

Perancangan dan Pengklonaan Gen *Iron-Dependent Repressor and Activator Mycobacterium tuberculosis* pada Vektor pMV261

Erlan Pradan

Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Medan, Indonesia; erlanpradan11@gmail.com

Ryan Fadillah Pasya

Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Medan, Indonesia; fearm34@gmail.com

Bunail Isna Alfari

Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Medan, Indonesia; bunailisnaalfari317@gmail.com

Chiara Maharani Arihta Sebayang

Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Medan, Indonesia; chiara.cs02@gmail.com

Adam Yulianto

Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Medan, Indonesia; adamxvb@gmail.com

Tegar Adriansyah Putra Siregar

Departemen Mikrobiologi dan Imunologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, Medan, Indonesia; tegaradriansyah@umsu.ac.id (koresponden)

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis, which causes tuberculosis, is the leading cause of death among infectious diseases worldwide. The problem with tuberculosis is the unique self-defense mechanism of *M. tuberculosis* so that it remains dormant and lives inside phagocytic cells. The aim of this research was to design and clone the *Iron-dependent Repressor and Activator (ideR)* gene into the pMV261 plasmid vector, which will be used for further research to see the phenotypic and functional characterization of the *ideR* gene. The research method was carried out in several stages, namely: designing the construction of the *ideR* gene fragment in the pMV261 plasmid vector in silico, amplifying the *ideR* gene fragment from the *M. tuberculosis* genome, constructing the *ideR* gene fragment into the pMV261 plasmid vector in vitro, cloning the recombinant plasmid pMV261-*ideR* in competent *E. coli* cells, and validating the recombinant plasmid pMV261-*ideR* using PCR or genomic sequencing methods. The research results demonstrated that the *ideR* gene fragment was successfully cloned into the pMV261 plasmid vector both in silico and in vitro, as demonstrated by 1% agarose gel electrophoresis analysis. This study concluded that the recombinant plasmid pMV261-*ideR* was successfully cloned.

Keywords: *Mycobacterium*; overexpression; *M. tuberculosis*; *IdeR*; pMV261

ABSTRAK

Mycobacterium tuberculosis yang menyebabkan tuberkulosis adalah penyebab utama kematian di antara penyakit menular di seluruh dunia. Permasalahan pada tuberkulosis adalah mekanisme pertahanan diri *M. tuberculosis* yang unik sehingga tetap dorman dan hidup di dalam sel-sel fagosit. Tujuan riset ini yaitu merancang dan mengklona gen *Iron-dependent Repressor and Activator (ideR)* ke dalam vektor plasmid pMV261, yang akan digunakan untuk riset tahap selanjutnya untuk melihat gambaran karakterisasi fenotip dan fungsional gen *ideR*. Metode riset dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu: merancang konstruksi fragmen gen *ideR* pada vektor plasmid pMV261 secara in silico, mengamplifikasi fragmen gen *ideR* dari genom *M. tuberculosis*, mengonstruksi fragmen gen *ideR* ke dalam vektor plasmid pMV261 secara in vitro, mengklona plasmid rekombinan pMV261-*ideR* pada sel kompeten *E. coli*, dan memvalidasi plasmid rekombinan pMV261-*ideR* dengan menggunakan metode PCR atau sekuensing genomik. Hasil riset yang dicapai menunjukkan bahwa fragmen gen *ideR* berhasil diklona ke dalam vektor plasmid pMV261 secara in silico dan in vitro, yang ditunjukkan dengan hasil analisis elektroforesis jel agarosa 1%. Pada riset ini dapat disimpulkan bahwa plasmid rekombinan pMV261-*ideR* telah berhasil diklona.

