367(6482):1147-1151.
4. Medjahed H, Gaillard JL, Reyrat JM. *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. *Trends Microbiol.* 2010 Mar;18(3):117-23.
5. Holzheimer M, Buter J, Minnaard AJ. Chemical Synthesis of Cell Wall Constituents of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Rev.* 2021;121(15):9554-9643.
6. Kordulakova J, Gilleron M, Mikusova K, Puzo G, Brennan PJ, Gicquel B, Jackson M. 2002. Definition of the first mannosylation step in phosphatidylinositol mannoside synthesis. PimA is essential for growth of mycobacteria. *JBiol Chem*277:31335–31344.
7. Kordulakova J, GilleronM, Puzo G, Brennan PJ, Gicquel B, Mikusova K, Jackson M. 2003. Identification of the required acyltransferase step in the biosynthesis of the phosphatidylinositol mannosides of mycobacterium species. *J Biol Chem*278:36285–36295.
8. Jackson M, Crick DC, Brennan PJ. 2000. Phosphatidylinositol is an essential phospholipid of mycobacteria. *J Biol Chem* 275:30092–30099.
9. DeJesus MA, Gerrick ER, Xu W, Park SW, Long JE, Boutte CC, Rubin EJ, Schnappinger D, Ehrt S, Fortune SM, Sassetti CM, Ioerger TR. 2017. Comprehensive essentiality analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* genome via saturating transposon mutagenesis. *mBio.* 2017 Jan 17;8(1):e02133-16.
10. Boldrin F and Manganelli R. Repressible Promoter System to Study Essential Genes in Mycobacteria. p. 317-332 . In R. Zhang (ed.), *Methods and Protocols*, Center for Molecular Medicine and Genetics, Wayne State University School of Medicine, Detroit, MI, USA. Humana Press, Inc., Totowa, NJ.
11. Kendall SL and Frita R. Construction of Targeted Mycobacterial Mutants by Homologous Recombination, p. 297-310. In T. Parish and A. Brown (ed.), *Mycobacteria protocols*, 2nd ed., vol. 465. Humana Press, Inc., Totowa, NJ.

12. Maciag A, Dainese E, Rodriguez GM, Milano A, Provvedi R, Pasca MR, Smith I, Palù G, Riccardi G, Manganelli R. Global analysis of *the Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. *J Bacteriol.* 2007 Feb;189(3):730-40.
13. Hu Y, Coates AR. Transcription of two sigma 70 homologue genes, *sigA* and *sigB*, in stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 1999 Jan;181(2):469-76.
14. Colin FP, Thin-layer chromatography: challenges and opportunities. *Journal of Chromatography A*, Volume 1000, Issues 1–2, 2003, Pages 963-984, ISSN 0021-9673.
15. <https://www.priyamstudycentre.com/2021/11/thin-layer-chromatography.html>
16. Boldrin F, Degiacomi G, Serafini A, Kolly GS, Ventura M, Sala C, Provvedi R, Palu G, Cole ST, Manganelli R. 2018. Promoter mutagenesis for fine-tuning expression of essential genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Biotechnol* 11:238–247.
17. Taneja R, Malik U, Khuller GK. 1979. Effect of growth temperature on the lipid composition of *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607. *J Gen Microbiol* 113:413–416.
18. Boldrin F, Ventura M, Degiacomi G, Ravishankar S, Sala C, Svetlikova Z, Ambady A, Dhar N, Kordulakova J, Zhang M, Serafini A, Vishwas KG, Vishwas VG, Kolly GS, Kumar N, Palù G, Guerin ME, Mikusova K, Cole ST, Manganelli R. 2014. The phosphatidyl-myo-inositol mannosyltransferase PimA is essential for *Mycobacterium tuberculosis* growth *in vitro* and *in vivo*. *J Bacteriol* 196:3441–3451.
19. Boldrin F, Casonato S, Dainese E, Sala C, Dhar N, Palu G, Riccardi G, Cole ST, Manganelli R. 2010. Development of a repressible mycobacterial promotersystem based on two transcriptional repressors. *Nucleic Acids Res* 38:e134.
20. Geiss F. 1987. Fundamentals of thin-layer chromatography (planar chromatography). Heidelberg, Basel, New York.



The Phosphatidyl-*myo*-Inositol Dimannoside Acyltransferase PatA Is Essential for *Mycobacterium tuberculosis* Growth *In Vitro* and *In Vivo*

Francesca Boldrin,^a Itxaso Anso,^b Sogol Alebouyeh,^c Iker A. Sevilla,^d Mariví Geijo,^d Joseba M. Garrido,^d Alberto Marina,^b Laura Cioetto Mazzabò,^a Greta Segafreddo,^a Marcelo E. Guerin,^{b,e} Riccardo Manganelli,^a Rafael Prados-Rosales^c

^aDepartment of Molecular Medicine, University of Padova, Padua, Italy

^bCenter for Cooperative Research in Biosciences (CIC bioGUNE), Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Spain

^cDepartment of Preventive Medicine and Public Health and Microbiology, Autonoma University of Madrid, Madrid, Spain

^dAnimal Health Department, NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Derio, Spain

^eIKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain

ABSTRACT *Mycobacterium tuberculosis* comprises an unusual cell envelope dominated by unique lipids and glycans that provides a permeability barrier against hydrophilic drugs and is central for its survival and virulence. Phosphatidyl-*myo*-inositol mannosides (PIMs) are glycolipids considered to be not only key structural components of the cell envelope but also the precursors of lipomannan (LM) and lipoarabinomannan (LAM), important lipoglycans implicated in host-pathogen interactions. Here, we focus on PatA, a membrane-associated acyltransferase that transfers a palmitoyl moiety from palmitoyl coenzyme A (palmitoyl-CoA) to the 6-position of the mannose ring linked to the 2-position of inositol in PIM₁/PIM₂. We validate that the function of PatA is vital for *M. tuberculosis* *in vitro* and *in vivo*. We constructed a *patA* conditional mutant and showed that silencing *patA* is bactericidal in batch cultures. This phenotype was associated with significantly reduced levels of Ac₆PIM₂, an important structural component of the mycobacterial inner membrane. The requirement of PatA for viability was also demonstrated during macrophage infection and in a mouse model of infection, where a dramatic decrease in viable counts was observed upon silencing of the *patA* gene. This is reminiscent of the behavior of PimA, the mannosyltransferase that initiates the PIM pathway, also found to be essential for *M. tuberculosis* growth *in vitro* and *in vivo*. Altogether, the experimental data highlight the significance of the early steps of the PIM biosynthetic pathway for *M. tuberculosis* physiology and reveal that PatA is a novel target for drug discovery programs against this major human pathogen.

IMPORTANCE Tuberculosis (TB) is the leading cause of death from a single infectious agent. The emergence of drug resistance in strains of *M. tuberculosis*, the etiologic agent of TB, emphasizes the need to identify new targets and antimicrobial agents. The mycobacterial cell envelope is a major factor in this intrinsic drug resistance. Here, we have focused on the biosynthesis of PIMs, key virulence factors and important components of the cell envelope. Specifically, we have determined that PatA, the acyltransferase responsible for the first acylation step of the PIM synthesis pathway, is essential in *M. tuberculosis*. These results highlight the importance of early steps of the PIM biosynthetic pathway for mycobacterial physiology and the suitability of PatA as a potential new drug target.

KEYWORDS tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, conditional mutant, acyltransferase, glycolipid, mycobacterium

Mycobacterium tuberculosis, the etiologic agent of tuberculosis (TB), is the second most deadly infectious agent in the world after HIV. In 2018, there were about 10 million new cases and 1.2 million deaths from TB, with an estimated one-quarter of

Citation Boldrin F, Anso I, Alebouyeh S, Sevilla IA, Geijo M, Garrido JM, Marina A, Mazzabò LC, Segafreddo G, Guerin ME, Manganelli R, Prados-Rosales R. 2021. The phosphatidyl-*myo*-inositol dimannoside acyltransferase PatA is essential for *Mycobacterium tuberculosis* growth *in vitro* and *in vivo*. J Bacteriol 203:e00439-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00439-20>.

Editor Laurie E. Comstock, Brigham and Women's Hospital/Harvard Medical School

Copyright © 2021 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Riccardo Manganelli, riccardo.manganelli@unipd.it, or Rafael Prados-Rosales, rafael.prados@uam.es.

