

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

PRISCILA REINALDO VITOLA

**CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA ADENILOSSUCCINATO LIASE (*purB*, EC 4.3.2.2)
DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv COMO ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO
DE DROGAS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Porto Alegre

2013

PRISCILA REINALDO VITOLA

**CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA ADENILOSSUCCINATO LIASE (*purB*, EC 4.3.2.2)
DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv COMO ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO
DE DROGAS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre na área de concentração de Farmacologia e Bioquímica Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre

2013

V845c Vitola, Priscila Reinaldo

Caracterização da enzima adenilossuccinato liase (*purB*, EC 4.3.2.2) de *Mycobacterium Tuberculosis* H37Rv como alvo para desenvolvimento de drogas para o tratamento da tuberculose / Priscila Reinaldo Vitola. Porto Alegre, 2013.
125 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, 2013.

Orientador: Diógenes Santiago Santos; Co-orientador: Luiz Augusto Basso.

1. Medicina. 2. Farmacologia. 3. Bioquímica molecular. 4. Adenilossuccinato liase. 5. Tuberculose humana. 6. Biossíntese de purinas. I. Santos, Diógenes Santiago. II. Título.

Catálogo na publicação: Leandro Augusto dos Santos Lima – CRB 10/1273

PRISCILA REINALDO VITOLA

**CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA ADENILOSSUCCINATO LIASE (*purB*, EC 4.3.2.2)
DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv COMO ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO
DE DROGAS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre na área de concentração de Farmacologia e Bioquímica Molecular.

Aprovada em: 25 de março de 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Nadja Schröder – PUCRS

Prof. Dr. Carla Denise Bonan – PUCRS

Prof. Dr. Arthur Germano Fett-Neto – UFRGS

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre

2013

Dedico este trabalho aos meus pais Levy Reinaldo Vitola e Daniel Vitola (*in memoriam*) por me ensinarem o valor inestimável da educação.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Diógenes Santiago Santos e Luiz Augusto Basso, pela oportunidade de crescimento profissional dentro do seu esplêndido grupo de pesquisas, e principalmente por toda a ajuda e suporte.

Ao colega, professor e amigo Cristiano Bizarro por compartilhar comigo sua sabedoria através de conselhos valiosos, bem como seus conhecimentos.

Aos meus colegas e amigos de laboratório por compartilharem comigo seus conhecimentos tornando possível a realização deste trabalho, também pela paciência e companheirismo, principalmente aos colegas Diana Rostirolla, Zilpa Adriana, Gregório, Tathyana Franco Christiano Neves, Anne Villela, Cândida Deves, Léia Jaskulski, Laura Marder, Valnês Junior, Caroline Brancher, Priscila Wink, Renilda, Gleci, Melissa e Pâmela.

Aos meus amigos, Graci, Milena, Luana, Helena, Laura, Luita e Douglas por fazerem parte da minha vida, por sempre terem uma palavra de conforto e otimismo, pela confiança, incentivo, paciência e pela verdadeira amizade por nós compartilhada.

Ao meu amigo, companheiro e, sobretudo, meu amor, Rafael Saraiva, por todo apoio emocional, paciência e incentivo, que foi peça fundamental para realização deste mestrado.

Às minhas irmãs Denise e Luciana, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem.

Finalmente, gostaria de agradecer à minha mãe, por todo apoio, sem o qual não teria sido possível alcançar tal conquista.

Muito obrigada a todos vocês!

RESUMO

A tuberculose humana (TB) é uma doença infectocontagiosa provocada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* e permanece sendo um importante problema mundial de saúde. Estima-se que 8,7 milhões de novos casos tenham ocorrido em 2011. Problemas relacionados ao tratamento da infecção ocorrem devido à sua habilidade de persistir de forma latente no hospedeiro criando um reservatório da doença. Adicionalmente, a emergência de cepas multi, extensivamente e totalmente resistentes, a coinfeção TB-HIV e a complexidade do tratamento utilizado atualmente, alertam para a necessidade de novos medicamentos, que possuam novos mecanismos de ação.

A enzima adenilossuccinato liase (ASL) está envolvida em ambas as vias de biossíntese de purinas. Neste trabalho, nós descrevemos a amplificação, clonagem da ASL de *M. tuberculosis* (*MtASL*) e expressão em *Escherichia coli*. O sequenciamento N-terminal juntamente com análises por espectrometria de massas confirmaram a identidade da *MtASL* homogênea. Foi demonstrado através de cromatografia de exclusão por tamanho que a proteína é um homotetrâmero em solução. Ensaio de cinética no estado estacionário revelaram que a *MtASL* exibe um modelo de cinética hiperbólica e que catalisa a clivagem de S-AMP a AMP e fumarato. Estudos de perfil de pH demonstraram que a *MtASL* realiza um mecanismo catalítico ácido-básico e, tais estudos, combinados ao alinhamento múltiplo de sequências, permitiram propor os resíduos de aminoácidos envolvidos na reação. Adicionalmente, estudos de inibição pelos produtos somados a estudos de calorimetria de titulação isotérmica da ligação dos mesmos, permitiram propor o mecanismo cinético da *MtASL*. Os resultados deste trabalho podem auxiliar na posterior identificação de análogos de nucleotídeos que sejam capazes de inibir a viabilidade do *M. tuberculosis*, com poucos danos ao hospedeiro humano.

Palavras-chave: adenilossuccinato liase, *purB*, tuberculose, biossíntese de purinas.

ABSTRACT

Human tuberculosis (TB), an illness that results from *Mycobacterium tuberculosis* infection, remains a major health problem worldwide, accounting for an estimated 8.7 million new cases globally in 2011. Problems related to treatment of *M. tuberculosis* infection are related to its ability to persist latently in host tissues, getting protection against drug treatment and creating a reservoir of disease. Additionally, the emergence of multi, extensively and totally drug-resistant strains, TB-HIV co-infection and the complexity of the treatment currently used, underline the need of new antitubercular drugs, with novel mechanisms of action.

The enzyme adenylosuccinate lyase (ASL) is involved in both de novo and salvage pathways of purine biosynthesis. Here we describe *M. tuberculosis* ASL (*MtASL*) cloning and expression in *Escherichia coli*. N-terminal amino acid sequencing and electrospray ionization mass spectrometry analyses confirmed the identity of homogeneous *MtASL*. Size exclusion chromatography showed that the protein is a homotetramer in solution. Steady-state kinetics revealed that *MtASL* exhibits hyperbolic kinetics and confirmed that the recombinant enzyme indeed catalyses the cleavage of S-AMP in AMP and fumarate. The pH-rate profile showed that *MtASL* follows an overall acid-basic mechanism of catalysis and these studies, combined with multiple sequence alignment analysis led us to propose what amino acid residues are involved in the *MtASL* chemical reaction. In addition, product inhibition studies and isothermal titration calorimetry of binding products allowed us to propose the *MtASL* kinetic mechanism. The results here reported could lead to the identification of nucleoside analogs that potently inhibit *M. tuberculosis* viability, with minor damages to the human host.

Keywords: adenylosuccinate lyase, *purB*, tuberculosis, purine biosynthesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estimativas globais da incidência de TB	16
Figura 2. Morfologia dos isolados TDR-TB	23
Figura 3. Estrutura do nucleotídeo adenosina 5'-monofosfato (AMP)	26
Figura 4. Via <i>de novo</i>	30
Figura 5. Conversão de IMP em AMP ou GMP a partir de duas reações distintas.....	31
Figura 6. Visão global da via de salvamento identificadas no genoma de <i>M. tuberculosis</i>	34
Figura 7. Reações catalisadas pela ASL.....	36
Figura 8. Liberação do inserto pela clivagem com EcoRI	52
Figura 9. Triagem dos clones com as enzimas de restrição.....	53
Figura 10. Melhor condição de expressão da <i>MtASL</i>	54
Figura 11. Etapas da purificação	55
Figura 13. Alinhamento múltiplo de seqüências de aminoácidos das ASLs de <i>M. tuberculosis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , Humana e de <i>T. maritima</i> por CLUSTALW	58
Figura 14. Parâmetros cinéticos no estado estacionário	60
Figura 15. Perfil de pH para a reação catalizada pela <i>MtASL</i>	63
Figura 16. Gráficos duplo-recíprocos para a inibição da <i>MtASL</i>	65
Figura 17. Análises de ITC.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Medicamentos utilizados no tratamento de TB resistente	20
Tabela 2. Purificação da <i>MtASL</i> a partir de células de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.	56

LISTA DE SIGLAS

ADK – adenilato quinase

ADP – adenosina difosfato

AICAR – 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotídeo

AIDS – *Acquired immune deficiency syndrome*

AK – adenosina quinase

AMP – adenosina monofosfato

ASL – adenilossuccinato liase

ASS – adenilossuccinato sintase

ATIC – AICAR transformilase/IMP cicloidrolase

ATP – adenosina trifosfato

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CHES – ácido 2-(cicloexilamino)-etanesulfônico

DNA – ácido desoxirribonucléico

DMSO – dimetil sulfóxido

DO – densidade óptica

DOTS – *Directly Observed Treatment Short Course*

FPLC – *Fast protein liquid chromatography*

GDP – guanosina difosfato

GMK – guanilato quinase

GMP – guanosina monofosfato

GMPS – guanosina monofosfato sintase

GTP – guanosina trifosfato

HEPES – ácido 4-(2-hidroxi-etil)piperazina-1-etanesulfônico

HGPRT – hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HMW – *high molecular weight*

IMP – inosina monofosfato

IMPDH – IMP-desidrogenase

IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
ITC – isothermal titration calorimetry
LB – Luria-Bertani
LMW – *low molecular weight*
MDR-TB – *multi-drug resistant tuberculosis*
MES – ácido 2-morfolinoetanesulfônico monoidratado
NTPs – nucleosídeos trifosfato
OMS – Organização Mundial da Saúde
PNP – purina nucleosídeo fosforilase
PRPP – fosforibosil pirofosfato
PRS – 5-fosforibosil-1-pirofosfato sintase
SAICAR – 5-aminoimidazol-4(N-succinilcarboxamida) ribonucleotídeo
S-AMP – succinil-adenosina monofosfato
SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*
TB – Tuberculosis
TDR-TB – *totally drug-resistant tuberculosis*
TRIS – Tris(hidroximetil)aminometano
VC – volumes de coluna
XDR-TB – *extensively drug-resistant tuberculosis*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Tuberculose: uma visão geral	15
1.2 Tratamento	18
1.3 Desenvolvimento de resistência	19
<i>1.3.1 Mecanismos de resistência</i>	22
1.4 Coinfecção com o HIV	23
1.5 Desenvolvimento de novas drogas	24
1.6 Metabolismo de nucleotídeos	26
<i>1.6.1 A biossíntese de nucleotídeos purínicos em Mycobacterium tuberculosis</i>	28
1.6.1.1 <i>Via de novo</i>	29
1.6.1.2 <i>Via de Salvamento</i>	32
1.7 Adenilossuccinato Liase (EC 4.3.2.2)	35
3 OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Amplificação do gene <i>purB</i> através da reação em cadeia da polimerase	41
4.2 Clonagem do gene <i>purB</i> em vetor de clonagem pCR®-Blunt	41
4.3 Subclonagem do gene <i>purB</i> em vetor de expressão pET-23a(+)	42
4.4 Sequenciamento dos fragmentos clonados no vetor de expressão pET-23a(+)	42
4.5 Superexpressão da enzima Adenilossuccinato Liase em sistema heterólogo	43
4.6 Purificação pela técnica de FPLC	43
4.7 Análise da estrutura primária da proteína através de espectrometria de massa	45
4.8 Determinação do estado oligomérico em solução	46
4.9 Alinhamento múltiplo de sequências	47
4.10 Cinética enzimática no estado estacionário	47
4.11 Perfil de pH	48
4.12 Estudos de inibição pelos produtos	49

4.13 Calorimetria de titulação isotérmica.....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Amplificação do gene <i>purB</i> através da reação em cadeia da polimerase.....	51
5.2 Clonagem do gene <i>purB</i> em vetor de clonagem pCR®-Blunt.....	51
5.3 Subclonagem do gene <i>purB</i> em vetor de expressão pET-23a(+)......	52
5.4 Sequenciamento dos fragmentos clonados no vetor de expressão pET-23a(+)......	53
5.5 Superexpressão da enzima Adenilossuccinato Liase em sistema heterólogo	54
5.6 Purificação pela técnica de FPLC	55
5.7 Análise da estrutura primária da proteína através de espectrometria de massa	56
5.8 Determinação do estado oligomérico em solução.....	57
5.9 Alinhamento múltiplo de sequências.....	57
5.10 Cinética enzimática no estado estacionário	59
5.11 Perfil de pH.....	60
5.12 Estudos de inibição pelos produtos	64
5.13 Calorimetria de titulação isotérmica.....	65
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	71
ANEXO 1. Manuscrito submetido	81
ANEXO 2. Submissão do manuscrito	125

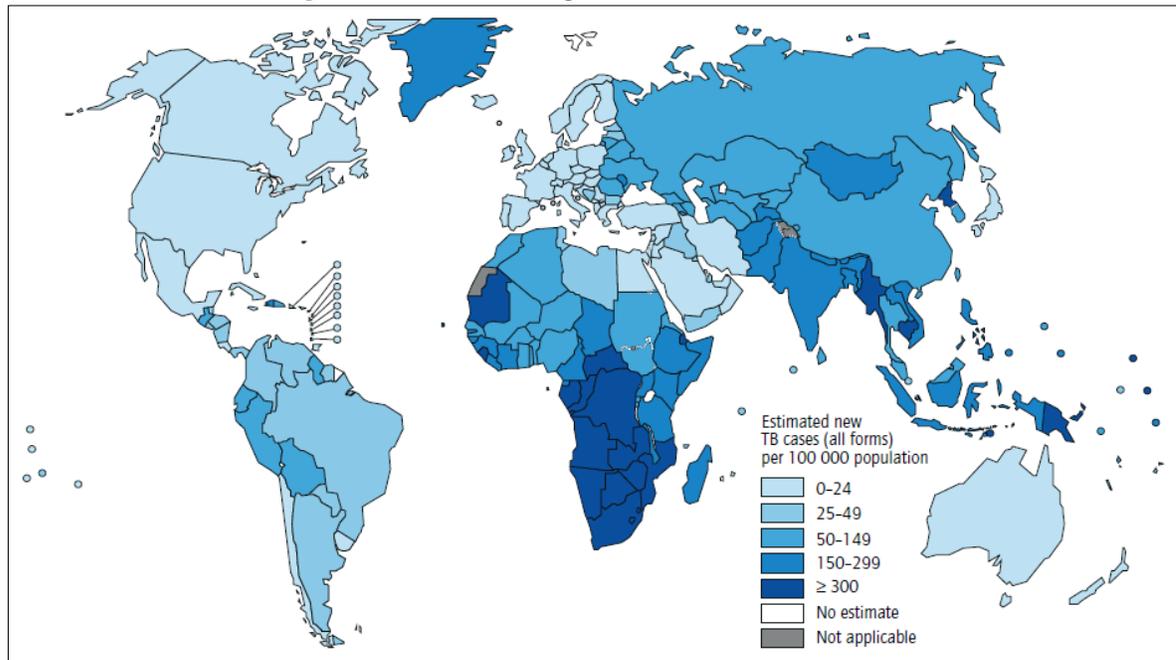
1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose: uma visão geral

A tuberculose humana (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, um patógeno parasita que infecta predominantemente os macrófagos alveolares. Sua evolução é regulada pela resposta imune celular do hospedeiro que, muitas vezes contém a infecção, mas não a erradica (DUCATI *et al.*, 2006). A transmissão da TB ocorre, sobretudo, em condições ambientais associadas à pobreza, tais como espaços superlotados com ventilação inadequada e em casos de desnutrição (WHO, 2010a; 2010b; 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que no ano de 2011, ocorreram 8,7 milhões de novos casos de TB – principalmente na Ásia e na África (Figura 1) – e que 1,4 milhões de pessoas morreram da doença, sendo que destes, aproximadamente um milhão de mortes ocorreu entre indivíduos HIV negativos. A prevalência mundial estimada é de 12 milhões de pessoas. Apesar de o número de casos incidentes e do número absoluto dos casos da doença estarem diminuindo, a tuberculose ainda está longe de ser combatida, principalmente devido ao surgimento das cepas resistentes (WHO, 2012).

Figura 1. Estimativas globais da incidência de TB



Fonte: WHO, 2012.

As características importantes do bacilo causador da TB são: crescimento lento, estabelecimento de latência, complexidade do envelope celular e homogeneidade genética, ou seja, o genoma do *M. tuberculosis* possui alto conteúdo de G e C (65,6%) e é rico em sequências repetitivas (COLE *et al.*, 1998). O tempo de geração do *M. tuberculosis* é de aproximadamente 24h, o que contribui para a natureza crônica da doença (HARSHEY & RAMAKRISHNAN, 1977; HIRIYANNA & RAMAKRISHNAN, 1986; COLE *et al.*, 1998). As micobactérias podem persistir por períodos prolongados no hospedeiro graças à sua baixa taxa de replicação, resultando na produção de baixos níveis de antígenos, o que, por sua vez, pode provocar um atraso na diferenciação das células T ou ainda silenciar a resposta imune, impedindo, portanto, a completa eliminação do patógeno (RUSSELL *et al.*, 2007).

A formação do granuloma é um evento patognomônico da infecção por *M. tuberculosis*. Após a infecção, os bacilos inalados são fagocitados pelos macrófagos alveolares, podendo ser eliminados ou permanecer no ambiente intracelular. A resposta imune mediada por células, gerada somente entre a segunda e sexta semana após a infecção, promove a ocorrência de infiltrados inflamatórios na lesão, essencialmente compostos por linfócitos e macrófagos

ativados. Como resultado da reação inflamatória, grande parte da carga bacteriana é eliminada, porém, uma grande proporção de fagócitos e de células do parênquima pulmonar também morre; esse evento produz uma necrose sólida caseosa característica, o granuloma ou complexo de Gohn, no qual alguns bacilos podem persistir na forma latente ¹ (DUCATI *et al.*, 2006). Os granulomas limitam a replicação do *M. tuberculosis*, restringindo o acesso do mesmo a oxigênio e nutrientes e expondo o bacilo a pH ácido e a efetores imunes, como o óxido nítrico (RUSTAD *et al.*, 2009).

A sobrevivência de bactérias intracelulares baseia-se, entre outras habilidades, na sua capacidade de permanecer no ambiente ácido dos fagossomas dos macrófagos infectados. Na maioria dos indivíduos imunocompetentes é estabelecida uma resposta imune secundária capaz de controlar a infecção por um longo período. A falha do sistema imunológico do indivíduo infectado pode permitir a ativação da infecção latente, levando então ao desenvolvimento de TB ativa, fato que pode ocorrer em consequência de qualquer fator desencadeador de imunossupressão, como na infecção por HIV, desnutrição, envelhecimento, uso de drogas, câncer, diabetes, insuficiência renal crônica e terapia com imunossupressor (PARRISH *et al.*, 1998). Em suma, o *M. tuberculosis* se torna ativo se o sistema imune for incapaz de impedir seu crescimento.

Indivíduos com TB latente não apresentam sintomas e não transmitem a infecção. O único sinal da infecção é a positividade da reação de *Mantoux* ² (CDC, 2012a).

¹ Definida como a presença de qualquer lesão causada pelo bacilo que não produz sintomas da sua presença. A latência pode ser atingida pela restrição do crescimento do *M. tuberculosis* nos pulmões antes do início da doença ativa ou pela resolução espontânea da TB primária. A maioria das pessoas expostas ao bacilo da tuberculose consegue produzir uma vigorosa resposta imune celular que impede a progressão da doença limitando-a ao local inicial da infecção. No entanto, a completa eliminação do patógeno é lenta e difícil de ser atingida. Na ausência de tratamento quimioterápico, acredita-se que a infecção latente (ou crônica) é responsável pela evolução à doença ativa. A TB latente pode reativar após anos ou mesmo décadas de persistência sub-clínica, resultando na progressão da doença e transmissão do patógeno. O termo latência refere-se, portanto, a uma situação na qual o patógeno e o hospedeiro estabeleceram um balanço que resulta na ausência de sintomas no hospedeiro. Fonte: (GOMEZ & MCKINNEY, 2004; ZHANG, 2004)

² A reação de *Mantoux*, ou teste cutâneo da tuberculina, consiste em uma reação de hipersensibilidade cutânea às proteínas do bacilo presentes em um reagente que contém derivado proteico purificado (PPD), que ocorre em indivíduos infectados em geral. É realizado por meio de injeção subcutânea do reagente, procedendo a interpretação do teste após um período de 48 ou 72 horas, medindo-se o diâmetro do halo formado em milímetros no qual um diâmetro ≥ 5 mm é considerado resultado positivo para pacientes com

1.2 Tratamento

Apesar de existirem diferentes regimes de tratamento contra a TB, a OMS recomenda o esquema conhecido como DOTS (*Directly Observed Treatment Short Course*) (WHO, 2010a; 2010c). A quimioterapia indicada para pacientes sem história prévia de TB consiste em uma associação de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol por dois meses, seguida de quatro meses de tratamento com isoniazida e rifampicina. Em caso de necessidade de um novo tratamento com drogas de primeira linha (como no caso de países onde o diagnóstico molecular de doença sexualmente transmissível não é de fácil acesso), recomenda-se um regime de dois meses de tratamento com isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol e estreptomicina, seguidos de um mês com isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, mais cinco meses de tratamento com isoniazida, rifampicina, e etambutol (WHO, 2010c). Havendo falha no tratamento, ou seja, presença de culturas positivas após cinco meses de terapia apropriada (IOM, 2009), são utilizados os medicamentos de segunda linha. Os medicamentos utilizados são apresentados na Tabela 1, agrupados de maneira alternativa, conforme a eficácia no tratamento de cepas resistentes, experiência de uso e classe medicamentosa. Por exemplo, os agentes do Grupo 1 são os mais potentes e melhor tolerados; medicamentos do Grupo 5 não são recomendados para o tratamento rotineiro de TB resistente, pois sua eficácia nesses regimes não é clara (WHO, 2010b; 2010c).

Para o tratamento de cepas resistentes, diversos fatores devem ser considerados, tais como a disponibilidade de resultados laboratoriais de resistência e a coinfeção com HIV. Regimes individualizados são baseados na história prévia do uso de isoniazida, rifampicina, agentes injetáveis de segunda linha e fluoroquinolona.

O tratamento da infecção latente deve ser levado em consideração quando os indivíduos infectados pertencem a grupos de risco, reduzindo então a probabilidade de desenvolvimento da TB ativa. Contudo, se o indivíduo tiver sido exposto a uma cepa resistente, o tratamento preventivo pode não ser uma opção (WHO, 2010c; CDC, 2012b).

HIV, indivíduos que tiveram contato recente com TB infecciosa e para indivíduos que possuem cicatrização pulmonar indicativa de TB antiga; uma reação ≥ 10 mm é positiva em pessoas que não preenchem os critérios acima, mas possuem outros fatores de risco para TB. Fonte: HENRY, 2008.

Em situações normais, é necessário um único medicamento para tratar a TB latente. O mais utilizado nesses casos é a isoniazida, preferencialmente por nove meses. Porém, crianças e indivíduos soropositivos podem necessitar de um tratamento mais prolongado (CDC, 2012b).

Além de preconizar o tratamento, a estratégia do DOTS inclui outros cinco componentes: *i*) estabelecer uma rede de indivíduos treinados a administrar e supervisionar o DOTS; *ii*) criar laboratórios e profissionais habilitados para o diagnóstico da TB; *iii*) implementar um sistema de fornecimento confiável de medicamentos de alta qualidade (preferencialmente, sem custo aos pacientes); *iv*) compromisso governamental e *v*) estabelecer um sistema de monitoramento dos casos, tratamento e resultados (WHO, 2010c). Tais estratégias podem prevenir a ocorrência de novas infecções e, adicionalmente e mais importante, dificultar o surgimento de casos de cepas resistentes (DUCATI *et al.*, 2006).

1.3 Desenvolvimento de resistência

O *M. tuberculosis* é naturalmente resistente a muitos antimicrobianos e quimioterápicos utilizados por possuir enzimas que hidrolisam ou modificam os medicamentos, sistemas de efluxo e, também, devido à presença de uma parede celular altamente hidrofóbica, com permeabilidade e penetrabilidade extremamente baixa (COLE *et al.*, 1998; DUCATI *et al.*, 2006; CHANDRA *et al.*, 2011).

Tabela 1. Medicamentos utilizados no tratamento de TB resistente

Grupos	Medicamentos (abreviações)
Grupo 1 – Agentes orais de primeira linha	Pirazinamida Etambutol Rifabutina
Grupo 2 – Agentes injetáveis	Canamicina Amicacina Capreomicina Estreptomicina
Grupo 3 – Fluorquinolonas	Levofloxacino Moxifloxacino Ofloxacino
Grupo 4 – Agentes bacteriostáticos orais de segunda linha	Ácido para-aminosalicílico Cicloserina Terizidona Etionamida Protionamida
Grupo 5 – Agentes cujo papel não é estabelecido no tratamento de tuberculose resistente	Clofazimina Linezolida Amoxicilina/clavulanato Tioacetazona Imipenem/cilastatina Alta dose de isoniazida Claritromicina

Adaptado de: WHO, 2011.

Nota: Os medicamentos de primeira linha são os que pertencem ao grupo 1 e estreptomicina. Os medicamentos do grupo 2-5, exceto a estreptomicina, são de segunda linha. Alta dose de isoniazida é definida como 16-20 mg/kg/dia.

O desenvolvimento de cepas resistentes tem sido largamente documentado. No *M. tuberculosis*, se dá essencialmente por mutações cromossomais (CHANDRA *et al.*, 2011). Nos anos 90, foi identificada uma cepa resistente a no mínimo isoniazida e rifampicina, denominada MDR-TB (*multi-drug resistant tuberculosis*). O tratamento da mesma requer o uso dos medicamentos de segunda linha que têm menor eficiência, são mais tóxicos e mais caros, além de ser mais prolongado, podendo perdurar de 18 a 24 meses após a conversão das culturas (WHO, 2010b; 2010c).

A resistência pode ser tipicamente adquirida ou amplificada na presença de diversas situações: quando os medicamentos são utilizados inadequadamente por falhas na prescrição; devido à falta de adesão dos pacientes ao tratamento e devido à utilização de medicamentos inadequados ou de baixa qualidade (CDC, 2006b; IOM, 2009). A resistência pode ser considerada primária, ou seja, quando a infecção inicial se dá por uma cepa de *M. tuberculosis*

com resistência medicamentosa, ou secundária, quando a infecção se dá por uma cepa suscetível, que após o contágio, gera alguma mutação que a torna resistente (LASHLEY & DURHAM, 2007).

Estima-se que, em 2011 ocorreram 630.000 casos de MDR-TB mundialmente, predominantemente entre pacientes previamente tratados (WHO, 2012), principalmente na Europa oriental e na Ásia central. Entretanto, o número de casos pode ser subestimado devido a várias razões, tais como, a ausência de estudos de prevalência em muitos países africanos, a disponibilidade limitada de laboratórios que realizem o diagnóstico em alguns países, o fato de muitos dos estudos realizados considerarem somente casos de TB com esfregaço positivo, o que acaba excluindo muitos casos de MDR-TB, já que nem todos apresentam positividade (IOM, 2009).

Em março de 2006, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) comunicou a existência de uma nova cepa com extensiva resistência às drogas de segunda linha, denominada XDR-TB (*extensively drug-resistant tuberculosis*) (CDC, 2006b). A XDR-TB foi posteriormente definida como TB cujos isolados são resistentes à isoniazida e rifampicina com resistência adicional a qualquer fluoroquinolona e, a pelo menos, um dos três medicamentos de segunda linha (i.e., amicacina, canamicina ou capreomicina) (CDC, 2006a). A XDR-TB pode ser particularmente letal, especialmente entre pessoas coinfectadas com HIV (WHO, 2010a). Em 2011, 62 países e 3 territórios reportaram pelo menos um caso de XDR-TB (WHO, 2012).

Um estudo realizado no Irã, entre 2006 e 2008, procurou verificar a ocorrência de resistência entre pacientes MDR-TB. Dentre as 146 cepas envolvidas no estudo, foram encontrados oito isolados XDR-TB (5,4%) e 15 isolados TDR-TB (*totally drug-resistant tuberculosis*). Após 18 meses de tratamento com medicamentos de segunda linha, seguidos de troca do mesmo, culturas e esfregaços obtidos a partir de amostras dos pacientes com TDR-TB, permaneceram positivas (VELAYATI *et al.*, 2009).

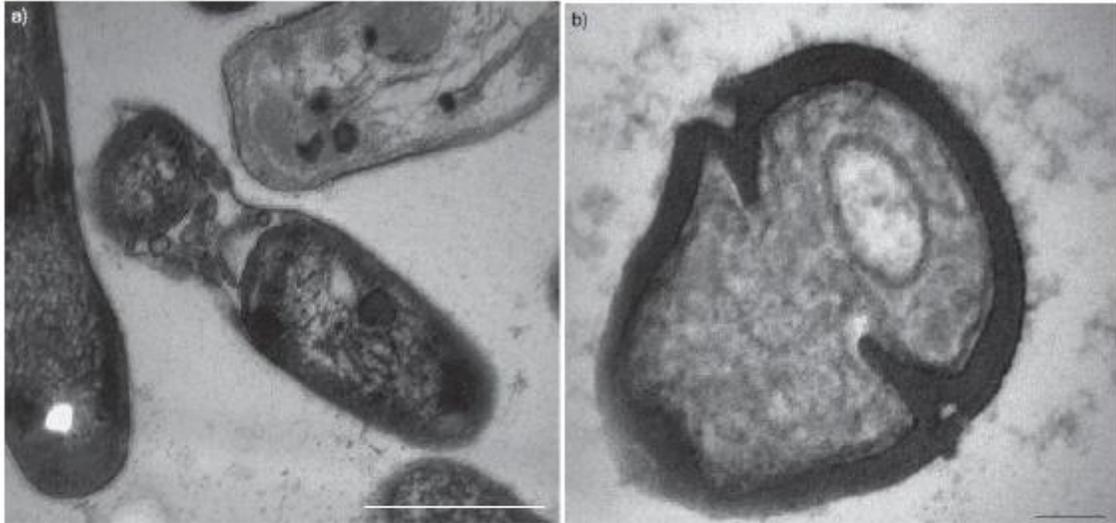
Os pesquisadores definiram TDR-TB como cepas MDR-TB resistentes aos medicamentos de primeira linha (isoniazida, rifampicina, estreptomicina, etambutol e pirazinamida) e segunda linha testados (ofloxacino, cicloserina, protionamida, amicacina, canamicina, etionamida, ácido para-aminossalicílico e capreomicina). No estudo, 95% das cepas XDR-TD e TDR-TB foram isoladas a partir de amostras de pacientes com história prévia de TB, que não estavam

coinfectedados com HIV. Dentre os pacientes estudados, muitos não haviam recebido medicamentos de segunda linha, anteriormente, porém, 10,2% desses pacientes estavam contaminados com cepas totalmente resistentes. Os autores atribuíram isso ao fato de que, no Irã, grande parte das drogas de segunda linha é utilizada rotineiramente no tratamento de outras afecções respiratórias (VELAYATI *et al.*, 2009), situação que pode ocorrer também no Brasil, onde o uso de agentes antimicrobianos é reconhecidamente descontrolado. Três anos após serem reportadas pela primeira vez, já foram reportados casos de TDR-TB na Índia (UDWADIA *et al.*, 2012), um dos países de maior incidência da doença.