Kata kunci: *Mycobacterium*; overekspreksi; *M. tuberculosis*; *IdeR*; pMV261

PENDAHULUAN

Penyakit tuberkulosis paru (TB) yang disebabkan oleh patogen *Mycobacterium tuberculosis* menginfeksi sistem pernafasan sebagai target organ primer dibandingkan dengan organ sistem yang lain. Diperkirakan ada 15% kasus infeksi akibat *M. tuberculosis* bisa terjadi di luar paru-paru. Berdasarkan data estimasi yang dikeluarkan *World Health Organization* (WHO) tahun 2021, tercatat 10,6 juta kasus terinfeksi tuberkulosis dengan 1,6 juta di antaranya meninggal dunia.^(1,2) Peningkatan penyebaran TB dan bakteri *M. tuberculosis* yang resisten terhadap obat anti-tuberkulosis menjadi tantangan dalam pengendalian TB.⁽³⁾

TB ditularkan melalui transmisi droplet yang diinhalasi oleh penderita TB. Paru-paru bagian atas menjadi tempat utama yang dimasuki *M. tuberculosis*.^(4,5) Walaupun tubuh memiliki sistem kekebalan imunitas selular dan humoral, bakteri akan tetap hidup dan dorman di dalam sel makrofag tanpa adanya gejala yang ditimbulkan.⁽⁶⁾ *M. tuberculosis* merupakan bakteri aerob obligat, non-motil, dan patogen di intraseluler.⁽⁷⁾ Bakteri ini memiliki karakteristik dinding sel yang kompleks yang mayoritasnya disusun oleh lapisan lipid yang tebal. Tingginya kandungan lipid pada dinding sel *M. tuberculosis* membuat kapsul bakteri menjadi lebih fleksibel.⁽⁸⁾

M. tuberculosis sama halnya dengan organisme lainnya, membutuhkan nutrisi untuk dapat bertahan hidup, sebagai contoh adalah zat besi.⁽⁹⁾ Secara umum dalam menjaga homeostasis kadar besi, bakteri lainnya memiliki protein bernama *Diphtheria Toxin Repressor* (DtxR).⁽¹⁰⁾ Sedangkan pada *M. tuberculosis*, terdapat homolog *Iron-*

Dependent Repressor (IdeR) yang berperan sebagai pengontrol sekresi zat besi.⁽¹¹⁾ Jika *M. tuberculosis* kekurangan zat besi, proses replikasi akan dihentikan dan bakteri menjadi sensitif terhadap antibiotik.⁽¹²⁾ Lebih jauh lagi, morfologi bakteri dapat dipengaruhi oleh peningkatan zat besi intraseluler yang bersifat toksik.⁽¹³⁾ Pada laporan dan publikasi riset lain menunjukkan bahwa IdeR diperlukan untuk ekspresi penuh gen *katG* dan *sodA*, yang mana kedua gen ini berperan dalam menyalurkan oksidan radikal. KatG di isolat klinis *M. tuberculosis* tertentu dapat merestriksi induksi *autophagy*, yang merupakan suatu mekanisme imun pertahanan host terhadap patogen.⁽¹⁴⁾ IdeR adalah regulator dari respons stres seluler, karena memiliki peran sebagai pelindung pada sel bakteri yang menghadapi stres lingkungan, seperti peningkatan tingkat spesies oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*; ROS) dan *intermediate* obat anti-tuberkulosis Isoniazid (INH) yang sangat toksik.⁽¹⁵⁾

Perubahan fisiologis baik sel eukariot ataupun prokariot dapat dipantau dari ekspresi gen intraselulernya. Oleh karena itu, untuk mengkaraktiristik suatu fenotip bakteri, dapat dilakukan metode inhibisi/tekanan ataupun peningkatan (*over*) ekspresi dari suatu gen. Jika suatu gen dirancang untuk mengalami peningkatan ekspresi, maka akan terbentuk transforman bakteri dengan fenotip mutan. Sebagai contoh, adanya overekspresi yang dilakukan pada gen *mycobacteria* tertentu menyebabkan bakteri *M. tuberculosis* resisten terhadap antibiotik.⁽¹⁶⁾ Overekspresi suatu gen pada bakteri dapat juga digunakan dalam riset transkriptomik untuk melihat respon sel host/imun pada saat terjadinya infeksi.⁽¹⁷⁾