Received 30 July 2020

Accepted 30 December 2020

Accepted manuscript posted online

19 January 2021

Published 8 March 2021

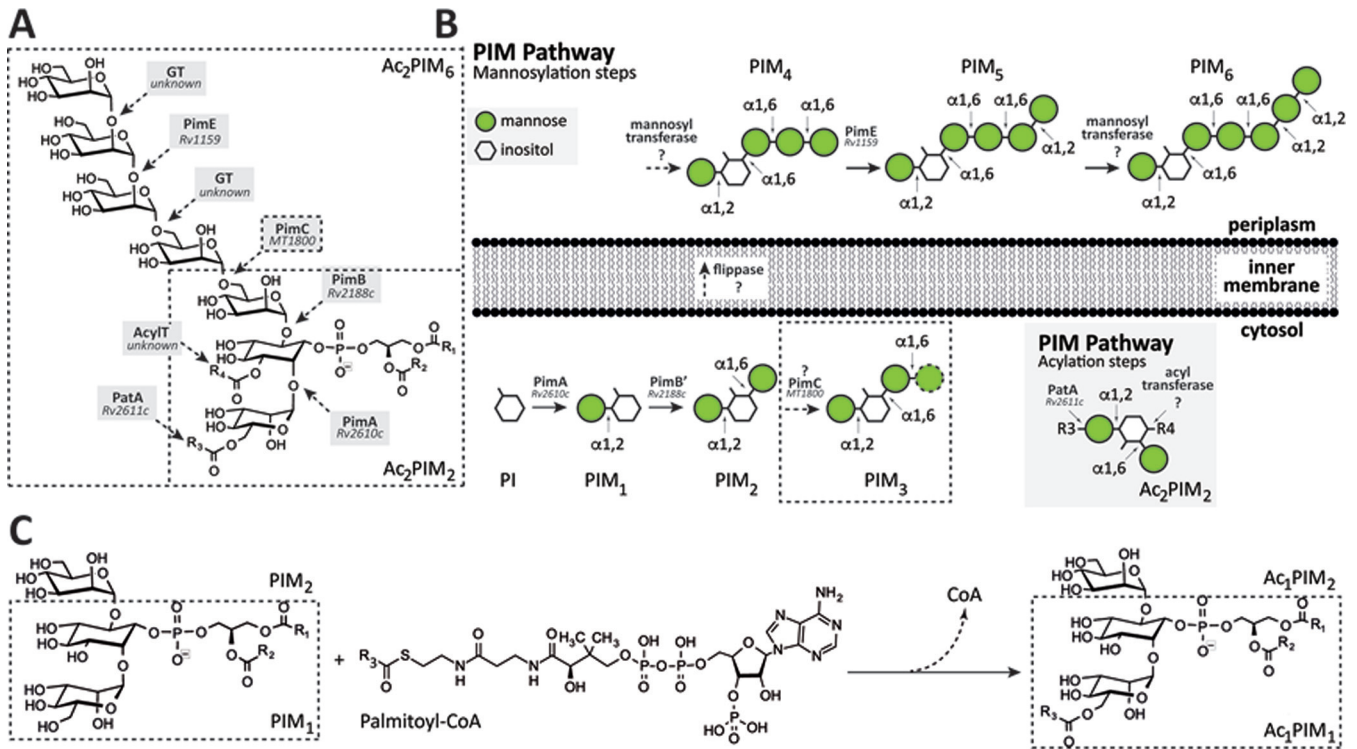


FIG 1 The PIMs from *M. tuberculosis*. (A) The chemical structure of PIMs. The major PIM species have two (PIM₂) or six (PIM₆) mannose residues with different degrees of acylation. (B) The current model of PIM biosynthesis. The currently accepted model proposes that PimA and PimB catalyze the two first consecutive mannosylation steps in the cytoplasmic face of the plasma membrane. The identity and location of the enzyme(s) responsible for the third and fourth mannosylation steps, as well as the existence of a flippase, are under debate. The fifth mannosylation step is catalyzed by PimE in the periplasmic face of the plasma membrane. The identity of the enzyme responsible for the sixth mannosylation step is still unknown. PIMs can be also acylated by the action of two acyltransferases: PatA catalyzes the transfer of an acyl chain to the mannose ring transferred by PimA at the cytosolic face of the plasma membrane, whereas an unknown acyltransferase catalyzes the transfer of an acyl chain to the inositol ring of the glycolipid. In the inset, the acylation steps on Ac_2PIM_2 are shown as an example. (C) PatA transfers a palmitoyl moiety from palmitoyl-CoA to the 6-position of the mannose ring linked to 2-position of inositol in PIM₁/PIM₂.

the human population carrying a latent infection (1–4). First-line treatment for active, drug-susceptible TB, requires a standard administration of four drugs during a period of 6 months, including isoniazid, rifampicin, ethambutol, and pyrazinamide (5). Multidrug-resistant TB (MDR-TB) and extensively drug-resistant TB (XDR-TB) emerge mainly as a result of poor compliance during short-course chemotherapy (6). Specifically, MDR-TB is a form of TB caused by bacteria that do not respond to isoniazid and rifampicin. Although MDR-TB is curable, it requires expensive and toxic second-line drugs and an extensive chemotherapy of up to 2 years. XDR-TB is a more serious form of MDR-TB caused by bacteria that do not respond to the most effective second-line anti-TB drugs, often leaving patients without any further treatment options (6). MDR-TB and XDR-TB remain a public health crisis and a health security threat, making the discovery of new targets and novel anti-TB drugs with bactericidal mechanisms different from those of currently available agents an urgent need (7). The cell envelope of *M. tuberculosis* exhibits a unique architecture comprised of sugars and lipids of exceptional chemical structure, providing a hydrophobic impermeable barrier against many commonly used antibiotics and allowing the bacteria to survive in extremely hostile intracellular conditions. Due to its essential role in the biology of *M. tuberculosis*, the cell envelope represents a highly attractive target for the discovery of novel anti-TB drugs (8–10). In that sense, several key medicines used in current TB therapy inhibit enzymes involved in cell envelope biosynthesis.

The phosphatidyl-*myo*-inositols (PIMs) are glycolipids found in abundant quantities in the inner and outer membranes of the cell envelope of *Mycobacterium* spp. and a few other actinomycetes (Fig. 1) (11–13). PIMs are based on a phosphatidyl-*myo*-inositol (PI) anchor and can contain one to six mannose residues and up to four acyl chains.

The tri- and tetra-acylated phosphatidyl-*myo*-inositol dimannosides (Ac₁PIM₂ and Ac₂PIM₂, respectively) are considered both metabolic end products and intermediates in the biosynthesis of the tri- and tetra-phosphatidyl-*myo*-inositol hexamannosides (Ac₁PIM₆ and Ac₂PIM₆, respectively), lipomannan (LM), and lipoarabinomannan (LAM) (11, 12, 14). PIMs, LM, and LAM play an essential role as structural components of the mycobacterial cell envelope but are also important molecules implicated in host-pathogen interactions in the course of TB and leprosy (11, 13, 15–18). The biosynthesis of PIMs takes place on both sides of the mycobacteria inner membrane (Fig. 1) (12, 13). The biosynthesis of PIMs is initiated on the cytoplasmic side by the mannosyltransferase PimA (Rv2610c; the Rv numbers of the nomenclature based on the *M. tuberculosis* H37Rv genome are included hereafter), which catalyzes the transfer of a mannose residue from GDP-mannose (GDP-Man) to the 2-position of the *myo*-inositol ring of PI to produce phosphatidyl-*myo*-inositol monomannoside (PIM₁ [19, 20]). The second step is mediated by the mannosyltransferase PimB (Rv2188c), which transfers a mannose residue from GDP-Man to the 6-position of the *myo*-inositol ring of PIM₁ to produce phosphatidyl-*myo*-inositol dimannoside (20–23). The acyltransferase PatA catalyzes the transfer of a palmitoyl moiety from palmitoyl coenzyme A (palmitoyl-CoA) to PIM₁ and PIM₂ at the 6-position of the mannose ring transferred by PimA to form Ac₁PIM₁ and Ac₁PIM₂, respectively (24–26). The following two pathways were originally proposed for the biosynthesis of Ac₁PIM₂: (i) PI is mannosylated by the consecutive action of PimA and PimB to form PIM₂, which is further acylated to form Ac₁PIM₂, and (ii) PIM₁ is acylated by PatA to form Ac₁PIM₁ and then mannosylated by PimB to form Ac₁PIM₂. The experimental data indicate that both pathways might coexist in mycobacteria, although the sequence of events PI→PIM₁→PIM₂→Ac₁PIM₂ is favored (20, 27, 28). Ac₁PIM₂ can be further acylated on position 3 of the *myo*-inositol ring to form Ac₂PIM₂ (20, 28). This acyltransferase as well as most of the mannosyltransferases involved in the biosynthesis of higher forms of PIMs still remains to be identified (11–13, 29). Strikingly, the following four enzymes participating in the early steps of the PIM pathway were found to be essential *in vitro* in *Mycobacterium smegmatis*: the phosphatidylinositol phosphate synthase PIP (Rv2612c), PimA, PimB, and PatA (19, 26, 30, 31). From a drug discovery perspective, the essential character of the enzymes involved in the early steps of PIM biosynthesis and their restriction to mycobacteria and a few other actinomycetes highlight their interest as novel targets for TB drug discovery (12, 13).