1.3.1 Mecanismos de resistência

Uma das características estruturais que podem estar relacionadas com o aumento da resistência é a espessura da parede celular dos isolados resistentes. Outro estudo realizado no Irã, com cepas MDR-TB e TDR-TB, identificou algumas características peculiares na estrutura de suas paredes celulares. Três diferentes populações foram observadas na fase de crescimento exponencial dos bacilos TDR-TB estudados: *i*) de estrutura normal (70-80%), *ii*) de formato redondo ou oval (15-20%) e *iii*) com parede celular extraordinariamente espessa, com 21-26 nm de espessura, possuindo características similares às de bacilos dormentes (5-7%). Tais formas adaptadas foram encontradas em todos os isolados TDR-TB, independente de superfamília ou padrão genotípico, não sendo encontradas entre os isolados MDR-TB. Diferenças marcantes e estatisticamente significativas na espessura da parede celular foram encontradas através da análise por microscopia de transmissão, sendo encontrados $15,6 \pm 1,03$ nm, $17,1 \pm 1,03$ nm e $20,2 \pm 1,5$ nm para isolados suscetíveis, MDR-TB e TDR-TB, respectivamente. Formas ovais ou redondas também foram encontradas somente entre isolados TDR-TB (VELAYATI *et al.*, 2009). A Figura 2 ilustra a morfologia característica dos isolados de TDR-TB.

Figura 2. Morfologia dos isolados TDR-TB



Fonte: Adaptado de Velayati *et al.*, 2009.

Nota: a) Bacilo TDR-TB com corpos ovais ou redondos em seu interior. Escala de 5.500 nm. b) Bacilo TDR-TB na forma de estágio estacionário ou dormente em divisão. O aumento na espessura da parede celular é evidente. Escala de 5.100 nm.

1.4 Coinfecção com o HIV

Em todo o mundo, a TB é reconhecidamente a infecção oportunista mais comum entre indivíduos infectados com HIV, estando entre as principais causas de morte desses indivíduos (CDC, 2007; WHO, 2010a). Por outro lado, a infecção pelo HIV modificou a epidemiologia e história natural da TB através do aumento da sua transmissão, morbidade e mortalidade (CDC, 2007; IOM, 2009).

A coinfecção HIV/TB vem aumentando nos últimos anos (WHO, 2010a) e contribui com o desenvolvimento de TB resistente, pois favorece a sobrevivência e transmissão de cepas até mesmo atenuadas entre esses indivíduos, fato que não ocorreria entre hospedeiros normais (IOM, 2009). Outro fator que deve ser levado em consideração é o fato que dentre esses pacientes o índice de abandono ao tratamento é maior (BRENNAN, 1997; CDC, 2007). Desse modo, as duas patologias estão intimamente relacionadas, sendo muitas vezes referidas como coepidemias (WHO, 2010a).

Indivíduos que são HIV positivos reconhecidamente possuem comprometimento do sistema imune, estando mais suscetíveis à reativação da TB latente quando a sua contagem de

linfócitos T CD4 diminui (IOM, 2009). A diminuição dessas células, que é uma das principais características da progressão para Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired immune deficiency syndrome – AIDS*) é induzida pelo *M. tuberculosis* através da produção de citocinas estimulatórias (DUCATI *et al.*, 2006).

Pacientes MDR-TB coinfectados com HIV tem menores índices de cura do que pacientes contaminados apenas com MDR-TB (IOM, 2009). O tratamento desses indivíduos é prejudicado por diversos fatores, dentre eles a dificuldade de adesão provocada pela polifarmácia, sobreposição de efeitos colaterais dos medicamentos antituberculose e antirretrovirais, síndrome inflamatória da reconstituição imune e interações medicamentosas. Apesar disso, a terapia antirretroviral é primordial entre os pacientes com TB e AIDS avançada, pois resulta em acentuada diminuição do risco de morte ou do estabelecimento de outras infecções oportunistas. É importante observar também que o uso de antirretrovirais diminui a eficácia dos medicamentos antituberculose (CDC, 2007; HU *et al.*, 2010).

As interações medicamentosas mais importantes no tratamento de indivíduos coinfectados são as que ocorrem entre rifampicina e inibidores da transcriptase reversa não nucleosídicos – efavirenz e nevirapina. Rifampicina é a única rifamicina disponível em muitos países e o tratamento antirretroviral inicial – nas áreas onde há altos índices de tuberculose – consiste de efavirenz e nevirapina em combinação com análogos nucleosídicos (CDC, 2007).

1.5 Desenvolvimento de novas drogas

Os regimes de tratamento, atuais são muito longos e requerem muitos medicamentos. O tratamento de indivíduos infectados com cepas suscetíveis perdura de 6 a 9 meses, enquanto que, na presença de cepas resistentes, pode levar de 18 a 24 meses (WHO, 2010c).

Os medicamentos de segunda linha disponíveis são muito mais tóxicos e possuem custo mais elevado quando comparados aos medicamentos de primeira linha. No entanto, muitos medicamentos de primeira linha não são compatíveis com alguns medicamentos comumente utilizados no tratamento do HIV (WHO, 2010a; 2010c).

Um dos objetivos do plano global da OMS para interromper a progressão mundial da TB é o desenvolvimento de novos medicamentos que preferencialmente possuam novos mecanismos

de ação, que sejam capazes de proporcionar menor período de tratamento – visando obter um aumento na adesão dos pacientes ao tratamento, que sejam compatíveis com o tratamento antirretroviral utilizado nos indivíduos soropositivos e, principalmente, sejam efetivos na fase latente da infecção (WHO, 2010C).

A existência de MDR e TDR-TB e sua disseminação exigem a descoberta e produção de novos medicamentos. Dentre os desafios a serem superados para o desenvolvimento de novos fármacos com as características desejadas, está a falta de entendimento sobre a biologia de persistência do bacilo (COLE *et al.*, 1998; DUCATI *et al.*, 2006; IOM, 2009; VELAYATI *et al.*, 2009; SIMEONE *et al.*, 2010; CDC, 2012a). Para atingir esse objetivo, a OMS preconiza o entendimento da biologia do *M. tuberculosis*, identificando e validando novos alvos enzimáticos para o desenvolvimento de drogas e a identificação de compostos capazes de se tornar candidatos a novos fármacos (WHO, 2010c).

Uma estratégia racional para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças infecciosas, como a tuberculose, é o estudo da bioquímica básica do organismo causador da doença a fim de determinar quais as diferenças presentes entre o agente infeccioso e as células humanas. Um alvo promissor ideal seria essencial para a sobrevivência do patógeno no organismo humano e ausente no ser humano, o que deveria resultar no desenvolvimento de medicamentos anti-infecciosos atóxicos. Alternativamente, um alvo promissor pode desempenhar um papel importante na estratégia de sobrevivência do patógeno (adaptação) em uma determinada circunstância fisiológica (numa célula ou compartimento celular) do hospedeiro (ROSTIROLLA *et al.*, 2011; BREDA *et al.*, 2012).

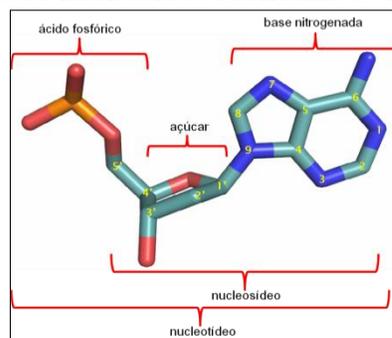
Enzimas estão entre as principais categorias de alvos explorados no processo de desenvolvimento de drogas e os inibidores enzimáticos são responsáveis por pelo menos metade dos medicamentos utilizados na clínica atualmente. Diversas vias metabólicas têm sido estudadas como possíveis alvos de drogas, incluindo as vias de biossíntese de purinas e pirimidinas, que têm sido largamente utilizadas no desenvolvimento de agentes anticâncer e antivirais devido ao seu envolvimento em muitos processos celulares essenciais para a sobrevivência (ROBERTSON, 2005; PARKER & LONG, 2007). Diferenças entre as enzimas homólogas podem ser exploradas para o desenvolvimento de agentes que interajam especificamente com a enzima do agente causador da doença, o que por sua vez, resultaria numa toxicidade seletiva para o organismo

patogênico (PARKER & LONG, 2007). A seguir, apresentamos uma breve descrição das vias de biossíntese de purinas como alvos promissores para o desenvolvimento de drogas anti-TB.

1.6 Metabolismo de nucleotídeos

Os nucleotídeos são compostos que fazem parte de um grande número de processos bioquímicos nas diferentes formas de vida, tais como sinalização celular, regulação de rotas biossintéticas e fornecimento de energia para rotas metabólicas dentre outras inúmeras funções. A importância dos nucleotídeos no metabolismo celular é sustentada pelo fato de que quase todas as células podem sintetizá-los tanto *de novo* quanto a partir dos produtos de degradação dos ácidos nucleicos – o que se denomina salvamento ou recuperação (VOET & VOET, 2011). Eles são formados por ésteres de fosfato de um açúcar de cinco átomos de carbono (pentose), nos quais uma base nitrogenada está covalentemente ligada ao C1' do resíduo de açúcar (Figura 3). Os ribonucleotídeos constituem as unidades monoméricas do ácido ribonucleico (RNA), no qual a pentose é a D-ribose, enquanto que os desoxirribonucleotídeos possuem a desoxi-D-ribose como pentose e são as unidades monoméricas do DNA (NELSON & COX, 2005; SMITH *et al.*, 2005; VOET & VOET, 2011). São divididos ainda quanto à base nitrogenada que possuem, em nucleotídeos de purinas e pirimidinas.

Figura 3. Estrutura do nucleotídeo adenosina 5'-monofosfato (AMP)



Adaptado de: Voet D, 4ª ed., 2011.

Nota: A ligação glicosídica entre o açúcar e a base nitrogenada forma o nucleosídeo. Quando um ácido fosfórico é esterificado com um grupo hidroxila da porção açúcar de um nucleosídeo, forma-se um nucleotídeo. Átomos de carbono em ciano, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e fósforo em laranja. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para maior clareza da figura. Numeração padrão dos átomos da base e do açúcar em amarelo.

As bases nitrogenadas são moléculas planas, aromáticas e heterocíclicas, derivadas de purinas ou pirimidinas. Os principais componentes purínicos dos ácidos nucleicos são as bases adenina (A) e guanina (G) enquanto que os pirimidínicos são citosina (C), uracila (U), que ocorre principalmente no RNA, e timina (T), que ocorre no DNA (VOET & VOET, 2011). Portanto, os nucleotídeos são classificados em purínicos e pirimidínicos (NELSON & COX, 2005; SMITH *et al.*, 2005; VOET & VOET, 2011).

O metabolismo de nucleotídeos requer um controle fino, pois eles devem estar presentes em quantidades específicas e no momento correto para a síntese de ácidos nucleicos, permitindo a replicação celular e a síntese de proteínas, além de influenciar na manutenção do balanço eletroquímico das células – devido às suas cargas negativas (NELSON & COX, 2005).

É provável que o *M. tuberculosis* tenha que reciclar bases, nucleosídeos, e/ou nucleotídeos para sobreviver no ambiente hostil oferecido pelos macrófagos do hospedeiro, uma vez que a parede celular micobacteriana é constituída de três macromoléculas covalentemente ligadas: peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos – complexo comumente descrito como micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (SCHROEDER *et al.*, 2002) – sendo, portanto, pouco permeável para compostos hidrofílicos, uma vez que estes atravessam a parede lentamente devido à pouca eficiência e baixa concentração das porinas. A parede micobacteriana também retarda a taxa de internalização de compostos lipofílicos – devido à sua baixa fluidez (JARLIER & NIKAIDO, 1994) – e compostos químicos com carga líquida negativa – devido à carga líquida negativa da parede micobacteriana (BLOOM, 1994).

Por conseguinte, não é provável que os nucleotídeos mono, di, ou trifosfatos sejam internalizados pelo bacilo a menos que haja um sistema de transporte para realizar tal processo. Não há qualquer evidência experimental para a presença de transportadores de bases purínicas e/ou pirimidínicas bem como de seus nucleosídeos e/ou nucleotídeos constituintes dos ácidos nucleicos na parede celular do *M. tuberculosis* (BRAIBANT *et al.*, 2000; YOUM & SAIER, 2012).

O estudo da bioquímica básica do *M. tuberculosis*, a fim de determinar enzimas importantes no seu metabolismo, possibilita explorar novas abordagens para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

1.6.1 A biossíntese de nucleotídeos purínicos em *Mycobacterium tuberculosis*

As purinas são biomoléculas de importância vital para todos os organismos vivos. Elas são essenciais para a síntese de ácidos nucleicos, proteínas e outros metabólitos, bem como para reações que necessitam de energia. Em geral, os nucleotídeos de purinas podem ser sintetizados pela via *de novo* – que inicia a partir de precursores simples – e/ou pela via de salvamento, na qual são utilizadas as bases e os nucleosídeos purínicos endógenos e exógenos (ZARKIN & NYGAARD; DUCATI *et al.*, 2011). Em ambos os casos, a molécula de ribose 5'-fosfato é sintetizada a partir de 5'-fosforribosil- α -1-pirofosfato (PRPP) – que é produzido a partir de glicose pela via da pentose-fosfato (TOZZI *et al.*, 2006) – e de ATP, em reação catalisada pela enzima 5-fosforribosil-1-pirofosfato sintase (PRS), que é uma enzima regulatória da via. Portanto, purinas são inicialmente sintetizadas como ribonucleotídeos, e não como bases livres (ZALKIN & NYGAARD, 1996; VOET & VOET, 2011).

O metabolismo de purinas é conservado entre eucariotos e procariotos, incluindo o *M. tuberculosis*. Embora as duas vias de biossíntese não tenham sido ainda detalhadamente caracterizadas, sabe-se que o bacilo expressa enzimas de ambas as vias (MALATHI & RAMAKRISHNAN, 1966). Enzimas homólogas a enzimas das duas vias têm sido identificadas no genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (COLE *et al.*, 1998) e, a despeito do fato de muitas destas enzimas serem essenciais para seu crescimento e persistência (SASSETTI *et al.*, 2003), seus mecanismos de ação permanecem obscuros.

Adaptações metabólicas ao ambiente energético são relacionadas com o deslocamento entre as vias de salvamento e de novo da síntese de purinas. Já foi demonstrado que micobactérias patogênicas são capazes de modificar a expressão das enzimas da via de salvamento mediante a suplementação de bases de purina (WHEELER, 1987).

A via de salvamento de purinas é considerada um alvo promissor para o desenvolvimento de análogos de nucleosídeos com atividade anti-TB (EL KOUNI, 2003). Análogos de nucleosídeos são considerados uma importante classe de medicamentos e são utilizados no tratamento de câncer e infecções virais, podendo ser relevantes no tratamento de TB resistente,

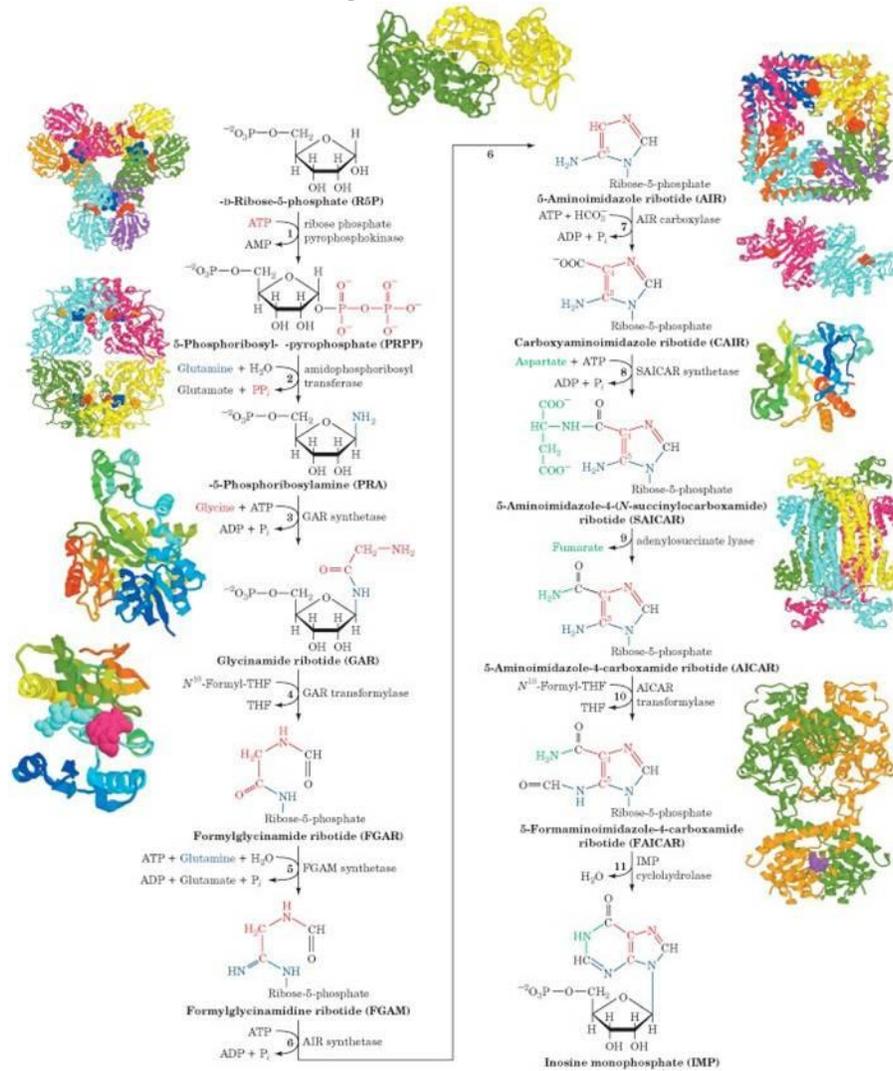
uma vez que seu mecanismo de ação é diferente das terapias existentes ou, ainda, podem ser úteis no tratamento de TB latente (DUCATI *et al.*, 2011).

1.6.1.1 Via *de novo*

A rota típica de biossíntese *de novo* de IMP é representada na Figura 4 e envolve de 10 a 12 reações enzimáticas – iniciadas a partir da formação de PRPP – que sucessivamente convertem fosforibosilpirofosfato (PRPP) ao primeiro nucleotídeo de purina, a inosina monofosfato (IMP) (KAPPOCK *et al.*, 2000). Estudos comparativos indicam padrões únicos de organização dos genes que codificam enzimas dessa via, mecanismos únicos de regulação gênica, e enzimas multifuncionais distintas entre os organismos (ZALKIN & NYGAARD, 1996). Na maioria dos organismos são necessários 12 passos, dos quais 6 utilizam ATP, 2 utilizam glutamina e 2 utilizam N¹⁰-formil tetraidrofolato (LE NOURS *et al.*, 2011).

As reações catalisadas pelas enzimas PRS, PRPP amido-transferase, adenilossuccinato sintase (ASS) e IMP-desidrogenase (IMPDH) são as etapas reguladas da via, sendo que as duas primeiras enzimas controlam a síntese de IMP e as duas últimas controlam a síntese de adenosina monofosfato (AMP) e guanosina monofosfato (GMP), respectivamente. Um sítio primário de regulação é a síntese de PRPP. A PRS é negativamente afetada por guanosina difosfato (GDP) e, em um sítio alostérico distinto, por adenosina difosfato (ADP). Assim, a ligação simultânea de uma oxipurina e uma aminopurina podem ocorrer, tendo como resultado uma inibição sinérgica da enzima (SMITH *et al.*, 2005).

Figura 4. Via *de novo*



Fonte: Voet & Voet, 2011.

Nota: Rota metabólica da biossíntese *de novo* de IMP. O resíduo de purina é sintetizado a partir de um anel de ribose, através de 11 reações catalisadas por enzimas. As estruturas cristalográficas, resolvidas através de raios-X, das enzimas que catalisam as reações estão demonstradas ao lado de suas reações correspondentes.

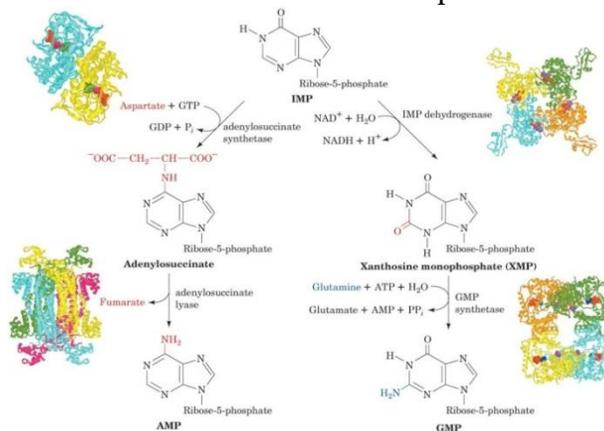
A primeira metade da via é dedicada à formação do anel aminoimidazólico ligado à ribose, enquanto a segunda metade da via modifica os substituintes das posições 4 e 5 do imidazol, até a reação de ciclização final na qual o IMP é formado (KAPPOCK *et al.*, 2000; LE NOURS *et al.*, 2011).

Pouco se sabe com relação às enzimas desta via no *M. tuberculosis*, apesar de ser essencial para seu crescimento e sobrevivência (SASSETTI *et al.*, 2003). Recentemente, duas enzimas foram identificadas e tiveram suas estruturas caracterizadas, demonstrando que os dois últimos passos são catalisados por uma enzima bifuncional codificada pelo gene *purH*, a AICAR transformilase/IMP cicloidrolase (ATIC) (LE NOURS *et al.*, 2011) e, que a enzima codificada pelo gene *purN*, corresponde à glicinamida ribonucleotídeo transformilase (GAR transformilase), a qual catalisa o quarto passo da via (ZHANG *et al.*, 2009).

Após a sua formação, o IMP não acumula nas células, mas é rapidamente convertido em AMP e GMP, através de duas reações anabólicas diferentes (ZALKIN & NYGAARD, 1996; VOET & VOET, 2011).

As enzimas Adenilossuccinato sintetase (ASS) e Adenilossuccinato liase (ASL) catalisam duas reações sequenciais para a síntese de AMP a partir de IMP, enquanto a síntese de GMP é catalisada pelas enzimas inosina 5'-monofosfato desidrogenase e GMP sintetase (Figura 5) (ZALKIN & NYGAARD, 1996; VOET & VOET, 2011).

Figura 5. Conversão de IMP em AMP ou GMP a partir de duas reações distintas



Fonte: Voet & Voet, 2011.

Nota: As estruturas cristalográficas, resolvidas através de raios-X, das enzimas que catalisam as reações estão demonstradas ao lado de suas reações correspondentes.

O sequenciamento do genoma de *M. tuberculosis* (COLE *et al.*, 1998a) evidenciou que a síntese *de novo* de purinas no bacilo é mediada por rotas altamente conservadas em outras bactérias. Além disso, a maquinaria celular responsável por converter o produto inicial IMP, em AMP e GMP, encontra-se essencialmente intacta (MIZRAHI *et al.*, 2005).

Para que ocorra sua incorporação nos ácidos nucleicos, os nucleosídeos monofosfato devem ser convertidos em seus nucleosídeos trifosfato (NTPs) correspondentes. A síntese de NTPs ocorre a partir de sucessivas reações de fosforilação, catalisadas por nucleosídeo monofosfato quinases (específicas para bases purínicas ou pirimidínicas; porém que não discriminam entre ribose e desoxirribose) e nucleosídeo difosfato quinases não específicas. Estas enzimas catalisam a transferência reversível de um grupo fosfato a partir de um nucleosídeo trifosfato, geralmente adenosina 5'-trifosfato (ATP), para os nucleosídeos mono ou difosfatados (VOET & VOET, 2011).

1.6.1.2 Via de Salvamento

Em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, as rotas de salvamento possuem várias funções. Uma delas é o aproveitamento de bases pré-formadas e nucleosídeos exógenos, para a síntese de nucleotídeos; outra é a reutilização de bases e nucleosídeos endógenos, como resultado da reciclagem de nucleotídeos. Além disso, durante o catabolismo, moléculas de pentose de nucleosídeos exógenos e grupos amina de compostos de adenina contribuem como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente (ZALKIN & NYGAARD, 1996).

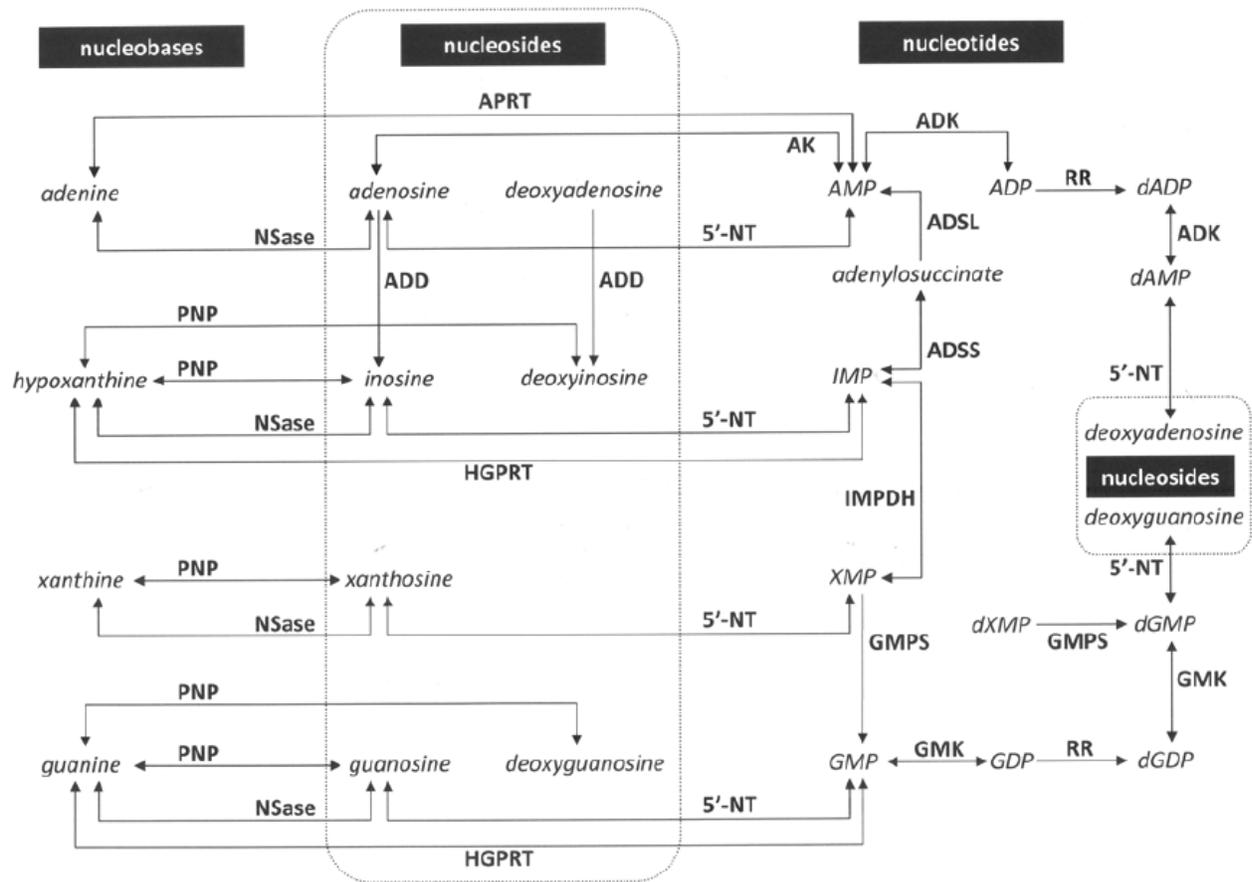
A maioria das células é capaz de reciclar ácidos nucleicos e, embora a formação de AMP e GMP a partir de IMP seja irreversível, purinas podem ser interconvertidas em adenina, guanina ou hipoxantina. Essas bases livres são então reconvertidas a seus nucleotídeos correspondentes através de rotas de salvamento (MIZRAHI *et al.*, 2005; VOET & VOET, 2011).

Ao contrário da síntese *de novo*, que é praticamente idêntica em todas as células, vias de salvamento diferem em características e distribuição. Enzimas envolvidas nesta rota são bem conhecidas em células humanas pela importância que têm no desenvolvimento de drogas antivirais e no tratamento anticâncer. A rota de salvamento em células humanas acontece quando adenina e adenosina são convertidas para AMP pela adenina fosforribosiltransferase e adenosina quinase, respectivamente, e hipoxantina e guanina são convertidas a IMP ou GMP pela hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT). Estes nucleotídeos são convertidos em nucleotídeos trifosfatos (ATP, GTP, dATP e dGTP) os quais são substratos de RNA e DNA polimerases (PARKER & LONG, 2007).

Quando bases livres ou nucleosídeos presentes no meio de crescimento são aproveitadas, as vias de síntese *de novo* são suprimidas. Igualmente, uma vez que as reações químicas envolvidas na síntese *de novo* de IMP requerem alta demanda de energia celular, em condições de baixa viabilidade energética ou multiplicação rápida, a via de salvamento pode ser a principal fonte de nucleotídeos (ZALKIN & NYGAARD, 1996; DUCATI *et al.*, 2011).

