

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PRISCILA LAMB WINK

A ENZIMA HIDROLASE DE NUCLEOSÍDEOS PURÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis* H37RV: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, TERMODINÂMICA E ESTUDOS DE NOCAUTE GÊNICO

Porto Alegre
2013

PRISCILA LAMB WINK

A ENZIMA HIDROLASE DE NUCLEOSÍDEOS PURÍNICOS DE *Mycobacterium tuberculosis* H37RV: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, TERMODINÂMICA E ESTUDOS DE NOCAUTE GÊNICO

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

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

Porto Alegre
2013

PRISCILA LAMB WINK

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____ .

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves - UFRGS

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado - PUCRS

Prof. Dr. Maurício Reis Bogo - PUCRS

Porto Alegre
2013

Dedico esta tese aos meus pais, Gisele e Ilgo, por todo o amor, carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Professor Diógenes Santiago Santos, pela confiança, pela oportunidade e por todo o apoio ao longo destes anos. Agradeço ao meu co-orientador, Professor Luiz Augusto Basso, pela disponibilidade constante em ajudar, pelos ensinamentos e discussões de resultados que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e colegas do CPBMF e da Quatro G, pelo carinho, amizade, ajuda e apoio durante todos esses anos. Em especial à minha querida amiga Zilpa Adriana Quitian pela ajuda incansável e ao Leonardo Rosado pela ajuda no planejamento dos experimentos e na análise dos resultados.

Muito obrigada aos meus queridos amigos Diana Rostirolla, Valnês da Silva Rodrigues Junior, José Eduardo Sacconi Nunes, Candida Deves, Anne Drumond Villela, Christiano Ev Neves e Daiana Renck, pela amizade e apoio nos momentos mais difíceis, pelos momentos de descontração e pelo companheirismo do começo ao fim, que foram de fundamental importância para a realização deste trabalho.

Ao meu namorado, Robert Snyder, a todos os meus amigos e familiares pelas sinceras demonstrações de apoio e carinho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS.

Ao CNPq, pela bolsa fornecida durante todo o doutorado.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram, não só para a realização deste trabalho, como também para a minha formação pessoal e profissional.

Muito obrigada!

*“Expose yourself to your deepest fear;
after that, fear has no power, and the fear of
freedom shrinks and vanishes. You are free.”*

Jim Morrison

RESUMO

A tuberculose humana (TB) é considerada uma ameaça à saúde global. O aumento na prevalência da doença, a emergência de cepas resistentes e a coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana levaram à urgente necessidade do desenvolvimento de novas drogas mais eficientes para o combate do agente causativo da TB, *Mycobacterium tuberculosis*. Além disso, há a necessidade de novas drogas contra a micobactéria nos seus diferentes estados fisiológicos, incluindo a TB latente. Um maior entendimento sobre as vias metabólicas de nucleotídeos do bacilo da TB, em particular as vias de salvamento de purinas e pirimidinas, levariam ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para controlar a incidência global de TB. A hidrolase de nucleosídeos catalisa a hidrólise irreversível da ligação *N*-glicosídica de ribonucleosídeos, dando origem à α -D-ribose e sua base livre correspondente. Este trabalho descreve a amplificação e clonagem do gene *iunH*, e a expressão e purificação da enzima recombinante hidrolase de nucleosídeos purínicos de *M. tuberculosis* (*MtlAGU-NH*). Os resultados de cinética no estado estacionário mostram que a *MtlAGU-NH* possui uma ampla especificidade pelos substratos, utilizando inosina, adenosina, guanosina e uridina como substratos. As medidas cinéticas da ligação da ribose à *MtlAGU-NH* por espectroscopia fluorimétrica sugerem a existência de duas formas da enzima em equilíbrio, relacionadas à associação ao ligante. As concentrações intracelulares de inosina, uridina, hipoxantina e uracil foram determinadas e os parâmetros termodinâmicos, estimados. Os parâmetros termodinâmicos de ativação (E_a , ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger) para a reação química catalisada pela *MtlAGU-NH*, além dos resultados de espectrometria de massa, calorimetria de titulação isotérmica, experimento de perfil de pH, alinhamento de múltiplas sequências e experimentos de docagem molecular também são apresentados neste trabalho. O nocaute do gene *iunH* mostrou que este não é essencial para o crescimento do bacilo *M. tuberculosis* H37Rv nas condições experimentais empregadas. Os resultados aqui descritos deverão ser úteis para um melhor entendimento sobre a enzima *MtlAGU-NH*, fornecendo bases sólidas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas para diminuir a incidência global da TB.

ABSTRACT

Human tuberculosis (TB) is a major global health threat. The disease's increasing prevalence, coupled with the emergence of drug-resistant strains and the devastating effects of co-infection with human immunodeficiency virus (HIV) indicate an urgent need for the development of new and more efficient drugs to combat the disease's causative agent, *Mycobacterium tuberculosis*. Global health authorities have also begun to recognize the need for drugs that can kill the mycobacteria in its different physiological states including but not limited to latent TB infection. A more comprehensive understanding of the bacilli's nucleotide metabolic pathways, in particular purine and pyrimidine salvage pathways, could aid in the development of new therapeutic strategies to reduce the incidence of TB worldwide. Nucleoside hydrolase catalyzes the irreversible hydrolysis of *N*-glycosidic bond of ribonucleosides, forming α -D-ribose and the corresponding base. This work describes the amplification, cloning, expression and purification of the *iunH*-encoding purine nucleoside hydrolase from *M. tuberculosis* (*MtIAGU-NH*). Results from steady-state kinetic experiments indicate that *MtIAGU-NH* has broad substrate specificity, accepting inosine, adenosine, guanosine, and uridine as substrates. Kinetics analysis utilizing fluorescence spectroscopy of ribose binding to *MtIAGU-NH* suggests that prior to ligand association there are two pre-existing forms of the enzyme. We determined the intracellular concentrations of inosine, uridine, hypoxanthine, and uracil as well as the reaction's thermodynamic parameters. Thermodynamic activation parameters (E_a , ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger) for the *MtIAGU-NH*-catalyzed chemical reaction, along with results from mass spectrometry, isothermal titration calorimetry (ITC), pH-rate profile experiments, multiple sequence alignment, and molecular docking experiments are also presented. Knockout experiments of the *iunH* gene indicate that this gene is not essential for the growth of *M. tuberculosis* H37Rv underutilized experimental conditions. The data presented here contribute to our understanding of *MtIAGU-NH*, providing a solid basis for the development of efficient prophylactic and therapeutic strategies to reduce the global incidence of TB.

LISTA DE SIGLAS

ADC: complexo contendo albumina, dextrose e catalase

ADOK: adenosina quinase

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

AMP: adenosina 5'-fosfato

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

APRT: adenina fosforribosil transferase

ATP: adenosina trifosfato

BCG: Bacille-Calmette-Guérin

C: citosina

CDA: citidina deaminase

CDP: citidina 5'-difosfato

CMP: citidina 5'-monofosfato

DCO: *crossover* duplo

dCTP: 2'-desoxicitidina 5'-trifosfato

DNA: ácido desoxirribonucléico

DOTS: tratamento de curto prazo diretamente observado

dTDP: 2'-desoxitimidina 5'-difosfato

dTMP: 2'-desoxitimidina 5'-monofosfato

dTTP: 2'-desoxitimidina 5'-trifosfato

dUMP: 2'-desoxiuridina 5'-monofosfato

dUTP: 2'-desoxiuridina 5'-trifosfato

dUTPase: desoxiuridina trifosfatase

ΔG : energia livre da reação

ΔG° : energia livre padrão

$\Delta G^\#$: energia livre de ativação

G: guanina

GMP: guanosina 5'-fosfato

GMPc: guanosina monofosfato cíclico

GTP: guanosina trifosfato

HGPRT: hipoxantina-guanina fosforribosil transferase

HIV: síndrome da imunodeficiência humana

IAG-NH: hidrolase de nucleosídeos com preferência por inosina, adenosina e guanosina

IG-NH: hidrolase de nucleosídeos com preferência por inosina e guanosina

IMP: inosina 5'-monofosfato

IPTG: isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

ITC: calorimetria de titulação isotérmica

***iunH::kan*:** gene *iunH* interrompido pelo cassete contendo o gene que confere resistência à canamicina

IU-NH: hidrolase de nucleosídeos com preferência por inosina e uridina

kan: canamicina

kan^R: resistência à canamicina

LC-MS/MS: cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

MCSs: sítios múltiplos de clonagem

MDR-TB: tuberculose resistente a múltiplas drogas

MtIAGU-NH: Hidrolase de nucleosídeos de *M. tuberculosis* com preferência por inosina, adenosina, guanosina e uridina

NH: hidrolase de nucleosídeos

NDP: nucleosídeo difosfato

OADC: complexo contendo ácido oleico, albumina, dextrose e catalase

OMS: Organização Mundial da Saúde

OriE: origem de replicação para *E. coli*

OriM: origem de replicação para *M. tuberculosis*

PCR: reação em cadeia da polimerase

PNP: fosforilase de nucleosídeos purínicos

PPi: pirofosfato

PRPP: 5-fosforribosil- α -1-pirofosfato

PyNP: pirimidina nucleosídeo fosforilase

sac: sensível à sacarose

SCO: *crossover* simples

TB: tuberculose

TDR-TB: tuberculose totalmente resistente a drogas

UDP: uridina 5'-difosfato

UMP: uridina 5'-monofosfato

UPRT: uracil fosforribosil transferase

XDR-TB: tuberculose extensivamente resistente a drogas

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

SUMÁRIO

Capítulo 1

| | |
|---|----|
| 1 Introdução | 13 |
| 1.1 Tuberculose | 13 |
| 1.1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 14 |
| 1.1.2 Infecção | 17 |
| 1.1.3 Latência | 20 |
| 1.1.4 Tuberculose e HIV | 21 |
| 1.1.5 Tratamento e surgimento de cepas resistentes | 22 |
| 1.1.6 Desenvolvimento de novas drogas e vacinas | 24 |
| 1.2 Biossíntese de Nucleotídeos | 25 |
| 1.2.1 Rotas de salvamento de purinas e pirimidinas | 26 |
| 1.3 Hidrolase de Nucleosídeos Purínicos de <i>M. tuberculosis</i> | 30 |
| 2 Hipótese do Trabalho | 32 |
| 3 Objetivos | 33 |
| 3.1 Objetivos Gerais | 33 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 33 |

Capítulo 2

| | |
|---|----|
| Manuscrito enviado ao periódico <i>Archives of Biochemistry and Biophysics</i> intitulado "Biochemical characterization of recombinant nucleoside hydrolase from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv" | 36 |
|---|----|

Capítulo 3

| | |
|--|----|
| Nocaute gênico da sequência de DNA correspondente ao gene <i>iunH</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv | 77 |
|--|----|

Capítulo 4

| | |
|--|----|
| Considerações Finais | 85 |
| Referências | 92 |
| Anexo | |
| Carta de aceite - <i>Archives of Biochemistry and Biophysics</i> | 99 |

Capítulo 1

1 Introdução

1.1 Tuberculose

1.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

1.1.2 Infecção

1.1.3 Latência

1.1.4 Tuberculose e HIV

1.1.5 Tratamento e surgimento de cepas resistentes

1.1.6 Desenvolvimento de novas drogas e vacinas

1.2 Biossíntese de Nucleotídeos

1.2.1 Rota de salvamento de purinas e pirimidinas

1.3 Hidrolase de Nucleosídeos Purínicos de *M. tuberculosis*

2 Hipótese do Trabalho

3 Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

3.2 Objetivos Específicos

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose

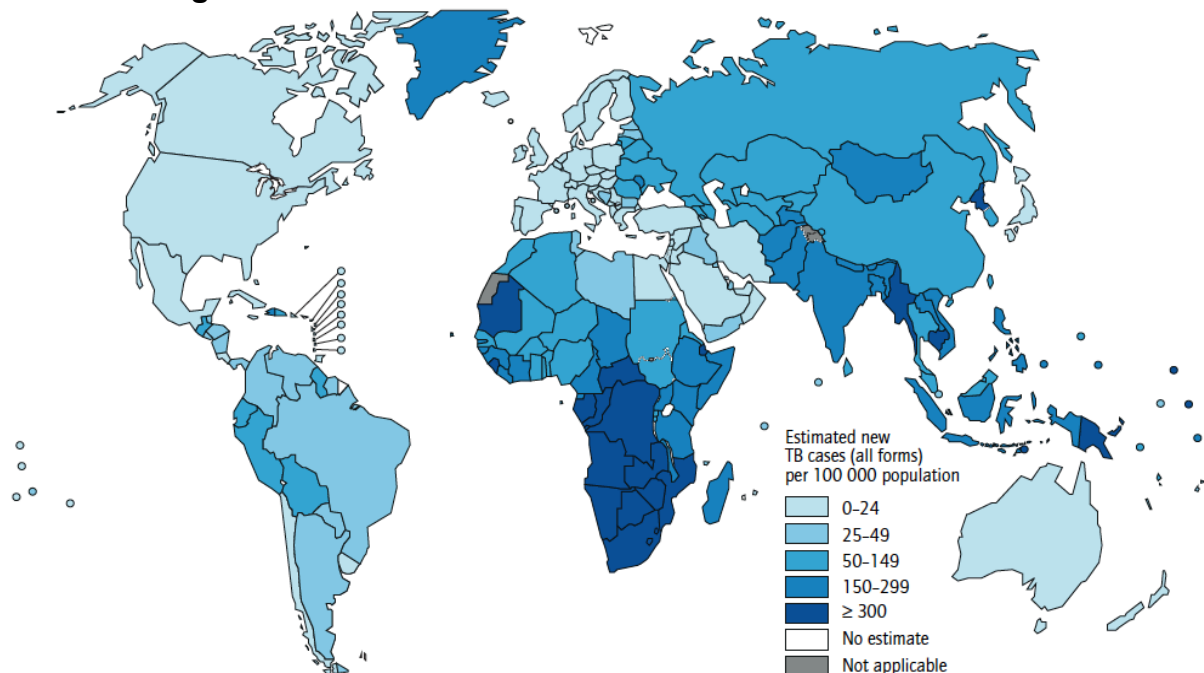
A tuberculose humana (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, uma bactéria aeróbica e de crescimento lento que causa infecção preferencialmente em macrófagos alveolares do sistema pulmonar (1). O progresso da infecção é regulado pela integridade do sistema imune do hospedeiro, que pode causar a eliminação imediata do microrganismo ou a condição de latência do mesmo, enquanto que a incapacidade imunológica em conter a infecção pode resultar no desenvolvimento da doença ativa.

A TB foi responsável por milhões de mortes no passado, devido à carência de métodos de tratamento adequados para pacientes infectados com a doença. Acredita-se que a epidemia de TB na Europa, conhecida como “a grande peste branca”, tenha iniciado no século XVII e continuado pelos próximos duzentos anos. A morte causada pela TB era considerada inevitável e no século XIX apresentou-se como uma doença avassaladora, com altas taxas de transmissão e que levava a um número de mortes muito elevado. Esta época corresponde ao início da revolução industrial, onde houve o surgimento dos aglomerados urbanos, muitas vezes sem estruturas de higiene e habitação, o que colaborava para a disseminação e o estabelecimento de inúmeras doenças, dentre elas a TB (2, 3).

A introdução da quimioterapia e de medidas profiláticas levou à redução drástica do número de mortes causadas pela TB, o que foi mantido por muitas décadas. Porém, a mesma doença que dizimou populações no final do século XIX e início do século XX, continua sendo um grande problema de saúde mundial. Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a TB como uma emergência de saúde pública global, sendo considerada hoje como a segunda principal causa de morte no mundo devido a um único agente infeccioso, estando atrás apenas do vírus da imunodeficiência humana (HIV). O *M. tuberculosis* é, portanto, a principal causa de morte devido a um único agente bacteriano (4).

O bacilo da TB é uma ameaça à saúde global visto que infecta cerca de um terço da população mundial (5, 6, 7). A OMS estimou a ocorrência de quase nove milhões de novos casos de TB em 2011 (13% eram pacientes soropositivos) e 1,4 milhões de mortes incluindo 350 mil mortes associadas à coinfeção com o HIV (4). Em 2011, a maioria dos casos de TB ocorreu na Ásia (59%) e na África (26%) e proporções menores de casos ocorreram na Região Mediterrânea Oriental (7,7%), na Região Europeia (4,3%) e na Região das Américas (3%) (Figura 1). Os 22 países com os maiores números absolutos de casos de TB contabilizam 82% de todos os casos estimados no mundo e inclui o Brasil. Segundo a OMS, os cinco países com o maior número de incidência de casos em 2011 eram a Índia, China, África do Sul, Indonésia e Paquistão, dentre os quais a Índia e a China contabilizaram 26 e 12% dos casos no mundo, respectivamente (4).