Dalam mempelajari *M. tuberculosis* dibutuhkan laboratorium dengan keselamatan biologi tingkat 3 (*biosafety level 3*; BSL3) yang saat ini hanya dimiliki oleh instansi pemerintah, dikarenakan biaya pemeliharaan yang relative mahal. Akan tetapi, ada beberapa publikasi dengan fasilitas laboratorium dengan BSL1 atau BSL2 menggunakan *Mycobacterium smegmatis* sebagai opsi model pengganti dari *M. tuberculosis*.⁽¹⁸⁾

Pada riset ini, fragmen gen *ideR* berhasil diklonasi ke dalam vektor plasmid pMV261 secara *in silico* dan *in vitro*, yang ditunjukkan dengan hasil analisis elektroforesis jel agarosa 1%. Diharapkan modifikasi peningkatan ekspresi terhadap gen *ideR* dapat digunakan untuk riset selanjutnya dalam melihat gambaran karakterisasi fenotip dan fungsional gen pada *M. smegmatis* yang dapat dimanfaatkan lebih lanjut dalam riset untuk mengeksplorasi mekanisme anti-oksidan pada *mycobacteria*. Secara eksplisit, tujuan riset ini yaitu merancang dan mengklona gen *Iron-dependent Repressor and Activator (ideR)* ke dalam vektor plasmid pMV261, yang akan digunakan untuk riset tahap selanjutnya untuk melihat gambaran karakterisasi fenotip dan fungsional gen *ideR*.

METODE

Riset dilakukan secara paralel di NovoPro Lab Bioscience, Shanghai, China dan Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara (UMSU) dari bulan Mei 2023 sampai dengan bulan Oktober 2023.

Perancangan secara *in silico* dilakukan dengan menggunakan piranti lunak SnapGene [Trial; Dotmatics]. Sekuens DNA fragmen gen *ideR* *M. tuberculosis* diperoleh dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dengan kode akses sekuens referensi NCBI NC_000962.3. Sementara, sekuens DNA vektor plasmid pMV261 diperoleh dari NovoPro Lab dengan katalog nomor V012795.

Fragmen gen *ideR* diamplifikasi dengan menggunakan metode *gene synthesis* (NovoPro Lab) dan dikonfirmasi dengan metode elektroforesis jel agarosa. Fragmen gen *ideR* dirancang dengan menambahkan situs restriksi *EcoRI* ke bagian 5' dan *SalI* ke bagian 3' dari fragmen tersebut. Untuk mengonstruksi fragmen gen *ideR*, vektor plasmid pMV261 didigesti pada situs restriksi *EcoRI* di bagian upstream yaitu posisi nukleotida 4347 pb dan *SalI* di bagian downstream yaitu posisi nukleotida 4354 pb dari plasmid tersebut. Selanjutnya, fragmen gen *ideR* akan diligasikan ke dalam vektor plasmid pMV261 dengan menggunakan metode ligasi oleh enzim ligase. Hasil akhir berupa plasmid rekombinan pMV261-*ideR* akan siap untuk ditransformasikan. Plasmid rekombinan pMV261-*ideR* ditransformasikan ke dalam bakteri kompeten *E. coli* galur Top 10 dengan menggunakan metode heat shock. Kemudian akan disebarkan keatas media agar Luria Bertani (LB) yang mengandung Kanamycin, dan diinkubasikan selama satu malam pada suhu 37°C. Koloni transforman yang tumbuh diperkirakan memiliki plasmid rekombinan pMV261-*ideR* akan dikultur di dalam media broth untuk diisolasi dengan plasmid mini prep kit dan divalidasi dengan metode PCR atau sekuensing genomik. Penafsiran dan kesimpulan ditarik bila plasmid rekombinan pMV261-*ideR* berhasil divalidasi.