O conhecimento sobre esta via no *M. tuberculosis* ainda é escasso, porém, acredita-se que a mesma é utilizada quando o bacilo capta hipoxantina, guanina e adenina do meio externo, convertendo-as em seus nucleotídeos correspondentes (BIAZUS *et al.*, 2009; DUCATI *et al.*, 2011). Diversas enzimas homólogas da via de salvamento de purinas têm sido identificadas no genoma do *M. tuberculosis* (COLE *et al.*, 1998). Bases purínicas, nucleosídeos e nucleotídeos podem então ser interconvertidos através da atividade das enzimas descritas na Figura 6.

Figura 6. Visão global da via de salvamento identificadas no genoma de *M. tuberculosis*



Fonte: Ducati *et al.*, 2011.

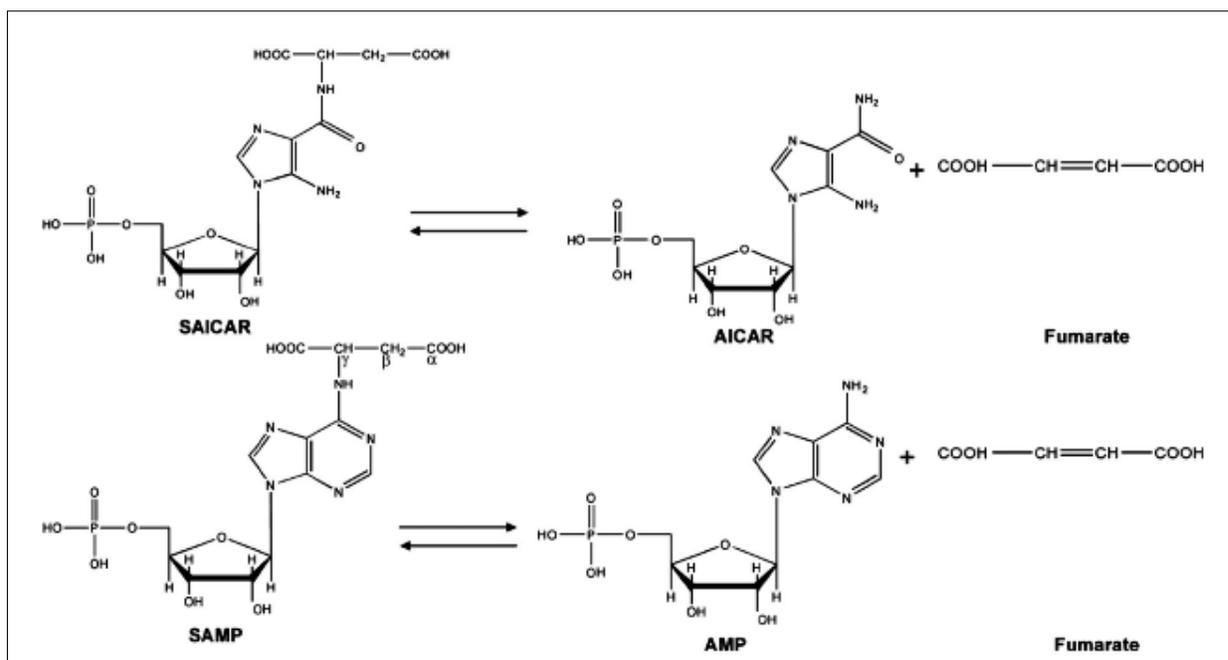
Nota: Enzimas da via de salvamento de purinas identificadas na sequência genômica de *M. tuberculosis* H37Rv. As abreviaturas e os intermediários estão de acordo com Ducati e colaboradores.

Contudo, apenas algumas destas enzimas tiveram sua caracterização bioquímica ou estrutural realizada, como Adenosina Quinase (AK) (LONG *et al.*, 2003), HGPRT (BIAZUS *et al.*, 2009), IMPDH (USHA *et al.*, 2011; USHA *et al.*, 2012), purina nucleosídeo fosforilase (PNP) (BASSO *et al.*, 2001; SHI *et al.*, 2001), Adenilato Quinase (ADK) (MUNIER-LEHMANN *et al.*, 1999), Guanilato Quinase (GMK) (HIBLE *et al.*, 2006) e Guanosina Monofosfato Sintase (GMPS) (FRANCO *et al.*, 2012).

1.7 Adenilossuccinato Liase (EC 4.3.2.2)

A enzima Adenilossuccinato Liase (ASL, adenilossuccinase, succino AMP liase; EC 4.3.2.2) de *M. tuberculosis* (*MtASL*) é composta por 473 aa, possui um peso molecular de 50,909 kDa e ponto isoelétrico (PI) teórico de 6,33. É codificada no genoma de *M. tuberculosis* pelo gene *purB* (Rv0777), de 1419 pb. Como pôde ser verificado no item 1.6, esta enzima catalisa dois passos distintos na síntese de purinas: a clivagem de 5-aminoimidazol-4(N-succinilcarboxamida) ribonucleotideo (SAICAR) a 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotideo (AICAR) e fumarato – o oitavo passo da via *de novo* – e a clivagem de succinil-adenosina monofosfato (SAMP) a adenosina monofosfato (AMP) e fumarato – último passo da síntese de AMP (Figura 6) (WOODWARD & BRAYMER, 1966) e que também pode estar envolvido na via de salvamento (DUCATI *et al.*, 2011).

Figura 7. Reações catalisadas pela ASL



Fonte: Bulusu et al, 2009.

A ASL pertence à superfamília das aspartases/fumarases, grupo de enzimas que catalisam reações nas quais o fumarato é um dos produtos, que apresentam alta conservação da estrutura terciária e quaternária (VAN DEN BERGHE *et al.*, 1997; SPIEGEL *et al.*, 2006; PUTHAN VEETIL *et al.*, 2012) a despeito do fato de que o alinhamento de suas sequências pode apresentar identidade tão baixa quanto 15%. O mecanismo geral pelo qual tais enzimas realizam a catálise é ácido-básico. Primeiramente, uma cadeia lateral básica de um aminoácido presente na enzima abstrai o próton do C β do substrato, formando um intermediário carbânion (PORTER & BRIGHT, 1980; PORTER *et al.*, 1983; NUIRY *et al.*, 1984; RAUSHEL, 1984; PUTHAN VEETIL *et al.*, 2009). Subsequentemente, o intermediário colapsa e a clivagem da ligação C–N ocorre – etapa limitante da reação (BLANCHARD & CLELAND, 1980; NUIRY *et al.*, 1984; WU *et al.*, 1998; BULUSU *et al.*, 2009); então uma cadeia lateral ácida de um aminoácido presente na enzima doa o próton para o grupamento de saída (BROSIUS & COLMAN, 2002; TSAI *et al.*, 2007; KOZLOV *et al.*, 2009).

Juntas, as reações catalisadas pelas enzimas ASS e ASL também regulam o metabolismo celular pelo controle de fumarato – um intermediário do ciclo do ácido cítrico, e pelos níveis de AMP livre (TOTH & YEATES, 2000). As ASLs são homotetrâmeros com aproximadamente 52 kDa por subunidade, das quais três contribuem com aminoácidos para o sítio ativo, que é localizado em tal interface (BROSIUS & COLMAN, 2002; PUTHAN VEETIL *et al.*, 2012). Resíduos de histidina de duas subunidades distintas participam da catálise (LEE *et al.*, 1999; BULUSU *et al.*, 2009).

Enzimas homólogas têm sido caracterizadas, bioquímica e/ou estruturalmente, com o objetivo de desenvolver inibidores em diversos organismos, tais como *Staphylococcus aureus* (FYFE *et al.*, 2010), *Schistosoma mansoni* (FOULK *et al.*, 2002), *Plasmodium falciparum* (MARSHALL & COPPEL, 1997) *Trypanosoma cruzi* (SPECTOR *et al.*, 1982) e *Bacillus subtilis* (LEE *et al.*, 1997; 1998; 1999; BROSIUS & COLMAN, 2000; 2002; SIVENDRAN & COLMAN, 2008) o que demonstra a sua relevância neste contexto.

ASL participa da regulação do metabolismo celular pelo controle dos níveis de fumarato – um intermediário do ciclo do ácido cítrico – e AMP livre (ARAGON & LOWENSTEIN, 1980; VAN DEN BERGHE *et al.*, 1992). Experimentos em *E. coli* demonstraram que a expressão de todos os genes envolvidos na síntese do IMP é reprimida em consequência da suplementação de hipoxantina e que, a expressão destes genes, juntamente com os genes da síntese de GMP, são reguladas pelo mesmo repressor, o PurR (*purR*). Este repressor se liga a sequências PUR *box-like* (gaaaacgtttnc) encontradas na região promotora de genes relacionados à síntese de purinas bem como na região downstream do *purR* (MENG *et al.*, 1990). O gene *purB* de *E. coli* é regulado tanto pelo conteúdo de purinas quanto pelo PurR (WOLFE & SMITH, 1985; HE *et al.*, 1992).

No genoma de *M. tuberculosis* não é encontrado nenhum homólogo do *purR* e nenhuma sequência PUR *box-like* foi identificada no gene *purB*, o que indica que a MtASL pode responder apenas ao conteúdo de purinas, o que corrobora com a atividade regulatória dos níveis de AMP livre atribuídas ao ciclo de nucleotídeos de purina (VAN DEN BERGHE *et al.*, 1997). Por outro lado, já foi demonstrado que a ASL de *B. subtilis* atua como reguladora da biossíntese de proteínas via glutamyl-tRNA sintetase (GENDRON *et al.*, 1992), um processo que demanda muita energia. Portanto, a ASL pode ser responsável pelo acoplamento das biossínteses de

purinas e proteínas, regulando a biossíntese de AMP e mantendo a razão celular ATP/AMP (TOTH *et al.*, 2000).

A essencialidade desta enzima para a viabilidade e virulência tem sido estudada em diferentes organismos. *E. coli* mutantes que não expressavam ASS e ASL demonstraram-se auxotróficas para adenosina, adenina ou AMP, mas não cresceram em meio com ADP, ATP, inosina, hipoxantina, guanina ou guanosina (WATANABE *et al.*, 2011). Mutantes de *Bacillus anthracis* que não expressavam ASL ou ASS perderam a virulência – fato que não pôde ser revertido com a suplementação de nenhuma purina pós-infecção – em contraste a outros mutantes auxotróficos para purinas (IVANOVICS *et al.*, 1968). Do mesmo modo, cepas de *Streptococcus sanguinis* nocautes para ASL tiveram sua virulência diminuída em 150 vezes (PAIK *et al.*, 2005), o que foi corroborado por resultados encontrados em *S. typhimurium* e *Salmonella dublin*, nos quais o nocaute de *purA* e *purB* provocou perda total da virulência, enquanto que em outros mutantes – *purF*, *purG* ou *purC*, também chamados de responsivos à hipoxantina – a perda da virulência foi parcial (MCFARLAND & STOCKER, 1987).

Devido à sua importância na biossíntese de purinas e seu papel na sobrevivência e virulência demonstrado em diferentes organismos, a caracterização da *MtASL* por meio de estudos cinéticos – que podem prover uma base sólida para o entendimento do mecanismo de ação da mesma – é de grande relevância para o entendimento da biologia do *M. tuberculosis* e para o posterior desenvolvimento de compostos inibidores que possam se tornar candidatos a medicamentos que possuam novos mecanismos de ação.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, a vigilância do tratamento e pesquisas avançadas para o desenvolvimento de novas drogas se tornou uma prioridade na luta contra a TB. Uma das características mais importantes do patógeno causador da TB é sua capacidade de persistir no hospedeiro humano por longos períodos em estado de latência, quando não se apresentam manifestações clínicas que permitam sua identificação.

Embora o número de casos de tuberculose tenha diminuído em estimativas recentes, a emergência de cepas MDR, XDR e TDR-TB e sua rápida progressão em países populosos – nos quais grande parte da população vive em condições de pobreza – torna cada vez mais urgente o desenvolvimento de novos medicamentos.

Vias de síntese de nucleotídeos são consideradas uma boa fonte de novos alvos para medicamentos antibacterianos, e a via de salvamento de purinas é considerada um alvo promissor para o desenvolvimento de análogos de nucleosídeos com atividade anti-TB (EL KOUNI, 2003), que possam ser relevantes tanto no tratamento de cepas resistentes quanto durante a fase de latência (DUCATI *et al.*, 2011).

Apoiando os esforços para o descobrimento de novos alvos, o nosso grupo estuda as enzimas da biossíntese de purinas e pirimidinas, a fim de determinar a sua importância na viabilidade do bacilo. Estudos cinéticos visando o entendimento do mecanismo de ação das enzimas em questão podem prover uma base sólida para posterior avaliação do seu papel biológico.

Devido à sua importância na biossíntese de purinas e seu papel na sobrevivência e virulência demonstrado em diferentes organismos, a caracterização bioquímica da *MtASL* é de grande relevância para o entendimento da biologia do *M. tuberculosis* e para o posterior identificação de compostos inibidores que possam se tornar candidatos a novos medicamentos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é a caracterização cinética da enzima Adenilossuccinato liase (ASL) de *M. tuberculosis*.

3.2 Objetivos específicos

- Amplificar o gene *purB* a partir de DNA genômico total de *M. tuberculosis* H37Rv através da reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Clonar o fragmento amplificado em vetor de clonagem pCR®-Blunt;
- Subclonar em vetor de expressão pET-23a(+);
- Sequenciar os fragmentos subclonados no vetor de expressão pET-23a(+);
- Expressar a enzima em sistema heterólogo, utilizando diferentes cepas eletrocompetentes de *E. coli* a fim de obter a enzima recombinante na forma solúvel;
- Purificar a proteína através da técnica de FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) e quantificar;
- Analisar a estrutura primária da proteína através de espectrometria de massa;
- Determinar o estado oligomérico da enzima em solução;
- Determinar a atividade enzimática e principais características enzimológicas por meio de ensaios de cinética enzimática no estado estacionário bem como os efeitos do pH;
- Determinar o mecanismo cinético por meio de estudos de inibição pelos produtos e por ensaios de ligação pela técnica de ITC (*Isothermal Titration Calorimetry* – Calorimetria de Titulação Isotérmica).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amplificação do gene *purB* através da reação em cadeia da polimerase

O desenho de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos contendo os sítios de restrição para as enzimas NdeI e BamHI foi realizado utilizando a sequência do gene reportada na base de dados NCBI para o gene *purB*, Rv0777, de 1419 pb (pares de base), (NCBI Reference Sequence: NC_000962.2) da cepa laboratorial H37Rv de *M. tuberculosis*, anotada nas bases de dados Tuberculist e Protein (NCBI) como Adenilossuccinato Liase (*MtASL*, EC 4.3.2.2; NCBI Reference Sequence: NP_215291.1). A amplificação da sequência nucleotídica, que codifica a proteína de interesse, foi realizada mediante a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*), a partir de DNA (ácido desoxirribonucléico) genômico total da cepa H37Rv, utilizando para isto a enzima DNA polimerase de *Pyrococcus furiosus*, Pfu® Turbo DNA Polymerase (Stratagene), que possui atividade de exonuclease 3'–5' e confere alta fidelidade de amplificação. Além disso, esta enzima foi escolhida por ser altamente termoestável, e gerar fragmentos de PCR com extremidades cegas.

4.2 Clonagem do gene *purB* em vetor de clonagem pCR®-Blunt

O fragmento purificado foi clonado em vetor de clonagem pCR®-Blunt (Invitrogen), utilizando a enzima T4 DNA ligase. Este *kit* tem como objetivo a clonagem de fragmentos de PCR de extremidades cegas e a seleção dos clones recombinantes, pois a ligação do fragmento ao vetor interrompe a expressão de um gene letal para a célula, o *ccdB*. O vetor recombinante (pCR-Blunt::*purB*) foi posteriormente inserido em células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B, por eletroporação (Gene Pulser II; Capacitance Extender II; Pulse Controller II, BIO-RAD) seguida de posterior crescimento em placas de cultura (meio Lysogeny Broth – LB) contendo canamicina 50 µg mL⁻¹ – antibiótico de resistência do vetor – para seleção das células recombinantes e subsequente inoculação em meio LB líquido contendo o mesmo antibiótico, para crescimento, posterior extração do DNA plasmidial (Qiaprep Spin Miniprep – Qiagen) e clivagem com a enzima de restrição EcoRI (Cenbiot Enzimas) para confirmação da ligação do

fragmento correspondente ao gene (1419 pb) ao vetor. Os fragmentos foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose.

4.3 Subclonagem do gene *purB* em vetor de expressão pET-23a(+)

Para a transferência do gene de interesse para um plasmídeo de expressão, o vetor recombinante pCR®-Blunt::*purB* e o vetor de expressão pET-23a(+) (Novagen) foram clivados com enzimas de restrição específicas (NdeI e BamHI), a fim de proporcionar extremidades coesivas entre o vetor e o fragmento. O fragmento clivado (1419 pb) foi clonado em vetor de expressão pET-23a(+), na presença de T4 DNA ligase. O vetor de expressão recombinante foi introduzido por eletroporação em células *E. coli* DH10B, e inoculados para crescimento em meio apropriado (LB contendo 50 µg mL⁻¹ de ampicilina) para posterior extração do DNA plasmidial (Qiaprep® Spin Miniprep – Qiagen), sendo que o produto obtido nessa etapa é designado como o plasmídeo pET-23a(+>::*purB*. A confirmação da presença do inserto em vetor de expressão pET-23a(+) foi realizada pela clivagem do plasmídeo recombinante com as mesmas enzimas de restrição e visualização da liberação do inserto após eletroforese em gel de agarose.

4.4 Sequenciamento dos fragmentos clonados no vetor de expressão pET-23a(+)

O DNA plasmidial, contendo o inserto (pET-23a(+>::*purB*), foi quantificado no espectrofotômetro Ultrospec 3100 pro (Amersham Biosciences) utilizando o programa DNA quantification, que mede a absorvância em dois comprimentos de onda, 260 nm e 280 nm. A leitura em 260 nm permite o cálculo da concentração de ácidos nucléicos na amostra, em que uma DO (densidade óptica) de 1 corresponde a aproximadamente 50 µg mL⁻¹ para DNA dupla fita. A relação entre as leituras a 260 nm e 280 nm (DO₂₆₀/DO₂₈₀) proporciona uma estimativa de pureza em ácidos nucléicos. Preparações puras de DNA possuem valores de DO de 1,8. Havendo contaminação com proteína, a DO será significativamente menor, não sendo possível obter uma quantificação precisa (SAMBROOK *et al.*, 1989). O DNA quantificado foi posteriormente enviado para sequenciamento automático no setor de sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano, pertencente ao Instituto de Biociências da Universidade de São

Paulo, a fim de verificar a identidade e a integridade da sequência.

4.5 Superexpressão da enzima Adenilossuccinato Liase em sistema heterólogo

Nesta etapa, diferentes cepas de *E. coli* (Novagen) foram transformadas com o DNA plasmidial pET-23a(+):*purB* e, paralelamente, com o vetor pET-23a(+) (controle negativo) por eletroporação (Gene Pulser II; Capacitance Extender II; Pulse Controller II, BIO-RAD). As células transformadas foram então semeadas em placas de Petri contendo meio LB sólido e o(s) antibiótico(s) apropriado(s). Após crescimento, uma única colônia foi inoculada em meio LB (também contendo antibiótico) – pré-inóculo – e incubada para crescimento (37°C, 180 rpm, por 16h). O pré-inóculo foi utilizado para a realização dos inóculos em meio LB, Terrific Broth (TB) ou 2YT, que por sua vez, foram incubados para crescimento (37°C, 180 rpm, por 16h) até as culturas atingirem a densidade óptica (DO₆₀₀) entre 0,4 e 0,6, (Ultrospec 3100 pro – Amersham Biosciences), etapa na qual os controles positivos para indução foram induzidos com isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Todos os inóculos em meio líquido foram realizados na presença de antibiótico(s) apropriado(s). Após a indução, as culturas foram incubadas para crescimento e a superexpressão da proteína de interesse, a qual foi monitorada através da realização de coletas periódicas.

As amostras resultantes das diferentes coletas foram rompidas por ultrassom (Vibra cell, SONICS) e centrifugadas para separação das frações. As frações solúveis (sobrenadantes) foram separadas das frações insolúveis (*pellet*) e todas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel vertical de poliacrilamida 12% SDS – PAGE (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) corado com Comassie Blue (LAEMMLI, 1970).

4.6 Purificação pela técnica de FPLC

Depois de obtida a superexpressão da proteína recombinante na fração solúvel, foram realizadas diversas tentativas de purificação da mesma pela técnica de FPLC (*Fast protein liquid chromatography*), em equipamento do sistema de purificação ÄKTA (GE Health Care), com detecção UV a 215, 254 e 280 nm. Foram testados diferentes protocolos de purificação, nos quais

se modificou as colunas cromatográficas utilizadas, bem como os tampões, para obtenção da proteína homogênea e ativa. Todos os passos de purificação foram realizados a 4 °C ou em gelo e todas as frações foram analisadas por SDS-PAGE 12% corado com Comassie Blue (LAEMMLI, 1970).

O protocolo iniciou a partir de 2 g de células úmidas as quais foram ressuspensas em 20 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e incubados sob agitação por 30 min. Subsequentemente, adicionou-se lisozima (Sigma Aldrich) a uma concentração final de 0,2 mg mL⁻¹ e a solução foi incubada sob agitação por 30 min. Em seguida, as células foram rompidas por ultrassom (10 pulsos de 10 s, com intervalos de resfriamento de 1 min, a 60 % amplitude) com um probe de 13 mm, e a fração insolúvel do extrato celular foi removida por centrifugação a 38.000g por 30 min. O sobrenadante foi então tratado com sulfato de estreptomicina (Sigma Aldrich) a uma concentração final de 1% e a amostra foi centrifugada a 38.000 g for 30 min. O sobrenadante foi dialisado extensivamente contra Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e clarificado por centrifugação a 38.000 g por 30 min. O sobrenadante foi tratado com igual volume de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo (NH₄)₂SO₄ 2 M, a fim de obter uma concentração final de (NH₄)₂SO₄ 1 M, sob agitação constante.

A amostra tratada foi então aplicada em uma coluna de interação hidrofóbica (HiPrep 16/10 Octyl Sepharose FF, GE HealthCare) pré-equilibrada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo (NH₄)₂SO₄ 1 M, lavada com 5 volumes de coluna (VC) do mesmo tampão, seguida por 20 VC de um gradiente linear (100 – 20 %) do mesmo tampão, sob fluxo de 1,0 mL min⁻¹. As frações contendo a enzima recombinante foram agrupadas, concentradas a um volume final de 8 mL em uma célula de ultrafiltração (Amicon, equipado com membrana de 30 kDa de ponto de corte – Millipore) e aplicadas em uma coluna de exclusão por tamanho (HiLoad 26/60 Superdex-200 HR, GE HealthCare) pré-equilibrada com Hepes-NaOH 50 mM pH 7,0. As proteínas eluíram mediante gradiente isocrático a um fluxo de 0,5 mL min⁻¹. As frações contendo a enzima foram agrupadas e aplicadas em uma coluna de troca aniônica (MonoQ HR 16/10, GE HealthCare) pré-equilibrada com Hepes-NaOH 50 mM pH 7,0, lavada com 3 VC e a *MtASL* recombinante eluiu mediante 20 VC de um gradiente linear de 0 – 100 % de Hepes-NaOH 50 mM pH 7,0, contendo 400 mM de NaCl, sob fluxo de 1,0 mL min⁻¹. As frações contendo a enzima homogênea foram dialisadas extensivamente contra Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e armazenadas a –80 °C.

Para determinação da concentração total de proteína foi utilizado o *kit* Bio-Rad Protein Assay (BIORAD), o qual se baseia na técnica desenvolvida por Bradford (BRADFORD, 1976). A curva-padrão é realizada utilizando albumina de soro bovino. Todos os pontos da curva e a quantificação da proteína recombinante foram feitos em triplicata em espectrofotômetro Ultrospec 3100pro.

4.7 Análise da estrutura primária da proteína através de espectrometria de massa

Os ensaios foram realizados no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (PUC-RS) utilizando os espectrômetros de massas LTQ-XL e LTQ Orbitrap Discovery (Thermo), sob a coordenação do Dr. Cristiano V. Bizarro.

A fim de confirmar a identidade da *MtASL*, foi realizado mapeamento peptídico por LC-MS/MS. Amostras contendo 50 µg da proteína purificada (1 nmol) foram dessalinizadas e digeridas com tripsina através da adaptação do protocolo desenvolvido por Klammer e MacCoss (KLAMMER & MACCOSS, 2006). Separações cromatográficas dos peptídeos digeridos foram realizadas com colunas capilares de 15 cm (150 µm i.d., Kinetex 2.6 µm C18 core-shell particles – Phenomenex, Inc.) utilizando o sistema nanoLC Ultra (nanoLC Ultra 1D plus, Eksigent, USA) conectado a um espectrômetro de massas híbrido LTQ-Orbitrap (Thermo Electron Corporation, São Jose, CA). Os peptídeos gerados foram separados mediante um gradiente fracionado da fase móvel A (ácido fórmico 0,1 % em acetonitrila – 0–2% B por 5 min; 2–10% B por 3 min; 10–60% B por 60 min; 60–80% B por 2 min; 80% B isocrático por 10 min; 80–2% B por 2 min; e 2% B isocrático por 8 min) a um fluxo de 300 nL min⁻¹. A fragmentação por MS/MS foi realizada através de dissociação induzida por colisão com uma ativação Q de 0,250 e um tempo de ativação de 30,0 ms, 35% da energia de colisão normalizada e tamanho de isolamento de 1,0 Da. Os dados obtidos no LC-MS/MS foram comparados com espectros teóricos obtidos de digestão tripítica *in silico* do proteoma de *M. tuberculosis* H37Rv (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes>). Foi permitida a perda de dois sítios de clivagem para tripsina, uma tolerância de precursores de 10 ppm e de fragmentos de 0,8 Da; caramidometilação estática de cisteínas e oxidação em resíduos de metionina. Para redução de falsas identificações, a análise foi restrita a resultados com escore

Xcorr > 2.0 para íons duplamente carregados e escore Xcorr > 2.5 para íons triplamente carregados.

Para determinação da massa molecular da MtASL, a mesma foi dessalinizada, reconstituída em acetonitrila 50%/ácido fórmico 0,1% e diretamente injetada em uma fonte de ionização por *electrospray* IonMax, utilizando uma seringa de 500 µL (Hamilton Company, USA). Os parâmetros da fonte de *electrospray* foram os seguintes: modo íon positivo, 4,5 kV de voltagem aplicada à fonte de *electrospray*, 5 unidades arbitrárias de gás (faixa de 0 – 100), 4,0 V de voltagem do capilar, temperatura do capilar de 200 °C e 49,7 V de voltagem nas lentes. Os espectros obtidos (na faixa de 600 – 2000 m/z) foram coletados durante 7 min utilizando um Thermo Orbitrap Discovery XL com resolução nominal de 30,000 a m/z 400, e processados através do software MagTran (ZHANG & MARSHALL, 1998) para deconvolução dos estados de carga.

4.8 Determinação do estado oligomérico em solução

A determinação do estado oligomérico em solução, ou seja, a massa molecular da proteína homogênea biologicamente ativa em solução, foi realizada pela técnica de FPLC utilizando a coluna de gel filtração Superdex 200 (HR 10/30) (GE Healthcare) pré-equilibrada com Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo 200 mM de NaCl a um fluxo de 0,4 mL/min, com detecção UV a 215, 254 e 280 nm (SANCHEZ-QUITIAN *et al.*, 2010). Realizou-se uma curva de calibração com diferentes proteínas-padrão de massa molecular conhecida, de baixo e alto peso molecular (ferritina, catalase, aldolase, albumina, ovalbumina, quimiotripsinogênio A e ribonuclease A – LMW e HMW *Gel Filtration Calibration Kit* – GE Healthcare), medindo seus volumes de eluição (V_e) que foram utilizados para calcular os correspondentes coeficientes de partição (K_{av} , Equação (1)). Blue dextran 2000 (Ge Healthcare) foi utilizado para determinar o volume morto (V_0). V_t é o volume total do leito da coluna. O valor de K_{av} calculado para cada proteína foi plotado *versus* o log de sua massa molecular, proporcionando uma função linear com valores para intercepto e inclinação (Equação (2)). Um volume de 100 µL da MtASL recombinante em uma concentração de 0,7 mg mL⁻¹ foi aplicado à coluna para determinação do V_e . A substituição na equação (2) permitiu a determinação da massa molecular da enzima recombinante em solução.

$$(1) \quad K_{av} = V_c - V_0/V_t - V_0$$

$$(2) \quad K_{av} = 0.9669 - (-0.3087) \log \text{ kDa}$$

4.9 Alinhamento múltiplo de sequências

As sequências de aminoácidos das enzimas homólogas cujas estruturas tridimensionais foram resolvidas ou para as quais foram realizados estudos de mutagênese – para determinação de resíduos essenciais – foram incluídas no alinhamento: *M. tuberculosis* (NP_215291.1), *Homo sapiens* (AAC83935.1), *S. aureus* (NP_375015.1), *E. coli* (ZP_03034589.1), *Thermotoga maritima* (NP_228901.1) e *B. subtilis* (YP_005555703.1). O alinhamento múltiplo de sequências foi obtido através do programa ClustalW (COMBET *et al.*, 2000), utilizando a matriz Blossum para substituição de aminoácidos e os parâmetros-padrão.

4.10 Cinética enzimática no estado estacionário

A atividade biológica *in vitro* da MtASL recombinante foi determinada por meio de ensaio direto em espectrofotômetro, monitorando a clivagem de S-AMP ($\epsilon_{282\text{nm}} = 10\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a AMP e fumarato pelo decréscimo tempo dependente da absorbância a 282 nm (LEE *et al.*, 1997), utilizando para tal o espectrofotômetro UV-2550 UV/visível (Shimadzu), equipado com um dispositivo de controle de temperatura. Todos os ensaios enzimáticos foram monitorados utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico em tampão Tris-HCl pH 8,0 a 25 °C, em um volume total de 0,5 mL (WOODWARD & BRAYMER, 1966; SEGEL, 1975). A reação foi iniciada pela adição da MtASL recombinante (14 μM) e a determinação dos parâmetros cinéticos no estado estacionário (K_m e V_{max}) foi realizada pela variação das concentração de S-AMP (4 – 150 μM).