Figura 1. Taxas de incidência de novos casos de TB em 2011



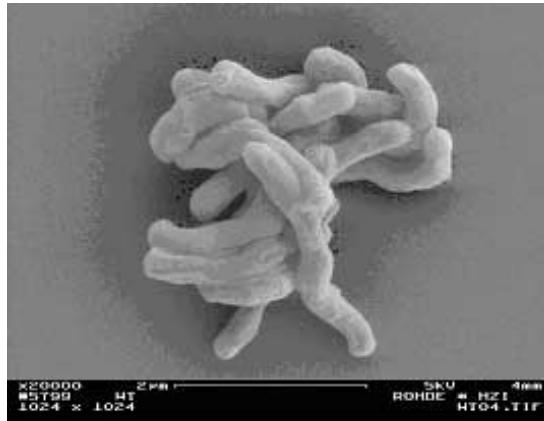
Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2012 (4).

1.1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

O principal agente etiológico da TB, *M. tuberculosis* (Figura 2), pertencente à família Mycobacteriaceae, é uma bactéria considerada fracamente Gram-positiva, em formato de bastão, que não contém flagelos, não forma esporos, não produz toxinas e não contém cápsula. Sua largura varia de 0,3 a 0,6 µm e sua altura, de 1 a

4 μm , e caracteriza-se por apresentar um crescimento muito lento, envelope celular complexo e homogeneidade genética. É um parasita intracelular obrigatório que estabiliza sua infecção preferencialmente no sistema pulmonar, onde é usualmente condicionado ao estado de latência, quando o sistema imune do hospedeiro encontra-se satisfatoriamente ativo (2, 3).

Figura 2. Microscopia eletrônica de bacilos de *M. tuberculosis* crescendo em cultura



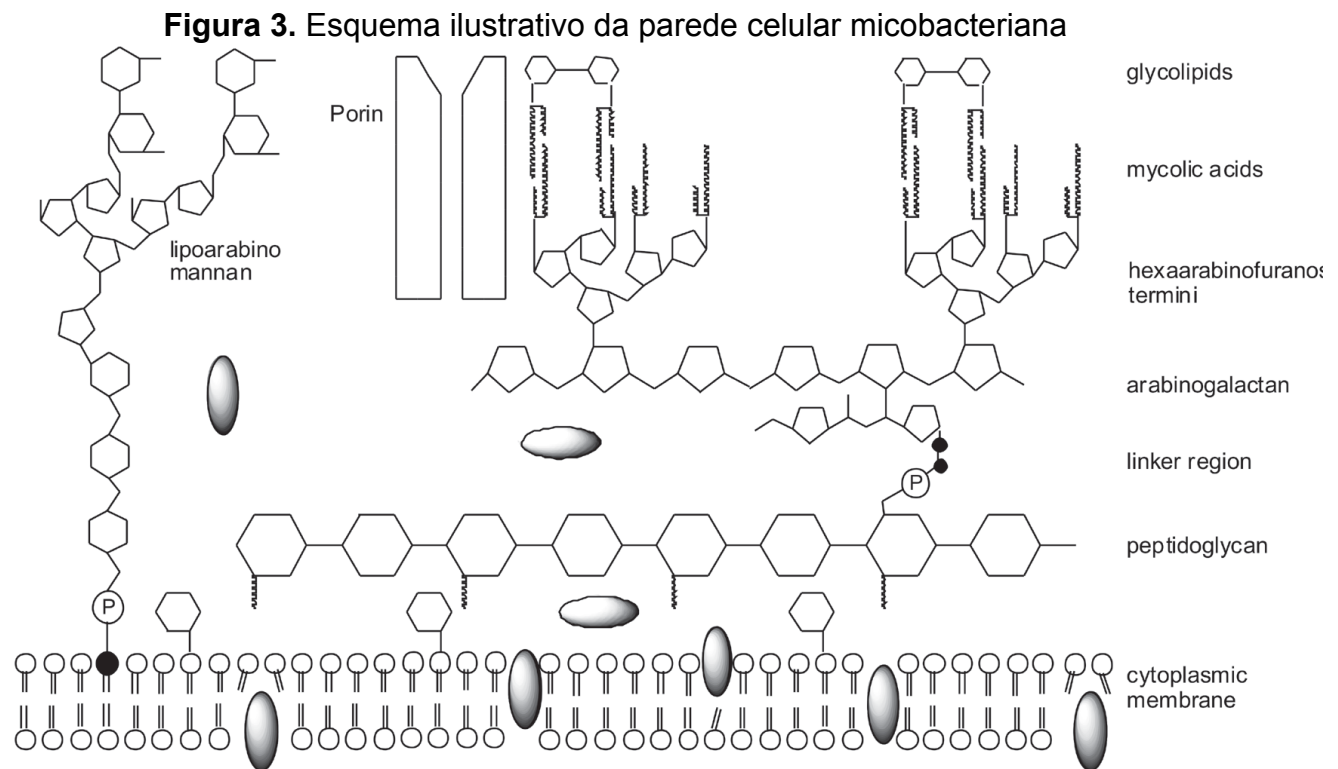
Fonte: Palomino et al, 2007 (3).

O bacilo da TB possui um potencial para sintetizar todos os aminoácidos essenciais, vitaminas e cofatores enzimáticos. O bacilo *M. tuberculosis* pode metabolizar uma variedade de carboidratos, hidrocarbonetos, álcoois, cetonas e ácidos carboxílicos, possuindo a capacidade de adaptar o seu metabolismo às mudanças ambientais (1).

A estrutura da parede celular micobacteriana é extremamente incomum quando comparada com a de outras bactérias (Figura 3). A camada de peptideoglicano contém ácido *N*-glicolilmurâmico ao invés de *N*-acetilmurâmico e cerca de 60% da parede celular é constituída de lipídeos que consistem basicamente em ácidos graxos de cadeia longa incomuns, denominados ácidos micólicos (6, 8).

Os ácidos micólicos são ramificações de ácidos graxos que possuem uma cadeia longa e outra cadeia curta, com 22 a 24 e 40 a 64 carbonos, respectivamente (9). Eles estão ligados covalentemente ao polissacarídeo que compõe a parede celular, o arabinogalactano, que por sua vez está anexado ao peptideoglicano por uma ligação fosfodiéster (10). Além disto, a parede celular contém muitas outras espécies de lipídeos livres, os quais não estão ligados covalentemente a este

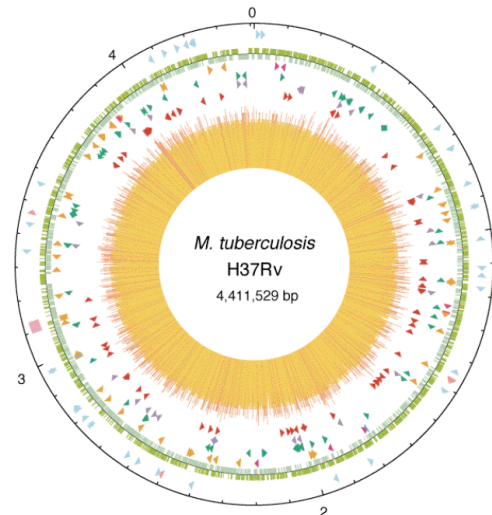
esqueleto basal. Esses lipídeos podem agir como antígenos no hospedeiro e a parede celular incomum apresentada pelo bacilo permite que o mesmo sobreviva dentro de macrófagos, a reações inflamatórias do hospedeiro, além de conferir resistência a uma série de antibióticos (1).



Fonte: Ducati et al, 2006 (2).

O sequenciamento completo do genoma da linhagem *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 4) permitiu Stewart Cole e colaboradores identificarem algumas características únicas do bacilo, que caracterizaram o mesmo por possuir um cromossomo circular de 4.411.529 pares de bases contendo um genoma rico de 65,6% de conteúdo de guanina mais citosina (G+C) no seu genoma, porcentagem consideravelmente alta em relação à maioria das bactérias (1).

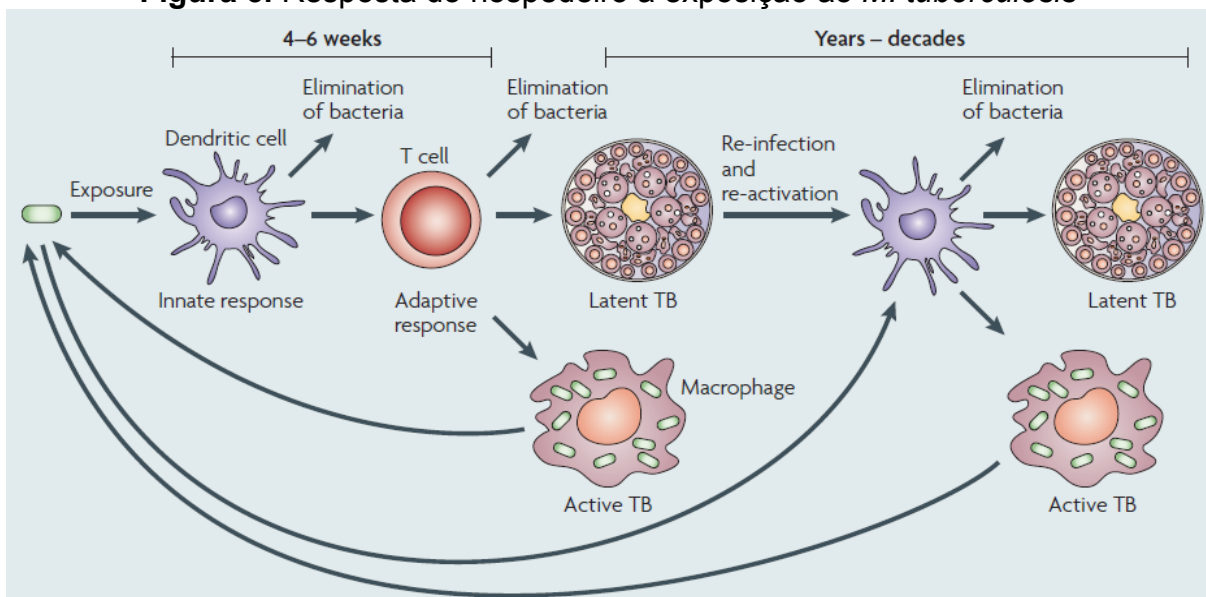
Figura 4. Representação esquemática do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv



Fonte: Cole et al, 1998 (1).

1.1.2 Infecção

O bacilo *M. tuberculosis* é geralmente transmitido entre os indivíduos através do ar por aerossóis de secreções respiratórias contendo o bacilo e podem permanecer em suspensão durante horas. A tosse de pacientes com a doença ativa, que caracteriza o sintoma de inflamação pulmonar crônica, constitui o principal mecanismo de disseminação do organismo para novos hospedeiros. Quando inalada, a micobactéria é fagocitada por macrófagos alveolares nos bronquíolos respiratórios e nos alvéolos, iniciando a resposta inata. O bacilo inalado poderá ou não estabelecer a infecção, o que dependerá da virulência bacteriana, da capacidade bactericida dos macrófagos e do sistema imune do indivíduo infectado (6, 11). Sob condições normais, a infecção é combatida pelo sistema imune do hospedeiro e, em 90% dos indivíduos infectados, a infecção não progride para a doença ativa. Portanto, estes microrganismos podem ser imediatamente eliminados, entrar em estado de latência ou estabelecer a doença ativa (Figura 5) (12, 13).

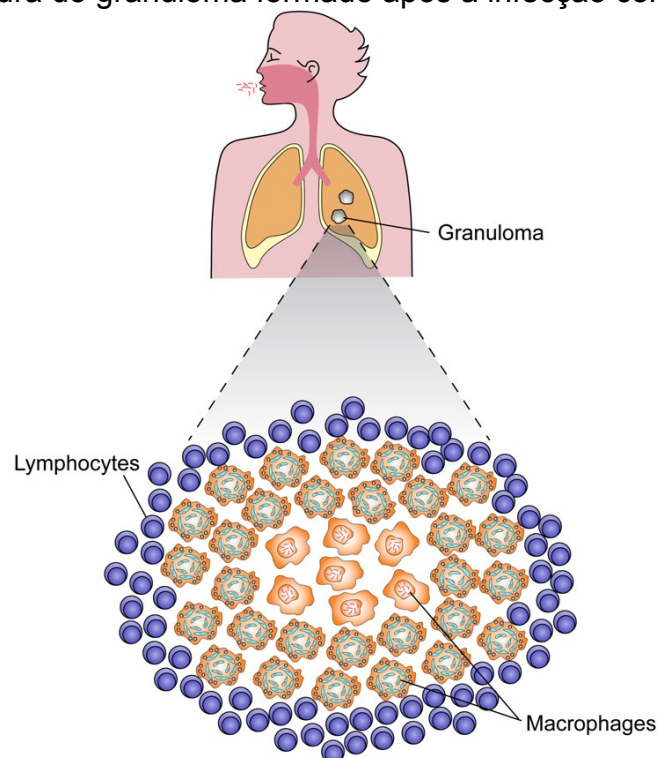
Figura 5. Resposta do hospedeiro à exposição ao *M. tuberculosis*

Fonte: Young et al, 2008 (13).

Nota: O bacilo é internalizado por fagocitose pelos macrófagos alveolares, iniciando a resposta inata. As células dendríticas iniciam a resposta adaptativa mediada por células T que ativam os macrófagos através da liberação de citocinas, o que pode resultar na eliminação da bactéria, TB latente ou TB ativa. A TB latente pode evoluir para a forma ativa da doença após anos ou décadas.

Na maioria dos indivíduos imunocompetentes, as células T e os macrófagos são recrutados, uma resposta imune é montada e a infecção é controlada. O sítio da infecção pode ser reconhecido como uma lesão granulomatosa ou tubérculo, que compreende uma área central de macrófagos infectados por *M. tuberculosis* circundada por diferentes tipos de células imunes, em particular macrófagos e linfócitos T (**Figura 6**). A sobrevivência intracelular do patógeno é mediada por sua capacidade de secretar proteínas que impedem a fusão do fagossoma com o lisossoma, impedindo assim a sua destruição. Deste modo, o bacilo é capaz de sobreviver dentro dos macrófagos, sendo controlado pelo sistema imunológico do hospedeiro dentro do granuloma (6).

Figura 6. Estrutura do granuloma formado após a infecção com *M. tuberculosis*



Fonte: Pieters, 2008 (6).

A TB primária pode ser desenvolvida dentro de um a dois anos após a infecção inicial e está geralmente associada a uma infecção disseminada por envolver a replicação do *M. tuberculosis*, a colonização dos linfonodos locais e a eventual disseminação da infecção para locais mais distantes (14, 15). A TB pós-primária desenvolve-se tardiamente e pode ser causada tanto pela reativação de bacilos remanescentes da infecção inicial como pela impossibilidade de controlar uma reinfecção subsequente. A TB pós-primária gera dano pulmonar extensivo, além de facilitar a transmissão bacilar por aerossóis (14, 15).

Os processos patológico e inflamatório induzem sintomas tais como enfraquecimento, febre, perda de peso, sudorese noturna, consternação torácica, insuficiência respiratória e tosse, ou mesmo hemoptíase (expectoração de sangue a partir de alguma via do trato respiratório, formando escarro sanguinolento) (16).

Foi visto que o genoma do *M. tuberculosis* codifica enzimas envolvidas na maioria das rotas anabólicas e catabólicas características das bactérias e na síntese e degradação de aminoácidos. Este estudo genômico permitiu a identificação de quatro mil genes, principalmente codificando enzimas envolvidas em lipólise e lipogênese, importantes para a sobrevivência intracelular e biossíntese de lipídeos

destinados à construção do envelope celular, respectivamente. Além das várias funções envolvidas no metabolismo de lipídeos, estão também presentes enzimas envolvidas em glicólise, rota das pentoses e ciclos do ácido tricarboxílico e glicoxilato, o que evidencia, portanto, o metabolismo dinâmico desta bactéria. Desde o seu isolamento, em 1905, esta linhagem H37Rv tem tido grande aplicação mundial na pesquisa biomédica devido à característica de virulência em modelos animais, além de ser suscetível a fármacos e possibilidade de manipulação genética (1).

1.1.3 Latência

Em condições normais, a resposta imune do hospedeiro contra o bacilo causador da TB é altamente efetiva no controle da replicação bacteriana, impedindo a progressão da doença e limitando-a ao local inicial da infecção. Esta condição é chamada de TB latente, que é a forma não contagiosa da doença, onde a bactéria permanece “contida”, período durante o qual o indivíduo infectado não apresenta sinais clínicos aparentes da doença. Em geral, o sistema imunológico humano está capacitado para conter, mas não para eliminar a infecção. Entretanto, ao contrário da TB ativa, a TB latente não constitui uma doença infecciosa e, portanto, não representa um risco à saúde pública. Acredita-se que aproximadamente dois bilhões de indivíduos estejam infectados com *M. tuberculosis* na forma latente (17, 18).

Os mecanismos de latência do bacilo causador da TB no hospedeiro ainda estão sendo investigados. Sabe-se que a TB latente ocorre após um indivíduo ter sido exposto ao *M. tuberculosis*, onde a infecção foi estabelecida e uma resposta imune gerada para controlar o patógeno e forçá-lo a entrar no seu estado de latência dentro do granuloma. O bacilo persiste e coexiste pacificamente em seu hospedeiro na forma de uma infecção quiescente em macrófagos alojados em estruturas calcificadas ou cicatrizadas resultantes da tentativa da resposta imune do hospedeiro em isolar a área infectada, os chamados tubérculos, formando um grande reservatório bacteriano (19).