HASIL

Pengklonaan molekuler fragmen gen *ideR* ke dalam vektor plasmid pMV261 didahului dengan proses perancangan secara *in silico* dengan menggunakan piranti lunak SnapGene [Trial; Dotmatics]. Sekuens gen *ideR* diperoleh dari *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dengan kode akses sekuens referensi NCBI NC_000962.3. Sementara, sekuens vektor plasmid pMV261 diperoleh dari NovoPro Lab dengan katalog nomor V012795 (Gambar 1).

Perancangan fragmen gen *ideR* ke dalam vektor plasmid pMV261 dilakukan dengan menambahkan situs restriksi *EcoRI* ke bagian 5' dan *SalI* ke bagian 3' dari fragmen gen *ideR*. Selanjutnya, pada vektor plasmid pMV261 akan didigesti pada situs restriksi *EcoRI* di bagian upstream yaitu posisi nukleotida 4347 pb dan *SalI* di bagian downstream yaitu posisi nukleotida 4354 pb dari plasmid tersebut (Gambar 2).

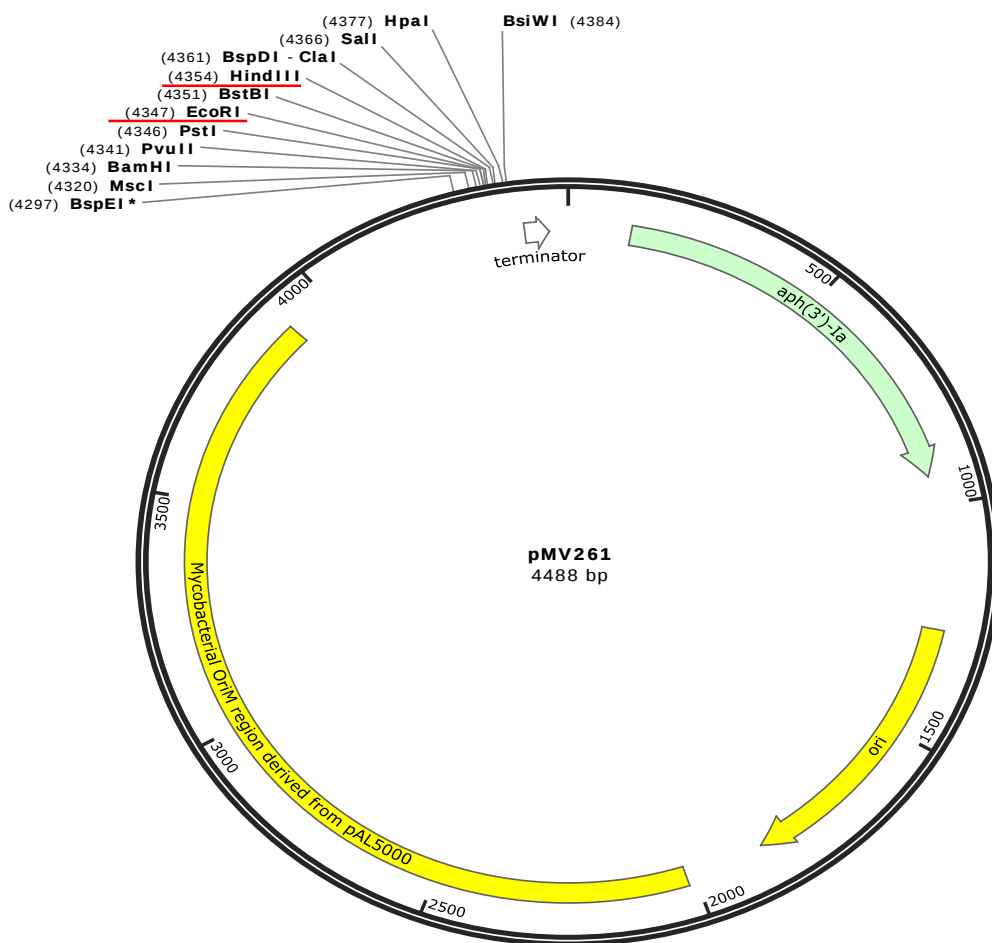
Kemudian, setelah fragmen gen *ideR* berhasil diklonasi ke dalam vektor plasmid pMV261 secara *in silico*, maka dilakukan pemeriksaan pada kodon start, stop, dan open reading frame untuk memastikan bahwa protein yang nantinya diekspresikan adalah *ideR* yang sesuai dengan referensi (Gambar 2). Selanjutnya, hasil *in silico* plasmid rekombinan pMV261-*ideR* dianalisis dengan simulasi elektroforesis jel agarosa 1% (Gambar 3).