As curvas de saturação hiperbólicas foram adequadas por meio de análise de regressão não-linear de acordo com a equação de Michaelis–Menten (3), na qual v é a velocidade inicial no

estado estacionário, V_{\max} é a velocidade máxima, $[S]$ é a concentração de substrato e K_m é a constante de Michaelis–Menten (SEGEL, 1975).

$$(3) \quad v = V_{\max}[S]/(K_m + [S])$$

A síntese de SAICAR foi realizada de acordo com o previamente reportado (ZIKANNOVA *et al.*, 2005; BULUSU *et al.*, 2009), utilizando a *MtASL*, com poucas modificações. A reação foi realizada em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 5 mM de AICAR, 40 mM de fumarato e 0,02 mg da enzima recombinante em um volume final de reação de 1 ml. A reação procedeu por 4 h a 37 °C. Para remoção da enzima, a mistura de reação centrifugada em Centricon equipado com um filtro com poros de 10 kDa (Centricon, Merk Millipore). Subsequentemente, a mistura de reação foi aplicada em uma coluna de troca aniônica (HiTrap DEAE FF, GE HealthCare) – utilizando a técnica de FPLC – e os compostos foram separados mediante um gradiente linear (10 – 500 mM) de bicarbonato de amônio, pH 8,0. Realizou-se previamente um controle contendo AICAR e fumarato nas mesmas concentrações descritas acima.

4.11 Perfil de pH

Os estudos de pH foram realizados segundo Cook & Cleland (2007). Previamente à realização dos estudos de pH, a estabilidade da enzima foi verificada em uma larga faixa de pH (5,5 a 11,0), incubando a enzima durante 20 minutos em Mes/Hepes/Ches 100 mM e posteriormente sua monitorando sua atividade em Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Os parâmetros cinéticos no estado estacionário foram determinados conforme descrito no item 4.10, variando a concentração de S-AMP de 0 – 200 μ M, na presença de 100 mM do mesmo tampão composto, em cada um dos diferentes valores de pH (6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0). Para originar os perfis de pH, as constantes catalíticas (k_{cat}) e de especificidade (k_{cat}/K_m) foram plotadas na forma de logaritmo *versus* o respectivo valor de pH e os dados foram adequados à equação (4), em que y é o parâmetro cinético aparente, C é o valor pH-independente de y , H é a concentração do íon hidrogênio, K_a é a constante aparente ácida e K_b é a constante aparente básica para os grupamentos ionizáveis. Foram utilizados para análise de $\log(k_{\text{cat}})$ *versus* pH os dados obtidos na

faixa de pH de 6,5 a 10,0 e para análise de $\log(k_{\text{cat}}/K_m)$ versus pH os dados obtidos na faixa de pH de 7,5 a 10,0.

$$(4) \quad \log y = \log[C/(1 + H/K_a + K_b/H)]$$

4.12 Estudos de inibição pelos produtos

Para obtenção de evidências experimentais que possibilitem distinguir a ordem de liberação dos produtos, análises de inibição pelos produtos foram realizadas. A modificação dos parâmetros cinéticos foi monitorada variando a concentração de S-AMP (4 – 100 μM) na presença de diferentes concentrações fixas de cada um dos produtos (AMP (50 – 200 μM) ou fumarato (25 – 150 μM). Os dados foram plotados $1/v$ versus $1/[\text{S-AMP}]$ para cada concentração dos produtos, obtendo-se gráficos lineares. Foram utilizadas diferentes equações para adequação dos dados, de acordo com os diferentes perfis de inibição apresentados, descritas abaixo.

Competitivo

$$(5) \quad v = V_{\text{max}}[S]/\{K_m (1 + [I]/K_i) + [S]\}$$

Não competitivo

$$(6) \quad v = V_{\text{max}}[S]/\{K_m (1 + [I]/K_i) + [S](1 + [I]/K_{is})\}$$

Incompetitivo

$$(7) \quad v = V_{\text{max}}[S]/\{K_m + [S](1 + [I]/K_{is})\}$$

Em que v é a velocidade inicial, V_{max} é a velocidade máxima, $[S]$ é a concentração de substrato, $[I]$ é a concentração de inibidor, K_m é a constante de Michaelis–Menten, K_i e K_{is} são as constantes de inibição para inclinação e para o intercepto, respectivamente.

4.13 Calorimetria de titulação isotérmica

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry* – *ITC*) foram realizados utilizando um microcalorímetro iTC200 (MicroCal, Inc., GE HealthCare). A *MtASL* utilizada durante as análises de ITC foi dialisada extensivamente contra Tris-HCL 50 mM pH 8,0 e o mesmo tampão foi utilizado para a preparação das soluções de ligantes.

A célula de referência (200 μL) permaneceu preenchida com água Milli-Q[®] durante todos os experimentos e a célula de amostra (200 μL) foi preenchida com a *MtASL* recombinante em uma concentração de 100 μM . Para cada ensaio de ligação, a seringa de injeção (39,7 μL) continha AMP (1 mM), fumarato (1 mM) ou AICAR (1 ou 8 mM). Cada produto foi diretamente titulado na célula de amostra contendo a enzima para obtenção das isotermas de ligação. A primeira injeção da titulação (0,5 μL) – que foi descartada da análise de dados – foi seguida por 17 injeções de 2,2 μL separadas por 240 s de intervalo (para AMP e AICAR) e por 180 s de intervalo para o fumarato. Previamente à análise dos dados, foram realizadas titulações-controle (ligante no tampão) para subtrair o calor de diluição e de mistura para cada experimento. Após a integração dos picos, subtração dos dados obtidos a partir das titulações controle e normalização das concentrações (calor normalizado a razão molar), as isotermas foram analisadas pelo software Origin 7 SR4 (Microcal, Inc.). Todos os ensaios foram realizados a 25 °C, sob constante velocidade de agitação (500 rpm) e pressão constante.

O ΔG (energia livre de Gibbs) de ligação foi calculado utilizando a relação descrita na equação (8), na qual R é a constante universal de gases (8,314 J K⁻¹ mol⁻¹), T é a temperatura em Kelvin ($T = \text{°C} + 273,15$), e K_a é a constante de associação no equilíbrio. A entropia de ligação (ΔS) também pode ser determinada através da mesma equação. As estimativas para os parâmetros iniciais n , K_a , e ΔH foram refinadas através de do método Marquardt de regressão não-linear fornecido pelo software Origin 7 SR4 software.

$$(8) \quad \Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

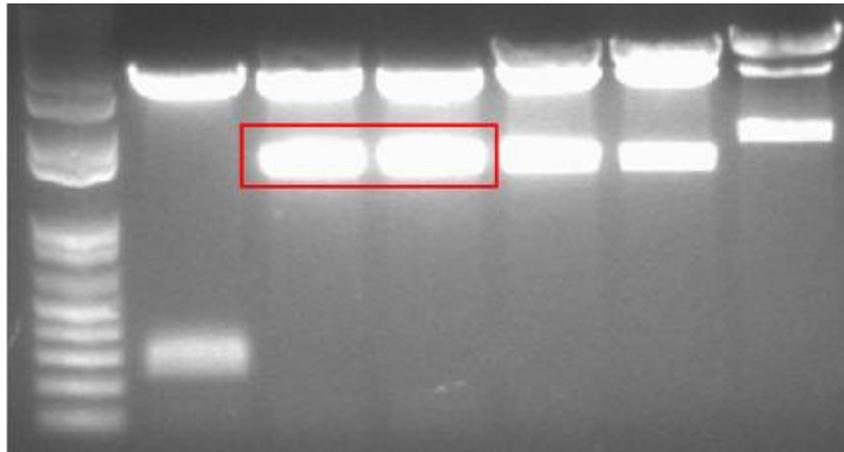
5.1 Amplificação do gene *purB* através da reação em cadeia da polimerase

A região codificante do gene *purB* foi amplificada a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis*, fazendo-se o uso da técnica de PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos contendo sítios de reconhecimento para as enzimas de restrição NdeI e BamHI, respectivamente, desenhados a partir da sequência de DNA completa deste micro-organismo. A reação de amplificação continha 0,5 µL de enzima *Pfu*, 4 µL dNTP 2,5 mM, 5 µL tampão de reação *Pfu* 10x, 1 µL DNA genômico, 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol µL⁻¹) e diferentes concentrações de DMSO (0, 5 e 10%). Todos os testes contendo DMSO foram positivos, podendo ser verificadas bandas em torno de 1.400 pb. A banda do DNA amplificado na presença de 10% de DMSO foi extraída do gel utilizando o *kit* QiaQuick Gel Purification (Qiagen).

5.2 Clonagem do gene *purB* em vetor de clonagem pCR®-Blunt

Os fragmentos amplificados correspondentes ao gene *purB* foram ligados em vetor pCR®-Blunt (Invitrogen), com a utilização da enzima T4 DNA ligase. A reação de ligação continha 2,5 µL de água Milli-Q® estéril, 1 µL de tampão 10x, 0,5 µL do vetor pCR®-Blunt, 5 µL do DNA amplificado e 1 µL de T4 DNA ligase. A mistura de reação foi colocada em termociclador a 16°C por 16 horas. Após a reação, o plasmídeo recombinante foi transformado em células de *E. coli* DH10B, isolado em placas de Petri. Quatro colônias isoladas foram propagadas em meio LB líquido. A extração de DNA plasmidial foi feita com o *kit* QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen). A triagem dos clones recombinantes foi realizada pela clivagem com a enzima EcoRI, capaz de liberar o fragmento caso o mesmo tenha sido inserido corretamente no vetor, pois o vetor pCR®-Blunt apresenta sítios de restrição para esta enzima nas suas extremidades. Cada reação de clivagem continha 0,5 µL de EcoRI 5 U, 1 µL de tampão 10x, 3,5 µL de água Milli-Q® e 5 µL do DNA purificado. A liberação do inserto pode ser confirmada através da eletroforese em gel de agarose (Figura 8).

Figura 8. Liberação do inserto pela clivagem com EcoRI

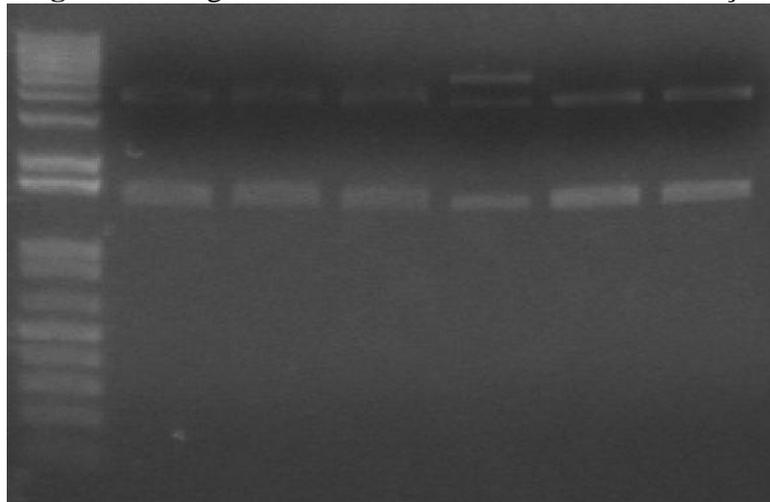


Nota: Eletroforese em gel de agarose 1 % mostrando os fragmentos de aproximadamente 1400 pb após a clivagem com a enzima EcoRI para a confirmação da clonagem no vetor pCR[®]-Blunt.

5.3 Subclonagem do gene *purB* em vetor de expressão pET-23a(+)

Os clones recombinantes pCR-Blunt(+)::*purB* foram clivados com as enzimas NdeI e BamHI, cujos sítios de reconhecimento encontram-se nos oligonucleotídeos iniciadores direto e reverso, respectivamente. O vetor de expressão pET-23a(+) foi também clivado com as mesmas enzimas de restrição levando assim à presença de extremidades coesivas entre o fragmento e o vetor de expressão. O fragmento *purB* foi subclonado em vetor de expressão pET-23a(+), através da reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase. A reação continha 1 µL de água Milli-Q[®], 2 µL tampão de ligação 5x, 2 µL pET-23a(+), 4 µL do DNA purificado e 1 µL de T4 DNA ligase. Após a reação de ligação, o plasmídeo foi transformado em células de *E. coli* DH10B e isolado em placas de Petri. Colônias isoladas foram propagadas em meio LB líquido. O DNA plasmidial foi extraído utilizando o *kit* QIAprep[®] Spin Miniprep (Qiagen). A triagem dos clones foi realizada por meio de clivagem com as mesmas enzimas de restrição. Todos os clones recombinantes liberaram o fragmento de 1.419 pb, como pode ser verificado na eletroforese em gel de agarose (Figura 9).

Figura 9. Triagem dos clones com as enzimas de restrição



Nota: Eletroforese em gel de agarose 1 % mostrando os fragmentos de aproximadamente 1400 pb após a clivagem com as enzimas NdeI e BamHI, para a confirmação da clonagem no vetor de expressão pET-23a(+).

5.4 Sequenciamento dos fragmentos clonados no vetor de expressão pET-23a(+)

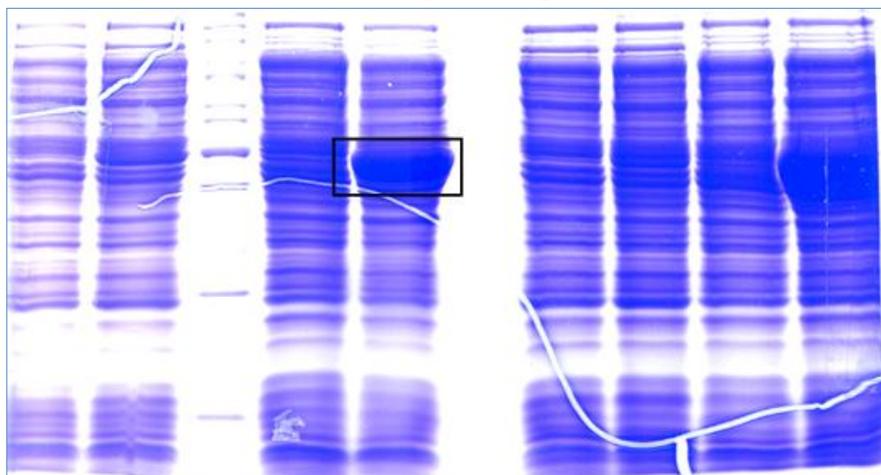
A análise do sequenciamento automático do clone 2 confirmou a identidade, integridade e a ausência de mutações do gene clonado.

5.5 Superexpressão da enzima Adenilossuccinato Liase em sistema heterólogo

Foram testadas diferentes condições de expressão nas quais se variaram a temperatura, meio de cultivo e concentração de IPTG, sendo que a melhor expressão obtida foi em células de BL21(DE3)Lys, meio TB, 25 °C, 23 h sem indução de IPTG. A expressão foi realizada conforme descrito no item 4.5, sendo que até as culturas atingirem DO_{600} entre 0,4 – 0,6, as culturas foram mantidas a 37 °C em agitador orbital. Após atingirem a DO_{600} desejada, as culturas foram transferidas para outro agitador orbital a 25 °C. As amostras foram coletadas (1 mL) em diferentes tempos, dos quatro inóculos. As células foram submetidas à centrifugação, o sobrenadante desprezado e armazenadas a -20 °C.

Para análise da expressão da proteína, as células foram ressuspensas em 500 μ L de tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,5 e rompidas por ultrassom como descrito no item 4.5. As frações solúvel e insolúvel do extrato celular BL21(DE3)Lys / pET-23a(+):*purB*, foram analisadas em SDS-PAGE 12% confirmando a superexpressão da proteína em estudo na sua fração solúvel.

Figura 10. Melhor condição de expressão da *MtASL*

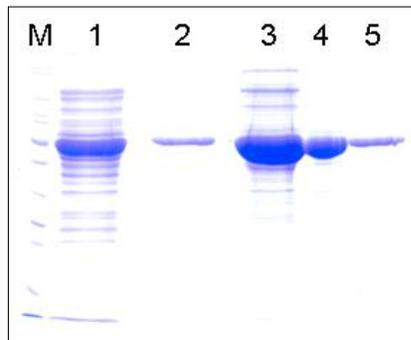


Nota: Análise por SDS-PAGE 12% das frações solúveis das amostras coletadas. Em destaque a proteína *MtASL* superexpressa na condição escolhida.

5.6 Purificação pela técnica de FPLC

A proteína superexpressa foi purificada através de um protocolo constituído por três passos, que consistiu em uma coluna de interação hidrofóbica (Octyl Sepharose) – na qual a eluição da proteína se deu em torno de 450 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – uma coluna de exclusão por tamanho (Superdex-200) e uma coluna de interação aniônica forte (Mono Q). A *MtASL* eluiu aproximadamente a 260 mM de NaCl da Mono Q, e a análise por SDS–PAGE 12 % demonstrou que a proteína estava homogênea (Figura 11).

Figura 11. Etapas da purificação



Nota: M: Marcador de peso molecular (Fermentas); 1: extrato bruto aplicado na Octyl Sepharose FF; 2: eluído da Octyl Sepharose FF; 3: aplicado na Superdex-200 HR; 4: eluído da Superdex-200 HR; 5: *MtASL* recombinante na forma homogênea.

Foram obtidos 25 mg da proteína recombinante neste protocolo de purificação, a partir de 2 g de células, indicando um rendimento de 9% (Tabela 2). Ensaio cinéticos realizados em espectrofotômetro demonstraram que a *MtASL* catalisa a clivagem do S-AMP. Entretanto, modificações na atividade específica foram observadas na presença de sais bem como mediante a mudanças do pH. Este fato pode ser atribuído à força iônica que, tal qual as variações no pH, são reconhecidas por afetar a conformação, estabilidade e atividade enzimática (PINNA *et al.*, 2005; ZHANG & CREMER, 2006). Tal observação corrobora o que foi primeiramente reportado por Miller *et al.* (MILLER *et al.*, 1959), que indicaram que a atividade da ASL é afetada pela força iônica do meio de incubação.

Tabela 2. Purificação da *MtASL* a partir de células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

Passo da purificação	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Ativ. específica (U mg⁻¹)	Fator de purificação	Rendimento (%)
Extrato bruto	258	340,56	1,32	1	100
Octyl Sepharose	101	280,78	2,78	2,1	82
Superdex-200	50	7,00	0,14	0,1	2
<i>MtASL</i> homogênea	25	31,00	1,24	0,9	9

5.7 Análise da estrutura primária da proteína através de espectrometria de massa

A partir dos experimentos de mapeamento peptídico realizados por LC-MS/MS foram identificados 20 peptídeos diferentes, que cobriram 52,5% da sequência da *MtASL*. Para a determinação da massa molecular, os espectros das amostras da proteína intacta foram gravados utilizando um analisador Orbitrap. Foram detectados picos correspondentes a estados de carga de 33+ a 73+. Após a deconvolução dos dados, foi encontrada uma massa molecular média de 50.908 Da, com excelente concordância com a massa esperada da *MtASL*, com a remoção da metionina inicial (massa teórica = 50.908,83 Da) (Figura 12).

5.8 Determinação do estado oligomérico em solução

A forma nativa da *MtASL* em solução foi determinada por cromatografia de gel filtração. Foi obtido um único pico com volume de eluição correspondente a aproximadamente 209 kDa, de acordo com a adequação dos dados pelas equações (1) e (2). A massa molecular obtida foi dividida pela massa molecular teórica da subunidade da *MtASL* (50,909 kDa), indicando que a *MtASL* é um homotetrâmero em solução ($209.13 \text{ kDa} / 50.909 \text{ kDa} = 4.1$), de acordo com as enzimas homólogas previamente caracterizadas como a humana (STONE *et al.*, 1993; LEE & COLMAN, 2007), de músculo esquelético de rato (CASEY & LOWENSTEIN, 1987), de *B. subtilis* (BULUSU *et al.*, 2009), de *Neurospora* (WOODWARD & BRAYMER, 1966), de *S. aureus* (FYFE *et al.*, 2010), de *Pyrobaculum aerophilum* (TOTH *et al.*, 2000), de *T. maritima* (TOTH & YEATES, 2000) e de todos os membros da família das aspartases/fumarases (PUTHAN VEETIL *et al.*, 2012).

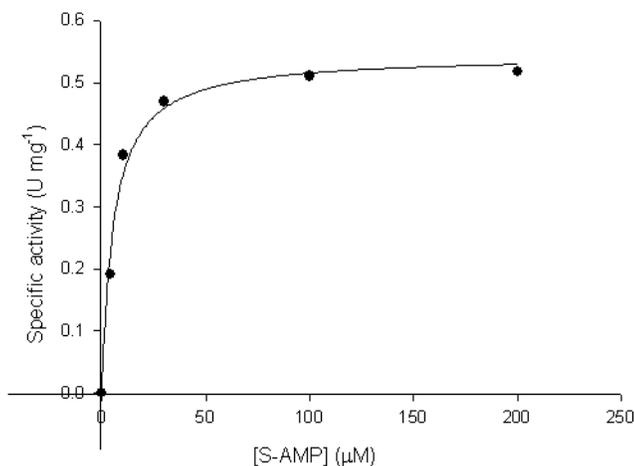
5.9 Alinhamento múltiplo de sequências

As sequências tridimensionais de estruturas depositadas na base de dados Protein Data Bank (PDB, 2012) disponíveis de *E. coli* (PDB ID: 2PTQ, 2PTR, 2PTS e 3GZH) (TSAI *et al.*, 2007; KOZLOV *et al.*, 2009), *S. aureus* (PDB ID: 2X75) (FYFE *et al.*, 2010), humana (PDB ID: 2VD6 e 2J91) e de *T. maritima* (TOTH & YEATES, 2000), juntamente com dados sobre resíduos essenciais para ligação do substrato e catálise oriundas de estudos de mutagênese realizados com a ASL de *B. subtilis* (LEE *et al.*, 1999; BROSIUS & COLMAN, 2000; 2002; SEGALL & COLMAN, 2004; SIVENDRAN & COLMAN, 2008), permitiram sugerir resíduos que são cruciais para a ligação e catálise da *MtASL*. O resultado obtido no alinhamento de sequências demonstrou baixa identidade entre os polipeptídeos analisados (5,42 %). Contudo, podem ser observados resíduos totalmente conservados entre todas as sequências, cujas funções estão descritas abaixo, como podem ser visualizados na Figura 12. A numeração utilizada corresponde à sequência de *M. tuberculosis*.

possui resíduo homólogo na ASL de *E. coli*, está localizada em posição favorável para abstrair o próton do C β da porção succinil do substrato, atuando como a base catalítica quando o *loop* está fechado (TSAI *et al.*, 2007). Adicionalmente, estudos estruturais e de mutagênese realizados nas ASLs humana e de *B. subtilis* e ainda em outros membros da superfamília como aspartase (FUJII *et al.*, 2003; FIBRIANSAH *et al.*, 2011), argininosuccinato liase (BHAUMIK *et al.*, 2004) e δ 2-cristalina (SAMPALANU *et al.*, 2002) tem reforçado a conexão entre este resíduo e a catálise. Lee e colaboradores (1997; 1999) inferiram a essencialidade do resíduo His147 para a catálise. Tal observação foi confirmada na estrutura da ASL de *E. coli* resolvida na presença de substrato e produtos (TSAI, Koo *et al.*, 2007) (KOZLOV, Nguyen *et al.*, 2009), e sugerem que este resíduo é o ácido catalítico, que, por sua vez, é ativado e orientado para a catálise pelo resíduo Glu290 (WU *et al.*, 1998; BROSIUS & COLMAN, 2002; SAMPALANU *et al.*, 2002; TSAI *et al.*, 2007; KOZLOV *et al.*, 2009).

5.10 Cinética enzimática no estado estacionário

A atividade específica da *MtASL* demonstrou-se linearmente dependente mediante variação da concentração de enzima de 100 – 400 nM sob concentração constante de S-AMP (30 μ M), indicando que a verdadeira velocidade inicial foi mensurada. As curvas de saturação apresentaram perfil hiperbólico (Figura 13) e os dados foram adequados de acordo com a equação de Michaelis–Menten, permitindo a determinação dos parâmetros cinéticos: $K_m = 5,6 (\pm 1) \mu$ M e $V_{max} = 0,54 (\pm 0,02) U mg^{-1}$. Tais resultados permitiram estimar um valor de $0,46 (\pm 0,02) s^{-1}$ para a constante catalítica (k_{cat}). O valor da constante de Michaelis–Menten determinado é semelhante aos valores reportados para as ASLs de levedura (BRIDGER & COHEN, 1968), de *Neurospora* (WOODWARD & BRAYMER, 1966), humana (KMOCH *et al.*, 2000; LEE & COLMAN, 2007; SIVENDRAN & COLMAN, 2008), de *B. subtilis* (PALENCHAR *et al.*, 2003; SIVENDRAN & COLMAN, 2008), de *Leishmania donovani* (SPECTOR *et al.*, 1979) e de rato (CASEY & LOWENSTEIN, 1987), porém, diferente do valor reportado para a ASL de *P. falciparum* ($K_m = 32 \mu$ M) (BULUSU *et al.*, 2009).

Figura 13. Parâmetros cinéticos no estado estacionário

Nota: Atividade específica (U mg^{-1}) versus $[\text{S-AMP}]$ (μM). A concentração final da *MtASL* utilizada foi 280 nM.

Tentativas de síntese do SAICAR a partir de AICAR e fumarato foram realizadas (ZIKANNOVA *et al.*, 2005; BULUSU *et al.*, 2009) devido à sua indisponibilidade comercial. Entretanto, nenhum pico correspondente ao SAICAR pode ser detectado no cromatograma, bem como a produção do mesmo não pode ser monitorada em espectrofotômetro, em contraste à formação de S-AMP a partir de AMP e fumarato, que foi claramente mensurável.

5.11 Perfil de pH

A atividade enzimática da *MtASL* pode ser monitorada na ampla faixa de pH testada. Entretanto, curvas de saturação para o S-AMP somente puderam ser geradas nos valores de pH de 6,5 a 10,0. Análises de $\log(k_{\text{cat}})$ e $\log(k_{\text{cat}}/K_m)$ foram feitas para confirmar a catálise ácido-base. Os dados apresentaram um perfil *bell-shaped* para o $\log(k_{\text{cat}})$ (Figura 14a) – que refletem ionizações no complexo enzima-substrato – foram adequados de acordo com a equação (4) e os valores aparentes de pK determinados foram $7,4 (\pm 0,2)$ e $10,7 (\pm 5,8)$, com inclinações de +1 e de -1 para o limbo ácido e básico, respectivamente. Estes resultados indicam a participação de um único grupamento ionizável em cada limbo, em que um grupo é desprotonado e outro protonado durante a catálise, respectivamente.

Já foi apontado que um resíduo de histidina (His147) é o ácido (TSAI *et al.*, 2007; KOZLOV *et al.*, 2009) e que um resíduo de serina (Ser277) é a base na catálise (SAMPALEANU *et al.*, 2002; FUJII *et al.*, 2003; BHAUMIK *et al.*, 2004; TSAI *et al.*, 2007; FIBRIANSAH *et al.*, 2011). O valor de pK de 7,4 ($\pm 0,2$) pode corresponder ao grupamento imidazólico da cadeia lateral de um resíduo de histidina, como previamente reportado para $\delta 2$ -cristalina ($pK = 6,18$) (WU *et al.*, 1998), e que é semelhante aos valores de pK encontrados na ASL de *P. falciparum* ($pK = 6,5$) (BULUSU *et al.*, 2009) e na aspartase de *Bacillus* sp. ($pK = 6,2$) (PUTHAN VEETIL *et al.*, 2009). As discrepâncias aparentes nos valores de pK podem ser explicadas por variações experimentais entre os estudos realizados e, o desvio no valor de pK em relação ao valor teórico da cadeia lateral ($pK = 6,0$), provavelmente reflete interações com outros resíduos presentes no sítio ativo, que podem perturbar seu valor de pK .

O valor de pK de 10,7 ($\pm 5,8$), o qual é similar ao valor encontrado em estudos de perfil de pH realizados para a enzima aspartase ($pK = 11,3$) (PUTHAN VEETIL *et al.*, 2009), pode corresponder ao oxiânion de serina, cujo pK_a do grupo β -OH é cerca de 15 (BULUSU *et al.*, 2009) e que, por sua vez, requer uma perturbação de aproximadamente cinco unidades de pK_a para sua formação (PUTHAN VEETIL *et al.*, 2012). Entretanto, este valor de pK foi atribuído a diversos resíduos na análise da estrutura da ASL de *E. coli* (TSAI *et al.*, 2007). Com base nestas observações, sugerimos que o resíduo Ser277 na forma de oxiânion é a base geral na catálise da MtASL, cuja protonação abole a atividade catalítica da enzima.

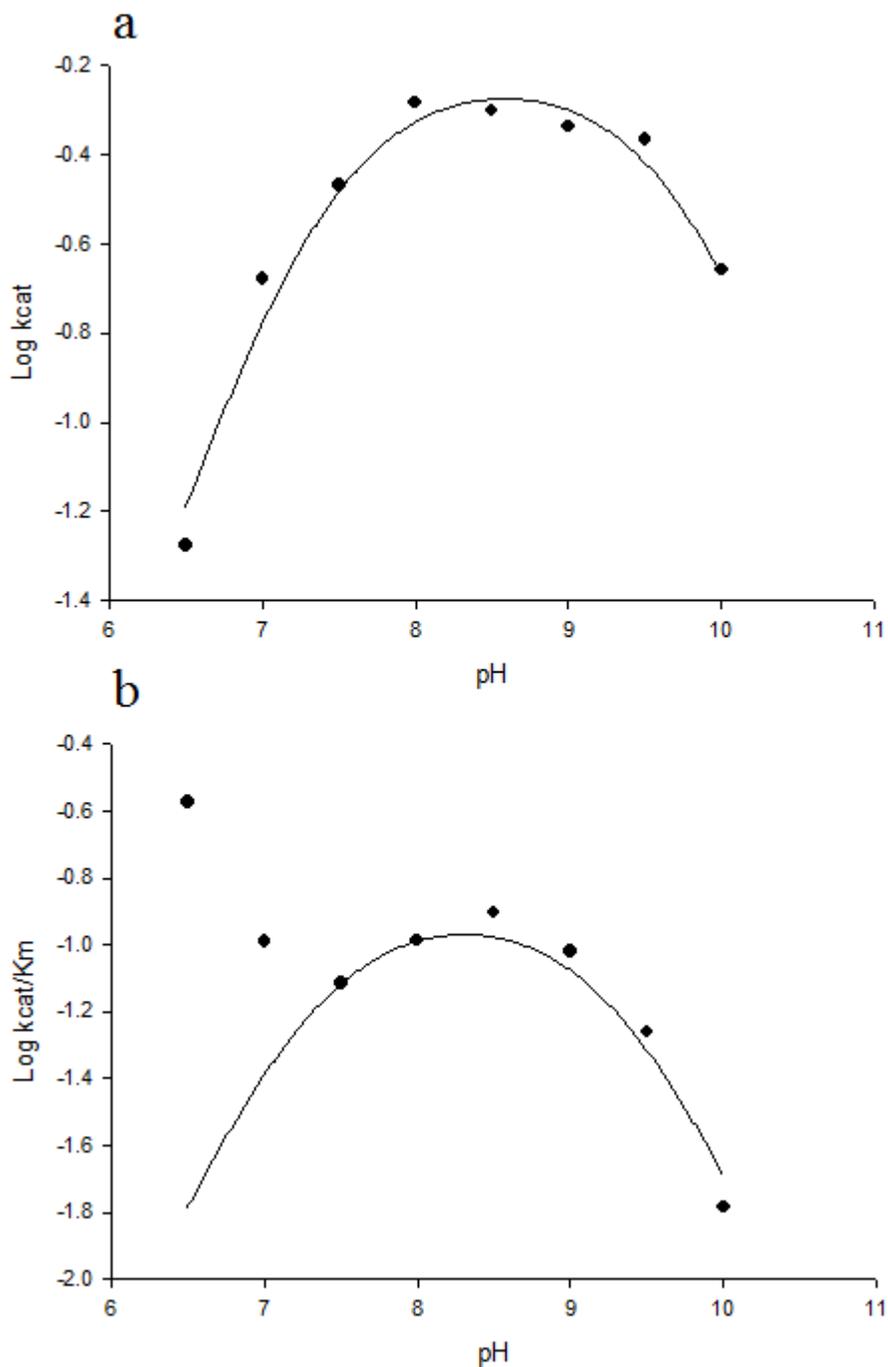
Os dados para o $\log(k_{cat}/K_m)$ (Figura 14b) também apresentaram um perfil *bell-shaped* e foram igualmente adequados à equação (4), permitindo a determinação dos valores de pK de 7,4 ($\pm 5,9$) e 8,3 ($\pm 4,7$), para grupamentos que podem estar desprotonados e protonados, respectivamente. As inclinações de +1 para o limbo ácido e de -1 para o limbo básico encontradas indicam a participação de um único grupamento ionizável em cada limbo, que pode fazer parte da enzima ou do substrato.