Here, we focus on PatA (2.3.1.265), an enzyme that belongs to an important family of acyltransferases, including HtrB and MsbB, involved in the last steps of Kdo2-lipid A biosynthesis in Gram-negative bacteria (32). We previously provided the very first crystal structures of PatA in the presence of (i) its naturally occurring acyl donor palmitoyl group, (ii) a nonhydrolyzable palmitoyl-CoA analog, and (iii) the 6-*O*-palmitoyl- α -D-mannopyranoside product, unraveling the acyl donor and acceptor binding mechanisms (32, 33). In this study, we carefully investigated the essentiality of PatA from *M. tuberculosis* *in vitro* and *in vivo*, in a mouse model of TB, in order to evaluate its potential for drug discovery purposes.

RESULTS

Silencing of *patA* in axenic cultures results in bacterial death. To probe the essentiality of PatA, a conditional knockdown (cKD) mutant for the *patA* gene (*rv2611c*) (TB489) was constructed in *M. tuberculosis* H37Rv as described in Materials and Methods. Since *patA* is part of a predicted operon including *pimA* (*rv2610c*) and *rv2609c* (19, 20, 34), to avoid artifacts due to polar effects, both genes were provided in *trans* on pFRA247, a pMV261-derived plasmid expressing the two genes from the constitutive promoter P_{*hsp60*}. In the resulting strain, named TB506.1, expression of *patA* was expected to be downregulated following the addition of anhydrotetracycline (ATc) to the culture medium.

As shown in Fig. 2A, when serial dilutions of a TB506.1 suspension were spotted on Middlebrook 7H10 containing 500 ng/ml ATc, bacterial growth was inhibited, confirming the predicted essentiality of *patA* *in vitro*. The visible residual growth corresponds

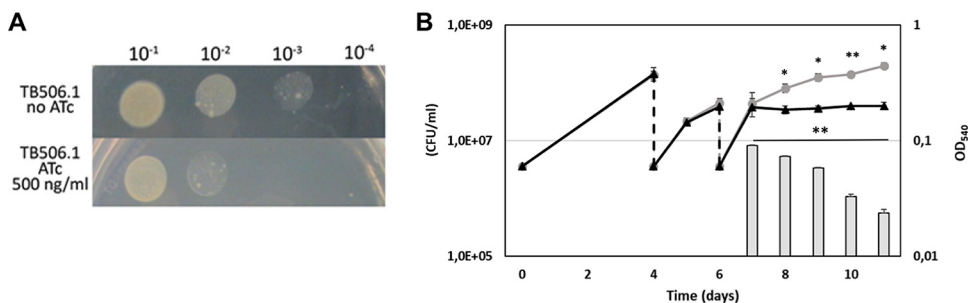


FIG 2 *patA* is an essential gene in *M. tuberculosis*. (A) Serial dilutions of log-phase cultures of the conditional mutant TB506.1 were spotted on Middlebrook 7H10 plates with or without 500 ng/ml ATc. (B) Growth curves of the conditional knockdown TB506.1 in the presence (triangles) or absence (circles) of 500 ng/ml ATc; 1:10 dilutions of the cultures in fresh medium with or without ATc (dashed arrows) were performed until the growth of the culture with ATc stopped. Gray bars represent the number of CFU per milliliter in the culture with ATc after its growth arrested. The results represent the average of three independent experiments. *, $P < 0.5$; **, $P < 0.05$.

to spots containing the largest number of bacteria, suggesting that bacteria must go through some generations before PatA is titrated down and the phenotype becomes detectable. As expected, the growth of TB38, an *M. tuberculosis* H37Rv derivative containing pFRA61 (carrying the TetR/PipOFF) on the chromosome, was unaffected by the presence of the drug at this concentration (see Fig. S2 in the supplemental material). A similar experiment was performed growing the bacteria in Middlebrook 7H9 liquid medium with or without ATc (500 ng/ml). As depicted in Fig. 2B, two passages in fresh ATc-containing medium were necessary to observe bacterial growth inhibition, confirming that some time was necessary to titrate down PatA after the downregulation of its structural gene. We also followed the viability of the culture of the *patA* conditional mutant grown in the presence of ATc after its growth curve diverged from that of the culture grown without ATc. As visible in Fig. 2B, despite the optical density of the culture with ATc remaining stable, the number of viable cells decreased, suggesting that PatA depletion is bactericidal.

To demonstrate that the observed phenotype was indeed due to the downregulation of *patA* and not to the failure to complement *pimA* (*rv2609c*) with pFRA247, this plasmid was transformed in a previously characterized *pimA* (*rv2609c*) conditional mutant TB99 (34) to obtain TB513. In this case, pFRA247 was able to complement the downregulation of *pimA*, as the presence of ATc did not affect the growth of this complemented strain (see Fig. S3 in the supplemental material). Further, to confirm expression of *pimA* in the *patA* mutant, we performed a side-by-side reverse transcriptase PCR (RT-PCR) analysis of both *pimA* and *patA* in TB99 and TB506.1 strains. We found that levels of *pimA* expression were comparable in the two strains in the absence of ATc, while in the presence of ATc, *pimA* was exclusively repressed in TB99 and *patA* was exclusively repressed in TB506.1 (see Fig. S4 in the supplemental material). Importantly, it is worth noting that the mRNA levels of *rv2612c* remained constant in strains TB99 and TB506.1 (Fig. S4).

Production of PIM is greatly reduced in *patA*-depleted mycobacteria. The effect of *patA* gene silencing on PIM biosynthesis was examined by one-dimensional and two-dimensional (2D) thin-layer chromatography (TLC) analysis of the lipids extracted from *M. tuberculosis* TB38 and TB506.1 cells collected at different time points (0, 4, and 12 days) in medium supplemented with 500 ng/ml ATc. Lipid identification was performed by calculating the retention factor (R_f) value, defined as the distance travelled by a given compound divided by the distance traveled by the solvent (35), and comparing to previous reports using the same experimental setup. As expected, the TB38 strain showed a similar lipid profile during the time course (Fig. 3A). In contrast in the TB506.1 strain, we could observe a reduction in lipid bands I, II, and III, starting from the origin (O), corresponding to Ac_1PIM_6 , Ac_2PIM_6 , and Ac_1PIM_2 , respectively (Fig. 3A)

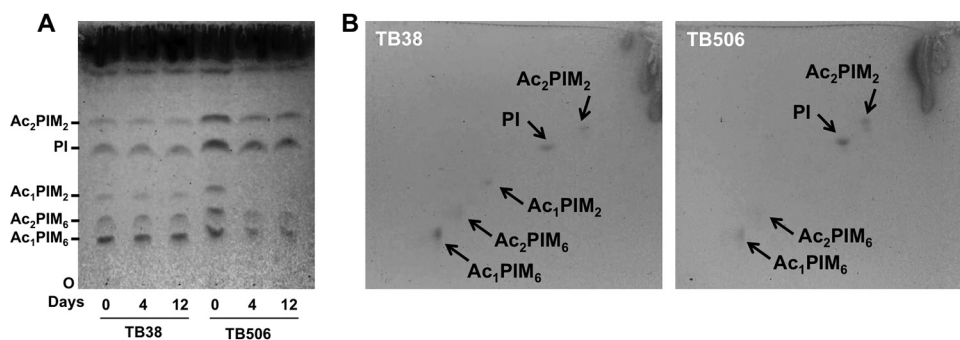


FIG 3 Loss of Ac₁PIM₂ in the PatA-depleted strain. (A) Lipids were extracted from *M. tuberculosis* TB38 and TB506.1 grown in the presence of 500 ng ml⁻¹ ATc at different time points (0, 4, and 12 days), separated by TLC in the solvent CHCl₃-CH₃OH-concentrated NH₄OH-H₂O (65:25:0.5:4) and visualized with α -naphthol. (B) Alternatively, samples from day 12 were separated by 2D-TLC using the same solvent system as in panel A for dimension 1 and chloroform, acetic acid, methanol, and water (50:60:2.3:3) for dimension 2 and visualized as in panel A. Data are representative of two independent experiments with similar results. At the indicated days, cultures were submitted to serial dilutions in fresh medium with ATc in order to visualize a progressive decrease in the Ac₁PIM₂ levels.

(19), and an increase in the lipid band assigned to PI relative to the TB38 strain (Fig. 3A) (36).