O bacilo pode permanecer neste estado dormente por meses, anos ou até décadas, até que as defesas do hospedeiro sejam diminuídas, como nos casos de infecção com HIV, subnutrição, uso de drogas, câncer, diabetes, insuficiência renal crônica e quimioterapia imunossupressora (19). Com o crescimento descontrolado do bacilo dentro dos macrófagos, há a disseminação do *M. tuberculosis* pelo

rompimento dos granulomas, possibilitando o desenvolvimento da TB ativa (6, 13). Indivíduos com a TB latente apresentam um risco de desenvolver a doença ativa de aproximadamente 5% após o primeiro ano e de 10% ao longo da vida. Portanto, o estado de latência representa um estágio de equilíbrio entre a persistência do patógeno e a resposta imune do hospedeiro (16).

1.1.4 Tuberculose e HIV

A epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) foi um dos principais fatores a estimular o ressurgimento da TB como emergência global, provocando um efeito devastador no controle da TB, mundialmente (3). Em 2011, o número de pacientes coinfectados com TB e HIV alcançou 2,5 milhões, equivalente a 40% dos casos de TB notificados no mundo, e as maiores taxas de coinfeção de TB e HIV foram reportadas na África. No Brasil, a percentagem de pacientes tuberculosos coinfectados com o HIV foi de 23%, em 2010 (3).

Segundo a OMS, indivíduos coinfectados com HIV e TB têm entre 21 e 34 vezes mais chances de desenvolver a TB ativa comparados com aqueles que são HIV-negativos e, além disso, apresentam alto risco de mortalidade (4). Enquanto uma entre dez pessoas imunocompetentes infectadas com o bacilo causador da TB apresenta os sintomas da doença ativa no curso de sua vida, entre aqueles que estão infectadas com HIV, especialmente com idades entre 20 e 35 anos, são considerados casos que requerem maior atenção (3). Estes dados alarmantes são resultantes do considerável enfraquecimento imunológico causado pelo HIV, sendo responsável pelo aumento da probabilidade de desenvolvimento da TB em até 30 vezes. Com a queda do sistema imunológico, o HIV promove a progressão da infecção latente da TB para a doença ativa e esta associação é a causa principal de morte entre os pacientes soropositivos, afetando cerca de 11 milhões de pessoas e resultando na morte de aproximadamente 200 mil no ano de 2005 (5). Além disso, com o aumento do número de indivíduos infectados com o HIV, torna-se preocupante o número de hospedeiros ativamente contaminados e capazes de transmitir a doença para o restante da população (20). Portanto, este sinergismo existente entre *M. tuberculosis* e o HIV representa um problema de efeito devastador tanto para pacientes infectados como para a população em geral. Entre pacientes soropositivos coinfectados por cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiplas

drogas (MDR-TB), índices de mortalidade superiores a 80% são observados. Em função disto, a MDR-TB passou a ser conhecida como “a mais maligna infecção oportunista associada à infecção por HIV” (21, 22).

1.1.5 Tratamento e surgimento de cepas resistentes

O médico e bacteriologista alemão Robert Koch tornou pública a identificação do *M. tuberculosis* como agente etiológico da TB durante o IV Congresso Mundial de TB, em 1882 (23). A partir da descoberta do bacilo de Koch, surgiram diversas terapias para o tratamento da TB. A introdução do “sanatório de cura” foi a primeira tentativa amplamente praticada como tratamento anti-TB, onde os pacientes infectados eram isolados do restante da população e recebiam descanso, ar fresco e dieta equilibrada. Visto que os índices de recuperação nunca foram representativos, foi necessária a introdução de fármacos para a terapia (3).

O uso de antibióticos revolucionou a quimioterapia contra a doença ativa, reduzindo consideravelmente a mortalidade por TB. A quimioterapia efetiva da TB deve incluir uma ação bacteriostática, inibindo a síntese da parede celular, ácidos nucléicos e proteínas micobacterianas, eliminando a maior parte dos bacilos infectantes. Posteriormente, objetiva-se uma ação bactericida, eliminando os bacilos remanescentes. Os dois principais fármacos utilizados no tratamento da TB são isoniazida, a qual inibe a síntese da parede celular e rifampicina, um inibidor transcricional. Ambas possuem atividade máxima contra culturas em crescimento (14).

Atualmente, o tratamento quimioterápico padrão recomendado pela OMS para o controle da TB no mundo, conhecido como terapia de curta duração de observação direta (DOTS), consiste na administração combinada dos fármacos isoniazida, rifampicina, pirazinamida e estreptomina (ou etambutol) durante dois meses. O tratamento deve prosseguir por mais quatro meses, quando se administra isoniazida e rifampicina. O tratamento foi estabelecido há mais de 50 anos empregando fármacos que foram desenvolvidas nos anos 1940 e 1950 (24, 25). O DOTS foi proposto com a intenção de ajudar os pacientes a administrar os medicamentos regularmente e pelo período completo de tratamento, atingindo a cura e prevenindo o desenvolvimento de resistência aos fármacos (3).

Entretanto, existem grandes desafios associados à terapia atual, incluindo intolerância a fármacos e toxicidade, resultando na necessidade de interrupções do tratamento e modificações no regime medicamentoso; interações farmacocinéticas entre fármacos, particularmente com a terapia com fármacos antirretrovirais para pacientes coinfectados com TB e HIV; e a adesão do paciente devido à longa duração do tratamento necessária para atingir a cura da TB (25). A adesão inadequada de pacientes ao tratamento levou à emergência de cepas de MDR-TB, cujos isolados são resistentes a pelo menos isoniazida e rifampicina (2). Pacientes com MDR-TB devem ser tratados com uma combinação de fármacos de segunda linha que, além de serem significativamente mais caros, possuem mais efeitos tóxicos e são menos efetivos que os fármacos de primeira linha. Além disso, casos de MDR-TB necessitam um tempo ainda maior para serem tratados (3).

Em novembro de 2005, houve o surgimento das cepas de *M. tuberculosis* extensivamente resistentes a drogas (XDR-TB), sendo resistentes não somente à isoniazida e rifampicina, mas também a, pelo menos, três das seis principais classes de fármacos de segunda linha (aminoglicosídeos, polipeptídeos, fluoroquinolonas, tiamidas, ciclosserina e ácido p-aminosalicílico) (26). A XDR-TB resultou na necessidade de administração de fármacos de terceira linha, que são mais caros, mais tóxicos, menos eficazes e são utilizados por mais tempo em relação aos fármacos de primeira linha e segunda linha (pelo menos 20 meses de tratamento), sendo um problema grave para a saúde pública mundial (3, 5, 27). A XDR-TB está associada a altas taxas de mortalidade e a pacientes infectados com o HIV que iniciam o tratamento tardiamente (25).

Além das cepas MDR-TB e XDR-TB, uma nova linhagem de *M. tuberculosis* foi identificada em 2009 como sendo resistente a todos os fármacos de primeira e segunda linha atualmente disponíveis para tratar a TB, sendo denominada de TB totalmente resistente a drogas (TDR-TB). Esta forma do bacilo contém uma parede celular extremamente espessa e tem sido relatada em países como Irã e Índia (28, 29, 30, 31). O pouco êxito na terapia e a ocorrência já difundida destas cepas resistentes levam a discussões sobre a drástica situação de casos de TB virtualmente incuráveis e aponta para a necessidade urgente de se introduzir novos fármacos anti-TB mais eficazes (26, 32).

1.1.6 Desenvolvimento de novas drogas e vacinas

É evidente uma urgente necessidade de desenvolvimento de novos agentes antimicobacterianos, considerando o fato de o tratamento atualmente recomendado pela OMS ter sido incapaz de controlar a TB no mundo (27). Estes novos medicamentos devem ser mais eficazes e apresentar uma toxicidade seletiva, possibilitando a redução da duração do tratamento atual para aumentar a adesão dos pacientes à quimioterapia, assim como melhorando as possibilidades de tratamento contra as cepas resistentes. Além disto, há a necessidade de um tratamento eficaz para a TB latente que evite que a doença progrida para a sua forma ativa, e também fármacos que não interfiram com os antirretrovirais, para que possam ser utilizados em pacientes coinfectados com o HIV.

Além de novos agentes quimioterápicos, o desenvolvimento de novas vacinas seria de fundamental importância na redução da incidência global da TB. Atualmente, a vacina mais utilizada no mundo para prevenir a TB é a Bacille-Calmette-Guérin (BCG), descoberta há quase cem anos. A vacina BCG oferece uma série de vantagens, uma vez que pode ser administrada por via oral, possui baixo custo de produção, além de requerer uma única imunização, sendo geralmente eficaz na prevenção de TB meningeal infantil. Apesar das vantagens, a sua eficácia varia entre 0 e 80%, além de não conferir proteção à TB pulmonar em adultos. Além disso, a BCG não é efetiva na prevenção da reativação da doença em pacientes com a TB latente, o que caracteriza uma desvantagem importante (33, 34). Uma nova vacina contra a TB deverá prevenir a infecção por TB (pré-exposição), progressão primária da doença, assim como a reativação da TB latente (pós-exposição) (4).

O sequenciamento completo do genoma da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv tem possibilitado o estudo e a validação de alvos moleculares para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a TB, visto que a sequência genômica de *M. tuberculosis* H37Rv inclui informações sobre todos os possíveis alvos aos quais possam se direcionar novos agentes antimicobacterianos (1). A elucidação da função desempenhada por proteínas envolvidas em rotas bioquímicas essenciais para o crescimento e/ou persistência da micobactéria podem ser usadas em ensaios funcionais na busca de inibidores e, ao mesmo tempo,

possibilitar a geração de informações estruturais para o desenvolvimento de novas estratégias profiláticas e terapêuticas seletivas contra a TB.

1.2 Biossíntese de Nucleotídeos

Os nucleotídeos são biomoléculas de importância vital para todos os organismos vivos e possuem funções essenciais em muitos processos bioquímicos, como na transcrição da informação genética em RNA, assim como precursores dos ácidos nucléicos. Além disso, são essenciais para a síntese de proteínas e outros metabólitos, e para reações que necessitam de energia. Os nucleotídeos também são componentes essenciais nas rotas de transdução de sinais, como os nucleotídeos cíclicos que são os segundo mensageiros adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que transmitem sinais tanto dentro das células como entre as células (35).

As rotas biossintéticas para a síntese de moléculas de purina e pirimidina constroem a base para todos os demais passos do metabolismo de nucleotídeos e rotas relacionadas. Em geral, os nucleotídeos purínicos e pirimídicos podem ser sintetizados pela via *de novo* e pela via de salvamento. Na via *de novo*, a síntese de nucleotídeos inicia-se a partir de precursores simples, enquanto que a via de salvamento é constituída por rotas de reutilização de bases e nucleosídeos gerados pela reciclagem intracelular de nucleotídeos, pelas quais as células podem obter os nucleotídeos necessários a partir de fontes endógenas e/ou exógenas de purinas e pirimidinas pré-formadas (36, 37, 38).

Desta forma, as rotas biossintéticas de nucleotídeos são de extrema importância e servem como pontos de intervenção para agentes terapêuticos. As enzimas envolvidas na biossíntese e na reciclagem de nucleotídeos purínicos e pirimídicos podem ser alvos promissores para a descoberta de novos quimioterápicos para o tratamento da TB, visto que existe a possibilidade de encontrar um inibidor seletivo para as enzimas de *M. tuberculosis*, devido a algumas diferenças que existem entre parasitas e hospedeiros (1). Entre elas, está a especificidade do transporte de purinas, a primeira etapa da via de salvamento de purinas, podendo ter um alto grau de seletividade e também as diferenças relacionadas à preferência pelo substrato utilizado (36, 39). O desenho racional de um novo fármaco é normalmente baseado no estudo da bioquímica e da fisiologia do

organismo responsável pela doença para determinar no que ele difere em relação às células humanas. O metabolismo de purinas e pirimidinas é um processo celular fundamental, crítico para a vida de todos os organismos. O entendimento das enzimas envolvidas no metabolismo de purinas e pirimidinas poderia servir de base para o futuro desenho racional de análogos de purinas ou de pirimidinas seletivos para o tratamento da TB (39).

1.2.1 Rotas de salvamento de purinas e pirimidinas

Dados sobre as enzimas envolvidas no salvamento de purinas em células humanas já estão disponíveis, devido ao amplo emprego de fármacos antitumorais e antivirais. Portanto, sabe-se que a porção ribose 5'-fosfato é obtida a partir do 5-fosforribosil- α -1-pirofosfato (PRPP), o qual faz parte tanto da via *de novo* como da via de salvamento de nucleotídeos purínicos e pirimídicos, atuando como um regulador comum (36). Na via de salvamento de purinas, as bases adenina, guanina e hipoxantina são reconvertidas a seus nucleotídeos correspondentes (AMP, GMP e IMP, respectivamente), enquanto que a via *de novo* leva à formação de inosina 5'-monofosfato (IMP), divergindo em uma série de reações anabólicas que sintetizam adenosina 5'-fosfato (AMP) e guanosina 5'-fosfato (GMP) (40).

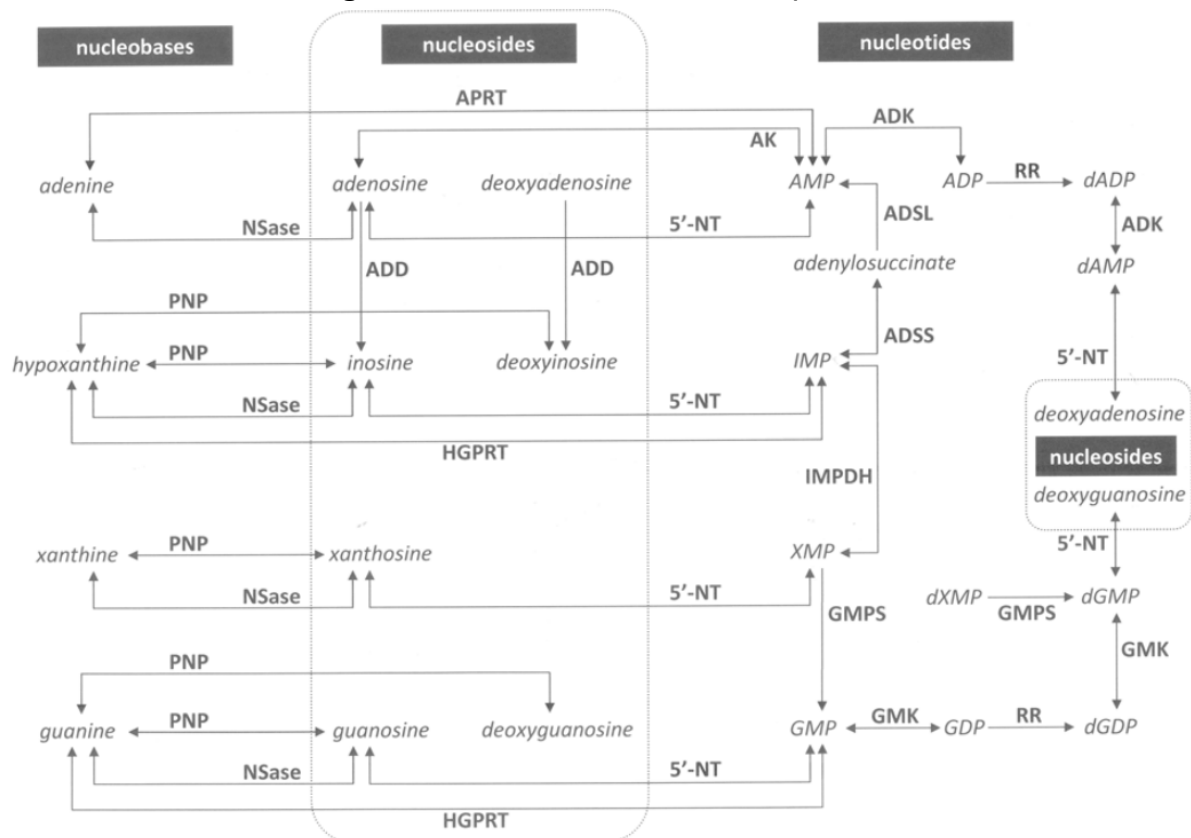
Sabe-se que o metabolismo de purinas e pirimidinas é conservado entre os organismos eucarióticos e procarióticos, incluindo em *M. tuberculosis*, e que o bacilo da TB expressa enzimas em ambas as vias de salvamento e *de novo* (40). Além disso, apesar de homólogos às enzimas da via de salvamento de purinas e pirimidinas terem sido identificados no genoma de *M. tuberculosis* e atividades correspondentes às de enzimas desta via já terem sido detectadas em extratos celulares micobacterianos, poucos genes e proteínas desta via metabólica foram detalhadamente caracterizados (41). O conhecimento da preferência de substratos destas enzimas e de como elas diferem de seus homólogos em humanos ainda é consideravelmente escasso (39). Portanto, pouco se sabe a respeito da possível oscilação do bacilo da TB entre as vias de salvamento e *de novo* para o suprimento das suas necessidades metabólicas para a obtenção de nucleotídeos. Logo, acredita-se que as vias de salvamento devam ser as principais fontes para a manutenção de nucleotídeos no *M. tuberculosis*, visto que a via *de novo* utiliza substratos simples para a obtenção de nucleotídeos. Desta maneira, este é um

processo considerado por gerar alto gasto de energia, enquanto que a via de salvamento é capaz de obter bases nitrogenadas livres do meio externo, sob condições de baixa energia ou de rápida multiplicação (40).