Como resultado, nós propusemos que o valor de pK de 7,4 ($\pm 5,9$) provavelmente corresponde a um resíduo de histidina, uma vez que há dois resíduos de histidina (His76 e His95) que foram reportados como envolvidos na ligação ao substrato, como detalhado anteriormente. Um grupo com valor de pK de 6,4 foi reportado como sendo importante para a ligação ao substrato na ASL humana (STONE *et al.*, 1993); um valor de 7,1 foi reportado para a aspartase

(PUTHAN VEETIL *et al.*, 2009). Adicionalmente, encontramos um resultado similar ao valor de pK reportado para a ASL de *P. falciparum* ($pK = 7,5$) em relação à ligação do S-AMP (BULUSU *et al.*, 2009), mas difere do valor de pK encontrado para a $\delta 2$ -cristalina ($pK = 5,9$), que, por sua vez, foi atribuído à um resíduo de glutamato (WU *et al.*, 1998).

Considerando o valor de pK encontrado para o limbo básico, foi reportado um valor de 7,5 para a ASL humana, tendo sido atribuído a um resíduo de histidina ou lisina (STONE *et al.*, 1993), este último também foi proposto por Wu e colaboradores para um valor de pK de 8,3, reportado para a $\delta 2$ -cristalina (WU *et al.*, 1998). Entretanto, o resultado reportado para a aspartase foi um pouco diferente ($pK = 9,8$) (PUTHAN VEETIL *et al.*, 2009). Portanto, nós propusemos que o valor de pK de 8,3 ($\pm 4,7$) pode ser atribuído tanto a um resíduo de lisina quanto de arginina, uma vez que um resíduo de carga positiva é crítico para a ligação do substrato (BROSIUS & COLMAN, 2002).

Figura 14. Perfil de pH para a reação catalizada pela *MtASL*



Nota: **(a)** pH-dependência do $\log(k_{cat})$; **(b)** pH-dependência do $\log k_{cat}/K_m(S\text{-AMP})$. Os dados experimentais foram adequados à equação (3), que descreve um processo de dupla ionização. As linhas apresentadas são linhas teóricas baseadas na adequação dos dados.

Tais estudos permitiram identificar as constantes de dissociação aparentes de grupos

funcionais de cadeias laterais de aminoácidos envolvidos na ligação e/ou catálise, cujos valores, associados a dados obtidos a partir de estudos estruturais e de mutagênese determinados para enzimas homólogas, permitiram indicar os prováveis aminoácidos envolvidos na interação com substrato e/ou produto na etapa catalítica e o mecanismo químico pelo qual a catálise é realizada pela *MtASL*.

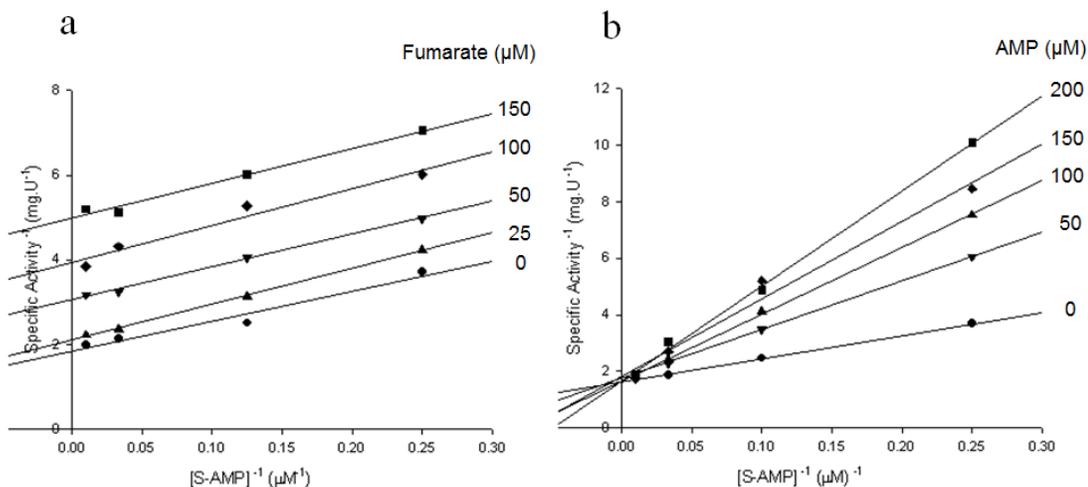
5.12 Estudos de inibição pelos produtos

O mecanismo cinético da *MtASL* foi investigado através de estudos de inibição pelos produtos (AMP e fumarato) e os resultados dos gráficos de duplo-recíproco em diferentes concentrações de produtos estão demonstrados na figura 15.

O padrão de inibição de linhas paralelas indica que o fumarato atua como inibidor incompetitivo e os dados foram adequados de acordo com a equação (7), obtendo-se um valor de K_i de $85 (\pm 7) \mu\text{M}$ (Figura 15a). Entretanto, foi previamente reportado que o fumarato atua como inibidor não-competitivo contra o S-AMP para as ASLs de *L. donovani* (SPECTOR *et al.*, 1979) e de *P. falciparum* (BULUSU *et al.*, 2009). Este resultado indica que o fumarato não combina com a enzima livre, o que é corroborado por resultados obtidos para as ASLs humana (STONE *et al.*, 1993) e de levedura (BRIDGER & COHEN, 1968).

O perfil de inibição pelo AMP é claramente competitivo na ampla faixa de concentração testada (Figura 15b), o que concorda com resultados previamente reportados para as ASLs humana (STONE *et al.*, 1993), de levedura (BRIDGER & COHEN, 1968) e de *P. falciparum* (BULUSU *et al.*, 2009). Os dados foram adequados à equação (5), permitindo a determinação de um valor de K_i de $60,5(\pm 10,4) \mu\text{M}$. Este perfil sugere que o AMP é capaz de ligar a forma livre da enzima, provavelmente no sítio de ligação do S-AMP. Como resultado, nós propusemos que a *MtASL* segue o mesmo mecanismo cinético Uni-Bi ordenado conforme determinado para outras enzimas homólogas, no qual o fumarato é o primeiro produto liberado.

Figura 15. Gráficos duplo-recíprocos para a inibição da *MtASL*



(a) Atividade específica⁻¹ (mg U⁻¹) versus [S-AMP]⁻¹ (μM⁻¹) mediante concentrações fixas de fumarato (0, 25, 50, 100 and 150 μM); (b) Atividade específica⁻¹ (mg U⁻¹) versus [S-AMP]⁻¹ (μM⁻¹) mediante concentrações fixas de AMP (0, 50, 100, 150 and 200 μM.). Os dados foram analisados utilizando as equações (6) e (7); a concentração final da *MtASL* utilizada foi 280 nM.

5.13 Calorimetria de titulação isotérmica

Para confirmação do mecanismo cinético proposto para a *MtASL* e para determinar as afinidades relativas de ligação dos produtos, experimentos foram realizados em ITC com AMP, AICAR e fumarato, separadamente. As isotermas de ligação foram integradas e corrigidas pelo calor de diluição. A aferição do calor liberado (processo exotérmico) durante o equilíbrio da ligação dos produtos permitiu determinar a entalpia do processo (ΔH), estimar a estequiometria da interação (n) e a constante de associação no equilíbrio (K_a). A constante de dissociação no equilíbrio (K_d) foi calculada como o inverso do K_a ($K_d = 1/K_a$). A energia livre de Gibbs (ΔG) e entropia (ΔS) de ligação foram calculados a partir da constante de associação no equilíbrio conforme descrito na equação (8). Os dados de ITC para ligação de todos os produtos à *MtASL* estão demonstrados na Figura 16.

Os resultados para o AMP demonstraram significantes mudanças de calor mediante sua ligação à *MtASL* livre e a isoterma geral do processo (Figura 16a) foi melhor adequada ao modelo *one set of sites*, rendendo um valor favorável de ΔH de $-26870 (\pm 1380)$ cal mol⁻¹ e um valor desfavorável de ΔS de $-65,3 (\pm 18,3)$ cal mol⁻¹ K⁻¹ foi determinado a partir do valor de

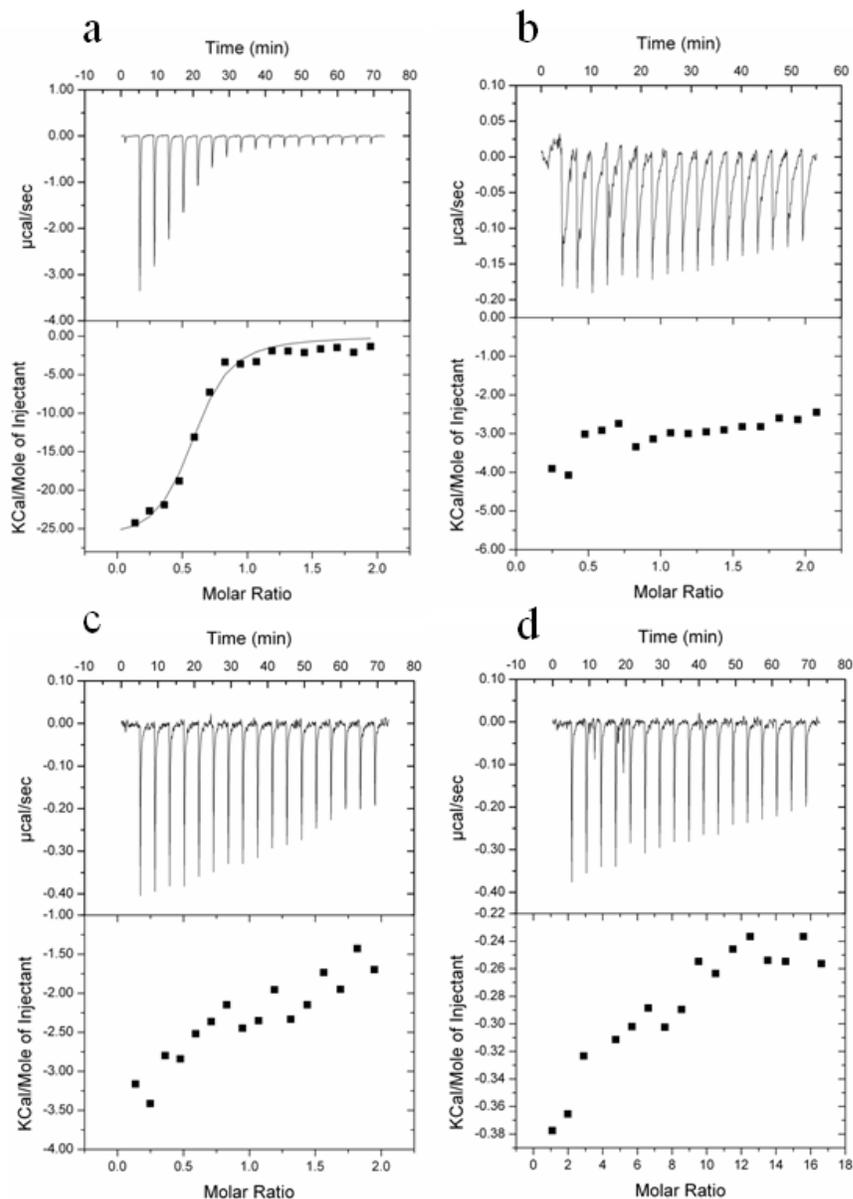
constante de associação no equilíbrio conforme descrito na equação (8), bem como a energia livre de Gibbs ($\Delta G = -7,4 (\pm 2.1)$ kcal), o que indica um equilíbrio favorável na formação do complexo binário. Estes resultados são similares aos previamente reportados para a ASL humana, na qual a entalpia é a força predominante na ligação (RAY *et al.*, 2012). A entropia desfavorável pode ser devida a modificações conformacionais que ocorrem durante a formação do complexo, e, sua magnitude indica que ocorre um “ajuste induzido” (*induced fit*) durante a interação da enzima com o ligante (O'BRIEN & NUNN, 2001). Tal achado pode ser associado com a característica reportada do *loop* SS para as estruturas de *P. aerophilum* e *T. marítima*, que é intrinsecamente desordenado (TOTH *et al.*, 2000; TOTH & YEATES, 2000) e cuja estrutura somente pode ser resolvida somente na presença de substratos ou produtos (TSAI *et al.*, 2007; FYFE *et al.*, 2010). O valor de K_d calculado de $3,75 (\pm 1,05)$ μM para a ligação do AMP indica maior afinidade quando comparado às enzimas humana ($K_d = 54$ μM) (RAY *et al.*, 2012) e de *P. falciparum* ($K_d = 170$ μM) considerando a formação do complexo binário ASL:AMP (BULUSU *et al.*, 2009). Foi reportado que a ASL é capaz de ligar uma molécula de AMP por monômero (BULUSU *et al.*, 2009; RAY *et al.*, 2012); entretanto, um valor de n de $0,56 (\pm 0,02)$ para a ligação do AMP refere-se ao evento de duas subunidades da *MtASL* realizando associação com cada molécula de AMP injetada na célula. Em suma, a ligação do AMP pode ocorrer na interface de dois monômeros, como visualizado na estrutura da ASL de *S. aureus* em complexo com AMP, na qual a ligação deste produto é compartilhada por três subunidades (FYFE *et al.*, 2010). Em contraste, não ocorreram trocas de calor significantes durante os ensaios de ligação realizados com o fumarato, o que sugere que o mesmo não é capaz de ligar na enzima livre (Figura 16b).

Ensaio de ligação utilizando ITC, combinados com os estudos de inibição pelos produtos, demonstraram que a reação catalisada pela *MtASL* segue um mecanismo uni-bi, que pode ser de estado estacionário (BRIDGER & COHEN, 1968; STONE *et al.*, 1993) ou rápido equilíbrio (BULUSU *et al.*, 2009), com liberação ordenada de produto, na qual o fumarato é o primeiro produto a se dissociar do sítio ativo da enzima.

As isotermas de ligação para o produto AICAR (Figuras 16c e d) demonstram que, embora possam ser observadas pequenas mudanças de calor, não foi possível atingir a saturação dos sítios de ligação da *MtASL* nem mesmo utilizando altas concentrações deste produto (8 mM). Este resultado difere dos resultados reportados para as ASLs humana e de *P. falciparum*, nas

quais o AICAR liga à enzima livre com afinidade superior ou similar a do AMP, respectivamente (BULUSU *et al.*, 2009; RAY *et al.*, 2012). Por outro lado, este comportamento pode explicar, pelo menos em parte, a falha na tentativa de síntese do SAICAR a partir de AICAR e fumarato, bem como a impossibilidade de monitorar a reação reversa espectrofotometricamente, conforme descrito anteriormente.

Figura 16. Análises de ITC



Nota: (a) Titulação do AMP até a concentração final de $198,5 \mu\text{M}$. (b) Titulação do fumarato até a concentração final de $198,5 \mu\text{M}$ (c e d) Titulação do AICAR até a concentração final de $198,5 \mu\text{M}$ e $1,59 \text{ mM}$. A concentração final da *Mt*ASL utilizada foi $100 \mu\text{M}$.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As enzimas ASLs têm sido propostas como interessantes alvos para o desenvolvimento de novas drogas devido ao seu envolvimento central no metabolismo (HAMPTON, 1962; SPECTOR *et al.*, 1979; SPECTOR *et al.*, 1982; PORTER *et al.*, 1983; FOULK *et al.*, 2002; BULUSU *et al.*, 2009; FYFE *et al.*, 2010), uma vez que são responsáveis pelo controle do metabolismo celular por pelo menos duas maneiras, pelo controle dos níveis de AMP e fumarato (ARAGON & LOWENSTEIN, 1980; VAN DEN BERGHE *et al.*, 1992). Entretanto, sua essencialidade em *M. tuberculosis* permanece obscura (SASSETTI *et al.*, 2003). Adicionalmente, a ASL pode estar envolvida na coordenação das biossínteses de purinas e proteínas (GENDRON *et al.*, 1992). Havia sido sugerido por Cole e colaboradores (1998) que o gene *purB* codifica uma enzima ASL, porém, análises bioquímicas formais eram necessárias para a correta atribuição desta fase de leitura aberta (*open reading frame*) em *M. tuberculosis*.

Em suma, foi descrito neste trabalho a amplificação do gene *purB*, clonagem, expressão heteróloga da proteína e purificação da *MtASL*. A massa molecular da enzima na forma biologicamente ativa em solução pode ser determinada por cromatografia de exclusão por tamanho, evidenciando que a *MtASL* é um tetrâmero em solução. O sequenciamento N-terminal do polipeptídeo e experimentos em ESI-MS confirmaram a identidade da proteína recombinante homogênea. Estudos de cinética no estado estacionário confirmaram que a *MtASL* de fato catalisa a clivagem de S-AMP a AMP e fumarato, o passo final na biossíntese de AMP e também um possível passo na via de salvamento. Análises do perfil de pH, combinadas com o alinhamento múltiplo de sequências, permitiram propor que resíduos de aminoácidos estão envolvidos na reação química catalisada pela *MtASL*. Contudo, estudos de mutagênese sítio-dirigida ainda são necessários para confirmar o papel dos resíduos aqui descritos na ligação e catálise pela *MtASL*.

Análises de cinética no estado estacionário também demonstraram que a *MtASL* segue um perfil hiperbólico e os experimentos em ITC permitiram propor o mecanismo cinético. Análises dos dados do ITC também demonstraram que a *MtASL* pode diferir das enzimas homólogas em relação à clivagem do SAICAR, uma vez que a afinidade da enzima pelo produto

desta reação – AICAR – é muito mais fraca quando comparada à afinidade pelo AMP – produto da clivagem do S-AMP.

Estudos de nocaute do gene *purB* – atualmente em andamento – podem permitir verificar a relevância desta enzima no contexto do metabolismo global de purinas do *M. tuberculosis* e, uma vez que a essencialidade da enzima seja confirmada, os resultados deste trabalho podem levar a identificação de análogos de nucleotídeos que sejam capazes de inibir a viabilidade do *M. tuberculosis*, com poucos danos ao hospedeiro humano.

REFERÊNCIAS

- ARAGON, J. J.; LOWENSTEIN, J. M. The purine-nucleotide cycle. Comparison of the levels of citric acid cycle. **Eur J Biochem**, v. 110, n. 2, p. 371-377, Sep 1980.
- BASSO, L. A. et al. Purine nucleoside phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*. Analysis of inhibition by a transition-state analogue and dissection by parts. **Biochemistry.**, v. 40, n. 28, p. 8196-8203, 2001.
- BHAUMIK, P. et al. Structure determination and refinement at 2.44 Å resolution of argininosuccinate lyase from *Escherichia coli*. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**. Denmark, v. 60, p.1964-1970, 2004
- BIAZUS, G. et al. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning, expression, and biochemical characterization. **Protein Expr Purif**, v. 66, n. 2, p. 185-190, Aug 2009.
- BLANCHARD, J. S.; CLELAND, W. W. Use of isotope effects to deduce the chemical mechanism of fumarase. **Biochemistry**, v. 19, n. 19, p. 4506-4513, 16 sep. 1980.
- BLOOM, B. R. **Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control**. Washington: ASM Press, 1994.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. United States, v. 72, p.248-254, 1976.
- BRAIBANT, M.; GILOT, P.; CONTENT, J. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Microbiol Rev.**, v. 24, n. 4, p. 449-467, 2000.
- BREDA, A. et al. Molecular, kinetic and thermodynamic characterization of *Mycobacterium tuberculosis* orotate phosphoribosyltransferase. **Mol Biosyst.**, v. 8, n. 2, p. 572-586, 2012.
- BRENNAN, P. J. Tuberculosis in the context of emerging and reemerging diseases. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 18, n. 4, p. 263-269, 1997.
- BRIDGER, W. A.; COHEN, L. H. The kinetics of adenylosuccinate lyase. **J Biol Chem**, v. 243, n. 3, p. 644-650, 10 feb. 1968.
- BROSIUS, J. L.; COLMAN, R. F. A key role in catalysis for His89 of adenylosuccinate lyase of *Bacillus subtilis*. **Biochemistry.**, v. 39, n. 44, p. 13336-13343, 2000.

_____. Three subunits contribute amino acids to the active site of tetrameric adenylosuccinate lyase: Lys268 and Glu275 are required. **Biochemistry.**, v. 41, n. 7, p. 2217-2226, 2002.

BULUSU, V. et al. Elucidation of the substrate specificity, kinetic and catalytic mechanism of adenylosuccinate lyase from *Plasmodium falciparum*. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1794, n. 4, p. 642-654, 2009.

CASEY, P. J.; LOWENSTEIN, J. M. Purification of adenylosuccinate lyase from rat skeletal muscle by a novel affinity column. Stabilization of the enzyme, and effects of anions and fluoro analogues of the substrate. **Biochem J**, v. 246, n. 2, p. 263-269, 1 sep. 1987.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Revised Definition of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. **MMWR.**, 55: 1176 p. 2006a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm5543.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2012.

_____. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with Extensive Resistance to Second-Line Drugs. Worldwide, 2000 – 2004. **MMWR.**, 55: 301-305 p. 2006b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5511a2.htm>>. Acesso em: 10 mai. 2012.

_____. **Managing Drug Interactions in the Treatment of HIV-Related Tuberculosis.** 2007.

_____. **Basic TB Facts.** 2012a. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/tb/topic/basics/default.htm#ltbi>>. Acesso em: 11 mai. 2012.

_____. **Treatment of Latent Tuberculosis Infection (LTBI).** 2012b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/treatment/treatmentLTBI.htm>>. Acesso em: 20 mai. 2012.

CHANDRA, N.; KUMAR, D.; RAO, K. Systems biology of tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb).** v. 91, n. 5, p. 487-496. 1 apr. 2011.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537-544, 11 jun. 1998.

COMBET, C. et al. NPS@: network protein sequence analysis. **Trends Biochem Sci.** England, v.25, p.147-150, 2000.

COOK, P. F.; CLELAND, W. W. **Enzyme Kinetics and Mechanisms.** New York: Garland Science, 2007.

DUCATI, R. G. et al. The resumption of consumption - A review on tuberculosis. Rio de Janeiro: **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 697-714, 2006.

DUCATI, R. G. et al. Purine Salvage Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr Med Chem**. Netherlands, v.18, p.1258-1275, 2011.

EL KOUNI, M. H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. **Pharmacol Ther.**, v. 99, n. 3, p. 283-309, 2003.

FIBRIANSAH, G. et al. Structural basis for the catalytic mechanism of aspartate ammonia lyase. **Biochemistry**, v. 50, n. 27, p. 6053-6062, 12 jul. 2011.

FOULK, B. W. et al. Adenylosuccinate lyase of *Schistosoma mansoni*: gene structure, mRNA expression, and analysis of the predicted peptide structure of a potential chemotherapeutic target. **Int J Parasitol.**, v. 32, n. 12, p. 1487-1495, 2002.

FRANCO, T. M. et al. Biochemical characterization of recombinant guaA-encoded guanosine monophosphate synthetase (EC 6.3.5.2) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain. **Arch Biochem Biophys.**, v. 517, n. 1, p. 1-11, 18 nov. 2012.

FUJII, T. et al. Crystal structure of thermostable aspartase from *Bacillus* sp. YM55-1: structure-based exploration of functional sites in the aspartase family. **J Mol Biol**. England, v. 328, p. 635-654, 2003.

FYFE, P. K. et al. Structure of *Staphylococcus aureus* adenylosuccinate lyase (PurB) and assessment of its potential as a target for structure-based inhibitor discovery. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.**, v. 66, n. Pt 8, p. 881-888. 9 jul. 2010.

GENDRON, N. et al. Adenylosuccinate lyase of *Bacillus subtilis* regulates the activity of the glutamyl-tRNA synthetase. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 89, n. 12, p. 5389-5392, 1992.

GOMEZ, J. E.; MCKINNEY, J. D. M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. **Tuberculosis (Edinb)**. v. 84, n. 1-2, p. 29-44, 2004.

HAMPTON, A. Studies of the action of adenylosuccinase with 6-thio analogues of adenylosuccinic acid. **J Biol Chem**, v. 237, p. 529-535, Feb 1962.

HARSHEY, R. M.; RAMAKRISHNAN, T. Rate of ribonucleic acid chain growth in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **J Bacteriol.**, v. 129, n. 2, p. 616-622, 1977.

HE, B.; SMITH, J. M.; ZALKIN, H. *Escherichia coli purB* gene: cloning, nucleotide sequence, and regulation by purR. **J Bacteriol.**, v. 174, n. 1, p. 130-136, 1992.

HENRY, J. **Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por métodos laboratoriais**. 20. ed. Barueri: Manole, 2008.

HIBLE, G. et al. Unique GMP-binding site in *Mycobacterium tuberculosis* guanosine monophosphate kinase. **Proteins**, v. 62, n. 2, p. 489-500, 2006.

HIRIYANNA, K. T.; RAMAKRISHNAN, T. Deoxyribonucleic acid replication time in *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv. **Arch Microbiol.**, v. 144, n. 2, p. 105-159, 1986.

HU, Y. et al. Extensive transmission of isoniazid resistant *M. tuberculosis* and its association with increased multidrug-resistant TB in two rural counties of eastern China: a molecular epidemiological study. **BMC Infect Dis.**, v. 10, p. 43, 2010.

IOM. INSTITUTE OF MEDICINE. **Addressing the Threat of Drug-Resistant Tuberculosis: A Realistic Assessment of the Challenge.** Workshop Summary. Washington: Nacional Academies Press, 2009.

IVANOVICS, G.; MARJAI, E.; DOBOZY, A. The growth of purine mutants of *Bacillus anthracis* in the body of the mouse. **J Gen Microbiol.**, v. 53, n. 2, p. 147-162, 1968.

JARLIER, V.; NIKAIDO, H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 123, n. 1-2, p. 11-18, 1994.

KAPPOCK, T. J.; EALICK, S. E.; STUBBE, J. Modular evolution of the purine biosynthetic pathway. **Curr Opin Chem Biol.**, v. 4, n. 5, p. 567-572, 2000.

KLAMMER, A. A.; MACCOSS, M. J. Effects of modified digestion schemes on the identification of proteins from complex mixtures. **J Proteome Res**, v. 5, n. 3, p. 695-700, Mar. 2006.

KMOCH, S. et al. Human adenylosuccinate lyase (ADSL), cloning and characterization of full-length cDNA and its isoform, gene structure and molecular basis for ADSL deficiency in six patients. **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 10, p. 1501-1513, 12 jun. 2000.

KOZLOV, G. et al. The structure of phosphate-bound *Escherichia coli* adenylosuccinate lyase. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 65, n. Pt 9, p. 857-861, 1 sep. 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 15 aug. 1970.

LASHLEY, F. R.; DURHAM, J. D. **Emerging Infectious Diseases: Trends and Issues.** 2. ed. 2007.

LE NOURS, J. et al. Structural analyses of a purine biosynthetic enzyme from *Mycobacterium tuberculosis* reveal a novel bound nucleotide. **J Biol Chem.**, v. 286, n. 47, p. 40706-40716, 2011.

LEE, P.; COLMAN, R. F. Expression, purification, and characterization of stable, recombinant human adenylosuccinate lyase. **Protein Expr Purif.** United States, v. 51, p.227-34, 2007.

LEE, T. T. et al. Implication of His68 in the substrate site of *Bacillus subtilis* adenylosuccinate lyase by mutagenesis and affinity labeling with 2-[(4-bromo-2,3-dioxobutyl)thio]adenosine 5'-monophosphate. **Biochemistry.**, v. 37, n. 23, p. 8481-8489, 1998.

_____. His68 and His141 are critical contributors to the intersubunit catalytic site of adenylosuccinate lyase of *Bacillus subtilis*. **Biochemistry.**, v. 38, n. 1, p. 22-32, 1999.

_____. Identification of His141 in the active site of *Bacillus subtilis* adenylosuccinate lyase by affinity labeling with 6-(4-bromo-2,3-dioxobutyl)thioadenosine 5'-monophosphate. **J Biol Chem.**, v. 272, n. 1, p. 458-65, 1997.

LONG, M. C.; ESCUYER, V.; PARKER, W. B. Identification and characterization of a unique adenosine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. **J Bacteriol.**, v. 185, n. 22, p. 6548-6555, 2003.

MALATHI, V. G.; RAMAKRISHNAN, T. Biosynthesis of nucleic acid purines in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Biochem J.**, v. 98, n. 2, p. 594-597, 1966.

MARSHALL, V. M.; COPPEL, R. L. Characterisation of the gene encoding adenylosuccinate lyase of *Plasmodium falciparum*. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 88, n. 1-2, p. 237-241, 1997.