Pada hasil elektroforesis jel agarosa 1% (Gambar 3) terlihat pita plasmid pMV261 supercoil yang belum didigesti dengan enzim yang berada di posisi sekitar 3000 pb pada marka DNA 1 kb (lajur 1 Gambar 3). Kemudian, terlihat pita fragmen gen *ideR* yang berada di posisi sekitar 700 pb pada marka DNA 1 kb (lajur 4 Gambar 3). Adapun plasmid rekombinan pMV261-*ideR* yang sebelumnya sudah berhasil diklonasi secara *in silico*, dan didigesti dengan enzim *EcoRI* dan *SalI*, terlihat pita berada di dua posisi yaitu di sekitar 4488 pb dan 700 pb

pada marka DNA 1 kb (lajur 5 Gambar 3). Kedua posisi pita hasil digesti plasmid rekombinan pMV261-ideR memiliki posisi yang sama dengan pita plasmid pMV261 supercoil (lajur 1 Gambar 3) dan pita fragmen gen *ideR* (lajur 4 Gambar 3) menunjukkan bahwa perancangan pengklonaan molekuler fragmen gen *ideR* ke dalam vektor plasmid pMV261 secara *in silico* berhasil dilakukan (lajur 5 Gambar 3).

Vektor plasmid pMV261 diperoleh dari NovoPro Bioscience, Shanghai, China. Vektor plasmid pMV261 dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% dan dilarikan pada 100 V selama 30 menit. Kemudian, gel agarosa diwarnai dengan etidium bromida dan divisualisasi menggunakan GelDoc (Gambar 4). Pada hasil elektroforesis gel agarosa 1% (Gambar 4) terlihat pita plasmid pMV261 didigesti dengan enzim *XbaI* yang berada di posisi sekitar 5000 pb pada marka DNA 1 kb (lajur 2 Gambar 4).

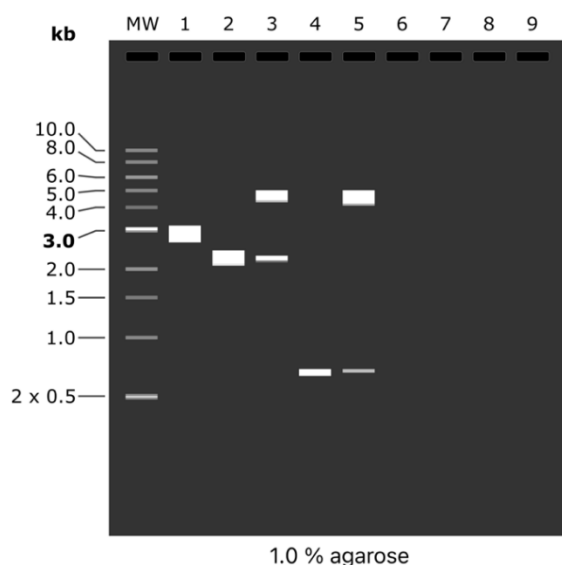
Untuk meringkas waktu pengklonaan, fragmen gen *ideR* diproduksi dengan metode *Gene Synthesis* (NovoPro Lab) dan langsung diklona ke dalam vektor plasmid pMV261 dengan strategi perancangan pengklonaan yang sudah dijelaskan sebelumnya. Plasmid rekombinan pMV261-ideR selanjutnya ditransformasi ke dalam sel kompeten bakteri *E. coli* strain Top10, plasmid rekombinan kemudian diisolasi dari koloni yang tumbuh diatas media agar LB+*Kanamycin*, dilarikan dengan elektroforesis gel agarosa 1% (Gambar 5). Plasmid rekombinan pMV261-ideR yang didigesti dengan enzim *XbaI-SalI* untuk mengkonfirmasi ketersediaan fragmen gen *ideR* di dalam plasmid rekombinan menunjukkan dua pita yang berada di dua posisi yaitu di sekitar 4000 pb dan 1000 pb pada marka DNA 1 kb (lajur 1 Gambar 5).