As rotas de salvamento de purinas e pirimidinas têm como função a reutilização de bases e nucleosídeos livres tanto exógenos como os produzidos no meio intracelular a partir da reciclagem de nucleotídeos. Os nucleosídeos são predominantemente metabolizados a bases livres antes de serem utilizados na síntese de nucleotídeos. Quantidades significativas de ribonucleotídeos são degradadas durante o crescimento normal e a reutilização destas bases e nucleosídeos livres requer enzimas da rota de salvamento. Além disto, a rota de salvamento tem o papel de manter as pentoses dos nucleosídeos exógenos disponíveis como fontes de carbono e energia e os grupamentos amino dos compostos de citosina, como fontes de nitrogênio (42). Acredita-se que a reciclagem de bases purínicas e pirimídicas pela rota de salvamento é preferencialmente utilizada, pois demanda menos energia do que a síntese *de novo* (43).

A **Figura 7** apresenta as principais enzimas envolvidas na rota de salvamento de purinas em células micobacterianas. Adenina e adenosina são convertidas a AMP pela adenina fosforribosiltransferase (APRT) e adenosina quinase (ADOK), respectivamente, e hipoxantina e guanina são convertidas a IMP e GMP, respectivamente, pela hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT). Estes nucleotídeos são então convertidos a nucleotídeos trifosfato naturais (ATP, GTP, dATP e dGTP) que, por sua vez, servem de substrato para a síntese de DNA e RNA (40).

Figura 7. Rota de salvamento de purinas



Fonte: Ducati et al, 2011 (40).

Nota: Rota de salvamento de purinas em células micobacterianas e as enzimas envolvidas que foram identificadas na sequência genômica de *M. tuberculosis* H37Rv. ADD: adenosina deaminase; AK: adenosina quinase; 5'-NT: 5'-nucleotidase; HGPRT: hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase; APRT: adenina fosforribosiltransferase; PNP: purina nucleosídeo fosforilase; NSase: purina nucleosidase; IMPDH: inosina monofosfato desidrogenase; ADSS: adenilosuccinato sintase; ADSL: adenilosuccinato liase; GMK: guanilato quinase; ADK: adenilato quinase; GMPS: guanosina monofosfato sintase; RR: ribonucleotídeo redutase.

Algumas enzimas da rota de salvamento de pirimidinas foram identificadas por homologia de sequência no genoma de *M. tuberculosis* (1): dCTP deaminase, que catalisa a conversão de dCTP a 2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (dUTP); desoxiuridina trifosfatase (dUTPase), que converte dUTP a 2'-desoxiuridina 5'-monofosfato (dUMP); timidilato sintase, que converte dUMP a 2'-desoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP); dTMP quinase, que catalisa a conversão de dTMP a 2'-desoxitimidina 5'-difosfato (dTDP) seguida pela NDP quinase, que converte dTDP a dTTP (Figura 8). Outras enzimas da rota de salvamento das pirimidinas incluem: citidina deaminase (CDA), que converte citidina ou desoxicitidina a uridina ou desoxiuridina, respectivamente; pirimidina nucleosídeo fosforilase (PyNP), que recicla o nucleosídeo timidina ou uridina a desoxiribose-1-fosfato e timina ou uracil; a

reciclagem que não exijam etapas enzimáticas complexas. Neste contexto, enzimas componentes da via de salvamento de purinas e de pirimidinas parecem ser alvos moleculares atrativos para o desenvolvimento de inibidores e vacinas que possam ser usados para o tratamento e profilaxia da TB. Embora tenha sido observado que muitas destas atividades enzimáticas estão também presentes em humanos, é possível a descoberta de inibidores com atividade seletiva contra enzimas do patógeno ao explorar as diferenças das suas características funcionais e estruturais (40).

1.3 Hidrolase de Nucleosídeos Purínicos de *M. tuberculosis*

As hidrolases de nucleosídeos (ou *N*-hidrolases de nucleosídeos; NH) catalisam a hidrólise irreversível da ligação *N*-glicosídica de ribonucleosídeos, dando origem à α -D-ribose e sua base livre correspondente (45). As NHs são distribuídas amplamente na natureza e já foram identificadas em muitos organismos, incluindo bactérias (46, 47, 48, 49), leveduras (50, 51, 52, 53, 54, 55), protozoários (50, 51, 52, 53, 54, 56), insetos (57) e mesozoários (58), o que indica que a NH possa apresentar uma função importante nestes microrganismos. É importante ressaltar que nenhuma atividade de NH nem os genes codificantes para esta enzima foram identificados em mamíferos.

Embora encontrada em muitos organismos, a função metabólica das NHs tem sido bem estabelecida apenas em parasitas protozoários, como *Crithidia fasciculata* (50, 52, 59, 60), *Trypanosoma brucei brucei* (53) e *Leishmania major* (54). Devido ao fato de os parasitas protozoários não possuírem a via *de novo* para sintetizar seus nucleosídeos purínicos, eles dependem da NH para suprir estes nucleosídeos pela reciclagem dos nucleosídeos presentes no hospedeiro (50) e, dessa forma, as NHs, principalmente de parasitas protozoários, têm sido amplamente estudadas utilizando cristalografia por raios X, métodos cinéticos e mutagênese sítio-dirigida (45).

As NHs têm sido classificadas em três subclasses, de acordo com as suas especificidades pelos substratos: NH com preferência por inosina e uridina (IU-NH) (50, 54), NH com preferência por inosina, adenosina e guanosina (IAG-NH) (61, 62) e NH com preferência por inosina e guanosina (IG-NH) (51, 61). Estudos recentes sugerem que esta classificação deva ser estendida, visto que existe um número crescente de NHs que não se adequam a nenhuma das três subclasses descritas

acima. Além disso, existe uma correlação pequena entre o nível de identidade entre os aminoácidos e a especificidade pelas nucleobases (48, 58, 63).

O gene *iunH* (*M. tuberculosis* Rv3393) foi proposto, por homologia de sequência, a codificar uma cadeia polipeptídica de atividade de NH com preferência pelos substratos inosina e uridina (IU-NH) (1). O homem não possui esta enzima e depende de um conjunto de reações enzimáticas diferente para a obtenção de nucleosídeos purínicos e pirimídicos. Além disso, o modo de ação do produto deste gene ainda não foi reportado pela literatura. Portanto, acredita-se que estudos bioquímicos do produto do gene *iunH* são de grande importância para a determinação do mecanismo catalítico da enzima. Igualmente, a reutilização de bases purínicas e pirimídicas pela rota de salvamento é preferencialmente utilizada, pois demanda menos energia (38) e, portanto, é possível que a NH desempenhe um papel importante no estado de latência do bacilo da TB.

Segundo Sasseti e colaboradores, o gene *iunH* foi predito como não essencial para o crescimento *in vitro* do *M. tuberculosis* H37Rv a partir da análise de uma biblioteca de mutantes gerados por inserção de transposons (64). Ainda, os resultados de perfil fenotípico global de alta resolução propõem que o produto do gene *iunH* não é essencial para o crescimento *in vitro* em meio de cultivo contendo glicerol e colesterol (fonte de carbono crítica durante a infecção) (65). No entanto, outros estudos são necessários, visto que os métodos utilizando a inserção de transposons para a definição de genes essenciais possuem algumas limitações, como a dificuldade de mapear precisamente as inserções, resultando em imprecisão em relação à localização de uma região essencial, além de gerar resultados falso-positivo ou falso-negativo (65).

A enzima NH de *M. tuberculosis* (*Mt*lAGU-NH) consiste em 308 resíduos de aminoácidos e possui peso molecular de aproximadamente 32.937,5 Da. Ela está descrita no GeneBank como possuindo preferência por inosina e uridina. Isto indica que, além de estar envolvida na rota de salvamento de purinas, possa estar envolvida na rota de salvamento de pirimidinas, atuando como uma uridina nucleosidase (**Figura 8**). Porém, até o presente, não existe nenhum estudo sobre ela, não havendo evidências experimentais sobre o possível papel desta enzima da rota de salvamento de purinas e pirimidinas no mecanismo de latência do bacilo da TB.

2 HIPÓTESE DO TRABALHO

A TB permanece entre as principais causas de morte por doenças infecciosas mundialmente. O surgimento de cepas resistentes e a dificuldade de produzir uma vacina contra o *M. tuberculosis* que forneça proteção à população adulta refletem a evidente necessidade de gerar novas formas de combater e prevenir a doença. O metabolismo de purinas e pirimidinas constitui um alvo potencial para o desenho racional de novos quimioterápicos para o tratamento da TB, devido a diferenças existentes nas enzimas que constituem a rota de biossíntese de nucleotídeos entre o parasita e seu hospedeiro. Além disso, a investigação do papel dos produtos dos genes envolvidos nestas vias durante os crescimentos *in vitro* e *in vivo* do *M. tuberculosis* H37Rv podem fornecer informações fundamentais sobre o metabolismo e a biologia do bacilo da TB e ainda possibilitar a obtenção de cepas atenuadas como futuras candidatas a uma nova vacina contra a TB. Avanços no entendimento dos mecanismos de latência, assim como das enzimas envolvidas no metabolismo de purinas e pirimidinas, podem servir como base para o futuro desenvolvimento de fármacos seletivos para o tratamento da TB e de vacinas eficientes para a prevenção da doença.

A reutilização de bases purínicas e pirimídicas pela rota de salvamento é preferencialmente utilizada, pois demanda menos energia e, portanto, é possível que a *MtIAGU-NH* desempenhe um papel importante no estado de latência do bacilo, já que o *M. tuberculosis* possivelmente necessite reciclar bases e/ou nucleosídeos para sobreviver no ambiente imposto pelo hospedeiro. A caracterização da enzima NH de *M. tuberculosis* codificada pelo gene *iunH*, a validação do seu papel bioquímico e a análise da sua importância na rota de salvamento de purinas e pirimidinas e no metabolismo do *M. tuberculosis* proporcionariam um maior entendimento sobre o modo de ação da enzima *MtIAGU-NH* no metabolismo de nucleotídeos do *M. tuberculosis* H37Rv, podendo auxiliar no desenvolvimento de estratégias profiláticas eficientes para reduzir a incidência global da TB.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Caracterizar a enzima hidrolase de nucleosídeos de purinas de *M. tuberculosis* H37Rv, codificada pelo gene *iunH*, validar o seu papel biológico e determinar a sua relevância na rota de salvamento de purinas e pirimidinas e no metabolismo de *M. tuberculosis*, visando à obtenção de cepas atenuadas como candidatas a vacinas anti-tuberculose.

3.2 Objetivos Específicos

1. Amplificar e clonar o gene *iunH* de *M. tuberculosis*; expressar e purificar a proteína recombinante *MtlAGU-NH*;
2. Determinar a estrutura da enzima *MtlAGU-NH*;
3. Determinar a sua atividade enzimática, os parâmetros cinéticos em estado estacionário e os efeitos do pH;
4. Realizar estudos cinéticos da formação do complexo binário *MtlAGU-NH*-ribose;
5. Determinar as concentrações intracelulares dos nucleosídeos e bases nitrogenadas em *M. tuberculosis* e determinar as constantes em equilíbrio para a enzima *MtlAGU-NH*;
6. Determinar a energia de ativação da enzima *MtlAGU-NH* para obter os parâmetros termodinâmicos de ativação;
7. Realizar estudos de modelagem e docagem molecular;
8. Analisar a importância da enzima *MtlAGU-NH* na rota de salvamento de purinas e pirimidinas e no metabolismo do *M. tuberculosis* pelo nocaute do gene *iunH*.

Os capítulos estão organizados da seguinte forma:

O **Capítulo 2** consiste em um artigo científico onde são apresentados os seguintes resultados: a amplificação do gene *iunH* a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv, clonagem em vetor pET23a(+), expressão heteróloga na cepa *E. coli* C41(DE3), purificação utilizando cromatografia líquida de rápida performance,

confirmação da identidade da proteína homogênea por LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa) e sequenciamento de aminoácidos (**Objetivo Específico 1**); determinação do estado oligomérico da enzima *MtlAGU-NH* na forma apo e na presença dos produtos ribose, hipoxantina, adenosina, guanosina e uracil (**Objetivo Específico 2**); determinação da atividade da enzima *MtlAGU-NH*, dos parâmetros cinéticos em estado estacionário para os substratos inosina, adenosina, guanosina e uridina utilizando espectrofotometria e/ou calorimetria de titulação isotérmica (ITC); estudo do perfil de pH (**Objetivo Específico 3**); estudos cinéticos da formação do complexo binário *MtlAGU-NH*-ribose por fluorimetria (**Objetivo Específico 4**); determinação das concentrações intracelulares dos nucleosídeos inosina e uridina e bases nitrogenadas hipoxantina e uracil em *M. tuberculosis* H37Rv; determinação das constantes em equilíbrio para a enzima *MtlAGU-NH* (**Objetivo Específico 5**); determinação dos parâmetros termodinâmicos de ativação utilizando ensaios de energia de ativação da enzima *MtlAGU-NH* para os substratos inosina e uridina (**Objetivo Específico 6**); realização de experimentos de modelagem e docagem molecular (**Objetivo Específico 7**).

No **Capítulo 3** são apresentados os resultados obtidos na construção da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv mutante para o gene *iunH* através de nocaute gênico utilizando o vetor suicida pPR27 $xyIE$ e a construção da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv mutante para o gene *iunH* e complementada com uma cópia extra do gene *iunH*.

No **Capítulo 4** são apresentadas as considerações finais.

Capítulo 2

Biochemical characterization of
recombinant nucleoside hydrolase from
Mycobacterium tuberculosis H37Rv

Manuscrito submetido ao periódico
Archives of Biochemistry and Biophysics,
2013.

Biochemical characterization of recombinant nucleoside hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Priscila Lamb Wink^{ab}, Zilpa Adriana Sanchez Quitian^{ab}, Leonardo Astolfi Rosado^{ab}, Valnês da Silva Rodrigues Junior^a, Guilherme Oliveira Petersen^{ab}, Daniel Macedo Lorenzini^a, Thiago Lipinski-Paes^c, Luís Fernando Saraiva Macedo Timmers^{ac}, Osmar Norberto de Souza^{bc}, Luiz Augusto Basso^{ab*} and Diógenes Santiago Santos^{ab*}

^aCentro 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), 6681/92-A Av. Ipiranga, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^cLaboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas (LABIO), Faculdade de Informática, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

*Corresponding authors: Luiz A. Basso or Diógenes S. Santos

Av. Ipiranga 6681 – Tecnopuc – Prédio 92A, ZIP CODE 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone/Fax: +55 51 33203629; E-mail addresses: luiz.basso@pucrs.br or diogenes@pucrs.br

Running title: Mode of action of recombinant *M. tuberculosis* Nucleoside Hydrolase

Abstract

Tuberculosis (TB) is a major global health threat. There is a need for the development of more efficient drugs for the sterilization of the disease's causative agent, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). A more comprehensive understanding of the bacilli's nucleotide metabolic pathways could aid in the development of new anti-mycobacterial drugs. Here we describe expression and purification of recombinant *iunH*-encoded nucleoside hydrolase from MTB (*MtIAGU-NH*). Glutaraldehyde cross-linking results indicate that *MtIAGU-NH* predominates as a monomer, presenting varied oligomeric states depending upon binding of ligands. Steady-state kinetics results show that *MtIAGU-NH* has broad substrate specificity, accepting inosine, adenosine, guanosine, and uridine as substrates. Inosine and adenosine displayed positive homotropic cooperativity kinetics, whereas guanosine and uridine displayed hyperbolic saturation curves. Measurements of kinetics of ribose binding to *MtIAGU-NH* by fluorescence spectroscopy suggest two pre-existing forms of enzyme prior to ligand association. The intracellular concentrations of inosine, uridine, hypoxanthine, and uracil were determined and thermodynamic parameters estimated. Thermodynamic activation parameters (E_a , ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger) for *MtIAGU-NH*-catalyzed chemical reaction are presented. Results from mass spectrometry, isothermal titration calorimetry (ITC), pH-rate profile experiment, multiple sequence alignment, and molecular docking experiments are also presented. These data should contribute to our understanding of the biological role played by *MtIAGU-NH*.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; nucleoside hydrolase; substrate specificity; thermodynamics; pH-rate profile; spectrofluorimetry.

Introduction

Tuberculosis (TB¹) is an infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and primarily affects the lungs (pulmonary TB) but can infect other organ systems (extra-pulmonary TB) [1]. The disease remains a major threat to global health, and TB accounts for 2.0% of all Disability Adjusted Life Years (DALYs). It is the third leading cause of DALYs among infectious diseases after human immunodeficiency virus (HIV) and malaria [2]. The World Health Organization (WHO) estimated that in 2011, there were 8.7 million incident TB cases (13% of which occurred in those co-infected with HIV), and 1.4 million deaths, 430,000 of which in HIV-positive individuals [3]. The current regimen for treating TB was established more than 30 years ago using drugs which were developed in the middle of the 20th century [4]. At the present time, the only approved TB vaccine is the bacillus Calmette-Guerin (BCG), which the WHO recommends in infants to prevent incident disease in children. However, this vaccine confers variable protection to adolescents and adults. Moreover, it is not effective in preventing reactivation of the disease in those with latent TB infection [5,6].