We performed 2D-TLC analysis of the same samples and corroborated that production of Ac₁PIM₆, Ac₂PIM₆, and Ac₁PIM₂ lipid species is affected in the TB506.1 strain relative to the TB38 strain (Fig. 3B). This was particularly evident in the case of Ac₁PIM₂, which is absent in the mutant and is considered an end product of the PIM pathway (12, 13, 18). Altogether, this profile is consistent with the biochemical reaction catalyzed by PatA, which transfers a palmitoyl moiety from palmitoyl-CoA to the 6 position of the mannose ring linked to the 2 position of *myo*-inositol in PIM₁ or PIM₂, leading to the synthesis of Ac₁PIM₁/Ac₁PIM₂. It is evident that depletion of PatA caused a block in the biosynthesis of PIMs, resulting in severe changes in the composition of the mycobacterial cell membrane, which correlates with the loss of viability observed.

patA is essential for growth in macrophages. To validate the essentiality of *patA* during intracellular growth on macrophages, we infected THP-1-derived macrophages with the *patA* conditional mutant TB506.1 and the parental strain TB38, in the presence or absence of ATc, and determined viable counts 2, 4, and 6 days after infection. Both TB38 parental strain and TB506.1 retained their infective capacity in the absence of ATc and beside the presence of TetR and Pip regulators. Conversely, only the TB506.1 strain showed reduced viability on the presence of ATc being significantly reduced at day 4 and 6 after infection (Fig. 4). Importantly, no difference in cell viability was observed between treatments (data not shown). These results indicate the essentiality of *patA* for macrophage infection.

patA is essential for growth in mouse. To assess the essentiality of *patA* *in vivo*, C57BL/6J mice were intranasally infected with the conditional mutant strain TB506.1. Silencing of *patA* was achieved by supplying animals with water with 5% sucrose containing doxycycline starting on the day of the infection. Control groups did not received doxycycline, allowing normal expression of *patA*. As depicted in Fig. 5, we observed that *M. tuberculosis* H37Rv sustained infection in the presence and in the absence of doxycycline, 4 and 8 weeks after challenge. In the same line, the TB506.1 mutant in the absence of doxycycline reached similar rates of bacterial replication during the acute (4 weeks) and chronic (8 weeks) phases of infection. In contrast, TB506.1 manifested a dramatic reduction in CFU at 4 and 8 weeks after infection in the presence of doxycycline, indicating the essential nature of *patA* during both the acute and chronic phases of infection. This significant trend of reduction in cell viability for TB506.1 in the presence of doxycycline was observed in both lungs and spleen. Altogether, these findings clearly highlight the essential role played by PatA during *M. tuberculosis* infection.

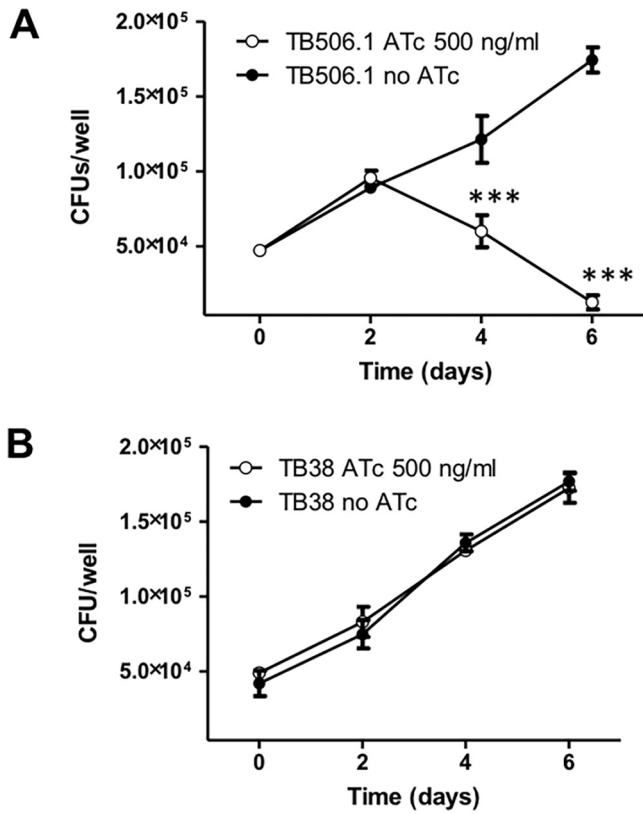


FIG 4 Growth curves of TB506.1 and of the parental strain TB38 in THP-1-derived macrophages. The *patA* conditional mutant TB506.1 and the parental strain TB38 were used to infect THP-1-derived macrophages. While TB506.1 was able to replicate intracellularly only in the absence of ATc (A), TB38 was able to divide regardless of the presence of ATc in the cell culture medium (B). Filled circles, no ATc; open circles, 500 ng/ml ATc added to the culture medium. Data are representative of two independent experiments with similar results. ***, $P < 0.001$ one-way ANOVA with Tukey posttest.

DISCUSSION

The gene *patA* is predicted to be an essential gene for *in vitro* growth of H37Rv according to analysis of saturated Himar1 transposon libraries (31, 37, 38). The aim of this work is to demonstrate the essentiality of *patA* during *in vitro* growth and experimental macrophage and mouse infections. These results strongly suggest that the membrane acyltransferase PatA is a potential drug target in *M. tuberculosis* according to its essentiality.

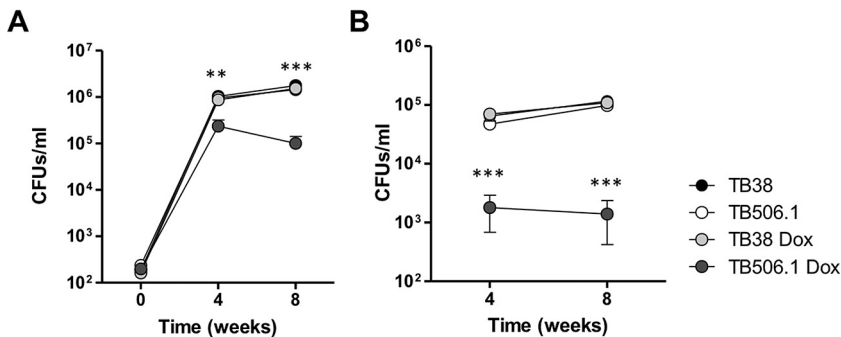


FIG 5 Validation of *patA* essentiality in the mouse model of infection. The graph illustrates the bacterial loads in the lungs (A) and spleens (B) of C57BL/6JOLA-Hsd mice infected with TB506.1. Silencing of *patA* was achieved by supplying animals with water supplemented with 5% sucrose containing doxycycline. Results represent the mean value and error for 5 mice per group and time point. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ one-way ANOVA with Tukey posttest.

We did this by exploiting a repressible promoter system based on the TetR and Pip regulators (34, 39). The *patA* gene is part of a cluster of genes potentially organized as a single transcriptional unit (12, 26) involved in the early steps of PIM biosynthesis. The upstream gene encodes the phosphatidylinositol phosphate synthase PIP (Rv2612c) (*rv2612c*, *PIP*) (30, 40–42), whereas the downstream open reading frame (ORF) encodes a putative GDP-mannose hydrolase (*rv2609c*) and the phosphatidyl-*myo*-inositol mannosyltransferase PimA (*rv2610c*) (19, 20). Although *rv2609c* was predicted to be nonessential (37), we decided to provide this ORF and that of the *pimA* gene in *trans* on a replicative plasmid to the TB506.1 strain in order to counteract potential polar effects caused by the single recombination event in the *patA* gene. In this regard, we are confident that the described phenotype is therefore due to the lack of the *patA* gene product only.

When grown on solid medium, the conditional mutant was clearly able to replicate only in the absence of ATc, and the same phenotype was evident also in liquid medium. Moreover, to observe an effect during growth in liquid culture, cells had to undergo two passages. This suggests that the conditional mutant accumulation of both PatA and PIMs allows cell growth for several rounds of replication after *patA* expression is repressed. This phenomenon has already been observed for other conditional mutants generated using the same TetR/PipOFF system and could be due to the higher strength of the *ptr* promoter compared to that of the original promoter of the downregulated gene causing its overexpression in the absence of ATc (43, 44). The sharp decrease of bacterial viability following *patA* repression resembled that observed after repression of *pimA* and expanded the essentiality to the early steps of the PIM biosynthetic pathway (12, 18). Biochemical analyses of the lipids after *patA* repression showed a clear depletion of PIMs and a consequent accumulation of the PIMs precursor PI, with no effect on the remaining pools of lipids, further supporting the essential role of PatA in this biochemical pathway.

The observed accumulation of PI and depletion of PIMs in the TB506.1 strain upon treatment with ATc seem to be deleterious during experimental infection of both macrophages and mice. We observed a rapid decline in viable counts 2 days after macrophage infection, indicating that alteration of the PIM biosynthesis pathway is critical during the initial stages of infection. Although macrophages represent a starting point at the time of interrogating the role of *patA* during infection, our results suggest that *M. tuberculosis* needs to keep the integrity of the early steps of PIM biosynthesis for optimal intracellular replication. To test the role of this gene during a more relevant complex infection scenario, we infected C57BL/6 mice with TB506.1 and control strains and provided water supplemented with or without doxycycline. The dramatic and significant decrease in the number of CFU in lung and spleens both at 4 and 8 weeks after infection for the TB506.1 strain in the presence of doxycycline strongly supports that the absence of *patA* leads to loss of bacterial cell viability. Although we do not know the exact mechanism by which silencing of *patA* might have accelerated the process of lung clearance, it is possible that some cell envelope instability due to altered lipid composition renders *M. tuberculosis* more susceptible to innate and adaptive immune responses.