MCFARLAND, W. C.; STOCKER, B. A. Effect of different purine auxotrophic mutations on mouse-virulence of a Vi-positive strain of *Salmonella dublin* and of two strains of *Salmonella typhimurium*. **Microb Pathog.**, v. 3, n. 2, p. 129-141, 1987.

MENG, L. M.; KILSTRUP, M.; NYGAARD, P. Autoregulation of PurR repressor synthesis and involvement of purR in the regulation of purB, purC, purL, purMN and guaBA expression in *Escherichia coli*. **Eur J Biochem.**, v. 187, n. 2, p. 373-9., 1990.

MILLER, R. W.; LUKENS, L. N.; BUCHANAN, J. M. Biosynthesis of the purines. XXV. The enzymatic cleavage of N-(5-amino-1-ribosyl-4-imidazolylcarbonyl)-L-aspartic acid 5'-phosphate. **J Biol Chem**, v. 234, n. 7, p. 1806-1811, Jul 1959

MIZRAHI, V.; BUCKSTEIN, M.; RUBIN, H. Nucleic Acid Metabolism. In: COLE, S. (Ed.). **Tuberculosis and the Tubercle Bacillus**. Washington, DC, 2005. cap. 23, p.369-378.

MUNIER-LEHMANN, H. et al. A new subfamily of short bacterial adenylate kinases with the *Mycobacterium tuberculosis* enzyme as a model: A predictive and experimental study. **Proteins.**, v. 36, n. 2, p. 238-248, 1999.

NELSON, D.; COX, M. **Lehninger - Principles of Biochemistry**. 4th ed. New York: 2005.

NUIRY, I. I. et al. Kinetic mechanism and location of rate-determining steps for aspartase from *Hafnia alvei*. **Biochemistry**, v. 23, n. 22, p. 5168-5175, 23 oct. 1984.

O'BRIEN, R. J.; NUNN, P. P. The need for new drugs against tuberculosis. Obstacles, opportunities, and next steps. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 163, n. 5, p. 1055-1058, Apr 2001.

PAIK, S. et al. Identification of virulence determinants for endocarditis in *Streptococcus sanguinis* by signature-tagged mutagenesis. **Infect Immun.**, v. 73, n. 9, p. 6064-6074, 2005.

PALENCHAR, J. B.; CROCCO, J. M.; COLMAN, R. F. The characterization of mutant *Bacillus subtilis* adenylosuccinate lyases corresponding to severe human adenylosuccinate lyase deficiencies. **Protein Sci**, v. 12, n. 8, p. 1694-1705, Aug 2003.

PARKER, W. B.; LONG, M. C. Purine Metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* as a Target for Drug Development. **Curr Pharm Des.**, v. 13, n. 6, p. 599-608, 2007.

PARRISH, N. M.; DICK, J. D.; BISHAI, W. R. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends Microbiol.**, v. 6, n. 3, p. 107-112, 1998.

PDB. **Protein Data Bank**. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/>>. Acesso em: 2012.

PINNA, M. C. et al. Hofmeister series: the hydrolytic activity of *Aspergillus niger* lipase depends on specific anion effects. **J Phys Chem B**, v. 109, n. 12, p. 5406-5408, 31 mar. 2005.

PORTER, D. J.; BRIGHT, H. J. 3-Carbanionic substrate analogues bind very tightly to fumarase and aspartase. **J Biol Chem**, v. 255, n. 10, p. 4772-4780, 25 may 1980.

PORTER, D. J.; RUDIE, N. G.; BRIGHT, H. J. Nitro analogs of substrates for adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate. **Arch Biochem Biophys**, v. 225, n. 1, p. 157-163, Aug 1983.

PUTHAN VEETIL, V. et al. Aspartase/Fumarase Superfamily: A Common Catalytic Strategy Involving General Base-Catalyzed Formation of a Highly Stabilized aci-Carboxylate Intermediate. **Biochemistry**, v. 15, p. 15, 2012.

_____. Site-directed mutagenesis, kinetic and inhibition studies of aspartate ammonia lyase from *Bacillus* sp. YM55-1. **Febs j**, v. 276, n. 11, p. 2994-3007, Jun 2009.

RAUSHEL, F. M. Nitro analogs of substrates for argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase. **Arch Biochem Biophys**, v. 232, n. 2, p. 520-5, 1 aug. 1984.

RAY, S. P. et al. Structural and biochemical characterization of human adenylosuccinate lyase (ADSL) and the R303C ADSL deficiency-associated mutation. **Biochemistry**, v. 51, n. 33, p. 6701-13, 21 aug. 2012.

ROBERTSON, J. G. Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. **Biochemistry**, v. 44, n. 15, p. 5561-5571, 19 apr. 2005.

ROSTIROLLA, D. C. et al. UMP kinase from *Mycobacterium tuberculosis*: Mode of action and allosteric interactions, and their likely role in pyrimidine metabolism regulation. **Arch Biochem Biophys.**, v. 505, n. 2, p. 202-212, 2011.

RUSSELL, M. S. et al. A reduced antigen load in vivo, rather than weak inflammation, causes a substantial delay in CD8+ T cell priming against *Mycobacterium bovis* (bacillus Calmette-Guerin). **J Immunol.**, v. 179, n. 1, p. 211-220, 2007.

RUSTAD, T. R. et al. Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. **Cell Microbiol.**, v. 11, n. 8, p. 1151-1159. 15 apr. 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual.** 2nd ed. 1989.

SAMPALEANU, L. M.; YU, B.; HOWELL, P. L. Mutational analysis of duck delta 2 crystallin and the structure of an inactive mutant with bound substrate provide insight into the enzymatic mechanism of argininosuccinate lyase. **J Biol Chem.** United States, v. 277, p. 4166-4175, 2002.

SANCHEZ-QUITIAN, Z. A. et al. Structural and functional analyses of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3315c-encoded metal-dependent homotetrameric cytidine deaminase. **J Struct Biol.** United States: 2009 Elsevier Inc, v. 169, p.413-23, 2010.

SASSETTI, C. M.; BOYD, D. H.; RUBIN, E. J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. **Mol Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 77-84, 2003.

SCHROEDER, E. K. et al. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr Pharm Biotechnol.**, v. 3, n. 3, p. 197-225, 2002.

SEGALL, M. L.; COLMAN, R. F. Gln212, Asn270, and Arg301 are critical for catalysis by adenylosuccinate lyase from *Bacillus subtilis*. **Biochemistry.**, v. 43, n. 23, p. 7391-7402, 2004.

SEGEL, I. H. **Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems.** New York: John Wiley and Sons, 1975.

SHI, W. et al. Structures of purine nucleoside phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* in complexes with immucillin-H and its pieces. **Biochemistry.**, v. 40, n. 28, p. 8204-8215, 2001.

SIMEONE, R. et al. Delineation of the roles of FadD22, FadD26 and FadD29 in the biosynthesis of phthiocerol dimycocerosates and related compounds in *Mycobacterium tuberculosis*. **Febs J.**, v. 277, n. 12, p. 2715-2725, 2010.

SIVENDRAN, S.; COLMAN, R. F. Effect of a new non-cleavable substrate analog on wild-type and serine mutants in the signature sequence of adenylosuccinate lyase of *Bacillus subtilis* and *Homo sapiens*. **Protein Sci.**, v. 17, n. 7, p. 1162-1174. 9 may. 2008.

SMITH, C.; MARKS, A.; LIEBERMAN, M. **Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach**. 2nd ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

SPECTOR, T.; BERENS, R. L.; MARR, J. J. Adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase from *Trypanosoma cruzi*, Specificity studies with potential chemotherapeutic agents. **Biochem Pharmacol.**, v. 31, n. 2, p. 225-229, 1982.

SPECTOR, T.; JONES, T. E.; ELION, G. B. Specificity of adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase from *Leishmania donovani*. Selective amination of an antiprotozoal agent. **J Biol Chem**, v. 254, n. 17, p. 8422-8426, 10 sep. 1979.

SPIEGEL, E. K.; COLMAN, R. F.; PATTERSON, D. Adenylosuccinate lyase deficiency. **Mol Genet Metab.**, v. 89, n. 1-2, p. 19-31. 12 jul 12, 2006.

STONE, R. L.; ZALKIN, H.; DIXON, J. E. Expression, purification, and kinetic characterization of recombinant human adenylosuccinate lyase. **J Biol Chem.**, v. 268, n. 26, p. 19710-19716, 1993.

TOTH, E. A. et al. The crystal structure of adenylosuccinate lyase from *Pyrobaculum aerophilum* reveals an intracellular protein with three disulfide bonds. **J Mol Biol.**, v. 301, n. 2, p. 433-450, 2000.

TOTH, E. A.; YEATES, T. O. The structure of adenylosuccinate lyase, an enzyme with dual activity in the de novo purine biosynthetic pathway. **Structure.**, v. 8, n. 2, p. 163-174, 2000.

TOZZI, M. G. et al. Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism. **Febs J.**, v. 273, n. 6, p. 1089-1101, 2006.

TSAI, M. et al. Substrate and product complexes of *Escherichia coli* adenylosuccinate lyase provide new insights into the enzymatic mechanism. **J Mol Biol.**, v. 370, n. 3, p. 541-554. 4 may. 2007.

UDWADIA, Z. F. et al. Totally Drug-Resistant Tuberculosis in India. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 4, p. 579-581, 2012.

USHA, V. et al. Identification of novel diphenyl urea inhibitors of Mt-GuaB2 active against *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology.**, v. 157, n. Pt 1, p. 290-299. 16 nov. 2011.

_____. Identification of Novel Mt-GuaB2 Inhibitor Series Active against *M. tuberculosis*. **PLoS One.**, v. 7, n. 3, p. e33886. 29 mar. 2012.

VAN DEN BERGHE, G. et al. The purine nucleotide cycle and its molecular defects. **Prog Neurobiol.**, v. 39, n. 5, p. 547-61, Nov 1992.

VAN DEN BERGHE, G.; VINCENT, M. F.; JAEKEN, J. Inborn errors of the purine nucleotide cycle: adenylosuccinase deficiency. **J Inherit Metab Dis.**, v. 20, n. 2, p. 193-202, 1997.

VELAYATI, A. A. et al. Totally drug-resistant tuberculosis strains: evidence of adaptation at the cellular level. **Eur Respir J.**, v. 34, n. 5, p. 1202-1203, 2009.

_____. Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. **Chest.**, v. 136, n. 2, p. 420-425. 6 apr. 2009.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry.** 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 2011.

WATANABE, K. et al. Uptake of AMP, ADP, and ATP in *Escherichia coli* W. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v. 75, n. 1, p. 7-12. 7 jan. 2011.

WHEELER, P. R. Enzymes for purine synthesis and scavenging in pathogenic mycobacteria and their distribution in *Mycobacterium leprae*. **J Gen Microbiol.**, v. 133, n. 11, p. 3013-3018, 1987.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report 2012.** Geneva: WHO Press, 2012.

_____. **Global tuberculosis control: WHO report 2011.** Geneva: WHO Press, 2011. 258p.

_____. **Global tuberculosis Control 2010.** Geneva: WHO Press, 2010a. 218p.

_____. **Global Tuberculosis Report 2012.** Geneva: WHO Press, 2012.

_____. **The global plan to stop TB 2011-2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis.** Geneva: WHO Press, 2010b.

_____. **Treatment of tuberculosis: Guideline.** Geneva: WHO Press, 2010c. 147p.

WOLFE, S. A.; SMITH, J. M. Separate regulation of *purA* and *purB* loci of *Escherichia coli* K-12. **J Bacteriol.**, v. 162, n. 2, p. 822-825, 1985.

WOODWARD, D. O.; BRAYMER, H. D. Purification and properties of *Neurospora* adenylosuccinase. **J Biol Chem**, v. 241, n. 3, p. 580-587, 10 feb. 1966.

WU, C. Y. et al. Chemical mechanism of the endogenous argininosuccinate lyase activity of duck lens delta2-crystallin. **Biochem J**, v. 333 (Pt 2), p. 327-334, 15 jul. 1998.

YOUM, J.; SAIER, M. H., JR. Comparative analyses of transport proteins encoded within the genomes of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1818, n. 3, p. 776-797, 2012.

ZALKIN, H.; NYGAARD, P. Biosynthesis of Purine Nucleotides. In: NEIDHARDT, F. C. (Ed.). **Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology**. 2nd ed. Washington, DC, 1996. cap. 34, p.561-579.

ZHANG, Y. Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis. **Front Biosci.**, v. 9, p. 1136-1156, 2004.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series. **Curr Opin Chem Biol**. England, v.10, p.658-663, 2006.

ZHANG, Z. et al. Structures of glycinamide ribonucleotide transformylase (PurN) from *Mycobacterium tuberculosis* reveal a novel dimer with relevance to drug discovery. **J Mol Biol.**, v. 389, n. 4, p. 722-33. 24 apr. 2009.

ZHANG, Z.; MARSHALL, A. G. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. **J Am Soc Mass Spectrom**. United States, v.9, p.225-233, 1998.

ZIKANNOVA, M. et al. Preparation of 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide ribotide, 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide riboside and succinyladenosine, compounds usable in diagnosis and research of adenylosuccinate lyase deficiency. **J Inherit Metab Dis**, v. 28, n. 4, p. 493-499, 2005.

ANEXOS

ANEXO A. Manuscrito submetido

Elsevier Editorial System(tm) for Archives of Biochemistry and Biophysics
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Biochemical characterization of recombinant purB-encoded adenylosuccinate lyase (EC 4.3.2.2) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Article Type: Regular Paper

Keywords: enzyme kinetics; aspartase/fumarase; isothermal titration calorimetry; pH-profile; product inhibition; purine biosynthesis

Corresponding Author: Prof. Cristiano Valim Bizarro, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

First Author: Priscila R Vitola, bachelor

Order of Authors: Priscila R Vitola, bachelor; Candida Deves, Master; Diana C Rostirolla, Master;

Cristiano Valim Bizarro, Ph.D.; Luiz A Basso, Ph.D.; Diógenes S Santos, Ph.D.

Abstract: The enzyme adenylosuccinate lyase (ASL) is involved in both de novo and salvage pathways of purine biosynthesis. Here we describe the cloning, expression, purification, and both the structural and kinetic characterization of a non-tagged recombinant form of ASL from *Mycobacterium tuberculosis* (MtASL). Size exclusion chromatography showed that the protein is a homotetramer in solution, and the steady-state kinetics analysis revealed that MtASL exhibits hyperbolic kinetics and confirmed that the recombinant enzyme indeed catalyses the cleavage of S-AMP in AMP and fumarate.

The pH-rate profile exhibited by MtASL are in agreement with the overall acid-basic mechanism of catalysis observed in members of the aspartase/fumarase superfamily of enzymes. These experiments, combined to sequence comparisons of MtASL with ASL orthologs structurally and biochemically characterized led us to identify specific residues potentially involved in MtASL substrate binding and catalysis. In addition, both product inhibition studies and product binding experiments using isothermal titration calorimetry allowed us to propose that MtASL follows a uni-bi ordered kinetic mechanism.

Suggested Reviewers: P. Lynne Howell

Research Institute Hospital for Sick Children and University of Toronto

howell@sickkids.ca

Professor Lynne Howell has made important contributions to our current understanding of adenylosuccinate lyase structure and activity

Roberta Colman

University of Delaware

rftcolman@udel.edu

Prof. Colman is an expert on adenylosuccinate lyase enzymes, with many contributions to the field.

John Blanchard

Albert Einstein College of Medicine

blanchar@aecom.yu.edu

Prof. Blanchard is an expert on enzyme kinetics.

Vern L. Schramm

Albert Einstein College of Medicine

vern@aecom.yu.edu

Prof. Schramm is an expert on purine metabolism and drug development.

Biochemical characterization of recombinant *purB*-encoded adenylosuccinate lyase (EC 4.3.2.2) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Priscila R. Vitola ^{a, b}, Candida Deves ^{a, b}, Diana C. Rostirolla^{a, b}, Cristiano V. Bizarro^{a, c}, Luiz A. Basso ^{a, b} and Diógenes S. Santos ^{a, b}

^a Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681 – Tecnopuc – Prédio 92-A, Porto Alegre 90619-900, RS, Brazil; ^b Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Prédio 60, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil; ^c Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre 90619-900, RS, Brazil

ABSTRACT

The enzyme adenylosuccinate lyase (ASL)¹ is involved in both *de novo* and salvage pathways of purine biosynthesis. Here we describe the cloning, expression, purification, and both the structural and kinetic characterization of a non-tagged recombinant form of ASL from *Mycobacterium tuberculosis* (*MtASL*). Size exclusion chromatography showed that the protein is a homotetramer in solution, and the steady-state kinetics analysis revealed that *MtASL* exhibits hyperbolic kinetics and confirmed that the recombinant enzyme indeed catalyses the cleavage of S-AMP in AMP and fumarate. The pH-rate profile exhibited by *MtASL* are in agreement with the overall acid-basic mechanism of catalysis observed in members of the aspartase/fumarase superfamily of enzymes. These experiments, combined to sequence comparisons of *MtASL* with ASL orthologs structurally and biochemically characterized led us to identify specific residues potentially involved in *MtASL* substrate binding and catalysis. In addition, both product inhibition studies and product binding experiments using isothermal titration calorimetry allowed us to propose that *MtASL* follows a uni-bi ordered kinetic mechanism.

Keywords: enzyme kinetics; aspartase/fumarase; isothermal titration calorimetry; pH-profile; product inhibition; purine biosynthesis.

¹ **Abbreviations used:** AICAR, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide; AMP, adenosine monophosphate; ASL, adenylosuccinate lyase; CID, collision-induced dissociation; Ches, 2-(cyclohexylamino)-ethanesulfonic acid; CV, column volumes; DMSO, dimethyl sulfoxide, GMP, guanosine monophosphate; Hepes, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid; HIV, human immunodeficiency virus; HMW, high molecular weight; IMP, inosine monophosphate; IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; ITC, isothermal titration calorimetry; LB, Lysogeny Broth; LMW, low molecular weight; Mes, 2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate; PRPP, phosphoribosyl pyrophosphate; SAICAR, 5-aminoimidazole-4(N-succinylcarboxamide) ribonucleotide; S-AMP, succinyl-adenosine monophosphate; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TB, Tuberculosis; Tris, Tris(hydroxymethyl)aminomethane.

INTRODUCTION

Human tuberculosis (TB), an illness that results from *Mycobacterium tuberculosis* infection, remains a major health problem worldwide, accounting for an estimated 9 million new cases globally in 2011 [1]. *M. tuberculosis* is a very successful pathogen thanks to its ability to persist latently in host tissues, getting protection against drug treatment and creating a reservoir of disease [2]. The emergence of multi, extensively [3] and totally drug-resistant strains [4], the increase of TB-HIV co-infection [1] and the complexity of the treatment currently used [5], warned to the need of new antitubercular drugs, with novel mechanisms of action. To achieve this purpose, it is crucial a better understanding of the biology [6] and the basic biochemistry of the pathogen [7, 8].

Enzymes are among the main categories of targets explored in the drug discovery process and enzyme inhibitors represent almost half of the drugs in clinical use today [9]. Several metabolic pathways have been studied as possible drug targets, including the purine and pyrimidine pathways, which have been implicated in the development of anticancer, antiviral and antibacterial agents due to their involvement in many cellular processes that are essential for survival [7, 9–13]. Structural and mechanistic studies of purine enzymes may provide a solid basis for the development of anti-TB nucleoside analogs [14] that can be active against resistant and latent bacteria [7].

Purine nucleotides can be synthesized by the *de novo* and salvage pathways, which are conserved among eukaryotes and prokaryotes. Although its characterization in *M. tuberculosis* is still incomplete, it is known that the bacilli express enzymes of both pathways [15, 16]. The *de novo* purine biosynthesis is composed by 10-12 sequential enzymatic steps to form inosine monophosphate (IMP) from phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) [17] whereas in the salvage pathway, adenine, guanine, and hypoxanthine are converted to AMP, GMP and IMP, respectively [18]. It is supposed that the purine salvage pathway is used when the bacillus uptakes these nucleobases from the external medium subsequently converting them to the correspondent nucleotides [19]. Metabolic adaptations to a nutritionally changing environment includes shifts between the activity of the salvage and the *de novo* purine pathways. Indeed, pathogenic

mycobacteria are capable of modifying the expression of purine enzymes through purine bases supplementation [20].

Several sequences homologous to enzymes from both *de novo* and salvage purine nucleotide pathways were identified in the genome sequence of *M. tuberculosis* H37Rv [21]. Interestingly, most of the enzymes of the *de novo* purine nucleotide biosynthesis pathway were predicted to be essential for optimal growth [22].

Enzymes of both pathways have been structurally or biochemically characterized in the last years as a consequence of the renowned interest in enzyme inhibitor development [12, 13, 19, 23–30], highlighting the relevance of these targets in TB drug discovery context.

Adenylosuccinate lyase (ASL) (EC 4.3.2.2), catalyses two similar and nonsequential steps in the purine biosynthetic pathway. The first one is the cleavage of 5-aminoimidazole-4(N-succinylcarboxamide) ribonucleotide (SAICAR) to 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) and fumarate, the eighth step of the *de novo* pathway, and the second one is the cleavage of succinyl-adenosine monophosphate (S-AMP) to adenosine monophosphate (AMP) and fumarate, the final step in AMP synthesis [31], which may be involved in the salvage pathway [16]. By exerting these activities, ASL takes part in regulating the cellular metabolism by controlling the fumarate – a citric acid cycle intermediate – and free AMP levels [32, 33]. The essentiality of this enzyme have been investigated and it was already demonstrated that *purB* gene knockout organisms from different species display smaller virulence (if any) or are auxotrophic to adenine, adenosine or AMP.[34-37].

ASL belongs to aspartase/fumarase superfamily, an enzymic group which catalyses reactions where fumarate is a common product. Despite the low identity in amino acid sequence, the members of this family exhibit high conservation of the tertiary and quaternary fold. These enzymes use a common acid-base mechanism in catalysis. Firstly, a general base of the enzyme abstracts a proton from the C β of the substrate, forming a carbanion intermediate [38–42]. Subsequently, the intermediate collapses and the cleavage of the C–N bond occurs – which is the rate-determining step of the reaction [41, 43–45]; then a general acid donates a proton to the leaving group [46–48]. ASL homologs have been characterized in many organisms [43, 49–51].

These enzymes are homotetramers with approximately 50 kDa per subunit, in which amino acid residues from three subunits contribute to form the active site [47, 52].

In the *M. tuberculosis* H37Rv genome, the *purB* gene (Rv0777) was proposed to encode an ASL protein based on functional annotation by homology [21]. However, the Rv0777 gene product has not been characterized biochemically yet and this functional assignment remains to be validated.

Here, we describe the *purB* gene cloning, heterologous protein expression, purification, and the molecular and kinetic characterization of a non-tagged ASL recombinant protein from *M. tuberculosis* H37Rv (*MtASL*). We report the steady-state kinetics parameters and the pH-rate profiles of *MtASL*. In addition, product inhibition studies and isothermal titration calorimetry of product binding were performed in order to determine the order of product release in the kinetic mechanism of *MtASL*. The biochemical characterization of *MtASL* performed here contributes to our understanding of the purine metabolism of *M. tuberculosis* and represents a first step towards validating this enzyme as a molecular target for drug development to treat TB.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Gene amplification, cloning and protein expression

The *purB* coding sequence (Rv0777, 1419 bp) was PCR amplified from total genomic DNA of *M. tuberculosis* H37Rv strain using specific primers designed to contain NdeI (forward primer, 5'-gccatagagcattcccaacgtgctggcc-3') and BamHI (reverse primer, 5'-tcggatcctcaaagaattgcacccggcgtg-3') restriction sites (underlined) and a high fidelity proof-reading thermostable DNA polymerase (*Pfu*[®] DNA polymerase, Stratagene), in the presence of 10 % dimethyl sulfoxide (DMSO, final concentration). PCR cycling parameters were 35 cycles of denaturation at 96 °C (45 s), annealing at 55 °C (45 s) and extension at 72 °C (3 min). The PCR product was visualized on 1% agarose gel and purified using a QIAGEN QIAquick gel extraction

kit (Qiagen). The purified fragment was initially cloned into pCR-Blunt vector (Invitrogen) and subcloned into pET-23a(+) expression vector (Novagen), previously digested with NdeI and BamHI restriction enzymes. The integrity of the constructs was confirmed in all cases by antibiotic selections and digestion with appropriated restriction enzymes (New England Biolabs). Moreover, the complete *purB* nucleotide sequence was determined by automated DNA sequencing to corroborate sequence identity and to check the absence of mutations in the cloned fragment.

Electrocompetent *E. coli* BL21(DE3) pLysS cells were transformed with pET-23a(+):*purB* recombinant vector by electroporation (Gene Pulser II; Capacitance Extender II; Pulse Controller II, Bio-Rad Laboratories) and the colonies were selected on Lysogeny Broth (LB) agar plates containing ampicillin ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) and chloramphenicol ($34 \mu\text{g mL}^{-1}$). A single bacterial colony was inoculated into 50 mL of LB medium containing both antibiotics (at the same concentrations used in agar plates) and was grown overnight at 37 °C and 180 rpm. A volume of 13 mL of this culture was inoculated in either LB, Terrific Broth or 2YT medium (500 mL) containing the antibiotics described above and the culture was incubated at 37 °C and 180 rpm until reaching an optical density ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) of 0.4 – 0.6. For recombinant protein expression, bacterial cultures were treated with 0.4 or 1 mM of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and were grown at 25 or 37 °C under stirring at 180 rpm. Cells were harvested by centrifugation (12 000g, 30 min, at 4 °C) and stored at –20 °C.

Purification of recombinant *MtASL*

All protein purification steps were carried out at 4 °C or on ice and all fractions were analyzed by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) stained with Coomassie Blue [53]. Chromatographic steps were performed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) on an Äkta Purifier System (GE HealthCare) with UV detection at 215, 254 and 280 nm. Wet cell (2 g) was suspended in 20 mL of 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)-HCl pH 8.0 and stirred for 30 min. Lysozyme (Sigma

Aldrich) was added to a final concentration of 0.2 mg mL^{-1} and the solution was incubated for 30 min under constant stirring. Subsequently, cells were disrupted by ultrasound (10 pulses of 10 s each, with cooling intervals of 1 min, at 60 % amplitude) with a 13 mm probe, and the insoluble cell fraction was removed by centrifugation at $38\,000g$ for 30 min. Streptomycin sulfate (Sigma Aldrich) was added to the supernatant to a final concentration of 1 % (wt/vol) and the sample was centrifuged at $38\,000g$ for 30 min. The supernatant was dialyzed against 50 mM Tris-HCl pH 8.0 (2 times against 2 L, for 3 h and additionally against 2 L overnight), and clarified by centrifugation at $38\,000g$ for 30 min. The supernatant was treated with an equal volume of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 containing 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, to a final concentration of 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ under constant stirring and loaded into an hydrophobic exchange column (HiPrep 16/10 Octyl Sepharose FF, GE HealthCare) pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 8.0 containing 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, washed with 5 column volumes (CV) of the same buffer, followed by 20 column volumes (CV) of 100–20 % linear gradient of this buffer, at 1.0 mL min^{-1} flow rate. Fractions containing the recombinant enzyme were pooled, concentrated to a final volume of 8 mL in a 50 mL Amicon stirred ultrafiltration cell (30 kDa molecular weight cutoff membrane, Millipore) and loaded into a size exclusion chromatographic column (HiLoad 26/60 Superdex-200 HR, GE HealthCare) pre-equilibrated with 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (Hepes)-NaOH pH 7.0. Proteins were isocratically eluted at 0.5 mL min^{-1} . Fractions containing the enzyme were pooled and loaded into an anion-exchange column (MonoQ HR 16/10, GE HealthCare) pre-equilibrated with 50 mM Hepes-NaOH pH 7.0, washed with 3 CV and the recombinant *MtASL* was eluted using a 20 CV linear gradient of 0–100% of 50 mM Hepes-NaOH pH 7.0, containing 400 mM NaCl, at 1.0 mL min^{-1} flow rate. Eluted fractions containing homogeneous *MtASL* were dialyzed extensively against 50 mM Tris-HCl pH 8.0 and stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Total protein concentration was determined by the method of Bradford [54], using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories) and bovine serum albumin as standard.

***Mt*ASL identification by mass spectrometry**

In order to confirm the identity of *Mt*ASL preparations, we performed LC-MS/MS peptide mapping experiments. Samples containing 50 μ g of purified *Mt*ASL (1nmol) were desalted and trypsin digested using a protocol adapted from [55]. Chromatographic separations of digested peptide mixtures were performed with 15 cm capillary columns (150 μ m i.d., Kinetex 2.6 μ m C18 core-shell particles – Phenomenex, Inc.) using a nanoLC Ultra system (nanoLC Ultra 1D plus, Eksigent, USA) connected to a LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA). The chromatographic method used a flow rate of 300 nL min⁻¹ with a step gradient from mobile phase A containing 0.1% formic acid in water to mobile phase B containing 0.1% formic acid in acetonitrile (0–2% B over 5 min; 2–10% B over 3 min; 10–60% B over 60 min; 60–80% B over 2 min; 80% B isocratic for 10 min; 80–2% B over 2 min; and 2% B isocratic for 8 min). Spectra of eluting peptides were acquired in positive ion mode in a data-dependent fashion. MS/MS fragmentation was performed using collision-induced dissociation (CID) with an activation Q of 0.250, an activation time of 30.0 ms, 35% of normalized collision energy, and an isolation width of 1.0 Da. LC-MS/MS data was compared with theoretical MS/MS spectra obtained from in-silico tryptic digests of the *M. tuberculosis* H37Rv proteome (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes>). We allowed two missed cleavage sites for trypsin, a precursor tolerance of 10 ppm, a fragment tolerance of 0.8 Da, static carbamidomethylation on cysteines, and oxidation on methionine residues. To reduce false identifications, we restricted our analysis to matches with a Xcorr score > 2.0 for doubly charged ions and Xcorr score > 2.5 for triply charged ions.

Determination of *Mt*ASL molecular mass

Purified *Mt*ASL samples were desalted (see supplementary materials), reconstituted in ACN 50%/FA 0.1% and directly injected using a 500 μ L syringe (Hamilton Company, USA) in a static mode into an IonMax electrospray ion source. The electrospray source parameters were as follows: positive ion mode, 4.5 kV of applied voltage to the electrospray source, 5 arbitrary units

(range 0–100) of sheath gas flow, 4.0 V of capillary voltage, 200 °C of capillary temperature, and 49.7 V of tube lens voltage. Full spectra (600 – 2000 m/z range) were collected during 7 min on a Thermo Orbitrap Discovery XL in profile mode at a nominal resolution $r = 30,000$ at m/z 400. The average spectrum was processed with the software MagTran [56] for charge state deconvolution.