There is an urgent need for the development of new and more efficient drugs for the treatment of TB. Strategies for the discovery of new anti-mycobacterial targets include elucidation of the role played by proteins in biochemical pathways essential for mycobacterial growth and/or persistence [7]. Nucleotide metabolic pathways provide a promising source for the discovery of new antibacterial drug targets as the enzymes and pathways involved frequently differ from their human counterparts. Purine and pyrimidine salvage pathways in MTB remain an incompletely explored possibility for drug development as purine and pyrimidine biosynthesis are essential steps, supplying building blocks for DNA and RNA synthesis [8]. Enzymes from these pathways are thus attractive anti-tubercular drug targets [8]. Several homologues to enzymes in the purine and pyrimidine pathways have been identified in the genome sequence of MTB H37Rv [9]. A better understanding of the characteristics of the enzymes involved in purine and pyrimidine salvage pathways in MTB will aid in the design of analogs that may selectively inhibit MTB replication and survival. Ideally this class of compounds will

¹*Abbreviations used:* BCG, Calmette-Guerin; CFU, colony-forming units; CHES, 2-(*N*-Cyclohexylamino)ethanesulfonic Acid; CV, column volumes; DALYs, Disability Adjusted Life Years; DMSO, dimethyl sulfoxide; ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry; HEPES, *N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic Acid; HIV, human immunodeficiency virus; IAG-NH, purine-specific inosine-adenosine-guanosine preferring nucleoside hydrolase; ICP-OES, Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy; IG-NH, inosine-guanosine preferring nucleoside hydrolase; IPTG, isopropyl β -D-thiogalactopyranoside; ITC, isothermal titration calorimetry; IU-NH, inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase; LB, Luria-Bertani; MES, 2-(*N*-Morpholino) ethanesulfonic Acid; MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; *MtIAGU*-NH, *iunH*-encoding nucleoside hydrolase from MTB; NH, nucleoside hydrolase; OADC, oleic acid-albumin-dextrose-catalase; PCR, polymerase chain reaction; PNP, purine nucleoside phosphorilase; SDS-PAGE, Dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TB, tuberculosis; WHO, World Health Organization.

be active against strains of MTB that are resistant to drugs currently used to treat the disease and, hopefully, also clear latent infections [10].

Nucleoside hydrolases (or nucleoside *N*-ribohydrolases; NH) catalyze the irreversible hydrolysis of *N*-glycosidic bond of ribonucleosides forming α -D-ribose and the corresponding base [11]. NHs are widely distributed in nature, and have been identified in a number of sources, including bacteria [12-15], yeast [16-21], protozoa [16-20,22], insects [23], and mesozoans [24], indicating that nucleoside hydrolysis plays an important role in many organisms. Interestingly, neither nucleoside hydrolase activity nor the encoding genes have ever been detected in mammals. Although found in most organisms, the metabolic role of NHs has been well established only in protozoan parasites such as *Crithidia fasciculata* [16,18,25,26], *Trypanosoma brucei brucei* [19], and *Leshmania major* [20]. Because parasitic protozoans lack the *de novo* pathway to synthesize purine nucleosides, they rely on nucleoside hydrolase to supply purine nucleosides by salvaging them from the host [16]. Thus, NH from parasitic protozoa in particular has been studied extensively by X-ray crystallography, kinetic methods and site-directed mutagenesis [11]. Nucleoside hydrolases have been classified into three subclasses according to their substrate specificity: the base-specific inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase (IU-NH) [16,20], the purine-specific inosine-adenosine-guanosine preferring nucleoside hydrolase (IAG-NH) [27,28] and an inosine-guanosine preferring nucleoside hydrolase (IG-NH) [17]. Recent data suggest that this classification has to be extended as there exists an increasing number of NHs that do not fit in any of these groups [14,24,29]. Moreover, there seems to be little correlation between the level of amino acid identity and nucleobase specificity. The *iunH* gene (MTB Rv3393) has been proposed by sequence homology to encode a polypeptide chain with IU-NH activity [9], and this gene product has been predicted not to be required for *in vitro* growth of MTB [30]. In addition, high-resolution global phenotypic profiling results have prompted the proposal that the *iunH*-gene product is not required for *in vitro* growth in glycerol and cholesterol (a critical carbon source during infection) media [31]. However, as pointed out by Griffin et al. [31], homologous recombination and high-density mutagenesis genetic approaches for defining essential genes have advantages and limitations. Humans lack this enzyme and rely on a different set of enzymatic reactions to supply their nucleoside requirements. To the best of our knowledge, there has been no formal proof as to ascertain the correct assignment to the open reading frame of *iunH* gene in MTB. In addition, the mode of action of this gene product has not yet been reported. Accordingly, biochemical studies on *iunH*-gene product seem to be worth pursuing.

Our manuscript describes polymerase chain reaction (PCR) amplification, cloning, expression and purification of recombinant *iunH*-encoded NH protein. Determination of metal identity and concentration by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy suggest the presence of a Ca^{2+} ion per enzyme subunit. Glutaraldehyde cross-linking results indicate that the recombinant protein is predominantly present in solution in a monomeric state, having varied oligomeric states depending upon binding of distinct ligands. Steady-state kinetics results, using a continuous

spectrophotometric assay, indicate that the recombinant protein has broad substrate specificity, accepting inosine, adenosine, guanosine, and uridine as substrates. Accordingly, the recombinant protein will henceforth be referred to as *MtIAGU-NH*. Inosine and adenosine displayed positive homotropic cooperativity kinetics, whereas guanosine and uridine displayed hyperbolic saturation curves. Fluorescence spectroscopy measurements of kinetics of ribose binding to *MtIAGU-NH* suggest two forms of free enzyme in solution. Results for mass spectrometry, isothermal titration calorimetry (ITC), pH-rate profiles, multiple sequence alignment, and molecular docking experiments are also presented. The intracellular concentrations of inosine, uridine, hypoxanthine, and uracil in MTB bacilli were determined. Equilibrium constants, standard free energy (ΔG°), and intracellular concentration of α -ribose to make the process favorable ($\Delta G < 0$) were evaluated. Thermodynamic activation parameters (E_a , ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger) for *MtIAGU-NH*-catalyzed chemical reaction are presented. It is hoped that the data presented here may contribute to our understanding of *MtIAGU-NH* mode of action, thereby providing a solid basis for the rational design of inhibitors of this enzyme's activity with potential use as chemotherapeutic agents to treat TB. These inhibitors may also be useful to chemical biologists interested in designing function-based chemical compounds to elucidate the biological role of *MtIAGU-NH* in the context of whole MTB cells.

Materials and methods

Gene amplification, cloning, and protein expression

Synthetic oligonucleotide primers were designed to contain *NdeI* (primer sense 5'TCCATATGAGCGTCGTATTCGCCGACGTCG3') and *HindIII* (primer antisense 5'CCAAGCTTTCACGTTCGGCGCGGAATCG'3) restriction sites (highlighted in italics). The *iunH* gene (Rv3393) was PCR amplified from total genomic DNA of MTB strain H37Rv using *Pfu* DNA polymerase (Stratagene, Foster City, USA) in the presence of 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (final concentration). The PCR product (927 bp) was then purified from agarose gel with a QIAGEN QIA quick gel extraction kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), cloned into the pCR-Blunt[®] vector (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, USA) and subcloned into the pET-23a(+) expression vector (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) using the *NdeI* and *HindIII* restriction enzymes (New England Biolabs, Ipswich, USA). In order to confirm the product's identity and integrity as well as to ensure that no mutations were introduced in the cloned fragment the MTB *iunH* gene was sequenced with automatic DNA sequencing.

E. coli C41(DE3) electro-competent cells were transformed with recombinant pET23a(+) containing the *iunH* gene by electroporation (Gene Pulser II; Capacitance Extender II; Pulse Controller II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) and grown on Luria-Bertani (LB) agar plates

containing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin. LB medium (50 mL) was inoculated with a single colony and cells were grown at 180 rpm at 37 °C overnight. The culture (9 mL) was inoculated in 500 mL of Terrific Broth medium, with the same antibiotic concentration, and grown in a shaker set at 180 rpm and 37 °C until they achieved an OD_{600} reading of 0.4-0.6. The cells were grown for an additional 18 h after induction with 0.5 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) at 30 °C. Cells were harvested by centrifugation at 8,000 g for 30 min at 4 °C and stored at -20 °C. Soluble and insoluble fractions were analyzed by 12% Dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [32].

Protein purification

HPLC was done using an ÄKTA System (GE Healthcare® Life Sciences, Pittsburgh, USA) and performed at 4 °C. Approximately 5 g of wet cell paste was suspended in 50 mL of 50 mM Tris HCl pH 7.5 (buffer A) containing a protease inhibitor cocktail tablet (Complete EDTA-free, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and gently stirred for 30 min in the presence of 0.2 mg mL^{-1} lysozyme (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). Cells were disrupted by sonication (10 pulses of 10 s each at 60% amplitude) and centrifuged at 48,000 g for 30 min. To precipitate nucleic acids and ribonuclear proteins, the supernatant was treated with 1% (w/v) streptomycin sulfate (final concentration) for 30 min under slow agitation and centrifuged at 48,000 g for 30 min. The supernatant was dialyzed against buffer A and loaded on a HiPrep Q-Sepharose Fast Flow anion exchange column (GE Healthcare® Life Sciences, Pittsburgh, USA) pre-equilibrated with buffer A, washed 3 column volumes (CV) of the same buffer, and the adsorbed proteins were eluted with a linear gradient (0-100%) of 20 CV of 50 mM Tris HCl pH 7.5 containing 150 mM NaCl (buffer B) at 1 mL min^{-1} flow rate. The adsorbed recombinant *MtIAGU-NH* was eluted at approximately 75 mM NaCl and all fractions were analyzed by SDS-PAGE. The fractions containing the *MtIAGU-NH* activity were pooled and concentrated to a final volume of 7 mL using a 50 mL stirred ultrafiltration cell (Millipore, Billerica, USA) with a 10 kDa cutoff filter, and loaded on a HiLoad Superdex 200 26/60 size exclusion column (GE Healthcare® Life Sciences, Pittsburgh, USA), previously equilibrated with buffer A. Proteins were isocratically eluted with 1 CV of buffer A at 0.3 mL min^{-1} flow rate, and the fractions containing the target protein were pooled and loaded on a High Resolution Mono Q 16/10 anion exchange column (GE Healthcare® Life Sciences, Pittsburgh, USA), previously equilibrated with buffer A. The column was washed with 1 CV, adsorbed proteins were eluted with a linear gradient (0-100%) of 20 CV of buffer B, and the target protein was eluted with 70 mM NaCl. The active fractions containing homogeneous *MtIAGU-NH* were concentrated and dialyzed against 0.5 L of 50 mM Tris HCl pH 7.5 containing 50 mM NaCl (buffer C). Protein concentration was determined by the method of Bradford using the Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, USA) and bovine serum albumin as standard [33].

MtIAGU-NH identification by mass spectrometry

The homogeneous *MtIAGU-NH* was submitted to electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) to confirm the enzyme's identity. The protein was digested with trypsin and the resulting peptides were separated and analyzed by liquid chromatography associated with mass spectrometry with induced fragmentation collision. The results were used to identify the amino acid sequence through search software (Protein Discover, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) analysis of metal content

ICP-OES (PerkinElmer Optima 4300 DV, PerkinElmer Sciex, Canada) measurements were employed to assess metal identity and concentration. Prior to these measurements, recombinant homogeneous *MtIAGU-NH* was extensively dialyzed against 50 mM Tris HCl pH 7.5 and concentrated by ultrafiltration to a protein concentration of 2 mg mL⁻¹.

MtIAGU-NH quaternary structure

Determination of *MtIAGU-NH* molecular mass in solution was performed injecting 100 µL protein suspension (11 µM homogeneous recombinant *MtIAGU-NH* in 50 mM Tris HCl pH 7.5 containing 50 mM NaCl) into a HighLoad 10/30 Superdex-200 gel chromatography (GE Healthcare® Life Sciences, Pittsburgh, USA) at 0.4 mL min⁻¹ flow rate and isocratic elution with 1 CV of 50 mM Tris HCl pH 7.5 containing 200 mM NaCl. Protein elution was monitored at 215, 254, and 280 nm. The LMW and HMW Gel Filtration Calibration Kits (GE Healthcare® Life Sciences, Pittsburgh, USA) were used to prepare a calibration curve, measuring the elution volumes (V_e) of standard proteins (ferritin, catalase, aldolase, ovalbumin, coalbumin, and ribonuclease A). These values were used to calculate their respective partition coefficients (K_{av} , Eq. 1). Blue dextran 2000 (GE Healthcare® Life Sciences, Pittsburgh, USA) 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 to obtain an estimate for free *MtIAGU-NH* molecular mass in solution.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0} \quad \text{Eq. 1}$$

Glutaraldehyde cross-linking studies were performed to obtain estimates for the oligomeric state of both free *MtIAGU-NH* and enzyme in the presence of products. The method described by Fadoulglou et al was employed using crystallization plates [34]. In short, the reservoir was filled with 120 µL of 25% (v/v) glutaraldehyde acidified with HCl, and a drop of 10 µL of protein suspension (15

μM homogeneous recombinant *MtIAGU-NH* in 50 mM Tris HCl pH 7.5 containing 50 mM NaCl) was placed on the cover slip, which in turn was used to seal the well (forming a hanging drop inside the well). Drops of 10 μL of protein suspension in the presence of 4 mM of ribose, hypoxanthine, uracil, adenine, and guanine were employed to determine the oligomeric states of *MtIAGU-NH* in the presence of products. The plates were incubated at 30 °C for different time intervals and protein drops were subsequently analyzed by 12% SDS-PAGE.

Steady-state kinetic parameters

All chemicals in enzyme activity measurements were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). *MtIAGU-NH* activity was measured by a continuous spectrophotometric assay in quartz cuvettes using a UV-visible Shimadzu spectrophotometer UV2550 equipped with a temperature-controlled cuvette holder.

The kinetic properties of *MtIAGU-NH* for inosine, adenosine, guanosine, and uridine were spectrophotometrically determined using the difference in absorption between the nucleoside and the purine or pyrimidine base. *MtIAGU-NH* enzyme activity was measured in the presence of varying concentrations of substrate in 50 mM Tris HCl pH 7.5 containing 50 mM NaCl at 30 °C. The reaction was started with addition of concentrations of *MtIAGU-NH* that yielded decreasing linear absorbance time courses for the conversion of nucleoside substrates into products in a total volume of 0.3 mL. The $\Delta\epsilon$ values ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) used were: inosine, 0.92 at 280 nm; uridine, 2.1 at 280 nm; adenosine, 1.4 at 276 nm; guanosine, 0.11 at 300 nm [16]. All assays were performed in duplicate. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme catalyzing the conversion of 1 μmol of substrate into product per minute at 30 °C.

The experimental data were either fitted to the Hill equation (Eq. 2) for a sigmoidal saturation curve or to the Michaelis-Menten equation (Eq. 3) for a hyperbolic saturation curve [35,36]. For these equations, v is the steady-state velocity, V_{max} is the maximal velocity, S is the substrate concentration, K_M is the Michaelis-Menten constant, n is the Hill coefficient (indicating the cooperative index), and $K_{0.5}$ is the substrate concentration in which $v=0.5 V_{\text{max}}$ [35,36]. All data were analyzed by nonlinear regression using the SigmaPlot software (SigmaPlot 9.01, Systac Software, Inc. Melbourne USA).

$$v = \frac{V_{\text{max}}[S]^n}{K_{0.5}^n + [S]^n} \quad \text{Eq. 2}$$

$$v = \frac{V_{\text{max}}[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Eq. 3}$$

As no saturation for uridine could be detected by the continuous spectrophotometric assay, ITC measurements were carried out. *MtIAGU*-NH activity measurements were thus performed using an ITC₂₀₀ microcalorimeter (Microcal, Inc., Pittsburgh USA) at 30 °C and a syringe of 39.7 µL total volume with the mixture stirring at 500 rpm. A heating reference of 11 µcal s⁻¹ was used in all experiments. After an initial delay of 60 s, reactions were initiated by injecting 7.2 µL of enzyme solution (86.2 µM) into the sample cell (for a total volume of 203 µL) loaded with substrate (2.5 mM uridine). A second enzyme injection was performed after a 3 h lag time to obtain the correct baseline and also to determine the dilution heat of enzyme in solution, which was subtracted from the total reaction heat. The apparent enthalpy of reaction (ΔH_{app}) is determined from area under the curve divided by the total number of moles of uridine (same as dividing the total heat generated in the reaction by the amount of product formed when the substrate is totally consumed) [37].