Ac₂PIM₂ was found to be the most abundant lipid group in the inner membrane (IM), accounting for up to 42% (by weight) of all of the lipids in the IM extract (16, 44–47). Our TLC analysis indicates the complete disappearance of Ac₁PIM₂ and the reduction of Ac₁PIM₆ and Ac₂PIM₆ glycolipid species in the TB506.1 strain relative to the TB38 strain (Fig. 3B). The accumulation of PI in the *M. tuberculosis patA*-deficient mutant is somehow expected as well as the accumulation of PIM₁ and/or PIM₂. Indeed, Kordulakova and colleagues have demonstrated the accumulation of PIM₁ and PIM₂ glycolipids in an *M. smegmatis patA*-deficient mutant (26). The lack of the palmitoyl residue in Ac₂PIM₂ glycolipid can certainly modify the properties of the mycobacterial cell envelope (48). In that sense, the *M. smegmatis patA* mutant could only be grown in the presence of a high concentration of NaCl (15 g/liter) and in the absence of Tween 80. The sodium salts might protect the weakened membrane by osmotic pressure or by

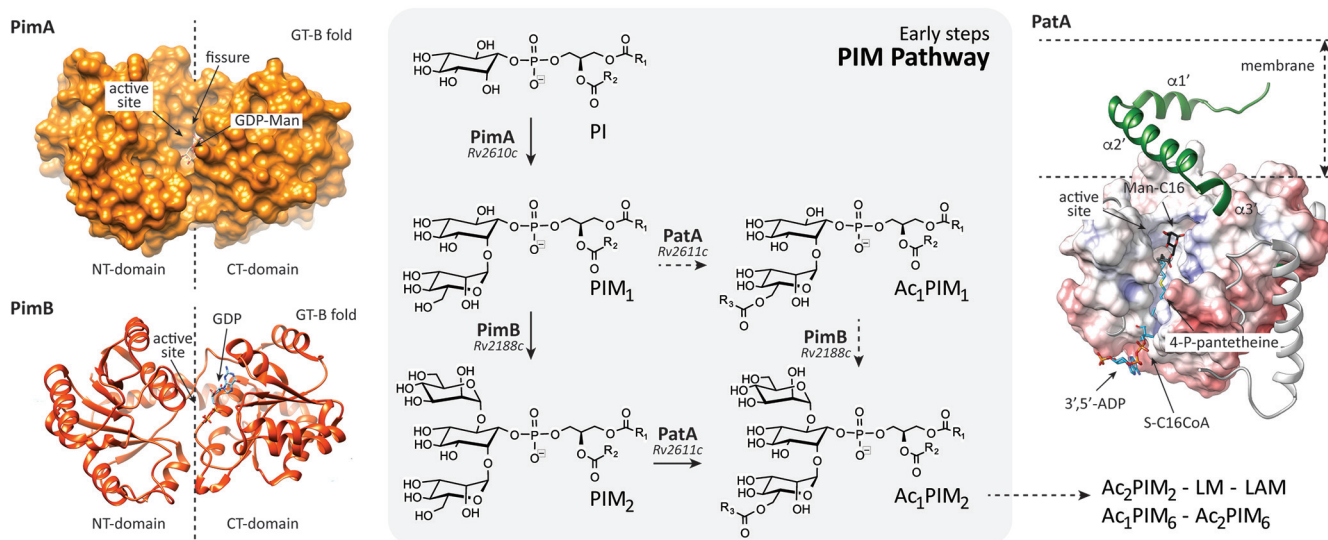


FIG 6 Essentiality of the early steps in PIM biosynthesis. Two pathways were originally proposed for the biosynthesis of Ac_1PIM_2 in the cytoplasmic phase of the mycobacterial inner membrane as follows: (i) PI is mannosylated to form PIM_2 by the consecutive action of the GT-B glycosyltransferases PimA and PimB, respectively, and PIM_2 is then acylated by PatA to form Ac_1PIM_2 ; and (ii) PI is mannosylated by PimA to form PIM_1 and then acylated by PatA to form Ac_1PIM_1 , which in turn is mannosylated by PimB to form Ac_1PIM_2 . *In vitro* experimental evidence indicates that although both pathways might coexist in mycobacteria, the sequence of events $PI \rightarrow PIM_1 \rightarrow PIM_2 \rightarrow Ac_1PIM_2$ is favored (20, 28). The production and purification of high yields of PimA, PimB, and PatA, along with the determination of their three-dimensional structure, place us in an unprecedented position to initiate a drug discovery program focusing on those enzymes (32, 33, 51–53).

neutralizing the surface charges of the membrane. Importantly, the mRNA levels of *rv2612c* remained constant in the two strains, TB99 and TB506.1, ruling out any defect in the PI biosynthesis. What seems interesting is the fact that, together with the complete disappearance of Ac_1PIM_2 and the reduction of Ac_1PIM_6 and Ac_2PIM_6 , the levels of Ac_2PIM_2 remain unchanged. According to Bansal-Mutalik and colleagues, Ac_2PIM_2 is the major component of the internal leaflet of the mycobacterial inner membrane (45). One possible explanation for these results is the presence of compensatory acyltransferase activities/specificities that could contribute to generate and maintain the Ac_2PIM_2 levels (26). Taken together, the experimental data suggest that Ac_1PIM_2 and Ac_2PIM_2 primarily play a structural role in the mycobacterial cell envelope (49). The alteration in the relative abundance of lipids/glycolipids leads to structural defects in the mycobacterial cell envelope, explaining the observed severe growth defects. Therefore, *patA* is another potential target whose depletion causes severe consequences in *M. tuberculosis* cell viability, similar to what has been reported for other mycobacterial genes (34, 50).

Our long-term goal is the discovery of novel anti-TB drugs targeting the early steps of PIM biosynthesis. From a drug discovery perspective, the essential character of PIM biosynthetic enzymes and their restriction to mycobacteria and a few other actinomycetes emphasizes their interest as novel targets for anti-TB chemotherapeutic agents (Fig. 6). The following four enzymes of the PIM pathway were found to be essential in *M. smegmatis* and/or *M. tuberculosis*: (i) *in vitro*, PIP (Rv2612c [30]), PimA (Rv2610c [19, 34]), PimB (Rv2188c [20]), and PatA (Rv2611c [26; this study]); and (ii) *in vivo* in *M. tuberculosis*, PimA (34) and PatA (this study). Interestingly, the crystal structures of PimA, PimB, and PatA have been reported (32, 33, 51–53). PimA and PimB belong to the GT-B family of glycosyltransferases, consisting of two Rossmann fold domains with a deep fissure at the interface that includes the catalytic center (54–58). As a consequence, the occurrence of an important interdomain movement has been well established in GT-B enzymes (27, 59). Specifically, PimA is an outstanding example of GT-B flexibility and intrinsic dynamic properties for the study of GT-B enzymes. The crystal structures of the unliganded form of PimA and that of the GDP-Man complex revealed the local reshuffling of secondary structure elements within the flexible segment (residues 118

to 163) in the N-terminal domain (52). Very recently, we identified four functionally relevant states of PimA that coexist in dynamic equilibrium in solution undergoing conformational exchange on timescales from milliseconds to seconds. Specifically, fold switching is a slow process, on the order of seconds, whereas domain motions occur simultaneously but are substantially faster, on the order of milliseconds (60). We hypothesize that such conformational flexibility has impaired identification of potent inhibitors against PimA using *in silico* and *in vitro* target-based drug screening approaches. In contrast, the crystal structures of PatA in the presence of (i) its naturally occurring acyl donor palmitoyl group, (ii) a nonhydrolyzable palmitoyl-CoA analog, and (iii) the 6-O-palmitoyl- α -D-mannopyranoside product revealed clear defined grooves that participate in the association of the substrates and products. We hypothesize that the presence of clear and deep pockets might facilitate the *in silico* and *in vitro* screenings for the discovery of potent inhibitors against the enzyme.

Taken together, these data clearly show the essentiality of PatA for *M. tuberculosis* growth and survival in axenic cultures and during macrophage or mouse infection, making it a potential candidate for *in vitro* target-based drug screening approaches. Finally, the modulation of PimA or PatA expression by the use of the conditional mutant could find application in target-based whole-cell screening assays for the identification of compounds targeting PimA or PatA or other cellular processes that are part of the same pathway.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and media. *M. tuberculosis* strain H37Rv was grown at 37°C in Middlebrook 7H9 or 7H10 (Difco) supplemented with 0.05% (vol/vol) Tween 80 (Sigma-Aldrich), 0.2% (vol/vol) glycerol (Sigma-Aldrich), and 10% ADN (2% glucose, 5% bovine serum albumin, 0.85% NaCl). For cloning procedures, *Escherichia coli* strain DH5 α was grown in Luria-Bertani medium (LB). When required, hygromycin (Roche) was used at a final concentration of 50 μ g/ml for *M. tuberculosis* and 150 μ g/ml for *E. coli*. Streptomycin and kanamycin (Sigma-Aldrich) were used at a concentration of 20 μ g/ml. Anhydrotetracycline (Sigma-Aldrich) was used at a concentration of 500 ng/ml.