Determination of the oligomeric state of *MtASL*

Gel-filtration chromatography was performed on a HiLoad 10/30 Superdex-200 HR column (GE Healthcare) pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl at 0.4 mL min⁻¹ flow rate, with UV detection at 215, 254 and 280 nm. The low (LMW) and high molecular weight (HMW) Gel Filtration Calibration Kits (GE Healthcare) were used to prepare a calibration curve. The elution volumes (V_e) of standard proteins (ferritin, catalase, aldolase, coalbumin, ovalbumin, ribonuclease A) were used to calculate their corresponding partition coefficients (K_{av} , equation (1)). Blue dextran 2000 (GE Healthcare) was used to determine the void volume (V_0). V_t is the total bead volume of the column. The K_{av} value for each protein was plotted against their corresponding molecular mass. The K_{av} value for each protein was plotted against the log of their corresponding molecular mass, yielding a linear function with the values for the y-intercept and the slope given in equation (2). A volume of 100 μ L of recombinant *MtASL* at 0.7 mg mL⁻¹ was applied to the column to determine the V_e value. Substitution of the latter in equation (2) allowed determination of the molecular mass of the recombinant enzyme in solution.

$$(1) \quad K_{av} = V_e - V_0 / V_t - V_0$$

$$(2) \quad K_{av} = 0.9669 - (-0.3087) \log kDa$$

Multiple sequence alignment

The amino acid sequences of ASL proteins whose three-dimensional structures were solved or which mutagenesis studies have been made to verify essential residues were included in the alignment: *M. tuberculosis* (NP_215291.1), *Homo sapiens* (AAC83935.1), *Staphylococcus aureus* (NP_375015.1), *E. coli* (ZP_03034589.1), *Thermotoga maritima* (NP_228901.1) and *Bacillus subtilis* (YP_005555703.1). Multiple amino acid sequence alignment was performed with ClustalW [57], using the Blossum matrix for amino acid substitutions and the default parameters.

Steady-state kinetics

MtASL enzyme activity was measured spectrophotometrically on an UV-2550 UV/Visible spectrophotometer (Shimadzu) equipped with a temperature-controlled cuvette holder, using 1.0 cm path length quartz cuvettes. The assay was performed at 25 °C in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 in a total volume of 0.5 mL [31], monitoring the cleavage of S-AMP to AMP and fumarate, following the time dependent decrease in absorbance at 282 nm using a difference extinction coefficient of 10 000 M⁻¹ cm⁻¹ [58]. The reaction was initiated by the addition of the recombinant *MtASL* (14 μM) and determination of the apparent steady-state kinetic parameters were evaluated at varying concentrations of S-AMP (4 – 150 μM).

Hyperbolic saturation curves were fitted by non-linear regression analysis to the Henri–Michaelis–Menten equation (3), in which v is the steady-state reaction rate, V_{\max} is the maximal reaction rate, $[S]$ is the substrate concentration, and K_m is the Henri–Michaelis–Menten constant for substrate S [59]. The k_{cat} values were calculated using equation (4).

$$(3) \quad v = V_{\max}[S]/(K_m + [S])$$

$$(4) \quad V_{\max} = k_{\text{cat}}[E]_t$$

SAICAR synthesis catalyzed by *MtASL* was performed as previously reported, with minor modifications [43, 60]. The reaction was carried out in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 5 mM AICAR, 40 mM fumarate and 0.02 mg of *MtASL* in a final reaction volume of 1 mL. The reaction mixture was incubated for 4 h at 37 °C. For enzyme removal, the reaction mixture was filtered with a Centricon[®] centrifugal device with MW cutoff of 10 kDa (Merk Millipore). Subsequently, the mixture was loaded on an anion exchange column (HiTrap DEAE FF, GE HealthCare) and the compounds were separated with a linear gradient (10 – 500 mM) of ammonium bicarbonate, pH 8.0. An experiment control was made in which the reaction mixture was incubated without the enzyme, and a chromatographic separation was made as described above.

pH-rate profile

Prior to perform the pH-rate profiles, the enzyme stability was assessed over a broader pH range (5.5 to 11) by incubating the enzyme for 20 minutes in 100 mM 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES)/Hepes/2-(N-cyclohexylamino)-ethanesulfonic acid (CHES) buffer mixture, and monitoring the activity in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. The pH dependence of kinetic parameters was determined by measuring initial velocities in the presence of varying S-AMP concentrations (1 – 200 μM) in 100 mM buffer mixture over the following pH values: 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0. The pH profiles were generated by plotting either $\log(k_{\text{cat}})$ or $\log(k_{\text{cat}}/K_m)$ versus the pH values, and data were fitted to equation (5) [61], where y is the apparent kinetic parameter, C is the pH-independent plateau value of y , H is the hydrogen ion concentration, K_a is the apparent acid dissociation constant and K_b is the apparent basic dissociation constant for ionizing groups. The data fitting employed the pH range of 6.5–10.0 for $\log(k_{\text{cat}})$ versus pH plot and of 7.5–10.0 for $\log(k_{\text{cat}}/K_m)$ versus the pH plot.

$$(5) \quad \log y = \log[C/(1 + H/K_a + K_b/H)]$$

Product inhibition studies

The order of product release was determined in product inhibition experiments where the initial rates were measured at varying concentrations of S-AMP (4 – 100 μM) and fixed-varying concentrations of either AMP (50 – 200 μM) or fumarate (25 – 150 μM). Double reciprocal plots of $1/v$ versus $1/[\text{S-AMP}]$ at different product concentrations were employed to characterize the inhibition as competitive, noncompetitive or uncompetitive, and to extract the slope and intercept inhibition constants. The equations for the different inhibition profiles used were:

Competitive

$$(6) \quad v = V_{\max}[S]/\{K_m (1 + [I]/K_i) + [S]\}$$

Noncompetitive

$$(7) \quad v = V_{\max}[S]/\{K_m (1 + [I]/K_i) + [S](1 + [I]/K_{is})\}$$

Uncompetitive

$$(8) \quad v = V_{\max}[S]/\{K_m + [S](1 + [I]/K_{is})\}$$

Wherein v is the initial velocity, V_{\max} is the maximum velocity, $[S]$ is the substrate concentration, $[I]$ is the inhibitor concentration, K_m is the Henri–Michaelis–Menten constant, K_i and K_{is} are the slope and the intercept inhibition constants, respectively.

Isothermal titration calorimetry (ITC)

ITC experiments were performed using an iTC200 Microcalorimeter (MicroCal, Inc., GE HealthCare). The *MtASL* used in ITC analysis was dialyzed against 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, and the same buffer was used to prepare all ligand solutions.

The reference cell (200 μL) was loaded with ultra-pure water during all experiments and the sample cell (200 μL) was filled with *MtASL* (100 μM). For each binding assay, the injection syringe (39.7 μL) contained either AMP (1 mM), fumarate (1 mM) or AICAR (1 or 8 mM). In order to obtain the ligand binding isotherms, each product was directly titrated into the sample cell containing *MtASL* (100 μM). The first titration injection (0.5 μL), which was discarded from data analysis, was followed by 17 injections of 2.2 μL , spaced by 240 s intervals (for AMP and AICAR) and by 180 s intervals for fumarate. Control titrations (ligand into buffer) were performed to subtract the heat of dilution and mixing for each experiment prior to data analysis. The data after peak integration of the isotherm generated by ITC, subtraction of control titration data and concentration normalization (heat normalized to the molar ratio), were analyzed by Origin 7 SR4 software (Microcal, Inc.). All assays were carried out at 25 $^{\circ}\text{C}$, and under stirring speed (500 rpm) and constant pressure.

The ΔG (Gibbs free energy) of binding was calculated using the relationship described in equation (9), in which R is the gas constant (8.314 J $\text{K}^{-1} \text{mol}^{-1}$), T is the temperature in Kelvin ($T = ^{\circ}\text{C} + 273.15$), and K_a is the association constant at equilibrium. The entropy of binding (ΔS) can also be determined by this mathematical formula. The initial estimates for n , K_a , and ΔH parameters were refined by standard Marquardt non-linear regression method provided in the Origin 7 SR4 software.

$$(9) \quad \Delta G = -RT \ln K_a = \Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ}$$

RESULTS AND DISCUSSION

Gene amplification, cloning and protein expression

The *purB* coding sequence (Rv0777) was amplified from genomic DNA of *M. tuberculosis* H37Rv in the presence of DMSO 10% (data not shown). The amplicon obtained (1419 bp) was blunt-end cloned into the pCR-Blunt cloning vector, and subsequently subcloned into the pET-23a(+) expression vector. Automated DNA sequencing confirmed the identity and the absence of mutations in the cloned fragment.

The *MtASL* protein was expressed in competent *E. coli* BL21 (DE3) pLysS cells, in Terrific Broth (TB) medium after 23h of growing, without IPTG induction. and the soluble fraction of cells was analyzed by SDS-PAGE. This analysis revealed a significant amount of *MtASL* with subunit molecular mass of 51 kDa, in agreement with the predicted MW for *MtASL* (data not shown).

Purification of recombinant *MtASL*

The overexpressed protein was purified in three chromatographic steps: hydrophobic interaction column (Octyl Sepharose) chromatography, in which protein elution occurred at around 450 mM of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, size exclusion column (Superdex-200) chromatography, and a final step using a strong anion-exchange column (Mono Q). *MtASL* eluted approximately at 260 mM of NaCl from the Mono Q column, and SDS-PAGE analysis showed that recombinant protein was homogeneous (Fig. 1). This purification protocol yielded 25 mg of recombinant protein from 2 g of cells, corresponding to a 9 % protein yield (Table 1). The purified recombinant *MtASL* catalyzes the cleavage of S-AMP into fumarate and AMP, as shown using a spectrophotometric assay. However, *MtASL* specific activity was sensitive to both salt concentration and pH variations. Indeed, ionic strength and pH variations are recognized to affect

enzyme conformation, stability and activity [62, 63]. Accordingly, it was firstly reported by Miller et al. [64] that ASL activity from different organisms is affected by the ionic strength of the incubation medium.

Identification and molecular mass determination of *MtASL* by mass spectrometry

From LC-MS/MS peptide mapping experiments, we identified 20 different *MtASL* tryptic peptides in 278 spectra. These peptides covered 52.5% of the *MtASL* sequence. For the monomeric molecular mass determination of purified *MtASL*, spectra of intact protein samples were recorded using an Orbitrap analyzer. We detected peaks corresponding to charge states spanning from state 33+ to 73+. After data deconvolution, we found an average molecular mass of 50,908 Da, in excellent agreement with the expected mass of *MtASL* with the N-terminal methionine post-translationally removed (predicted average mass of 50,908.83 Da).

Determination of the oligomeric state of *MtASL*

The oligomeric state of the native enzyme was determined by gel filtration chromatography. A single peak was obtained with elution volume corresponding to approximately 209 kDa, according to data fitting to equations (1) and (2). Molecular mass value divided by *MtASL* subunit molecular mass (50.909 kDa) indicated that *MtASL* is a homotetramer in solution ($209.13 \text{ kDa} / 50.909 \text{ kDa} = 4.1$), in agreement with ASLs previously characterized from human [65, 66], rat [67], *B. subtilis* [43], *Neurospora crassa* [31], *Staphylococcus aureus* [49], *Pyrobaculum aerophilum* [68], *Thermotoga maritima* [69] and all aspartase/fumarase superfamily members [52].

Multiple sequence alignment

The currently available ASL three-dimensional structures deposited in the Protein Data Bank from *E. coli* (PDB ID: 2PTQ, 2PTR, 2PTS and 3GZH) [46, 48], *S. aureus* (PDB ID: 2X75) [49], human (PDB ID: 2VD6 and 2J91) and *T. maritima* (PDB ID: 1C3U and 1C3C) [69], and the data about residues that are essential for substrate binding and catalysis, obtained from mutagenesis studies in ASL from *B. subtilis* [47, 70–73] and *E. coli* [46] helped to pinpoint the key residues involved in *MtASL* substrate binding and catalysis.

We found an overall low identity among the ASL polypeptide sequences aligned (Fig. 2). Notably, the majority of the conserved residues identified by this multiple alignment corresponds either to the conserved region C3 or to the above-mentioned residues found to be important for substrate binding or catalysis in *MtASL* orthologs. Indeed, we found 8 identical matches and one conserved substitution (Ser to Thr in position 170, *EcASL* numbering) from the 9 residues found to interact with fumarate in the resolved structure of the mutant H171N of *E. coli* ASL complexed with AMP and fumarate [46]. Interestingly, four of them (S295, S296, K301, and N303 – *EcASL* numbering) are located within the conserved region C3 (*MtASL* residues 276 – 286), which is part of the SS loop (C3 loop) and is highly conserved among all aligned sequences. The SS loop was proposed to undergo a conformational modification upon substrate binding [46]. Moreover, the K301 residue was also reported to be involved in binding to the succinil portion of the substrate [44, 47, 74].

Concerning phosphate binding, 4 residues from the 5 reported for *EcASL* are identical in the *MtASL*: Ser340, Arg344, Arg15, and Tyr16 (*E. coli* numbering) [46]. Studies made with human, *B. subtilis* and *S. aureus* ASLs also attributed this function to the correspondent arginine residues from those sequences [49, 73].

Regarding the reported residues involved in catalysis, Lee and co-workers [76] proposed that the His76 residue (*MtASL* numbering) have a role in catalysis, either as acid or base catalyst. However, the detailed structural analysis performed on mutants [46] and also in a wild type form [49] of *EcASL* strongly favored the view of His76 displaying a role on fumarate binding or

orientation but not on catalysis. Lee and co-workers [58, 70] have also suggested that the conserved His147 (*MtASL* numbering) is essential for catalysis, which was corroborated by studies performed on the *B. subtilis* ASL ortholog [73]. Although these studies inferred that this residue is the basic catalyst, there is now a convincing body of evidence, from both structural and mutational studies, that His147 is the acid catalyst, which are primed and oriented for catalysis by the Glu290 residue (*MtASL* numbering) [44, 46–48, 77]. However, the identity of the basic catalyst is still elusive. Tsai and co-workers [46] have suggested that Ser295 (*MtASL* Ser277), which is located in the signature sequence that takes part in the SS loop, is in a favorable position to abstract the proton from the C β of the succinyl moiety of the substrate, acting as a catalytic base when the loop is closed. Moreover, mutagenesis and structural studies performed in both human and *B. subtilis* ASLs [82] and in other family members like aspartase [74, 78], argininosuccinate lyase [79] and δ 2-crystallin [77] have argued for a link between this residue and catalysis. In contrast, it was suggested that Lys283 (*MtASL* numbering) is basic catalyst in *SaASL*, a residue that is also located in the SS loop [49].

Steady-state kinetics of *MtASL*

The specific activity of *MtASL* was linearly dependent on varying enzyme concentration from 100 – 400 nM at a constant S-AMP concentration (30 μ M) (data not shown), indicating that true initial velocities are being measured. Substrate saturation curves were hyperbolic (Fig. 3) and thus fitted to the Henry–Michaelis–Menten equation, yielding the following steady-state kinetic parameters: $K_m = 5.6 (\pm 1) \mu$ M, $V_{max} = 0.54 (\pm 0.02) \text{ U mg}^{-1}$. These results permit estimate a value of $0.46 (\pm 0.02) \text{ s}^{-1}$ for the catalytic constant (k_{cat}). The Henri–Michaelis–Menten constant value is similar to those reported for ASLs from yeast [80], *N. crassa* [31], human [66, 81, 82], *B. subtilis* [82, 83], *Leishmania donovani* [84] and rat [67], but somewhat different from the value reported for *P. falciparum* ASL ($K_m = 32 \mu$ M) [43].

Efforts have been made to synthesize SAICAR from AICAR and fumarate [43, 60] due to the unavailability from any commercial source. However, no peak corresponding to SAICAR

could be detected in the HPLC chromatogram (data not shown). It is also noteworthy that no SAICAR production could be detected spectrophotometrically, in contrast to the S-AMP formation from AMP and fumarate, which was clearly measurable.

pH-rate profile

*Mt*ASL activity could be assessed over the entire pH range tested (data not shown). Nevertheless, the S-AMP saturation curves could only be generated on pH values varying from 6.5 to 10.0. Analysis of $\log(k_{\text{cat}})$, and $\log(k_{\text{cat}}/K_m)$ for S-AMP were performed to confirm the acid-basic catalysis. The bell-shaped pH-rate data for $\log(k_{\text{cat}})$ (Fig. 4a), which reflect ionizations of the enzyme-substrate complex [85], were fitted to equation (5), yielding apparent p*K* values of 7.4 (\pm 0.2) and 10.7 (\pm 5.8), with slopes of +1 for the acidic limb and -1 for the basic limb. These results indicate participation of a single ionizable group in each limb, in which one group is deprotonated and other protonated during *Mt*ASL catalysis, respectively.

It has being pointed out that a histidine residue (His147) is the acid catalyst [46, 48]. The apparent p*K* value of 7.4 (\pm 0.2) may indeed correspond to an histidine residue as previously reported for δ 2-cristallin (p*K* = 6.18) [44] and is similar to the p*K* values found in *P. falciparum* ASL (p*K* = 6.5) [43] and *Bacillus* sp. Aspartase (p*K* = 6.2) [38]. The apparent discrepancies on the p*K* values can be due to variations in experimental approaches used in these studies, and the deviation in the p*K* value from the theoretical histidine imidazole group (p*K* = 6.0) probably reflects interactions with other residues in the active site, that may perturb this p*K* value.

The apparent p*K* of 10.7 (\pm 5.8), which is similar to the value found for aspartase pH profile studies (p*K* = 11.3) [38], may correspond to the p*K*_a of Lys283 (theoretical p*K*_a = 10.07) recently suggested to be the base catalyst in *S. aureus* ASL (Lys 268 in *Sa*ASL numbering) [49]. Although we cannot rule out from our data the proposed involvement of Ser277 as the base catalyst, its β -OH group p*K*_a is around 15 [43], which would require a perturbation of p*K*_a by \sim 5 units for the serine oxyanion formation [52].

Interestingly, differently from $\log(k_{\text{cat}})$ plots, pH-rate data for $\log(k_{\text{cat}}/K_m)$ could only be fitted to equation (5) when we limited the analysis to experiments done in pHs 7.5 to 10.0 (Fig. 4b). We obtained the apparent p*K* values of 7.4 (\pm 5.9) and 8.3 (\pm 4.7) when data points from pH range 7.5 - 10.0 were fitted to equation (5). The marked differences found between $\log(k_{\text{cat}})$ and $\log(k_{\text{cat}}/K_m)$ profiles at pH 6.5 and 7.0 were confirmed in three independent experiments, each of them done in triplicate. These differences could be related to changes on the ionization state of residues involved in S-AMP binding, which could affect K_d and, consequently, the K_m for the substrate. Further work will be required to determine the residues responsible for this effect.

Product inhibition

The kinetic mechanism of *MtASL* was investigated by product inhibition studies with both AMP and fumarate and figure 5 illustrates the resulting double-reciprocal plots at different product concentrations. The inhibition pattern of parallel lines indicates that fumarate acted as an uncompetitive inhibitor and the data were thus fitted to equation (8), yielding a K_i value of 85 (\pm 7) μM (Fig. 5a). However, it has been reported that fumarate acted as a noncompetitive inhibitor against S-AMP in *L. donovani* [84] and *P. falciparum* ASLs [43]. This result indicates that this product does not combine with the free form of the enzyme, in agreement with previous observation found for ASL from human [65] and yeast [80]. The inhibition by AMP is competitive in the wide range tested (Fig. 5b), accordingly to previous results in human [65], yeast [80] and *P. falciparum* [43] enzymes, and the data were thus fitted to equation (6), yielding a K_i value of 60.5(\pm 10.4) μM . This profile suggests that AMP is able to bind to the free form of *MtASL*, probably on the S-AMP binding site. As a result, we propose that *MtASL* follow the same Uni-Bi ordered kinetic mechanism as seen for other homologs, in which the fumarate is the first product released.

Isothermal titration calorimetry (ITC)

To ascertain about the proposed *MtASL* kinetic mechanism and to determine the relative affinities of reaction products, isothermal titration calorimetry (ITC) was performed with AMP, AICAR and fumarate. The binding isotherms were integrated and corrected for heat of dilution. The ITC data for binding of ligands to *MtASL* are shown in Fig. 6.

The ITC results showed significant heat changes upon binding of AMP to free *MtASL* enzyme and the overall binding isotherm (Fig. 6a) was best fitted to a model of one set of sites, yielding a favorable ΔH value of $-26.870 (\pm 1.380)$ kcal mol⁻¹ and an unfavorable ΔS value of $-65.3 (\pm 18.3)$ cal mol⁻¹ K⁻¹, which was determined from association constant value at equilibrium as described in equation (9) as well as Gibbs free energy ($\Delta G = -7.4 (\pm 2.1)$ kcal), which indicates a favorable equilibrium binary complex formation. These results are similar to previously reported for human ASL, wherein enthalpy is a predominant driving force of binding [86]. The unfavorable entropy can be due to conformational changes that occur during complex formation, and its magnitude indicates that an “induced fit” occurs through the interaction between enzyme and ligand [87]. This finding may be associated with the intrinsically disordered and flexible SS loop arrangement reported for *S. aureus* and *E. coli* ASL structures that [68, 69] were solved only in the presence of substrates or products [46, 49]. The calculated K_d value of $3.75 (\pm 1.05)$ μ M for AMP binding indicated greater affinity than for human ($K_d = 54$ μ M) [86] and *P. falciparum* ASLs ($K_d = 170$ μ M) regarding the ASL:AMP binary complex formation [43]. It has been reported that ASLs bind one AMP molecule per monomer [43, 86], however the n value of $0.56 (\pm 0.02)$ for the AMP binding refers to the event of two subunits of *MtASL* in the cell associating with each AMP molecule injected. In summary, AMP binding may occur at the interface of the two monomers as seen in the solved *S. aureus* ASL in complex with AMP, in which the binding of this product is shared by three subunits [49]. In contrast, no significant heat changes were obtained for fumarate binding to *MtASL*, suggesting that it cannot bind to free enzyme Fig. 6b.

Binding experiments using ITC combined with the product inhibition studies demonstrated that the reaction catalyzed by *MtASL* follows an uni-bi mechanism, which can be

either steady state [65, 80] or rapid equilibrium [43], with ordered product release, where fumarate is the first product to dissociate from the *MtASL* active site.

The binding isotherms for AICAR (Fig. 6c e d) showed that, though slightly heat changes could be observed, saturation of the *MtASL* binding sites could not be achieved, even at high AICAR concentration (8 mM). This finding differs from the results reported for *P. falciparum* and human ASLs, in which AICAR binds to free enzyme with similar or more affinity than AMP, respectively [43, 86]. On the other hand, this behavior may explain, at least in part, the unsuccessful synthesis of SAICAR from AICAR and fumarate, as well as the impossibility of monitoring the reverse reaction as described above.

ASLs have been proposed as interesting drug targets due to their roles in central metabolism [39, 43, 49–51, 84, 88], since they control the cellular metabolism through at least two ways, by fumarate and free AMP levels [32, 33]. Additionally, ASL may be involved in the coordination of purine and protein biosynthesis [89].

Based on functional annotation by homology, the *purB* gene (Rv0777) was proposed to encode the adenylosuccinate lyase of *M. tuberculosis* H37Rv [21]. However, there is no single study focused on the biochemical characterization of this gene product available in the literature. In order to fulfill this gap in our knowledge about this important metabolic activity in *M. tuberculosis*, we describe the *purB* gene amplification, cloning, heterologous protein expression, purification, and both structural and kinetic characterization of a non-tagged recombinant form of *MtASL*. The molecular mass of the native form of the enzyme in solution could be determined by size exclusion chromatography, evidencing that *MtASL* is a tetramer in solution. LC-MS/MS peptide mapping experiments confirmed the identity of the homogeneous recombinant protein. The determination of the *MtASL* molecular mass with high accuracy demonstrated that this recombinant form had its N-terminal methionine post-translationally removed and that no other changes occurred on the protein during expression and purification.

Steady-state kinetics confirmed that *MtASL* enzyme indeed catalyses the cleavage of S-AMP into AMP and fumarate, the final step of AMP biosynthesis, and also a possible step in the salvage pathway. These experiments also showed that *MtASL* follows hyperbolic kinetics and ITC experiments permit us to propose the *MtASL* kinetic mechanism. Analysis of ITC data

suggested that *Mt*ASL differ from others homologous enzymes regarding the SAICAR cleavage, since the affinity for AICAR is noticeable weaker than for AMP. The pH profile experiments combined to sequence comparisons of *Mt*ASL with ASL orthologs structurally and biochemically characterized led us to identify specific residues potentially involved in *Mt*ASL substrate binding and catalysis. Notwithstanding, further work will be required to confirm any role in catalysis and substrate binding proposed here.

Acknowledgments

This work was supported by funds of Decit/SCTIE/MS-MCTCNPq-FNDCT-CAPES to National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (INCT-TB) to D.S.S. and L.A.B. L.A.B. and D.S.S. also acknowledge financial support awarded by FAPERGS-CNPq-PRONEX-2009. D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06) and L.A.B. (CNPq, 520182/99-5) and are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). T.M.A.F., D.C.R., R.G.D., and D.M.L. acknowledge scholarships awarded by CNPq.

REFERENCES

- [1] World Health Organization, Global tuberculosis report 2012, WHO Press, Geneva, 2012.
- [2] J.E. Gomez, J.D. Mckinney, M. tuberculosis persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis*. 84 (2004) 29–44.
- [3] Centers for Disease Control and Prevention, Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with Extensive Resistance to Second-Line Drugs. Worldwide, 2000-2004. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 55 (2006) 301–305.

- [4] A.A. Velayati, M.R. Masjedi, P. Farnia, P. Tabarsi, J. Ghanavi, A.H. Ziazarifi, S.E. Hoffner, Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. *Chest*. 136 (2009) 420–425.
- [5] R. Giffin, S. Robinson. *Addressing the Threat of Drug-Resistant Tuberculosis: A Realistic Assessment of the Challenge: Workshop Summary*, National Academies Press, Washington, 2009.
- [6] A. Coates, Y. Hu, R. Bax, C. Page, The Future Challenges Facing The Development Of New Antimicrobial Drugs, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 1 (2002) 895–910.
- [7] W.B. Parker, M.C. Long, Purine metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* as a target for drug development. *Curr. Pharm. Des.* 13 (2007) 599–608.
- [8] C. Sala, R.C. Hartkoorn, Tuberculosis drugs: new candidates and how to find more Future *Microbiol.* 6 (2011) 617–633.
- [9] J.G. Robertson, Mechanistic Basis of Enzyme-Targeted Drugs, *Biochemistry.* 44 (2005) 5561–5571.
- [10] M.L. Read, M. Braendvang, P.O. Miranda, L.L. Gundersen, Synthesis and biological evaluation of pyrimidine analogs of antimycobacterial purines, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 3885–3897.
- [11] L. Hedstrom, G. Liechti, J.B. Goldberg, D.R. Gollapalli, The antibiotic potential of prokaryotic IMP dehydrogenase inhibitors, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 1909–1918.
- [12] V. Usha, S.S. Gurcha, A.L. Lovering, A.J. Lloyd, A. Papaemmanouil, R.C. Reynolds, G.S. Besra, Identification of novel diphenyl urea inhibitors of Mt-GuaB2 active against *Mycobacterium tuberculosis*, *Microbiol.* 157 (2011) 290–299.

- [13] V. Usha, J.V. Hobrath, S.S. Gurcha, R.C. Reynolds, G.S. Besra, Identification of Novel Mt-Guab2 Inhibitor Series Active against *M. tuberculosis*. *PLoS One*. 7 (2012) e33886.
- [14] M.H. el Kouni, Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites, *Pharmacol. Ther.* 99 (2003) 283–309.
- [15] V.G. Malathi, T. Ramakrishnan, Biosynthesis of nucleic acid purines in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Biochemistry. J.* 98 (1966) 594–597.
- [16] R.G. Ducati, A. Breda, L.A. Basso, D.S. Santos, Purine Salvage Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 1258–1875.
- [17] T.J. Kappock, S.E. Ealick, J. Stubbe, Modular evolution of the purine biosynthetic pathway, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4 (2000) 567–572.
- [18] C. Smith, A.D. Marks, M. Lieberman, *Mark's Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*, 2nd ed., Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- [19] G. Biazus, C.Z. Schneider, M.S. Palma, L.A. Basso, D.S. Santos, Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning, expression, and biochemical characterization. *Protein. Expr. Purif.* 66 (2009) 185–190.
- [20] P.R. Wheeler, Enzymes for purine synthesis and scavenging in pathogenic mycobacteria and their distribution in *Mycobacterium leprae*, *J. Gen. Microbiol.* 133 (1987) 3013–3018.
- [21] S.T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J.E.

Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, B.G. Barrell, Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393 (1998) 537–544.

[22] C.M. Sassetti, D.H. Boyd, E.J. Rubin, Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 77–84.

[23] J. Le Nours, E.M.M. Bulloch, Z. Zhang, D.R. Greenwood, M.J. Middleditch, J.M.J. Dickson, E.N. Baker, Structural analyses of a purine biosynthetic enzyme from *Mycobacterium tuberculosis* reveal a novel bound nucleotide. *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 40706–40716.

[24] Z. Zhang, T.T. Caradoc-Davies, J.M. Dickson, E.N. Baker, C.J. Squire, Structures of glycinamide ribonucleotide transformylase (PurN) from *Mycobacterium tuberculosis* reveal a novel dimer with relevance to drug discovery, *J. Mol. Biol.* 389 (2009) 722–33.

[25] H. Munier-Lehmann, S. Burlacu-Miron, C.T. Craescu, H.H. Mantsch, C.P. Schultz, A new subfamily of short bacterial adenylate kinases with the *Mycobacterium tuberculosis* enzyme as a model: A predictive and experimental study. *Proteins*. 36 (1999) 238–248.

[26] L.A. Basso, D.S. Santos, W. Shi, R.H. Furneaux, P.C. Tyler, V.L. Schramm, J.S. Blanchard, Purine nucleoside phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*. Analysis of inhibition by a transition-state analogue and dissection by parts. *Biochemistry*. 40 (2001) 8196–8203.