To measure enzyme activity, after an initial delay of 60 s, reactions were initiated by injecting 3 µL of enzyme solution (34.5 µM) into the sample cell (for a total volume of 203 µL) loaded with variable substrate concentrations (5-150 mM uridine). Substrate and enzyme solutions were suspended in the same buffer (50 mM Tris HCl pH 7.5 containing 50 mM NaCl) to minimize the effects of heat dilution. The reference cell (200 µL) was loaded with MilliQ water for all experiments. The initial velocity for *MtIAGU*-NH was measured by taking the difference in heat flux measured between the base line and 60 s, and the maximal heat flux after enzyme solution injection into the calorimeter cell containing the substrate medium at variable concentrations. A steady state is reached when the enzyme velocity remains constant (Origin 7, OriginLab Corp., USA). Experiments were carried out in duplicate. The heat transferred during the enzyme-catalyzed reaction was directly proportional to the reaction rate and can be described by Eq. 4, where ΔH_{app} is the reaction enthalpy variation, V is the calorimetric cell volume and $[P]$ is the product concentration, and dQ/dt represents the heat flow that is proportional to the rate of product formation ($d[P]/dt$) [37].

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V\Delta H_{app}} \frac{dQ}{dt} \quad \text{Eq. 4}$$

The kinetic parameters (V_{max} and K_M) were obtained by fitting the calorimetric data to the Michaelis-Menten equation (Eq. 3) using nonlinear least square regression analysis in the Sigmaplot 9.01 software program. The definition for unit of enzyme activity was the same as for the spectrophotometric assays.

Fluorescence spectroscopy

Data from cross-linking experiments demonstrates that the enzyme can form dimers, trimers or tetramers in solution in the presence of products. We thus deemed appropriate to try to study whether or not this equilibrium could be detected by a different experimental approach. As the binding of ribose (a common product of nucleoside hydrolysis) to free *MtIAGU-NH* causes a quench in tryptophan fluorescence, fluorescence spectroscopy was employed to study the kinetics of *MtIAGU-NH*:ribose binary complex formation. Fluorescence titration at varying ribose concentrations (1 to 56 mM) in a 2 mL solution containing 1 μ M *MtIAGU-NH* in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 and 50 mM NaCl was carried out at 30 °C. Excitation and emission wavelengths were, respectively, 280 and 333 nm. Slits for excitation and emission were, respectively, 3 and 5 nm. Control measurements were performed under the same conditions, except that no ligand was added. These values were subtracted from those obtained in the presence of enzyme. *MtIAGU-NH*:ribose binary complex formation was characterized by a monophasic quench in protein fluorescence. Accordingly, the data were fitted to a single exponential function, yielding the observed rate constants (k_{obs}). The k_{obs} values were fitted as a function of varied substrate concentration (A) to an equation describing a hyperbolic decay (Eq. 5), in which K_d is the intrinsic dissociation constant, and k_2 and k_{-2} are, respectively, limiting forward and reverse first-order rate constants for an isomerization process between two forms of free enzyme that must occur before substrate binding [38-41].

$$k_{obs} = \left(\frac{k_2 K_d}{A + K_d} \right) + k_{-2} \quad \text{Eq. 5}$$

The overall dissociation constant ($K_{D(overall)}$) is given by the ratio of the product of the concentrations of all free species to the summation of the concentrations of all complexes [41], as shown in Eq. 6 for the mechanism depicted in Fig. 5A.

$$K_{D(overall)} = \frac{([E^*] + [E])[ribose]}{[E^* - ribose] + [E - ribose]} \quad \text{Eq. 6}$$

Since the interaction of ribose with the E^* isomer of *MtIAGU-NH* is assumed to be negligible so that $[E - ribose] \gg [E^* - ribose]$, Eq. 6 reduces to Eq. 7.

$$K_{D(overall)} = \frac{([E^*] + [E])[ribose]}{[E - ribose]} \quad \text{Eq. 7}$$

The equilibrium constant (K_2) for the conversion from E^* to E , and K_d are defined in Eq. 8 and Eq. 9, respectively.

$$K_2 = \frac{[E]}{[E^*]} = \frac{k_2}{k_{-2}} \quad \text{Eq. 8}$$

$$K_d = \frac{[E][\text{ribose}]}{[E - \text{ribose}]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad \text{Eq. 9}$$

Rearranging Equations 8 and 9 to give, respectively, $[E^*]=[E]/K_2$ and $[E-\text{ribose}]=(E)[\text{ribose}]/K_d$, and substituting them into Eq. 7, yields an expression for $K_{D(\text{overall})}$ (Eq. 10) [41].

$$K_{D(\text{overall})} = K_d \left[\frac{1}{K_2} + 1 \right] \quad \text{Eq. 10}$$

Intracellular concentrations in MTB

In order to quantify the intracellular concentration of inosine, uridine, hypoxanthine and uracil in the bacilli, the MTB H37Rv laboratory strain was cultured as described by Rodrigues-Junior et al. [42]. Briefly, MTB colonies cultured in Ogawa solid medium were suspended in sterile 0.9% saline solution containing 0.05% Tween-80 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). We assessed the number of viable organisms in an aliquot of this cell suspension by plating serial dilutions on Middlebrook 7H10 agar (Difco, Sparks, USA) plates containing 10% Middlebrook oleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC) enrichment (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA). Plates were incubated at 37 °C for three weeks prior to counting the number of MTB colony-forming units (CFU). The MTB suspension was autoclaved at 121 °C for 20 min, followed by sonication (3 pulses of 10 s, at an amplitude value of 21%), prior to chromatographic analysis. An HPLC equipped with a quaternary pump, DAD detector, degasser, column oven and an automatic injection system (all HPLC components and software Chromeleon® from Thermo® Scientific (Sunnyvale, USA) was used in this set of experiments). Stock standard solutions (400 µM) of inosine, uridine, hypoxanthine, and uracil were prepared by diluting each standard in ultrapure water. Standard solutions were prepared by diluting the stock solution in ultrapure water to give final concentrations of 0.048, 0.097, 0.195, 0.390, 0.781, 1.562, 3.125, 6.25, and 12.50 µM in a final volume of 1.0 mL.

Chromatographic separations were carried out using an RP column (250 mm, 4.6 mm, 5µm Sephasil peptide ST C-18, GE Healthcare® Life Sciences, Pittsburgh, USA) at 20 °C. The mobile phase was 0.1% glacial acetic acid (Merck®, Darmstadt, Germany) in bottle A and a mixture of

methanol:water 80:20 (v/v) in bottle B. A flow rate of 0.5 mL min⁻¹ was employed and a linear gradient up to 100% B was started at 33 min and maintained until 50 min. The column was equilibrated with 100% A for 10 min. The DAD detector was set at 254 nm and a full scan was continuously performed with a total run time of 60 min.

Determination of equilibrium constants for MtIAGU-NH

In order to determine reaction spontaneity of MtIAGU-NH, the equilibrium constants (K_{eq}) were identified at the point of equilibrium between inosine, ribose and hypoxanthine or between uridine, ribose and uracil. The K_{eq} was measured at 30 °C in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 containing 50 mM NaCl by fixing the ratio of [hypoxanthine]/[inosine] or [uracil]/[uridine] at 1 and varying the ratio of [ribose]/[water]. The enzyme velocity was determined at various [ribose]/[water] ratios with ribose concentration ranging from 1 mM to 660 mM. All measurements were performed in duplicate. The point at which the curve crosses the abscissa is equal to K_{eq} (no net enzyme reaction). The values of K_{eq} permit to obtain estimates for the standard free energy (ΔG°) using Eq. 11, in which R is the gas constant (8.324 J K⁻¹ mol⁻¹; or 1.987 cal K⁻¹ mol⁻¹) and T is the temperature in Kelvin ($T = \text{°C} + 273.15$).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad \text{Eq. 11}$$

As intracellular concentrations of uridine, uracil, inosine and hypoxanthine were determined, the free energy of the reaction (ΔG) could be estimated from Eq. 12, in which ΔG° is the standard free energy. Assuming dilute solutions, we could tentatively regard the intracellular water concentration as a constant value of 55.5M ((1,000 g L⁻¹)/(18.015 g mol⁻¹)).

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \left(\frac{[base][\alpha - ribose]}{[nucleoside][H_2O]} \right) \quad \text{Eq. 12}$$

Activation energy

The activation energy (E_a) was assessed by measuring the variation of k_{cat} of MtIAGU-NH as a function of temperature. Initial velocity measurements were thus carried out in the presence of inosine (6.0 mM), uridine (2.7 mM), adenosine (2.0 mM), and guanosine (3.0 mM), at temperatures ranging from 15 to 40 °C (from 288.15 to 313.15 K). All assays were performed in duplicate. The E_a was calculated from the slope (E_a/R) of the Arrhenius plot (Fig. 7) fitting the data to Eq. 13, in which R is the gas constant (8.314 J mol⁻¹ K⁻¹) and the constant A represents the product of the collision frequency

(Z) and a steric factor (p) based on the collision theory of enzyme kinetics [43]. It should be pointed out that here it is assumed a simplistic approach to explain a complex phenomenon and that A is independent of temperature.

$$\ln k_{cat} = \ln A - \left(\frac{E_a}{R} \right) \frac{1}{T} \quad \text{Eq. 13}$$

The enthalpy (ΔH^\ddagger), entropy (ΔS^\ddagger), and Gibbs free energy (ΔG^\ddagger) of activation were estimated using the following equations derived from the transition state theory of enzymatic reactions [43]:

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \quad \text{Eq. 14}$$

$$\Delta G^\ddagger = RT \left(\ln \frac{k_B}{h} + \ln T - \ln k_{cat} \right) \quad \text{Eq. 15}$$

and

$$\Delta S^\ddagger = \frac{\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger}{T} \quad \text{Eq. 16}$$

Energy values are in kJ mol^{-1} , with k_{cat} in s^{-1} , to conform to the units of the Boltzmann ($1.3805 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) and Planck ($6.6256 \times 10^{-34} \text{ J s}^{-1}$) constants and R is as for Eq. 13. Errors on ΔG^\ddagger were calculated using Eq. 17 [43].

$$(\Delta G)_{Err} = \frac{RT(k_{cat})_{Err}}{k_{cat}} \quad \text{Eq. 17}$$

pH-rate profile

Prior to determining the dependence of the kinetic parameters on pH values, the pH-rate profiles, *Mt*AGU-NH enzyme stability was assessed over a wide pH range (4.5 to 10.0) by pre-incubating the enzyme for 2 min at 30 °C in 100 mM 2-(*N*-Morpholino)ethanesulfonic Acid (MES)/*N*-2-Hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic Acid (HEPES)/2-(*N*-Cyclohexylamino)ethanesulfonic Acid (CHES) buffer mixture [44], and monitoring the activity in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 containing 50 mM NaCl. These pre-incubation experiments were carried out to identify denaturing values and ensure enzyme stability over the pH range studied. The pH-rate profiles were determined by

measuring initial velocities in the presence of varying inosine concentrations (1 - 200 μM) in 100 mM MES/HEPES/CHES buffer mixture over the following pH values: 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 [44]. All measurements were performed in duplicate or triplicate. The pH-rate profile was generated by plotting $\log(k_{\text{cat}})$ versus the pH values (from 5.5 to 9.5), and data were fitted to Eq. 17, in which y is the apparent kinetic parameter, C is the pH-independent plateau value of y , H is the hydrogen ion concentration, and K_a is the apparent acid dissociation constant for the ionizing group.

$$\log y = \log \left(\frac{C}{1 + \frac{H}{K_a}} \right) \quad \text{Eq. 17}$$

It appears pertinent to point out that the determination of steady-state kinetic parameters, ITC measurements, fluorescence spectroscopy, determination of equilibrium constants, and activation energy data acquisition were all carried out at a constant pH value (7.5), in which the kinetic parameters are pH-independent.

Multiple sequence alignment

The amino acid sequences of protozoan parasite nucleoside hydrolases (*C. fasciculata* (U_43371) and *L. major* (AY_603045.1)), whose three-dimensional structures have previously been solved or for which mutagenesis studies have been reported to verify essential residues, were included in the alignment to compare with *MtIAGU-NH*. Multiple amino acid sequence alignment was performed with Clustal W software [45], using the Blossum matrix for amino acid substitutions and the default parameters to identify essential residues for nucleoside substrates binding, as well to infer possible structural similarities.

Molecular modeling studies

The homology modeling approach, implemented in the MODELLER 9v10 program, was used to build a structural model for *MtIAGU-NH* [46]. The protocol included the generation of 10 models. All models were submitted to the energy function DOPE evaluation that is implemented in the MODELLER 9v10 aiming to choose the best structures. Furthermore, we used the MOLPROBITY webserver PROCHECK [47], ANOLEA [48], VERIFY-3D [49], PROSAIL [50] programs to assess stereo chemical quality of the models. Molecular docking experiments were performed to analyze the binding mode of nucleoside substrates to *MtIAGU-NH* protein. Ligands, Ca^{2+} , and *MtIAGU-NH* were prepared using AutoDockTools1.5.2 while docking simulations were performed with AutoDock4.2,

allowing ligand flexibility. The validation procedure was made with the crystal structure of *C. fasciculata* IU-NH associated with a transition-state inhibitor (PDB ID: 2MAS). For all simulations the 3-D grid dimension used to define *MtIAGU*-NH active site and for scoring function evaluation was 60 x 60 x 60 with spacing of 0.375. The Lamarckian Genetic Algorithm was employed as the docking algorithm with 20 runs and the remaining parameters set to their default values, except for *ga_num_evals*, which was set to 2,500,00. Intermolecular hydrogen bonds were assessed using the program LIGPLOT [51]. All figures were generated using the PyMol program [52].

Results and discussion

Amplification, cloning, expression, and purification of MtIAGU-NH

The *iunH* gene was amplified from the MTB genome in the presence of 10% DMSO in the reaction mixture. The DMSO co-solvent helps overcome polymerase extension difficulties that result from secondary DNA structures while also enhancing the denaturation of Guanosine-Cytosine-rich DNAs [53], which is consistent with the 65.6% G+C content of the MTB genome [31]. A PCR amplification fragment consistent with the expected size for the MTB *iunH* sequence (927 bp) was detected on agarose gel (data not shown) and the fragment was cloned into pCR-Blunt vector, and subcloned into pET23a(+) expression vector between the *Nde*I and *Bam*HI restriction sites. Accurate construction without mutations was confirmed with enzyme restriction analysis and automatic DNA sequence analysis.

SDS-PAGE analysis showed expression of a protein in the soluble fraction with an apparent subunit molecular mass of ~33 kDa in agreement with the predicted molecular mass of *MtIAGU*-NH (32,937.5 Da). The heterologous expression in *E. coli* C41(DE3) host cells was achieved after 18 h of cell growth upon reaching an OD₆₀₀ of 0.4-0.6 at 30 °C in Terrific Broth medium with IPTG induction (data not shown). The pET expression system makes use of a powerful T7 polymerase, under control of the IPTG-inducible *lacUV5* promoter for transcription of genes of interest, which are positioned downstream of the bacteriophage T7 late promoter [54]. Recombinant *MtIAGU*-NH was purified to homogeneity (Fig. 1) using a three-step purification protocol that employed standard anionic exchange and size exclusion columns, with a protein yield of 7.8% (Table 1). Homogeneous enzyme was stored at -80 °C with no loss of activity.

Table 1: Purification protocol of recombinant *MtIAGU-NH*. Typical results of a three-step purification protocol for 5 g wet cell paste from 0.5 L media.

| Step | Total protein (mg) | Total activity ^a (U) | Specific activity (U mg ⁻¹) | Purification (fold) | Yield (%) |
|----------------|--------------------|---------------------------------|---|---------------------|-----------|
| Crude extract | 243.4 | 5.1 | 0.02 | 1.00 | 100 |
| Q-Sepharose FF | 36.2 | 0.9 | 0.03 | 1.19 | 17.6 |
| Superdex 200 | 3.8 | 0.3 | 0.07 | 3.38 | 5.9 |
| Mono-Q | 3.3 | 0.4 | 0.12 | 5.52 | 7.8 |

^a One enzyme unit is defined as the amount of *MtIAGU-NH* that converts 1 μmol of uridine to uracil at 30 °C per minute.

All experiments were performed in duplicate.

MtIAGU-NH identification by mass spectrometry

The homogeneous recombinant protein, digested with trypsin, was submitted to ESI-MS (analysis as described in the experimental procedures section) and showed identity and integrity of *MtIAGU-NH*. 213 spectra were obtained and identified with 19 different peptides from the *MtIAGU-NH* amino acid sequence. These peptides covered approximately 52% of the whole sequence and the subunit molecular mass of *MtIAGU-NH* was determined as 32,839.0 Da (data not shown). The results of mass spectrometry analysis combined with the amino acid sequencing demonstrated removal of the N-terminal methionine residue, and that the purified protein was indeed *MtIAGU-NH*.

Metal analysis by ICP-OES

Determination of metal concentration and identity by ICP-OES yielded $2.3 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ of Ca^{2+} . These results indicate the presence of one mol of Ca^{2+} (57.4 μM) per mol of enzyme subunit (60.7 μM), thereby suggesting that *MtIAGU-NH* is a metalloenzyme.