Construction of the *M. tuberculosis patA* conditional mutant. The *patA* (*rv2611c*) conditional mutant was constructed in *M. tuberculosis* H37Rv using the TetR/PipOFF repressible promoter system (39, 43). In this system, the gene of interest is placed under the transcriptional control of the repressible promoter P_{ptr} ; then, the gene encoding its repressor (Pip) is introduced in the chromosome together with the gene encoding the repressor TetR. Since the gene encoding Pip is transcribed from a TetR-dependent promoter, addition of anhydrotetracycline (ATc) to the culture medium leads to its induction and consequent repression of the gene of interest (39).

To place *patA* under P_{ptr} transcriptional control, we constructed a suicide plasmid cloning the first 620 bp of the *patA* gene (PCR amplified using primers RP1862bis, 5'-CCAATGCATATTGCCGCCTTAAGGGCT-3', and RP1889, 5'-AGGCCTCAGACCACTCGGTTGTTCT-3') downstream P_{ptr} in pFRA50 (39), conferring resistance to hygromycin. Ten micrograms of the resulting plasmid (pFRA238) was then introduced by electroporation into *M. tuberculosis* H37Rv, and transformants were selected on 7H10 plated containing hygromycin (see Fig. S1A in the supplemental material). The correct integration of the suicide plasmid by insertional duplication was confirmed by PCR, using an upper primer in the P_{ptr} region (RP1908, 5'-CGACCTGACCGGGAGAAAT-3') and a lower primer external to the homology region used for recombination (RP1909, 5'-CAGCAATGTGTGGGCAGCAA-3') (Fig. S1B). The resulting strain (TB498) was finally electroporated with the integrative plasmid pFRA61.1, containing the TetR-PipOFF system, conferring resistance to streptomycin to obtain TB499. Since *patA* might be cotranscribed with its downstream genes *rv2609c* and *rv2610* (*pimA*), we decided to provide these genes in *trans* expressed from a constitutive promoter so that addition of ATc would lead to the repression of only *patA* transcription. For this purpose, *pimA* and *rv2609c* were amplified from the H37Rv genome using the primers RP1890, 5'-AGGCCTCTCGGATCGGCATGTTTGTGTC-3', and RP1891, 5'-GTCGACCGACTTTTCTAAGCGGTCCA-3', and then cloned downstream P_{hsp60} in the replicative plasmid pMV261, conferring resistance to kanamycin. The resulting plasmid, named pFRA247, was then introduced in the conditional mutant TB499 to obtain TB506.1 (Table 1).

Characterization of the *patA* conditional mutant. To characterize the growth curves of the bacterial strains, mid-log cultures were diluted up to a theoretical optical density at 540 nm (OD_{540}) of 0.06 in Middlebrook 7H9 albumin-dextrose-catalase (ADC) with or without 500 ng/ml ATc and incubated without shaking at 37°C. OD_{540} was recorded at different time points to obtain the growth curves. To characterize the growth of the bacterial strains on solid medium, 5 μ l of 10-fold serial dilutions of a mid-log culture grown in Middlebrook 7H9 ADC was spotted on Middlebrook 7H10 plates with or without 500 ng/ml ATc. Plates were then incubated at 37°C until growth was visible.

Extraction of lipids from the *patA*-deficient *M. tuberculosis* mutant. *M. tuberculosis* TB506.1 was grown at 37°C in standing Middlebrook 7H9 supplemented with 500 ng/ml ATc. The bacteria were diluted every 120 h three times in fresh ATc-containing medium and collected before each dilution.

TABLE 1 *M. tuberculosis* strains used in this study

Strain name	Parental strain	Description	Reference or source
TB38	H37Rv	TetR/PipOFF system	39
TB498	H37Rv	$P_{ptr}patA_pimA_rv2609c$	This paper
TB499	TB498	$P_{ptr}patA_pimA_rv2609c$, TetR/PipOFF system	This paper
TB506.1	TB499	TB499(pFRA247) (pMV261-derived plasmid expressing $pimA_rv2609c$ under P_{hsp60})	This paper
TB99	H37Rv	$P_{ptr}pimA_rv2609c$, TetR/PipOFF system	34
TB513	TB99	TB99(pFRA247)	This paper

Cells were harvested by centrifugation at 3,500 rpm for 5 min, and pellets were heat inactivated at 100°C for 1 h and used for lipid extraction. A culture of *M. tuberculosis* TB506.1 grown without ATc served as a control. Five milliliters 2:1 (vol/vol) chloroform-methanol was added to the cell pellet and incubated at room temperature (RT) for 12 h with constant stirring. The organic extract was separated by centrifugation (1,000 × *g*, 5 min, RT) and decantation. The obtained pellet was extracted with 5 ml 2:1 (vol/vol) chloroform-methanol for 1 h at RT with constant stirring and separated under the same conditions. The combined two organic extracts were dried under a stream of nitrogen gas at RT and subjected to a biphasic Folch wash with 2.1 ml of 4:2:1 (by volume) water-chloroform-methanol mixture. Finally, the hydrophilic phase was removed, and the organic phase was saved and dried under a nitrogen gas stream.

Lipid profile characterization by thin-layer chromatography. The dried organic phase was resuspended with 4 μ l of 2:1 (vol/vol) chloroform-methanol per 1 mg of dry weight. Fourteen microliters of each sample was applied on 60 F₂₅₄ silica gel plates (Merck), and lipid components were separated by TLC using chloroform, methanol, ammonium hydroxide, and water (65:25:0.5:4) as a mobile phase. To develop plates, we repeated the process of pulverizing the staining solution and heating the plate at 100°C 4 to 5 times. To visualize the different glycolipids of the lipid mixture, we used α -naphthol staining, which contains 10.5 ml 15% ethanolic solution of 1-naphthol, 6.5 ml 97% sulfuric acid, 40.5 ml ethanol, and 4 ml water. Alternatively, total lipids were separated by 2D-TLC using chloroform, methanol, ammonium hydroxide, and water (65:25:0.5:4) as a mobile phase 1, and chloroform, acetic acid, methanol, and water (50:60:2.3:3) as mobile phase 2.

RNA extraction and quantitative reverse transcription-PCR. RNA extraction and quantitative reverse transcription-PCR were performed as previously described using the primers shown in Table S1 in the supplemental material (61). The *sigA* mRNA was used as internal invariant control for data normalization (36). RNA samples that had not been reverse transcribed were included in all experiments to exclude significant DNA contamination. For each sample, melting curves were performed to confirm the purity of the products.

Infection of macrophages. THP-1 macrophages (American Type Culture Collection) were grown in suspension at 37°C in 5% CO₂ in bicarbonate-buffered RPMI (Gibco) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS; Gibco), 50 μ mol/liter β -mercaptoethanol, and 50 μ g/ml gentamicin to a density of about 0.5×10^6 cells/ml (34). To induce differentiation of monocytes into macrophages, cells were seeded in 96-well plates and stimulated with 50 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma-Aldrich). After 24 h, PMA was removed, and cells were infected with *M. tuberculosis* H37Rv and TB506.1 at a multiplicity of infection of 1:10 for 90 min as previously described (62). Extracellular bacteria were further removed by washing with warm phosphate-buffered saline (PBS), and fresh medium supplemented with 200 ng/ml ATc was added. Macrophages were lysed at 0 h and 2, 4, and 6 days after infection, and extracts were plated to determine viable bacteria.

Intranasal infection of mice. The mice used in the experiment were 7-week-old female C57BL/6J purchased from Envigo. Forty mice were challenged via the intranasal route with 10^3 CFU of *M. tuberculosis* H37Rv or TB506.1 suspended in 15 μ l sterile PBS. For this procedure, mice were anesthetized with 75 mg/kg of ketamine and 1 mg/kg of medetomidine and reversed by 1 mg/kg of atipamezole. Drinking water was supplemented with 1 mg/ml of doxycycline (Sigma-Aldrich; D9891) and 5% sucrose. Control groups without doxycycline received drinking water with 5% sucrose. At day 1, week 4, and week 8 after infection, mice were euthanized in a CO₂ chamber, and lungs and spleen were collected for bacterial load estimation. The enumeration of viable CFU was performed by plating appropriate lung homogenate dilutions on Middlebrook 7H11 plates for *M. tuberculosis* H37Rv and Middlebrook 7H11 plates containing 50 μ g/ml hygromycin and 20 μ g/ml of streptomycin for TB506.1. The animal experiment was performed at the biosafety level 3 (BSL3) animal facilities of NEIKER Institute (Derio, Spain), having received institutional approval. All institutional and ethical guidelines for animal care and experimentation were adhered to with permits provided by "Diputacion Foral de Bizkaia 15/2017 and 20/2019." The NEIKER Animal Ethics Committee, registered with the Government of Spain (registration no. ES489010006099), approved all animal experimental protocols and usage.