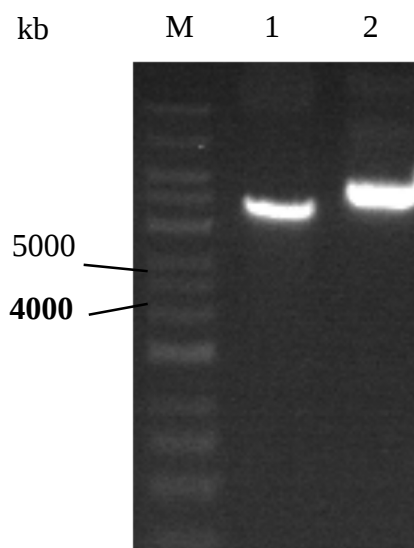
Gambar 1. Peta vektor plasmid pMV261 yang memiliki *multi-cloning site*



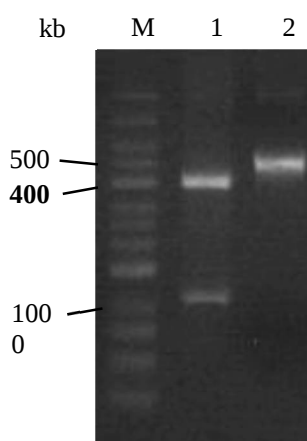
Gambar 2. Peta perancangan plasmid rekombinan pMV261-ideR



Gambar 3. Perancangan fragmen gen *ideR* ke dalam vektor plasmid pMV261 secara in silico. MW: Marka DNA 1 kb; Lajur 1. Plasmid pMV261 supercoil (tidak didigesti); 2. Kontrol positif fragmen gen; 3. Kontrol positif plasmid rekombinan; 4. Gen *ideR*; 5. Plasmid rekombinan pMV261-*ideR* (digesti dengan enzim *EcoRI* dan *SalI*)



Gambar 4. Vektor plasmid pMV261 pada jel agarosa 1%. M: Marka DNA 1 kb; Lajur 1. Plasmid kontrol; 2. Plasmid pMV261 didigesti dengan enzim *XbaI*



Gambar 5. Plasmid rekombinan pMV261-*ideR* pada jel agarosa 1%. M: Marka DNA 1 kb; Lajur 1. Plasmid rekombinan pMV261-*ideR* didigesti dengan enzim *XbaI-SalI*; 2. Plasmid rekombinan pMV261-*ideR* (tidak didigesti)

PEMBAHASAN

Metode pengklonaan dan transformasi adalah teknik dasar dalam rekayasa genetika untuk aplikasi overekspresi gen. Pengklonaan melibatkan pembuatan salinan identik dari suatu gen, sedangkan transformasi adalah proses memperkenalkan DNA asing ke dalam organisme. Metode ini sangat penting untuk mempelajari fungsi gen, produksi protein, dan berbagai aplikasi bioteknologi.