MtIAGU-NH quaternary structure

A value of 23.8 kDa for the apparent molecular mass of homogeneous recombinant *MtIAGU-NH* was estimated by gel filtration chromatography, fitting the elution volume of the single peak to Eq. 1 (data not shown). This result suggests that *MtIAGU-NH* is a monomer in solution, since ESI-MS analysis suggested a value of 32,839.0 Da for the subunit molecular mass of the recombinant protein. The monomeric state of *MtIAGU-NH* is in contrast to nucleoside hydrolases from other organisms such as *C. fasciculata* and *L. major*, which have been demonstrated to be homotetramers in solution [20,27], or *T. vivax* which has been demonstrated to be a homodimer in solution [28].

Cross-linking experiments were pursued to confirm the gel filtration chromatography results. The glutaraldehyde cross-linking results show that *MtIAGU-NH* is a monomer in solution, even after

60 min of incubation time in the absence of the reaction products (Fig. 2A). Dimers, trimers and tetramers were visualized on SDS-PAGE gel stained with Coomassie brilliant blue when *MtIAGU*-NH was incubated for 20 min in the presence of the reaction products ribose (Fig. 2B), hypoxanthine (Fig. 2C), adenine (Fig. 2D), uracil (Fig. 2E), and guanine (Fig. 2F). Goodey and Benkovic reported that the binding of an allosteric effector results in the redistribution of protein conformational ensembles and alters the rates of their interconversion, thereby modulating the geometry of active and binding sites [55]. As suggested by the cross-linking results, the protein oligomeric state appears to be modulated by ribose, hypoxanthine, adenine, uracil, and guanine products, resultant from the hydrolysis of their corresponding nucleosides catalyzed by *MtIAGU*-NH (see next section).

Steady-state kinetic parameters

Saturation curves for *MtIAGU*-NH specific activity plotted against increasing concentrations of inosine (Fig. 3A), adenosine (Fig. 3B), guanosine (Fig. 3C), and uridine (Fig. 3D) were shown to obey distinct functions. Steady-state kinetic parameters are given in Table 2. Fitting the sigmoidal data for inosine and adenosine saturation curves to Eq. 2 yielded values of 2.2 mM for $K_{0.5}$ and 0.49 s^{-1} for k_{cat} for inosine, and 0.70 mM for $K_{0.5}$ and 0.26 s^{-1} for k_{cat} for adenosine. These results suggest positive homotropic cooperative kinetics for inosine and adenosine. To the best of our knowledge sigmoidal profiles for purine and pyrimidine substrate saturation curves have never been observed for NH enzymes produced by parasitic protozoa. It is tempting to suggest that the limiting value for the Hill coefficient (n) is 4 as *MtIAGU*-NH can form tetramers in solution in the presence of hypoxanthine (Fig. 2C) and adenine (Fig. 2D) products. The n values of 2.9 and 3.4 indicate strong positive homotropic cooperativity for, respectively, inosine and adenosine. Saturation curves for increasing guanosine (Fig. 3C) and uridine (Fig. 3D) concentrations followed hyperbolic Michaelis-Menten kinetics. Values for the steady-state constants were calculated fitting the data to Eq. 3, yielding K_M and k_{cat} values of, respectively, 1.6 mM and 0.96 s^{-1} for guanosine, and 25 mM and 9.9 s^{-1} for uridine (Table 2).

Table 2: Kinetic constants for the substrates of *MtIAGU*-NH.

| Substrate | $K_{0.5}$ (mM) | n^a | K_M (mM) | V_{max} (U mg ⁻¹) | k_{cat} (s ⁻¹) |
|------------------------|----------------|-----------|------------|--|-------------------------------------|
| Inosine ^b | 2.2 ± 0.1 | 2.9 ± 0.5 | - | 0.89 ± 0.05 | 0.49 ± 0.02 |
| Adenosine ^b | 0.70 ± 0.03 | 3.4 ± 0.6 | - | 0.47 ± 0.02 | 0.26 ± 0.01 |
| Guanosine ^b | - | - | 1.6 ± 0.3 | 1.7 ± 0.1 | 0.96 ± 0.05 |
| Uridine ^c | - | - | 25 ± 3 | 18.1 ± 0.4 | 9.9 ± 0.4 |

^a n = the Hill coefficient.

^bThese results were collected by spectrophotometry.

^cThis result was collected by ITC.

All measurements were performed in duplicate.

As the curve for uridine did not achieve saturation with a continuous spectrophotometric assay, we employed a thermodynamic approach using ITC to be able to compare the kinetic parameters of uridine with the other substrates. Downward baseline displacement after enzymatic injection indicates an exothermic reaction; the *MtIAGU*-NH ΔH_{app} was $-9.5 (\pm 0.4) \times 10^{-4}$ cal mol⁻¹ for uridine hydrolysis (Fig. 3D - inset). The kinetic parameters obtained by ITC for the purified *MtIAGU*-NH enzyme are shown and compared with the other substrates (inosine, adenosine, and guanosine) in Table 2. ITC is a sensitive technique that directly determines the thermodynamic and kinetic parameters of enzymatic reactions by measuring the heat absorbed or released during a chemical reaction (binding, dilution, or transformation) [37]. As described by Bianconi, calorimetric enthalpy is the sum of the different heat effects that take place during a reaction [56]. Other researchers have reported that calorimetric and spectrophotometric data agree well [56,57]. Accordingly, ITC was employed to compare the kinetic parameters of *MtIAGU*-NH using uridine as a substrate.

The activity measurements demonstrate that the MTB *iunH* gene product has broad substrate specificity (Table 2), and was thus (as pointed out in the Introduction section) designated as *MtIAGU*-NH enzyme. Interestingly, even though the K_M value for uridine is larger than for the other nucleosides tested, its maximum velocity value is also larger. For instance, the specificity constant (k_{cat}/K_M) value for uridine is approximately 396 M⁻¹s⁻¹ whereas it is 600 M⁻¹s⁻¹ for guanosine, suggesting that the apparent second-order rate constants for these substrates are somewhat similar. Although the specificity constants for inosine and adenosine could not be estimated because saturation curves were sigmoidal; the k_{cat} values for inosine, adenosine and guanosine are similar, and the $K_{0.5}$ values for inosine and adenosine are in the same concentration range of the K_M value for guanosine.

Many enzymes that are subject to regulatory control have proven to be oligomeric proteins [58]. Interestingly, gel filtration chromatography suggested that apo *MtIAGU*-NH is monomeric in solution, whereas cross-linking results showed that this enzyme might shift to different oligomeric states in the presence of products. Unfortunately, cross-linking studies could not be performed in the presence of nucleosides as there would be catalysis in an aqueous solution. It has been shown that polymerization of an enzyme in the presence of a modifier can provide a mechanism for allosteric behavior [59,60]. Brown and Reichard showed that the *E. coli* ribonucleoside diphosphate reductase complex undergoes aggregation in the presence of the negative modifier dATP [61]. Most enzymes showing allosteric behavior (altered activity in the presence of ligands that bind at a site other than the catalytic center) are oligomeric, or have such high molecular weights that it is probable that they are oligomeric. Because of this association of oligomeric structure with allosteric behavior, allosteric mechanisms are usually discussed in terms of interaction between protomers [58].

Fluorescence spectroscopy

The kinetics of binding of ribose to *MtIAGU-NH* was evaluated by fluorescence spectroscopy. The change in protein fluorescence upon ribose binding to *MtIAGU-NH* was characterized by a monophasic quench in tryptophan fluorescence (Fig. 4 – Inset(A)), and the data were thus fitted to a single exponential function. The dependence of the apparent rate constants (k_{obs}) on ribose concentration showed a hyperbolic decrease (Fig. 4). The dependence of the k_{obs} on product concentration can be utilized to infer whether or not two forms of free enzyme are present in solution. If free enzyme exists in equilibrium between two forms, E and E*, the former interacting significantly with substrate and the latter interacting negligibly (Fig. 5A), one expects a decrease in the k_{obs} value as ligand concentration is raised [38-41]. On the other hand, if there is one form of free enzyme in solution (Fig. 5B), increasing substrate levels are accompanied by a hyperbolic increase in the value of k_{obs} [38-41]. The binding kinetics data for *MtIAGU-NH*:ribose binary complex formation is consistent with the mechanism depicted in Fig. 5A, which is described by the concerted mechanism of symmetry model proposed by Monod et al, that predicts two free *MtIAGU-NH* isomers in equilibrium, E and E*, with product (ribose) binding effectively to E and negligibly to E* [62]. In this mechanism, isomerization is thought to be slower than the binding steps. This model predicts that the rate constant of association of ribose to *MtIAGU-NH* is limited by the first-order isomerization rate constant (k_2) from E* to E as ribose concentration approaches infinity, because only E binds substrate considerably. Data fitting to Eq. 5 yielded values for k_2 , k_{-2} (the rate constant for the isomerization from E to E* in Fig. 5A), and K_d (Table 3).

Table 3: Rate and equilibrium parameters of *MtIAGU-NH*:ribose binary complex formation.

| Parameter ^a | Value \pm standard error |
|-------------------------|--|
| K_d | $1.7 \pm 0.4 \text{ mM}^b$ |
| k_2 | $5.2 (\pm 0.5) \times 10^{-3} \text{ s}^b$ |
| k_{-2} | $1.40 (\pm 0.08) \times 10^{-3} \text{ s}^b$ |
| $K_{D(\text{overall})}$ | $2.2 \pm 0.1 \text{ mM}^c$ |
| K_2 | 3.7 ± 0.4^d |

^a All parameters are derived from the kinetics of ribose binding to *MtIAGU-NH*.

^b Fitting observed association rate constants to Eq. 5.

^c Calculated by Eq. 10.

^d Obtained from Eq. 8.

Analysis of the proposed model for ribose binding to *MtIAGU-NH* (Fig. 5) allows evaluation of the overall dissociation constant ($K_{D(\text{overall})}$) for the *MtIAGU-NH*:ribose binary complex formation, which provides information on possible additional steps in the binding sequence. A value of $K_{D(\text{overall})} = 2.2 \text{ mM}$ was obtained using Eq. 10. Fluorescence spectroscopy measurements could not be carried out for the products hypoxanthine or uracil due to the fact that, different from ribose, they absorb in the wavelengths used to assess *MtIAGU-NH* fluorescence, resulting in inner-filter effects that precluded

reliable data collection. It is tempting to suggest that the $E^* \rightleftharpoons E$ equilibrium prior to ribose binding may be reporting on the different oligomeric states of *MtIAGU-NH* demonstrated by the glutaraldehyde cross-linking results (Fig. 2B). However, whether or not the pre-existing equilibrium process of different oligomeric forms of *MtIAGU-NH* in solution can be ascribed to an equilibrium between less active or more active of enzymes needs more experimental evidence. The amplitude of the spectroscopic signals of the monophasic quench in protein fluorescence plotted against ribose concentrations showed a hyperbolic increase (Fig. 4 – Inset(B)). Fitting the amplitude data to a hyperbolic equation yielded a value for the dissociation constant of 10 ± 2 mM. As this value is somewhat larger than $K_{D(\text{overall})}$ (2.2 mM), additional step(s) that was(were) not taken into account in the simple model given in Fig. 5A may have to be considered. However, it appears not to be warranted to put forward any more complex model based on the experimental results presented. Accordingly, further approaches will have to be pursued to ascertain whether or not there is(are) additional step(s) to be included in the minimal model given in Fig. 5A.

Intracellular concentrations in MTB

The intracellular concentrations of inosine, uridine, hypoxanthine, and uracil in MTB bacilli were determined by HPLC prior to determining equilibrium constants for *MtIAGU-NH*. According to the standard curves, retention times for inosine, uridine, hypoxanthine, and uracil were 42.90, 33.40, 24.52, and 13.18 min, respectively (data not shown). The intracellular concentrations of inosine, hypoxanthine, uridine and uracil are given in Table 4. It should be pointed out that we have assumed that each cell volume could be represented by a cylinder ($V=\pi r^2 h$, in which "r" represents the radius and "h" the length). These values were considered to be in the range 0.3-0.6 μm for diameter and 1-4 μm for length [1]. The lowest values were employed to estimate the maximum concentrations and the largest ones to estimate the minimum concentrations (Table 4).

Table 4: Intracellular concentrations of substrates and products of the *MtIAGU-NH*-catalysed reaction in MTB bacilli.

| | | Minimum Concentration (mM) | Maximum Concentration (mM) |
|-------------------|---------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Substrates | Inosine | 17.8 ± 0.3 | 285 ± 5 |
| | Uridine | 196 ± 39 | 3134 ± 618 |
| Products | Hypoxanthine | 27.5 ± 0.5 | 440 ± 8 |
| | Uracil | 19.6 ± 0.1 | 313 ± 2 |

All measurements were performed in triplicate.

Determination of MtIAGU-NH equilibrium constants

The ratio of [hypoxanthine]/[inosine] or [uracil]/[uridine] was fixed at 1, and the ratio of [ribose]/[water] was varied from 1.8×10^{-5} to 1.2×10^{-2} for the reaction with the purine or 1.8×10^{-5} to 6×10^{-3} for the reaction with the pyrimidine to determine *MtIAGU-NH* equilibrium constants. Hydrolytic reactions are regarded as experimentally irreversible because of the rather large concentration of water in comparison to other reactants. Plotting the *MtIAGU-NH* enzyme activity as a function of [ribose]/[water] ratio gives a straight line (Fig. 6), in which the point at which this line crosses the abscissa (no enzyme activity) gives an estimate for the equilibrium constant. This analysis yielded values of 0.0076 for K_{eq} of inosine (Fig.6A) and 0.0037 for K_{eq} of uridine (Fig. 6B). The standard free energy (ΔG°) can thus be calculated by Eq. 11. This analysis gives values at 30 °C (303.15 K) for ΔG° of 12.3 kJ mol^{-1} ($2.94 \text{ kcal mol}^{-1}$) for inosine and 14.1 kJ mol^{-1} ($3.37 \text{ kcal mol}^{-1}$) for uridine, which suggests that both reactions are not spontaneous. If we take into account the intracellular concentrations of inosine and uridine substrates and the reaction products (hypoxanthine and uracil) found in the HPLC quantification in MTB bacilli, we can employ Eq. 12 to obtain estimates for free energy of the reaction (ΔG). The intracellular concentration of uridine is approximately 10-fold larger than the concentration of uracil (Table 4). The concentration of inosine is slightly lower than the concentration of hypoxanthine (Table 4). We have been unable to both determine the MTB intracellular concentration of α -ribose and find a value for its concentration in the literature we searched. Notwithstanding, a minimum intracellular concentration for α -ribose needed to make the process favorable ($\Delta G < 0$) can be estimated. The intracellular concentration of α -ribose should be smaller than approximately 270 mM for inosine hydrolysis and than 2 M for uridine hydrolysis. Accordingly, it appears to be reasonable to conclude that these processes are likely favorable in the intracellular milieu of MTB bacilli. There are, however, other MTB enzymes that catalyze reactions that could provide free bases and nucleosides. For instance, purine nucleoside phosphorylase (PNP) is involved in the metabolism of both purine and pyrimidine [63]. PNP catalyzes the reversible phosphorolysis of the N-glycosidic bond of α -purine (deoxy)ribonucleosides to generate β -(deoxy)ribose 1-phosphate and the corresponding purine bases [64,65]. The PNP from MTB has been shown to be more specific to natural 6-oxopurine nucleosides and synthetic compounds, and does not catalyze the phosphorolysis of adenosine [66].

Activation energy

We assessed the activation energy for the enzyme-catalyzed chemical reaction by measuring the dependence of k_{cat} on temperature for four substrates (Fig. 7). The activation energies of *MtIAGU-NH* reactions were calculated by determining the slope ($-E_a/R$) of the Arrhenius plots. The thermodynamic activation parameters evaluated using Eqs. 13-17 are given in Table 5.

Table 5: Thermodynamic activation parameters for the *MtIAGU*-NH-catalyzed chemical reaction at 30 °C (303.15 K).

| Parameter | Inosine | Adenosine | Guanosine | Uridine |
|---|------------|------------|------------|------------|
| E_a (kJ mol ⁻¹) | 32 ± 2 | 70 ± 4 | 46.8 ± 0.7 | 31 ± 2 |
| ΔH^\ddagger (kJ mol ⁻¹) | 29 ± 1 | 67.1 ± 3.7 | 44.3 ± 0.7 | 28.5 ± 1.7 |
| ΔG^\ddagger (kJ mol ⁻¹) | 59.9 ± 0.1 | 59.9 ± 0.1 | 59.9 ± 0.1 | 59.9 ± 0.2 |
| ΔS^\ddagger (J mol ⁻¹) | -102 ± 5 | 24 ± 45 | -52 ± 2 | -104 ± 10 |

The E_a values for inosine, adenosine, guanosine and uridine (Table 5) represent the minimum amount of energy necessary to initiate the *MtIAGU*-NH-catalyzed chemical reaction. It should, however, be pointed out that larger concentrations of uridine could not be employed in the enzyme assay due to its large K_M value (25 mM) and limited solubility in aqueous solutions. The E_a values for adenosine and guanosine are somewhat larger than for inosine and uridine (Table 5), suggesting lower activation energy for the former substrates. The values of free activation energy (ΔG^\ddagger) represent the energy barrier required for reactions to occur. The ΔG^\ddagger values can also be regarded as the variation of the Gibbs energy between the activated enzyme:substrate(s) activated complex and enzyme:substrate(s) in the ground state. No differences in ΔG^\ddagger values were observed for the substrates studied here, suggesting a similar overall free activation energy for hydrolysis of inosine, adenosine, guanosine and uridine substrates.