Statistics. Statistical analyses were performed in GraphPad Prism 5.0. Two-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey posttest was used to evaluate paired replicates. *P* values of less than 0.05 were considered significant.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.7 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by grants from MINECO/FEDER EU contracts BFU2016-77427-C2-2-R, BFU2017-92223-EXP, PID2019-105649RB-I00; Severo Ochoa Excellence Accreditation SEV-2016-0644; the Basque Government contract KK-2019/00076; and NIH R01AI149297 (to M.E.G.). R.P.-R. is further a “Ramon y Cajal” fellow from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. R.P.-R. acknowledges support by MINECO/FEDER EU contract SAF2016-77433-R and PID2019-110240RB-I00.

REFERENCES

- Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF. 2013. Tuberculosis. *N Engl J Med* 368:745–755. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1200894>.
- Guinn KM, Rubin EJ. 2017. Tuberculosis: just the FAQs. *mBio* 8:e01910-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01910-17>.
- Getahun H, Matteelli A, Chaisson RE, Raviglione M. 2015. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *N Engl J Med* 372:2127–2135. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1405427>.
- World Health Organization. 2019. Global tuberculosis report 2019. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Horsburgh CR, Jr, Barry CE, III, Lange C. 2015. Treatment of tuberculosis. *N Engl J Med* 373:2149–2160. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1413919>.
- Dheda K, Gumbo T, Gandhi NR, Murray M, Theron G, Udwadia Z, Migliori GB, Warren R. 2014. Global control of tuberculosis: from extensively drug-resistant to untreatable tuberculosis. *Lancet Respir Med* 2:321–338. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70031-1](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70031-1).
- Libardo MD, Boshoff HI, Barry CE, III. 2018. The present state of the tuberculosis drug development pipeline. *Curr Opin Pharmacol* 42:81–94. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.08.001>.
- Jackson M, McNeil MR, Brennan PJ. 2013. Progress in targeting cell envelope biogenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol* 8:855–875. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.52>.
- Dulberger CL, Rubin EJ, Boutte CC. 2020. The mycobacterial cell envelope—a moving target. *Nat Rev Microbiol* 18:47–59. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0273-7>.
- Johnson EO, LaVerriere E, Office E, Stanley M, Meyer E, Kawate T, Gomez JE, Audette RE, Bandyopadhyay N, Betancourt N, Delano K, Da Silva I, Davis J, Gallo C, Gardner M, Golas AJ, Guinn KM, Kennedy S, Korn R, McConnell JA, Moss CE, Murphy KC, Nietupski RM, Papavinasundaram KG, Pinkham JT, Pino PA, Proulx MK, Ruecker N, Song N, Thompson M, Trujillo C, Wakabayashi S, Wallach JB, Watson C, Ioerger TR, Lander ES, Hubbard BK, Serrano-Wu MH, Ehrst S, Fitzgerald M, Rubin EJ, Sassetti CM, Schnappinger D, Hung DT. 2019. Large-scale chemical-genetics yields new *M. tuberculosis* inhibitor classes. *Nature* 571:72–78. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1315-z>.
- Angala SK, Belardinelli JM, Huc-Claustre E, Wheat WH, Jackson M. 2014. The cell envelope glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49:361–399. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.925420>.
- Guerin ME, Kordulakova J, Alzari PM, Brennan PJ, Jackson M. 2010. Molecular basis of phosphatidyl-myo-inositol mannoside biosynthesis and regulation in mycobacteria. *J Biol Chem* 285:33577–33583. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.168328>.
- Sancho-Vaello E, Albesa-Jove D, Rodrigo-Unzueta A, Guerin ME. 2017. Structural basis of phosphatidyl-myo-inositol mannosides biosynthesis in mycobacteria. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1862:1355–1367. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.11.002>.
- Khoo KH, Dell A, Morris HR, Brennan PJ, Chatterjee D. 1995. Structural definition of acylated phosphatidylinositol mannosides from *Mycobacterium tuberculosis*: definition of a common anchor for lipomannan and lipoarabinomannan. *Glycobiology* 5:117–127. <https://doi.org/10.1093/glycob/5.1.117>.
- Jankute M, Cox JA, Harrison J, Besra GS. 2015. Assembly of the mycobacterial cell wall. *Annu Rev Microbiol* 69:405–423. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104121>.
- Haites RE, Morita YS, McConville MJ, Billman-Jacobe H. 2005. Function of phosphatidylinositol in mycobacteria. *J Biol Chem* 280:10981–10987. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413443200>.
- Torrelles JB, Schlesinger LS. 2010. Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. *Tuberculosis (Edinb)* 90:84–93. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.02.003>.
- Morita YS, Fukuda T, Sena CB, Yamaryo-Botte Y, McConville MJ, Kinoshita T. 2011. Inositol lipid metabolism in mycobacteria: biosynthesis and regulatory mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1810:630–641. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.03.017>.
- Kordulakova J, Gilleron M, Mikusova K, Puzo G, Brennan PJ, Gicquel B, Jackson M. 2002. Definition of the first mannosylation step in phosphatidylinositol mannoside synthesis. PimA is essential for growth of mycobacteria. *J Biol Chem* 277:31335–31344. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204060200>.
- Guerin ME, Kaur D, Somashekar BS, Gibbs S, Gest P, Chatterjee D, Brennan PJ, Jackson M. 2009. New insights into the early steps of phosphatidylinositol mannoside biosynthesis in mycobacteria: PimB' is an essential enzyme of *Mycobacterium smegmatis*. *J Biol Chem* 284:25687–25696. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.030593>.
- Lea-Smith DJ, Martin KL, Pyke JS, Tull D, McConville MJ, Coppel RL, Crellin PK. 2008. Analysis of a new mannosyltransferase required for the synthesis of phosphatidylinositol mannosides and lipoarabinomannan reveals two lipomannan pools in *Corynebacterineae*. *J Biol Chem* 283:6773–6782. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707139200>.
- Mishra AK, Batt S, Krumbach K, Eggeling L, Besra GS. 2009. Characterization of the *Corynebacterium glutamicum* Δ pimB' Δ mgmA double deletion mutant and the role of *Mycobacterium tuberculosis* orthologues Rv2188c and Rv0557 in glycolipid biosynthesis. *J Bacteriol* 191:4465–4472. <https://doi.org/10.1128/JB.01729-08>.
- Torrelles JB, DesJardin LE, MacNeil J, Kaufman TM, Kutzbach B, Knaup R, McCarthy TR, Gurcha SS, Besra GS, Clegg S, Schlesinger LS. 2009. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* mannosyltransferase pimB reduces the cell wall lipoarabinomannan and lipomannan content and increases the rate of bacterial-induced human macrophage cell death. *Glycobiology* 19:743–755. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp042>.
- Brennan P, Ballou CE. 1967. Biosynthesis of mannophosphoinositides by *Mycobacterium phlei*. The family of dimannophosphoinositides. *J Biol Chem* 242:3046–3056. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)95931-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)95931-4).
- Brennan P, Ballou CE. 1968. Biosynthesis of mannophosphoinositides by *Mycobacterium phlei*. Enzymatic acylation of the dimannophosphoinositides. *J Biol Chem* 243:2975–2984. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)93368-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)93368-5).
- Kordulakova J, Gilleron M, Puzo G, Brennan PJ, Gicquel B, Mikusova K, Jackson M. 2003. Identification of the required acyltransferase step in the biosynthesis of the phosphatidylinositol mannosides of mycobacterium species. *J Biol Chem* 278:36285–36295. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303639200>.
- Guerin ME, Schaeffer F, Chaffotte A, Gest P, Giganti D, Kordulakova J, van der Woerd M, Jackson M, Alzari PM. 2009. Substrate-induced conformational changes in the essential peripheral membrane-associated mannosyltransferase PimA from mycobacteria: implications for catalysis. *J Biol Chem* 284:21613–21625. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.003947>.
- Svetlikova Z, Barath P, Jackson M, Kordulakova J, Mikusova K. 2014. Purification and characterization of the acyltransferase involved in biosynthesis of the major mycobacterial cell envelope glycolipid—monoacylated phosphatidylinositol dimannoside. *Protein Expr Purif* 100:33–39. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.04.014>.
- Berg S, Kaur D, Jackson M, Brennan PJ. 2007. The glycosyltransferases of