Dalam riset ini, fragmen gen *ideR* sepanjang 700 pb berhasil diklona ke dalam vektor plasmid pMV261 secara in silico dan in vitro. Plasmid pMV261 banyak digunakan sebagai vektor overekspresi gen yang ditargetkan. Plasmid rekombinan pMV261-*ideR* terklona akan digunakan untuk mengkarakteristik fenotip mycobacteria terhadap stres lingkungan, seperti peningkatan oksidan radikal atau penurunan asupan zat besi.^(13,15)

Pada riset lain, dalam menunjukkan aspek penting dari overekspresi gen, gen MDM2 yang mengodekan pengatur negatif dari protein supresor tumor p53 digunakan.⁽¹⁹⁾ Riset itu menunjukkan bahwa ekspresi tinggi MDM2 dapat menyebabkan transformasi sel dengan mengganggu aktivitas biologis p53.⁽¹⁹⁾ Hal ini menekankan pentingnya memahami mekanisme di balik overekspresi gen dan implikasinya dalam transformasi seluler.

Penelitian lainnya dalam metode pengklonaan terkini, pengembangan vektor retroviral pengklonaan bebas ligasi (*Ligation-independent cloning*) telah menyediakan sistem efektif untuk transduksi gen stabil dalam sel mamalia. Vektor-vektor ini berharga untuk overekspresi gen skala laboratorium dan aplikasi skala besar, seperti membuat perpustakaan cDNA retroviral.⁽²⁰⁾ Kemajuan dalam teknologi pengklonaan telah memfasilitasi manipulasi dan studi overekspresi gen dalam berbagai sistem biologis.

Selanjutnya, penggunaan vektor pengklonaan yang *multicopy* telah diidentifikasi sebagai metode sederhana untuk overekspresi gen. Dengan memindahkan gen ke vektor ini, peneliti dapat mencapai tingkat

ekspresi gen yang tinggi, yang sangat penting untuk mempelajari efek overekspresi gen pada proses seluler.⁽²¹⁾ Pendekatan ini sangat berguna dalam menyelidiki dampak overekspresi gen terhadap transformasi sel dan regulasi pertumbuhan. Pada penelitian lain, studi tentang gen yang dioverekspresi di dalam ampikon DNA telah difasilitasi oleh teknik pengklonaan cDNA subtraktif gabungan dan hibridisasi genomik komparatif array (*array comparative genomic hybridization*). Metode ini menawarkan strategi komprehensif untuk secara efisien mengidentifikasi dan mengklona gen yang diamplifikasi, memberikan wawasan tentang mekanisme molekuler yang mendasari overekspresi gen.⁽²²⁾ Pendekatan seperti ini sangat penting dalam menjelaskan konsekuensi fungsional dari overekspresi gen dalam berbagai konteks biologis.