[27] W. Shi, L.A. Basso, D.S. Santos, P.C. Tyler, R.H. Furneaux, J.S. Blanchard, S.C. Almo, V.L. Schramm, Structures of purine nucleoside phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis* in complexes with immucillin-H and its pieces, *Biochemistry*. 40 (2001) 8204–8215.

[28] M.C. Long, V. Escuyer, W.B. Parker, Identification and characterization of a unique adenosine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Bacteriol.* 185 (2003) 6548–6555.

- [29] G. Hible, P. Christova, L. Renault, E. Seclaman, A. Thompson, E. Girard, H. Munier-Lehmann, J. Cherfils, Unique GMP-binding site in *Mycobacterium tuberculosis* guanosine monophosphate kinase. *Proteins*. 62 (2006) 489–500.
- [30] T.M. Franco, D.C. Rostirolla, R.G. Ducati, D.M. Lorenzini, L.A. Basso, D.S. Santos, Biochemical characterization of recombinant *guaA*-encoded guanosine monophosphate synthetase (EC 6.3.5.2) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain. *Arch. Biochem. Biophys.* 517 (2012) 1–11.
- [31] D.O. Woodward, H.D. Braymer, Purification and properties of *Neurospora* adenylosuccinase, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 580–587.
- [32] G. Van Den Berghe, F. Bontemps, M. F. Vincent, F. Van Den Bergh The Purine Nucleotide Cycle And Its Molecular Defects, *Prog. Neurobiol.* 3 (1992) 547–561.
- [33] J.J. Aragon, J.M. Lowenstein, The Purine-Nucleotide Cycle Comparison of the Levels of Citric Acid Cycle Intermediates with the Operation of the purine Nucleotide Cycle in Rat Skeletal Muscle during Exercise and Recovery from Exercise. *Eur. J. Biochem.* 110 (1980) 371–377.
- [34] G. Ivanovics, E. Marjai, A. Dobozy, The growth of purine mutants of *Bacillus anthracis* in the body of the mouse. *J. Gen. Microbiol.* 53 (1968) 147–162.
- [35] W.C. Mcfarland, B.A. Stocker, Effect of different purine auxotrophic mutations on mouse-virulence of a Vi-positive strain of *Salmonella dublin* and of two strains of *Salmonella typhimurium*, *Microb. Pathog.* 3 (1987) 129–141.
- [36] K. Watanabe, S. Tomioka, K. Tanimura, H. Oku, K. Isoi, Uptake of AMP, ADP, and ATP in *Escherichia coli* W, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75 (2011) 7–12.

- [37] S. Paik, L. Senty, S. Das, J.C. Noe, C.L. Munro, T. Kitten, Identification of virulence determinants for endocarditis in *Streptococcus sanguinis* by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* 73 (2005) 6064–6074.
- [38] V. Puthan Veetil, H. Raj, W.J. Quax, D.B. Janssen, G.J. Poelarends, Site-directed mutagenesis, kinetic and inhibition studies of aspartate ammonia lyase from *Bacillus* sp. YM55-1. *FEBS J.* 276 (2009) 2994–3007.
- [39] D.J. Porter, N.G. Rudie, H.J. Bright, Nitro analogs of substrates for adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase, *Arch. Biochem. Biophys.* 225 (1983) 157–163.
- [40] D.J. Porter, H.J. Bright, 3-Carbanionic substrate analogues bind very tightly to fumarase and aspartase, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 4772–4780.
- [41] I.I. Nuiry, J.D. Hermes, P.M. Weiss, C.Y. Chen, P.F. Cook, Kinetic mechanism and location of rate-determining steps for aspartase from *Hafnia alvei*, *Biochemistry.* 23 (1984) 5168–5175.
- [42] F.M. Raushel, Nitro analogs of substrates for argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase, *Arch. Biochem. Biophys.* 232 (1984) 520–525.
- [43] V. Bulusu, B. Srinivasan, M.P. Bopanna, H. Balaram, Elucidation of the substrate specificity, kinetic and catalytic mechanism of adenylosuccinate lyase from *Plasmodium falciparum*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1794 (2009) 642–654.
- [44] C.Y. Wu, H.J. Lee, S.H. Wu, S.T. Chen, S.H. Chiou, G.G. Chang, Chemical mechanism of the endogenous argininosuccinate lyase activity of duck lens delta2-crystallin, *Biochem. J.* 333 (1998) 327–334.
- [45] J.S. Blanchard, W.W. Cleland, Use of isotope effects to deduce the chemical mechanism of fumarase, *Biochemistry.* 19 (1980) 4506–4513.

- [46] M. Tsai, J. Koo, P. Yip, R.F. Colman, M.L. Segall, P.L. Howell, Substrate and product complexes of *Escherichia coli* adenylosuccinate lyase provide new insights into the enzymatic mechanism, *J. Mol. Biol.* 370 (2007) 541–554.
- [47] J.L. Brosius, R.F. Colman, Three subunits contribute amino acids to the active site of tetrameric adenylosuccinate lyase: Lys268 and Glu275 are required, *Biochemistry.* 41 (2002) 2217–2226.
- [48] G. Kozlov, L. Nguyen, J. Pearsall, K. Gehring. The structure of phosphate-bound *Escherichia coli* adenylosuccinate lyase identifies His171 as a catalytic acid, *Acta. Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 65 (2009) 857–861.
- [49] P.K. Fyfe, A. Dawson, M.T. Hutchison, S. Cameron, W.N. Hunter, Structure of *Staphylococcus aureus* adenylosuccinate lyase (PurB) and assessment of its potential as a target for structure-based inhibitor discovery, *Acta. Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66 (2010) 881–888.
- [50] B.W. Foulk, G. Pappas, Y. Hirai, H. Hirai, D.L. Williams, Adenylosuccinate lyase of *Schistosoma mansoni*: gene structure, mRNA expression, and analysis of the predicted peptide structure of a potential chemotherapeutic target, *Int. J. Parasitol.* 32 (2002) 1487–1495.
- [51] T. Spector, R.L. Berens, J.J. Marr, Adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase from *Trypanosoma cruzi*, Specificity studies with potential chemotherapeutic agents, *Biochem. Pharmacol.* 31 (1982) 225–229.
- [52] V. Puthan Veetil, G. Fibriansah, H. Raj, A.W.H. Thunnissen, G.J. Poelarends, Aspartase/Fumarase Superfamily: A Common Catalytic Strategy Involving General Base-Catalyzed Formation of a Highly Stabilized aci-Carboxylate Intermediate, *Biochemistry.* 15 (2012) 15–22.

- [53] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*. 227 (1970) 680–685.
- [54] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [55] A.A. Klammer, M.J. MacCoss, Effects of modified digestion schemes on the identification of proteins from complex mixtures, *J. Proteom. Res.* 5 (2006) 695–700.
- [56] Z. Zhang, A.G. Marshall, A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9 (1998) 225–233.
- [57] M.A. Larkin, G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins, Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics*. 23 (2007) 2947–2948.
- [58] T.T. Lee, C. Worby, J.E. Dixon, R.F. Colman, Identification of His 141 in the active site of *Bacillus subtilis* adenylosuccinate lyase by affinity labeling with 6-(4-bromo-2,3-dioxobutyl) thioadenosine 5'-monophosphate, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 458–465.
- [59] I. Segel, *Enzyme Kinetics, Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, John Wiley and Sons, New York, 1975.
- [60] M. Zikánová, J. Krijt, H. Hartmannová, S. Kmoch, Preparation of 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide ribotide, 5-amino-4-imidazole-N-succinocarboxamide riboside and succinyladenosine, compounds usable in diagnosis and research of adenylosuccinate lyase deficiency, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28 (2005) 493–499.

- [61] P.F. Cook, W.W. Cleland, *Enzyme Kinetics and Mechanisms*. Garland Science, New York, 2007.
- [62] M.C Pinna, A. Salis, M. Monduzzi, B.W. Ninham, Hofmeister series: the hydrolytic activity of *Aspergillus niger* lipase depends on specific anion effects, *J. Phys. Chem. B*. 109 (2005) 5406–5408.
- [63] Y. Zhang, P.S. Cremer, Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 (2006) 658–663.
- [64] R.W. Miller, L.N. Lukens, J.M. Buchanan, Biosynthesis of the purines. XXV. The enzymatic cleavage of N-(5-amino-1-ribosyl-4-imidazolylcarbonyl)-L-aspartic acid 5'-phosphate, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 1806–1811.
- [65] R.L. Stone, H. Zalkin, J.E. Dixon, Expression, purification, and kinetic characterization of recombinant human adenylosuccinate lyase, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 19710–19716.
- [66] P. Lee, R.F. Colman, Expression, purification, and characterization of stable, recombinant human adenylosuccinate lyase, *Protein. Expr. Purif.* 51 (2007) 227–234.
- [67] P.J. Casey, J.M. Lowenstein, Purification of adenylosuccinate lyase from rat skeletal muscle by a novel affinity column. Stabilization of the enzyme, and effects of anions and fluoro analogues of the substrate, *Biochem. J.* 246 (1987) 263–269.
- [68] E.A. Toth, C. Worby, J.E. Dixon, E.R. Goedken, S. Marqusee, T.O. Yeates, The crystal structure of adenylosuccinate lyase from *Pyrobaculum aerophilum* reveals an intracellular protein with three disulfide bonds, *J. Mol. Biol.* 301 (2000) 433–450.
- [69] E.A. Toth, T.O. Yeates, The structure of adenylosuccinate lyase, an enzyme with dual activity in the de novo purine biosynthetic pathway, *Structure*. 8 (2000) 163–174.

- [70] T.T. Lee, C. Worby, Z.Q. Bao, J.E. Dixon, R.F. Colman, His68 and His141 are critical contributors to the intersubunit catalytic site of adenylosuccinate lyase of *Bacillus subtilis*, *Biochemistry*. 38 (1999) 22–32.
- [71] J.L. Brosius, R.F. Colman, A key role in catalysis for His89 of adenylosuccinate lyase of *Bacillus subtilis*, *Biochemistry*. 39 (2000) 13336–13343.
- [72] S. Sivendran, M.L. Segall, P.C. Rancy, R.F. Colman, Effect of Asp69 and Arg310 on the pK of His68, a key catalytic residue of adenylosuccinate lyase, *Protein. Sci.* 16 (2007) 1700–1707.
- [73] M.L. Segall, R.F. Colman, Gln212, Asn270, and Arg301 are critical for catalysis by adenylosuccinate lyase from *Bacillus subtilis*, *Biochemistry*. 43 (2004) 7391–7402.
- [74] G. Fibriansah, V.P. Veetil, G.J. Poelarends, A.M. Thunnissen, Structural basis for the catalytic mechanism of aspartate ammonia lyase, *Biochemistry*. 50 (2011) 6053–6062.
- [75] M.L. Segall, M.A. Cashman, R.F. Colman, Important roles of hydroxylic amino acid residues in the function of *Bacillus subtilis* adenylosuccinate lyase, *Protein Sci.* 16 (2007) 441–448.
- [76] T.T. Lee, C. Worby, Z.Q. Bao, J.E. Dixon, R.F. Colman, Implication of His68 in the substrate site of *Bacillus subtilis* adenylosuccinate lyase by mutagenesis and affinity labeling with 2-[(4-bromo-2,3-dioxobutyl)thio]adenosine 5'-monophosphate, *Biochemistry*. 37 (1998) 8481–8489.
- [77] L.M. Sampaleanu, B. Yu, P.L. Howell, Mutational analysis of duck delta 2 crystallin and the structure of an inactive mutant with bound substrate provide insight into the enzymatic mechanism of argininosuccinate lyase, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 4166–4175.

- [78] T. Fujii, H. Sakai, Y. Kawata, Y. Hata, Crystal structure of thermostable aspartase from *Bacillus* sp. YM55-1: structure-based exploration of functional sites in the aspartase family, *J. Mol. Biol.* 328 (2003) 635–654.
- [79] P. Bhaumik, M.K. Koski, U. Bergmann, R.K. Wierenga, Structure determination and refinement at 2.44 Å resolution of argininosuccinate lyase from *Escherichia coli*, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60 (2004) 1964–1970.
- [80] W.A. Bridger, L.H. Cohen, The kinetics of adenylosuccinate lyase, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 644–650.
- [81] S. Kmoch, H. Hartmannová, B. Stibůrková, J. Krijt, M. Zikánová, I. Sebesta, Human adenylosuccinate lyase (ADSL), cloning and characterization of full-length cDNA and its isoform, gene structure and molecular basis for ADSL deficiency in six patients, *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 1501–1513.
- [82] S. Sivendran, R.F. Colman, Effect of a new non-cleavable substrate analog on wild-type and serine mutants in the signature sequence of adenylosuccinate lyase of *Bacillus subtilis* and *Homo sapiens*, *Protein Sci.* 17 (2008) 1162–1174.
- [83] J.B. Palenchar, J.M. Crocco, R.F. Colman, The characterization of mutant *Bacillus subtilis* adenylosuccinate lyases corresponding to severe human adenylosuccinate lyase deficiencies, *Protein. Sci.* 12 (2003) 1694–1705.
- [84] T. Spector, T.E. Jones, G.B. Elion, Specificity of adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase from *Leishmania donovani*. Selective amination of an antiprotozoal agent, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 8422–8426.
- [85] D. Sigman, *The enzymes*. 3rd ed. Academic Press, San Diego, 1992.

- [86] S.P. Ray, M.K. Deaton, G.C. Capodagli, L.A. Calkins, L. Sawle, K. Ghosh, D. Patterson, S.D. Pegan, Structural and biochemical characterization of human adenylosuccinate lyase (ADSL) and the R303C ADSL deficiency-associated mutation, *Biochemistry*. 51 (2012) 6701–6713.
- [87] R. O'Brien, I. Haq, *Applications of Biocalorimetry: Binding, Stability and Enzyme Kinetics*, *Biocalorimetry 2 Applications of calorimetry in the biological sciences*, J.E Ladbury, M.L Doyle (Eds.), John Wiley & Sons, Hoboken, 2004, pp. 3–34.
- [88] A. Hampton, Studies of the action of adenylosuccinase with 6-thio analogues of adenylosuccinic acid, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 529–535.
- [89] N. Gendron, R. Breton, N. Champagne, J. Lapointe, Adenylosuccinate lyase of *Bacillus subtilis* regulates the activity of the glutamyl-tRNA synthetase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 89 (1992) 5389–5392.

Figure captions

Table 1

Purification of *MtASL* from *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Typical purification protocol from 2 g wet cell paste.

Fig. 1. Purification steps of recombinant *MtASL*. M: Protein Molecular Weight Marker (Fermentas); 1: crude extract loaded on Octyl Sepharose FF column; 2: eluted pool of Octyl Sepharose FF; 3: sample loaded in Superdex-200 HR; 4: eluted pool of Superdex-200 HR; 5: recombinant homogeneous *MtASL*.

Fig. 2. Amino acid sequence alignment from *M. tuberculosis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, Human and *T. maritima* ASLs by CLUSTALW. (*), (:), and (.) indicate, respectively, identity, strong similarity and weak similarity among the residues. The residues of the conserved region C3, that takes part in the active site loop SS, were shaded in gray; amino acid residues involved in phosphate binding were shaded in red and the amino acid residues involved in fumarate binding were shaded in yellow. The supposedly involved in catalysis are indicated by an arrow.

Fig. 3. Steady-state kinetic parameters. Specific activity (U mg^{-1}) versus [S-AMP] (μM). The *MtASL* final concentration was 280 nM.

Fig. 4. pH-rate profiles for *MtASL* catalyzed reaction. (a) pH dependence of $\log k_{\text{cat}}$; (b) pH dependence of $\log k_{\text{cat}}/K_m$. Experimental data were fitted to equation (5) which describes a double ionization process. Each line is a theoretical line based on curve fitting.

Fig. 5. Double-reciprocal plots for *MtASL* product inhibition. (a) Specific activity⁻¹ (mg U⁻¹) versus [S-AMP]⁻¹ (μM⁻¹) at fixed concentrations of fumarate (0, 25, 50, 100 and 150 μM); (b) Specific activity⁻¹ (mg U⁻¹) versus [S-AMP]⁻¹ (μM⁻¹) at fixed concentrations of AMP (0, 50, 100, 150 and 200 μM.). Data were analyzed using equations (6) and (8) and the final *MtASL* concentration was 280 nM.

Fig. 6. Isothermal titration calorimetric curves of binding of ligands to *MtASL* (100 μM). (a) Titration of AMP at a final concentration of 198.5 μM. (b) Titration of fumarate at a final concentration of 198.5 μM (c and d) Titration of AICAR at a final concentration of 198.5 μM and of 1.59 mM.

Figures**Table 1.**

Purification step	Total protein (mg)	Total enzyme activity (U)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	258	340,56	1,32	1	100
Octyl Sepharose	101	280,78	2,78	2,1	82
Superdex-200	50	7,00	0,14	0,1	2
Homogenous <i>MtASL</i>	25	31,00	1,24	0,9	9

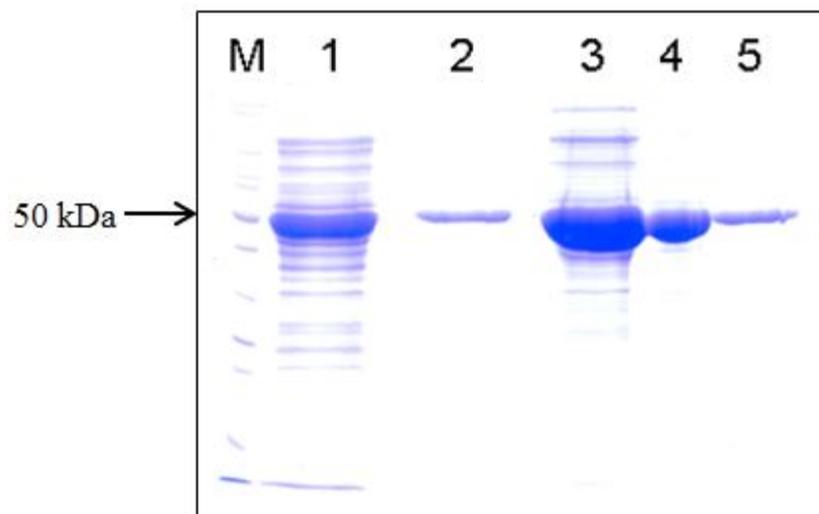
Fig. 1.

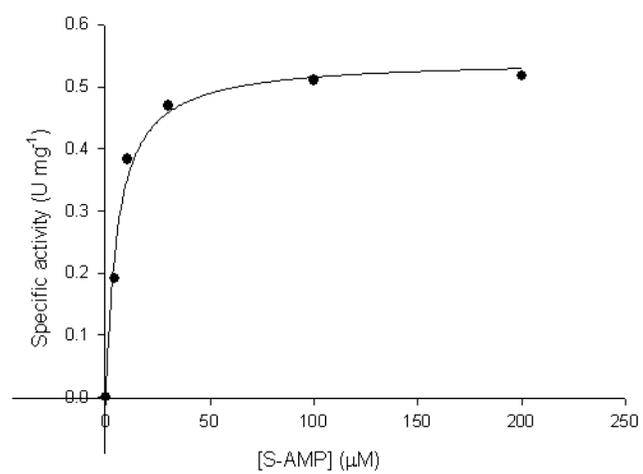
Fig. 3.

Fig. 4.

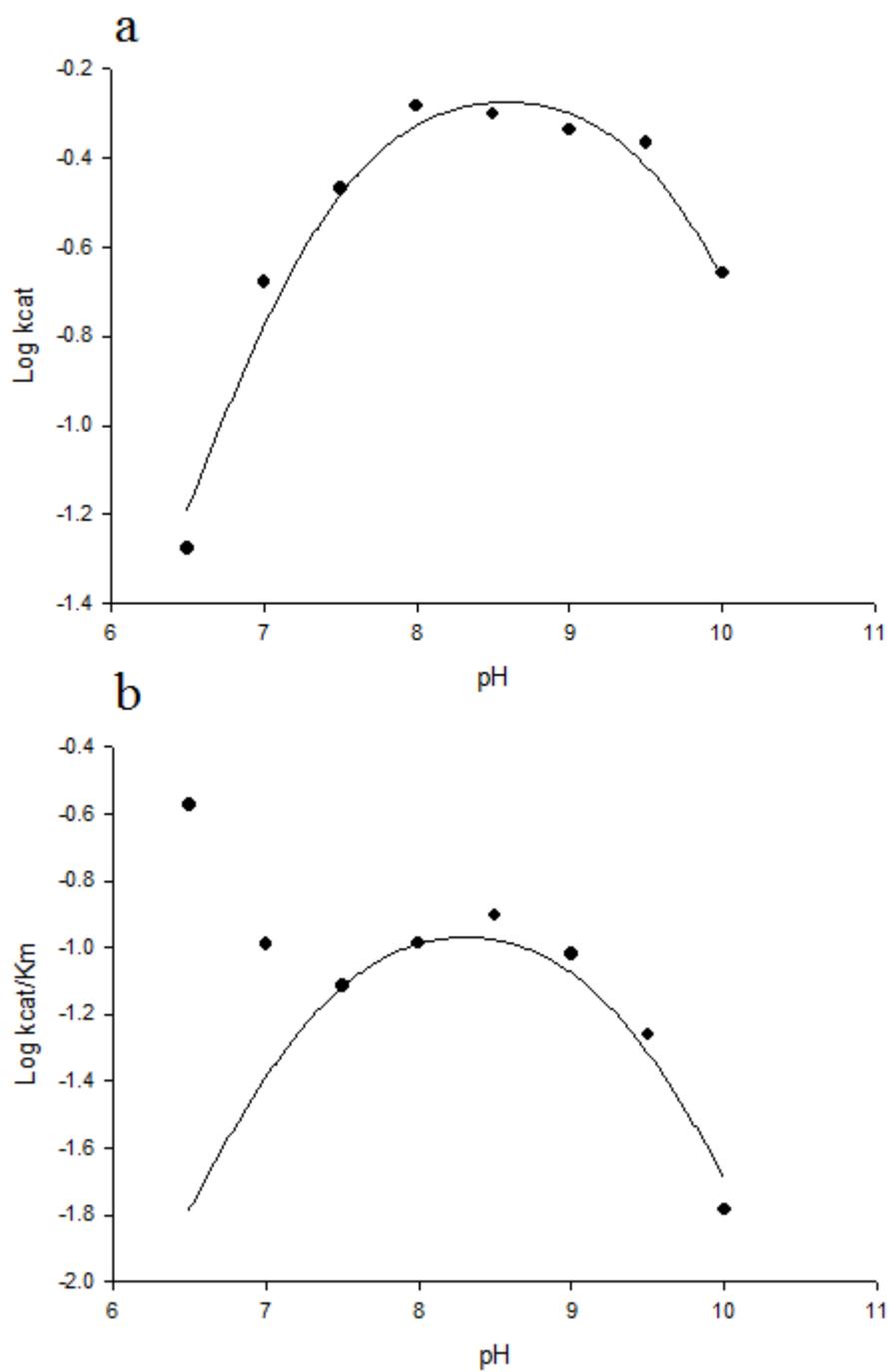


Fig. 5.

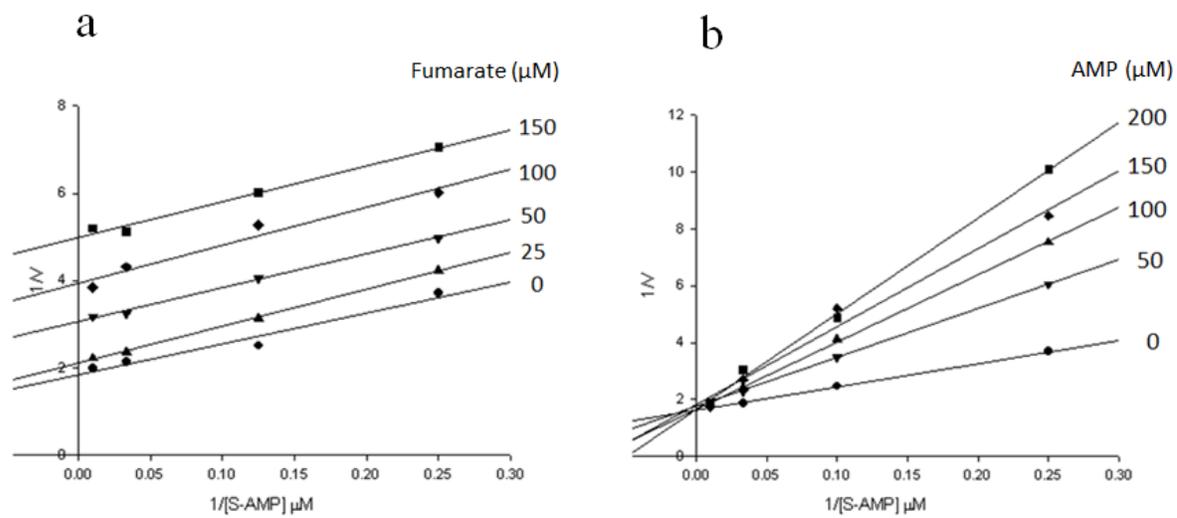
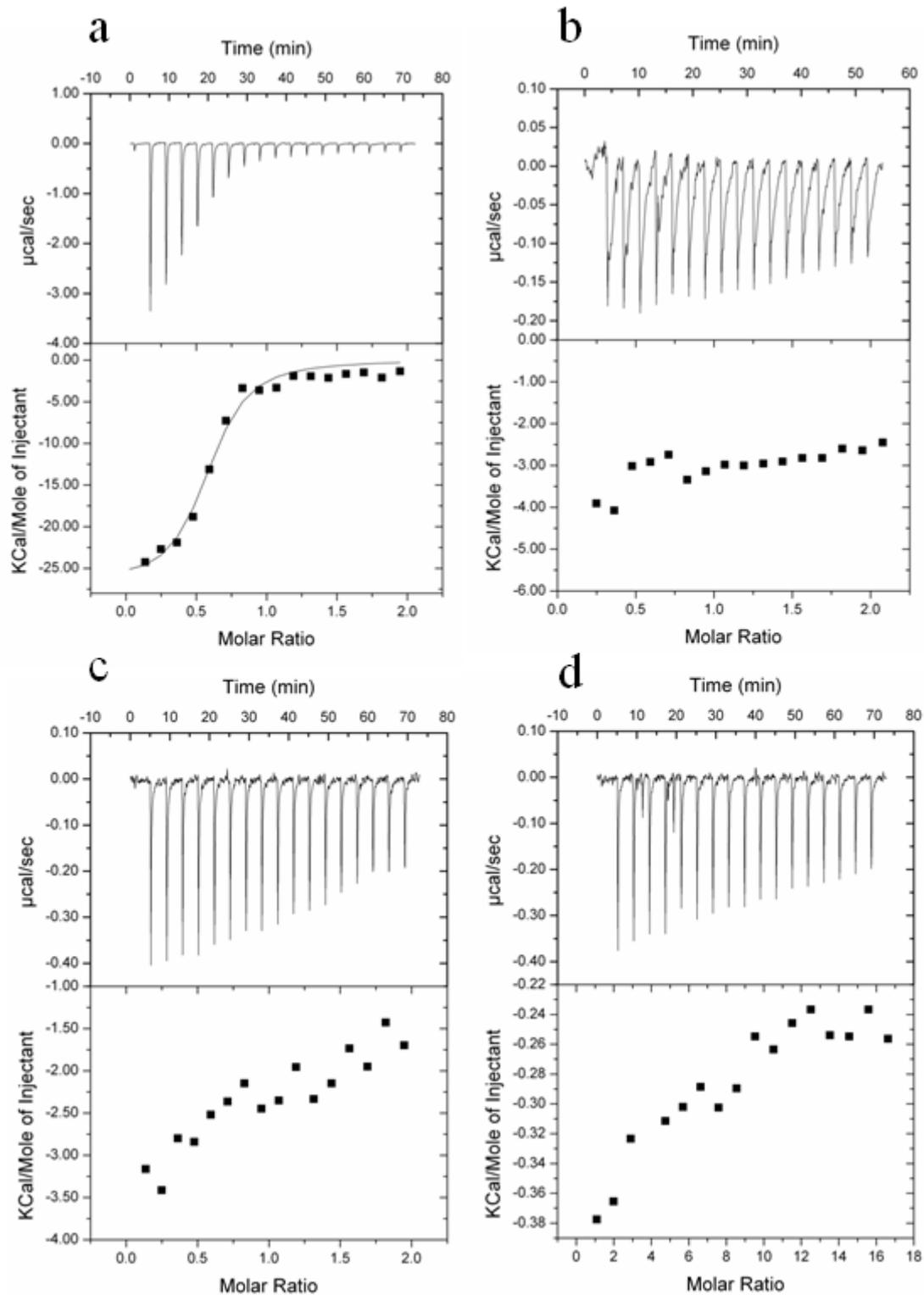


Fig. 6.



ANEXO B. Submissão do manuscrito

From: ABB <abb@elsevier.com>
 Date: Wed, Jan 30, 2013 at 9:45 PM
 Subject: Submission Confirmation
 To: cristiano.bizarro@puccs.br, cvbizarro@gmail.com

Dear Prof. Bizarro,

Your submission entitled "Biochemical characterization of recombinant purB-encoded adenylosuccinate lyase (EC 4.3.2.2) from Mycobacterium tuberculosis H37Rv." has been received for consideration in Archives of Biochemistry and Biophysics.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/yabbi/>.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

This manuscript will be processed with the understanding that it:

- is original
- has been written by the stated authors
- has not been published elsewhere
- is not currently being considered for publication by any other journal
- will not be submitted for such review while under review by this journal

For further details, please refer to the Guide for Authors printed in each issue of the journal and available on the journal home page: <http://www.elsevier.com/locate/yabbi>

If your paper does not meet the above guidelines, please contact us immediately.

Thank you for submitting your manuscript to Archives of Biochemistry and Biophysics. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Journal Editorial Office
 E-mail: ABB@elsevier.com

Archives of Biochemistry and Biophysics

[Contact us](#) [Help ?](#)

>> Can't complete consolidation? [Read more...](#)

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Username: cristiano.bizarro@puccs.br
 Role: [Author](#)

Version: EES 2012.2

Submissions Being Processed for Author Cristiano Valim Bizarro, Ph.D.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Biochemical characterization of recombinant purB-encoded adenylosuccinate lyase (EC 4.3.2.2) from Mycobacterium tuberculosis H37Rv.	Jan 30, 2013	Jan 30, 2013	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display results per page.