- Mycobacterium tuberculosis—roles in the synthesis of arabinogalactan, lipoarabinomannan, and other glycoconjugates. *Glycobiology* 17:35–56. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm010>.
30. Jackson M, Crick DC, Brennan PJ. 2000. Phosphatidylinositol is an essential phospholipid of mycobacteria. *J Biol Chem* 275:30092–30099. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004658200>.
 31. DeJesus MA, Gerrick ER, Xu W, Park SW, Long JE, Boutte CC, Rubin EJ, Schnappinger D, Ehrst S, Fortune SM, Sassetti CM, Ioerger TR. 2017. Comprehensive essentiality analysis of the Mycobacterium tuberculosis genome via saturating transposon mutagenesis. *mBio* 8:e02133–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02133-16>.
 32. Albesa-Jove D, Svetlikova Z, Tersa M, Sancho-Vaello E, Carreras-Gonzalez A, Bonnet P, Arrasate P, Eguskiza A, Angala SK, Cifuentes JO, Kordulakova J, Jackson M, Mikusova K, Guerin ME. 2016. Structural basis for selective recognition of acyl chains by the membrane-associated acyltransferase PatA. *Nat Commun* 7:10906. <https://doi.org/10.1038/ncomms10906>.
 33. Tersa M, Raich L, Albesa-Jove D, Trastoy B, Prandi J, Gilleron M, Rovira C, Guerin ME. 2018. The molecular mechanism of substrate recognition and catalysis of the membrane acyltransferase PatA from mycobacteria. *ACS Chem Biol* 13:131–140. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00578>.
 34. Boldrin F, Ventura M, Degiacomi G, Ravishankar S, Sala C, Svetlikova Z, Ambady A, Dhar N, Kordulakova J, Zhang M, Serafini A, Vishwas KG, Vishwas VG, Kolly GS, Kumar N, Palù G, Guerin ME, Mikusova K, Cole ST, Manganelli R. 2014. The phosphatidyl-myo-inositol mannosyltransferase PimA is essential for Mycobacterium tuberculosis growth in vitro and in vivo. *J Bacteriol* 196:3441–3451. <https://doi.org/10.1128/JB.01346-13>.
 35. Geiss F. 1987. Fundamentals of thin-layer chromatography (planar chromatography). Heidelberg, Basel, New York.
 36. Manganelli R, Dubnau E, Tyagi S, Kramer FR, Smith I. 1999. Differential expression of 10 sigma factor genes in Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* 31:715–724. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01212.x>.
 37. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. 2003. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* 48:77–84. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03425.x>.
 38. Griffin JE, Gawronski JD, DeJesus MA, Ioerger TR, Akerley BJ, Sassetti CM. 2011. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog* 7:e1002251. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002251>.
 39. Boldrin F, Casonato S, Dainese E, Sala C, Dhar N, Palu G, Riccardi G, Cole ST, Manganelli R. 2010. Development of a repressible mycobacterial promoter system based on two transcriptional repressors. *Nucleic Acids Res* 38:e134. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq235>.
 40. Salman M, Lonsdale JT, Besra GS, Brennan PJ. 1999. Phosphatidylinositol synthesis in mycobacteria. *Biochim Biophys Acta* 1436:437–450. [https://doi.org/10.1016/s0005-2760\(98\)00151-9](https://doi.org/10.1016/s0005-2760(98)00151-9).
 41. Morii H, Ogawa M, Fukuda K, Taniguchi H, Koga Y. 2010. A revised biosynthetic pathway for phosphatidylinositol in Mycobacteria. *J Biochem* 148:593–602. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq093>.
 42. Morii H, Okauchi T, Nomiya H, Ogawa M, Fukuda K, Taniguchi H. 2013. Studies of inositol 1-phosphate analogues as inhibitors of the phosphatidylinositol phosphate synthase in mycobacteria. *J Biochem* 153:257–266. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs141>.
 43. Boldrin F, Degiacomi G, Serafini A, Kolly GS, Ventura M, Sala C, Provvedi R, Palu G, Cole ST, Manganelli R. 2018. Promoter mutagenesis for fine-tuning expression of essential genes in Mycobacterium tuberculosis. *Microb Biotechnol* 11:238–247. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12875>.
 44. Taneja R, Malik U, Khuller GK. 1979. Effect of growth temperature on the lipid composition of Mycobacterium smegmatis ATCC 607. *J Gen Microbiol* 113:413–416. <https://doi.org/10.1099/00221287-113-2-413>.
 45. Bansal-Mutalik R, Nikaido H. 2014. Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:4958–4963. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403078111>.
 46. Morita YS, Patterson JH, Billman-Jacobe H, McConville MJ. 2004. Biosynthesis of mycobacterial phosphatidylinositol mannosides. *Biochem J* 378:589–597. <https://doi.org/10.1042/BJ20031372>.
 47. Morita YS, Velasquez R, Taig E, Waller RF, Patterson JH, Tull D, Williams SJ, Billman-Jacobe H, McConville MJ. 2005. Compartmentalization of lipid biosynthesis in mycobacteria. *J Biol Chem* 280:21645–21652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414181200>.
 48. Larrouy-Maumus G, Marino LB, Madduri AV, Ragan TJ, Hunt DM, Bassano L, Gutierrez MG, Moody DB, Pavan FR, de Carvalho LP. 2016. Cell-envelope remodeling as a determinant of phenotypic antibacterial tolerance in Mycobacterium tuberculosis. *ACS Infect Dis* 2:352–360. <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.5b00148>.
 49. Matsumoto K. 1997. Phosphatidylserine synthase from bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1348:214–227. [https://doi.org/10.1016/s0005-2760\(97\)00110-0](https://doi.org/10.1016/s0005-2760(97)00110-0).
 50. Evans JC, Trujillo C, Wang Z, Eoh H, Ehrst S, Schnappinger D, Boshoff HI, Rhee KY, Barry CE, III, Mizrahi V. 2016. Validation of CoaBC as a bactericidal target in the coenzyme A pathway of Mycobacterium tuberculosis. *ACS Infect Dis* 2:958–968. <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.6b00150>.
 51. Guerin ME, Kordulakova J, Schaeffer F, Svetlikova Z, Buschiazza A, Giganti D, Gicquel B, Mikusova K, Jackson M, Alzari PM. 2007. Molecular recognition and interfacial catalysis by the essential phosphatidylinositol mannosyltransferase PimA from mycobacteria. *J Biol Chem* 282:20705–20714. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702087200>.
 52. Giganti D, Albesa-Jove D, Urresti S, Rodrigo-Unzueta A, Martinez MA, Comino N, Barilone N, Bellinzoni M, Chenal A, Guerin ME, Alzari PM. 2015. Secondary structure reshuffling modulates glycosyltransferase function at the membrane. *Nat Chem Biol* 11:16–18. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1694>.
 53. Batt SM, Jabeen T, Mishra AK, Veerapen N, Krumbach K, Eggeling L, Besra GS, Futterer K. 2010. Acceptor substrate discrimination in phosphatidyl-myo-inositol mannoside synthesis: structural and mutational analysis of mannosyltransferase Corynebacterium glutamicum PimB'. *J Biol Chem* 285:37741–37752. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.165407>.
 54. Lairson LL, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG. 2008. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem* 77:521–555. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061005.092322>.
 55. Albesa-Jove D, Giganti D, Jackson M, Alzari PM, Guerin ME. 2014. Structure-function relationships of membrane-associated GT-B glycosyltransferases. *Glycobiology* 24:108–124. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt101>.
 56. Albesa-Jove D, Guerin ME. 2016. The conformational plasticity of glycosyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* 40:23–32. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.07.007>.
 57. Moremen KW, Haltiwanger RS. 2019. Emerging structural insights into glycosyltransferase-mediated synthesis of glycans. *Nat Chem Biol* 15:853–864. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0350-2>.
 58. Rodrigo-Unzueta A, Ghirardello M, Urresti S, Dello I, Giganti D, Anso I, Trastoy B, Comino N, Tersa M, D'Angelo C, Cifuentes JO, Marina A, Liebau J, Mäler L, Chenal A, Albesa-Jové D, Merino P, Guerin ME. 2020. Dissecting the structural and chemical determinants of the “open-to-closed” motion in the mannosyltransferase PimA from mycobacteria. *Biochemistry* 59:2934–2945. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00376>.
 59. Giganti D, Alegre-Cebollada J, Urresti S, Albesa-Jove D, Rodrigo-Unzueta A, Comino N, Kachala M, Lopez-Fernandez S, Svergun DI, Fernandez JM, Guerin ME. 2013. Conformational plasticity of the essential membrane-associated mannosyltransferase PimA from mycobacteria. *J Biol Chem* 288:29797–29808. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.462705>.
 60. Liebau J, Tersa M, Trastoy B, Patrick J, Rodrigo-Unzueta A, Corzana F, Sparrman T, Guerin ME, Mäler L. 2020. Unveiling the activation dynamics of a fold-switch bacterial glycosyltransferase by ¹⁹F NMR. *J Biol Chem* 295:9868–9878. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014162>.
 61. Maçig A, Dainese E, Rodriguez GM, Milano A, Provvedi R, Pasca MR, Smith I, Palù G, Riccardi G, Manganelli R. 2007. Global analysis of the Mycobacterium tuberculosis Zur (FurB) regulon. *J Bacteriol* 189:730–740. <https://doi.org/10.1128/JB.01190-06>.
 62. Manganelli R, Voskuil MI, Schoolnik GK, Smith I. 2001. The Mycobacterium tuberculosis ECF sigma factor σ^E : role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol Microbiol* 41:423–437. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02525.x>.