Secara keseluruhan, metode pengklonaan dan transformasi memainkan peran penting dalam aplikasi overekspresi gen, memungkinkan peneliti untuk menyelidiki efek dari amplifikasi gen dan overekspresi pada proses seluler. Implikasinya, dengan memanfaatkan teknologi pengklonaan mutakhir dan teknik molekuler, kompleksitas regulasi gen, transformasi seluler, dan mekanisme penyakit yang terkait dengan ekspresi gen yang abnormal dapat diuraikan. Akan tetapi, ketiadaan akses fasilitas pada metode-metode terkini yang diuraikan diatas, menjadi keterbatasan pada penelitian ini.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa fragmen gen *ideR* berhasil dirancang dan diklona ke dalam vektor plasmid pMV261 sehingga menghasilkan plasmid rekombinan pMV261-*ideR* yang digunakan untuk mengkarakteristik fenotip mycobacteria. Disarankan untuk meningkatkan kapasitas teknologi pada fasilitas lab agar dapat menggunakan metode klonasi terkini yang saat ini sudah banyak dilakukan di negara-negara maju.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2022. Geneva: WHO; 2022.
2. Gygli SM, Borrell S, Trauner A, Gagneux S. Antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Mechanistic and evolutionary perspectives. FEMS Microbiol Rev. 2017;41(3):354–73.
3. Bussi C, Gutierrez MG. *Mycobacterium tuberculosis* infection of host cells in space and time. FEMS Microbiol Rev. 2019;43(4):341–61.
4. Huang L, Nazarova E V., Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: Bacterial fitness within the host macrophage. Bact Intracellularity. 2020;7(2):127–38.
5. Lyon SM. Pulmonary tuberculosis. Med J Aust. 2016;2(20):726.
6. Suárez I, Fünfer SM, Rademacher J, Fätkenheuer G, Kröger S, Rybníček J. The diagnosis and treatment of tuberculosis. Dtsch Arztebl Int. 2019;116(43):729–35.
7. Kalscheuer R, Palacios A, Anso I, Cifuentes J, Anguita J, Jacobs WR, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* capsule: A cell structure with key implications in pathogenesis. Biochem J. 2019;476(14):1995–2016.
8. Ghazaei C. *Mycobacterium tuberculosis* and lipids: Insights into molecular mechanisms from persistence to virulence. J Res Med Sci. 2018;23(1).
9. Chao A, Sieminski PJ, Owens CP, Goulding CW. Iron acquisition in *Mycobacterium tuberculosis*. Chemical Reviews. 2019;119(1):1193–1220 p.
10. Yan S, Xu M, Wang R, Li Q, Yu Z, Xie J. Overexpression of Rv2788 increases mycobacterium stresses survival. Microbiol Res. 2017;195:51–9.
11. Marcos-Torres FJ, Juniar L, Griesse JJ. The molecular mechanisms of the bacterial iron sensor IdeR. Biochem Soc Trans. 2023;51(3):1319–29.
12. Rodriguez GM, Sharma N, Biswas A, Sharma N. The iron response of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for tuberculosis pathogenesis and novel therapeutics. Front Cell Infect Microbiol. 2022;12(5):1–9.
13. Cheng Y, Yang R, Lyu M, Wang S, Liu X, Wen Y, et al. IdeR, a DtxR family iron response regulator, controls iron homeostasis, morphological differentiation, secondary metabolism, and the oxidative stress response in *Streptomyces avermitilis*. Appl Environ Microbiol. 2018;84(22):1–19.
14. Siregar TAP, Prombutara P, Kanjanasirirat P, Kunkaew N, Tubsuwan A, Boonmee A, et al. The autophagy-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain upregulates KatG to evade starvation-induced autophagic restriction. Pathog Dis. 2022;80(1):1–13.
15. Moule MG, Cirillo JD. *Mycobacterium tuberculosis* dissemination plays a critical role in pathogenesis. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10(February):1–12.
16. Melief E, Kokoczk R, Files M, Bailey MA, Alling T, Li H, et al. Construction of an overexpression library for *Mycobacterium tuberculosis*. Biol Methods Protoc. 2018;3(1):1–9.
17. Vatlin AA, Shitikov EA, Shahbaaz M, Bespiatykh DA, Klimina KM, Christoffels A, et al. Transcriptomic Profile of *Mycobacterium smegmatis* in Response to an Imidazo[1,2-b][1,2,4,5]tetrazine reveals its possible impact on iron metabolism. Front Microbiol. 2021;12(August):1–9.
18. Zhang L, Hendrickson RC, Meikle V, Lefkowitz EJ, Ioerger TR, Niederweis M. Comprehensive analysis of iron utilization by *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog. 2020;16(2):1–27.
19. Sharp DA, Kratowicz SA, Sank MJ, George DL. Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. J Biol Chem. 1999;274(53):38189–96.
20. Patel A, Muñoz A, Halvorsen K, Rai P. Creation and validation of a ligation-independent cloning (LIC) retroviral vector for stable gene transduction in mammalian cells. BMC Biotechnol. 2012;12(1):3.
21. Sørensen KI, Larsen R, Kibenich A, Junge MP, Johansen E. A food-grade cloning system for industrial strains of *Lactococcus lactis*. Appl Environ Microbiol. 2000;66(4):1253–8.
22. De Preter K, Pattyn F, Berx G, Strumane K, Menten B, Van Roy F, et al. Combined subtractive cDNA cloning and array CGH: An efficient approach for identification of overexpressed genes in DNA amplicons. BMC Genomics. 2004;5:1–14.