The facility of the activated enzyme:substrate(s) complex formation depends on whether the degree of order is lower ($\Delta S^\ddagger > 0$) or higher ($\Delta S^\ddagger < 0$) than the enzyme:substrate(s) in the ground state [67]. The activation entropy ΔS^\ddagger values were found to be negative for inosine, guanosine, and uridine; whereas it was positive for adenosine (Table 5). The larger positive value for ΔH^\ddagger (unfavorable process) was found for adenosine, which appears to be compensated for by the positive ΔS^\ddagger value (Table 5). Interestingly, as the values of ΔG^\ddagger for the four nucleosides tested are equal, there appears to be enthalpy-entropy compensation, resulting in temperature-independent ΔG^\ddagger values, which has commonly been found in protein:ligand interactions [68].

pH-rate profile

The pH dependence of kinetic parameters for inosine was carried out to probe acid/base chemistry in *MtIAGU*-NH mode of action. *MtIAGU*-NH was stable over the pH range used in the pH-rate profiles (data not shown). Although we have tried to measure enzyme activity in a broader pH range (4.5 to 10), reliable data could only be obtained for pH values ranging from 5.5 to 9.5. All saturation curves in the latter pH range were sigmoidal. The pH dependence of k_{cat} is concerned with the chemical step and its value follows the pK_a of groups that play critical roles in catalysis. The pH-rate data of k_{cat} for inosine hydrolysis showed a profile of a curve with slope of 1 that goes to a slope of zero as a function of increasing pH values (Fig. 8). Fitting the pH-rate data to Eq. 17 yielded a value

of 5.7 (± 0.4) for pK_a . However, as no reliable data could be collected below pH 5.5, only a rough estimate of the apparent pK_a value on the acidic limb could be obtained. Notwithstanding, the pH-rate data suggest that protonation of a group with pK_a value of approximately 5.7 prevents catalysis. In addition, since inosine has no ionizable groups over this pH range, this pK_a value represents an ionizable group on the enzyme that is involved in catalysis.

It has been suggested that a histidine residue (His241) is essential for activity of inosine-uridine-preferring nucleoside hydrolase (IU-NH) from *C. fasciculata* [18]. The His241Ala mutation caused a 2100-fold loss in k_{cat} for inosine and this residue was proposed to act as a proton donor for leaving group activation in *C. fasciculata* IU-NH catalysis [18]. The values for $K_{0.5}$ (substrate concentration in which $v=0.5 V_{max}$) and n (Hill coefficient) showed no obvious trends in pH-dependence plots of *MtIAGU-NH* enzyme activity (data not shown). These results are in agreement with the role of His241 of *C. fasciculata* IU-NH as being only in catalysis and not substrate binding [18]. In addition, sequence alignment shows that the His241 of *C. fasciculata* IU-NH is conserved in both *L. major* IU-NH and *MtIAGU-NH* (Fig. 9). On the other hand, it has been proposed for the inosine-adenosine-guanosine-preferring nucleoside hydrolase (IAG-NH) from *T. vivax* that Asp10 is the general base in the reaction mechanism that abstracts a proton from a nucleophilic water molecule [27]. Moreover, the data for *C. fasciculata* IU-NH showed a bell-shaped pH profile (range: 5.6 – 10.5) for inosine, describing two essential groups necessary for catalysis, during which the enzyme requires one group to be deprotonated (pK 7.1) and one group to be protonated (pK 9.1) [25]. Accordingly, site-directed mutagenesis should be carried out to ascertain whether the His241 plays any role in *MtIAGU-NH* catalysis, and the possibility that groups with larger pK_a values may play any role in either catalysis or substrate binding.

Homology modeling

A structural model for the 308-amino-acid polypeptide chain of *MtIAGU-NH* was built to try to provide support for the probable involvement of amino acid residues in the enzyme's mode of action. Alignment was performed to evaluate protein similarities, identify enzyme signature and search for appropriate templates using the PROSITE web server [69]. Sequence alignment data (Fig. 9) suggested that *C. fasciculata* IU-NH (PDB ID: 2MAS) [70] is an appropriate template for molecular modeling studies.

The topology of *MtIAGU-NH* is similar to *C. fasciculata* IU-NH [26]. *MtIAGU-NH* has 12 α -helices (α 1 (Ile12-Ala23), α 2 (Val41-Cys55), α 3 (Lys79-His81), α 4 (Ala103-Ser113), α 5 (Thr127-Arg134), α 6 (Ala138-Leu142), α 7 (Trp161-Arg164), α 8 (Glu168-Thr175), α 9 (Leu189-Arg193), α 10 (Pro199-Ser207), α 11 (Arg216-Ala231), α 12 (Asp242-Met250), and α 13 (Pro290-Phe304), in addition to nine β -strands (β 1 (Asp26-Thr35), β 2 (Pro61-Gly65), β 3 (Gly120-Val122), β 4 (Leu146-

Gly150), $\beta 5$ (Gln182-Val186), $\beta 6$ (Leu254-Arg258), $\beta 7$ (Thr261-Asp265), $\beta 8$ (Ala269-Asp273) and $\beta 9$ (Arg283-Asp289). *MtIAGU*-NH subunit is folded into a single-domain globular structure that can be divided into three regions (see Graphical Abstract) as has been suggested for *C. fasciculata* IU-NH [26]. The first consists of an α, β core comprising segments $\beta 1$ - $\beta 6$, $\alpha 1$ - $\alpha 6$, $\beta 7$ and $\alpha 10$. The second is a lobe consisting of the four α helices ($\alpha 7$ - $\alpha 9$ and $\alpha 11$) that appears to have a purely structural function, shielding the hydrophobic residues of the core domain from the solvent. The third region consists of two short segments of β structure, strands $\beta 8$ and $\beta 9$, and forms the subunit-subunit interface [26].

Molecular docking experiments

To compare differences in the binding of substrates to *MtIAGU*-NH, the patterns of hydrogen bonds, and electrostatic and hydrophobic interactions were studied. Table 6 gives a summary of interactions for binary complexes formed between *MtIAGU*-NH and adenosine, guanosine, inosine and uridine.

Table 6: Intermolecular contacts for *MtIAGU*-NH:nucleoside binary complexes.

| Dockings | Hydrogen bonds | Electrostatic interactions | Hydrophobic interactions |
|------------------|--------------------------|-----------------------------------|---|
| Adenosine | Glu160 | Asp13 | Asp14, Asn38, His77, Phe80, His81, Met149, Gln156, Trp161, Asn162, Tyr225, His241, Asp242 |
| Guanosine | Asp13, Asn38 His77 | Glu160 | Asp14, Phe80, His81, Thr123, Met149, Gln156, Trp161, Asn162, Tyr225, Asp242 |
| Inosine | Asn38, Gln156, Asn162 | Glu160, Trp161 | His77, Phe80, His81, Met149, Leu189 |
| Uridine | Glu160, Tyr225 | | Asp13, Asn38, His77, Phe80, His81, Met149, Gln156, Asn162, His229, His241 |

Most of the hydrogen bonds and electrostatic interactions for *MtIAGU*-NH:nucleoside binary complexes involve the ribose moiety of substrates, which is more buried into the enzyme's active site than the base moiety (Fig. 10). A similar binding pattern was observed when comparing the amino acid residues involved in the ribose binding mode in *MtIAGU*-NH (Asp13, Asn38, Glu160, Asn162) with nucleoside hydrolases of different organisms. This suggests that molecular dockings experiments reproduced the correct binding mode of the ribose moiety of nucleosides. The analysis of base portion for each substrate molecule revealed some differences. Contrary to the ribose portion, adenine makes no hydrogen bonds contacts with *MtIAGU*-NH amino acids (>3.5 Å). On the other hand, hydrophobic contacts could be observed for adenine (Phe80, Trp161, Tyr225). Guanine makes one hydrogen bond

(Asp13). Hypoxanthine makes two hydrogen bonds with Gln156 and Asn162. Uracil makes two hydrogen bonds with Glu160 and Tyr225 (Fig. 10).

Conclusion

The complete genome sequencing of MTB H37Rv strain has accelerated the study and validation of molecular targets aimed at the rational design of anti-TB drugs [9]. Target-based rational design of new agents with anti-TB activity includes a thorough analysis of functional and structural components of MTB enzymes. Enzyme inhibitors make up roughly 25% of the drugs marketed in United States [71]. Enzymes catalyze multistep chemical reactions to achieve rate accelerations by stabilization of transition state structure(s) [72]. Accordingly, mechanistic analysis should always be a top priority for enzyme-targeted drug programs aiming at the rational design of potent enzyme inhibitors. Moreover, the recognition of the limitations of high-throughput screening approaches in the discovery of candidate drugs has rekindled interest in rational design methods [73]. However, the first step to validate enzyme targets must include experimental data demonstrating that the gene predicted by *in silico* analysis to encode a particular protein catalyzes the proposed chemical reaction.

Understanding the mode of action of *MtIAGU-NH* will inform us on how to better design inhibitors targeting this enzyme. In addition, understanding the mode of action of an enzyme can be used to inform functional annotation of newly determined sequences and structures, to select appropriate enzyme scaffolds for engineering new functions, and to refine definitions in the current EC classifications [74]. Bacterial nucleoside hydrolases have been proposed to be attractive drug targets because they are not present in humans, which rely on a different set of enzymatic reactions to supply their nucleoside requirements. Accordingly, the results here presented may contribute to both function-based drug design and functional genomic efforts. The results here presented may also help chemical biologists to design function-based chemical compounds to carry out either loss-of-function (inhibitors) or gain-of-function (activators) experiments to reveal the biological role of *MtIAGU-NH* in the context of whole MTB cells [75].

Acknowledgements

This work was supported by funds awarded by Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-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. L.A.B. (CNPq, 520182/99-5), O.N.S (CNPq, 559917/2010-4) and D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06) are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). P.L.W., L.A.R, V.S.R.J, and T.L.P. acknowledge scholarships awarded by CNPq. Z.A.S.Q., G.O.P, and L.F.S.M.T. acknowledge scholarships awarded by CAPES.

References

- [1] R.G. Ducati, A. Ruffino-Netto, L.A. Basso, D.S. Santos, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101 (2006) 697-714.
- [2] C.J.L. Murray, T. Vos, R. Lozano, M. Naghavi, A. D. Flaxman, *et al.*, *Lancet*, 380 (2012) 2197-2223.
- [3] World Health Organization, Global tuberculosis report 2012, WHO Press, Geneva, 2012.
- [4] W.J. Burman, *Clin. Infect. Dis.*, 50 (2010) S165-S172.
- [5] B.B. Trunz, P. Fine, C. Dye, *Lancet*, 367 (2006) 1173-1180.
- [6] S.H. Kaufmann, G. Hussey, P.H. Lambert, *Lancet*, 375 (2010) 2110-2119.
- [7] R.G. Ducati, L.A. Basso, D.S. Santos, *Curr. Drug Targets*, 8 (2007) 423-435.
- [8] K.A. Kantardjieff, C. Vasquez, P. Castro, N.M. Warfel, B.S. Rho, T. Lekin, C.Y. Kim, B.W. Segelke, T.C. Terwilliger, B. Rupp, *Acta Cryst.*, D61 (2005) 355-364.
- [9] S.T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry, 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, *Nature*, 393 (1998) 537-544.
- [10] W.B. Parker, M.C. Long, *Curr. Pharm. Des.*, 13 (2007) 599-608.
- [11] W. Versées, J. Steyaert, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 13 (2003) 731-738.
- [12] Y. Takagi, B.L. Horecker, *J. Biol. Chem.*, 225 (1957) 77-86.
- [13] M. Terada, M. Tatibana, O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 5578-5585.
- [14] J. Ogawa, S. Takeda, S.X. Xie, H. Hatanaka, T. Ashikari, T. Amachi, S. Shimizu, *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (2001) 1783-1787.
- [15] C. Petersen, L.B. Møller, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 884-894.
- [16] D.W. Parkin, B.A. Horenstein, D.R. Abdulah, B. Estupiñán, V.L. Schramm, *J. Biol. Chem.*, 266 (1991) 20658-20665.
- [17] B. Estupiñán, V.L. Schramm, *J. Biol. Chem.*, 269 (1994) 23068-23073.
- [18] D.N. Gopaul, S.L. Meyer, M. Degano, J.C. Sacchettini, V.L. Schramm, *Biochemistry*, 35 (1996) 5963-5970.
- [19] R. Pellé, V.L. Schramm, D.W. Parkin, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 2118-2126.
- [20] W. Shi, V.L. Schramm, S.C. Almo, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 21114-21120.
- [21] J.E. Kurtz, F. Exinger, P. Erbs, R. Jund, *Curr. Genet.*, 41 (2002) 132-141.
- [22] L. Cui, G.R. Rajasekariah, S.K. Martin, *Gene*, 280 (2001) 153-162.
- [23] J.M. Ribeiro, J.G. Valenzuela, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33 (2003) 13-22.
- [24] W. Versées, E. Van Holsbeke, S. De Vos, K. Decanniere, I. Zegers, J. Steyaert, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 59 (2003) 1087-1089.
- [25] D.W. Parkin, V.L. Schramm, *Biochemistry*, 34 (1995) 13961-13966.
- [26] M. Degano, D.N. Gopaul, G. Scapin, V.L. Schramm, J.C. Sacchettini, *Biochemistry*, 35 (1996) 5971-5980.
- [27] W. Versées, K. Decanniere, R. Pellé, J. Depoorter, E. Brosens, D.W. Parkin, J. Steyaert, *J. Mol. Biol.*, 307 (2001) 1363-1379.
- [28] D.W. Parkin, *J. Biol. Chem.*, 271 (1996) 21713-21719.
- [29] R. Mitterbauer, T. Karl, G. Adam, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (2002) 1336-1343.
- [30] C.M. Sasseti, D.H. Boyd, E.J. Rubin, *Mol. Microbiol.*, 48 (2003) 77-84.
- [31] J.E. Griffin, J.D. Gawronski, M.A. DeJesus, T.R. Ioerger, B.J. Akerley, C.M. Sasseti, *PLoS Pathog.*, 7 (2011) e1002251.
- [32] U.K. Laemmli, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- [33] M.M. Bradford, R.A. Meroire, W.L. Williams, *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248-254.
- [34] V.E. Fadoulglou, M. Kokkinidis, N.M. Glykos, *Anal. Biochem.*, 373 (2008) 404-406.
- [35] I. Segel, *Enzyme Kinetics, Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-state Enzyme Systems*, John Wiley and Sons, New York, 1975.

- [36] R.A. Copeland, *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*, John Wiley and Sons, Inc., New Jersey, 2005.
- [37] M.L. Bianconi, *Biophys. Chem.*, 126 (2007) 59-64.
- [38] K. Hiromi, *Kinetics of Fast Enzyme Reactions: Theory and Practice*, Halsted Press, New York, 1979, pp. 1-19.
- [39] H. Nakatani, K. Hiromi, *J. Biochem.*, 87 (1980) 1805-1810.
- [40] R.R. Lobb, D.S. Auld, *Experientia*, 40 (1984) 1197-1206.
- [41] R.G. Silva, L.A. Rosado, D.S. Santos, L.A. Basso, *Arch. Biochem. Biophys.*, 471 (2008) 1-10.
- [42] V.S. Rodrigues-Junior, A. Santos Junior, A.J. Santos, C.Z. Schneider, J.B. Calixto, E.H.S. Sousa, L.G.F. Lopes, A.A. Souto, L.A. Basso, D.S. Santos, M.M. Campos, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 40 (2012) 182-185.
- [43] T. Lonhienne, E. Baise, G. Feller, V. Bouriotis, C. Gerday, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1545 (2001) 349-356.
- [44] P.F. Cook, W.W. Cleland, in *Enzyme Kinetics and Mechanism*, Garland Science Publishing, New York, 2007, ch. 9, pp. 253-323.
- [45] C. Combet, C. Blanchet, C. Geourjon, G. Deléage, *Trends. Biochem. Sci.*, 25 (2000) 147-150.
- [46] A. Sali, T.L. Blundell, *J. Mol. Biol.*, 234 (1993) 779-815.
- [47] R.A. Laskowski, M.W. Macarthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, *J. Appl. Cryst.*, 26 (1993) 283-291.
- [48] F. Melo, E. Feytmans, *J. Mol. Biol.*, 277 (1998) 1141-1152.
- [49] R. Luthy, J.U. Bowie, D. Eisenberg, *Nature*, 356 (1992) 83-85.
- [50] M. Wiederstein, M.J. Sippl, *Nucleic Acids Res.*, 35 (2007) W407-410.
- [51] A.C. Wallace, R.A. Laskowski, J.M. Thornton, *Protein Eng.*, 8 (1995) 127-134.
- [52] W.L. DeLano. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA (2002) [<http://www.pymol.org>].
- [53] P.R. Winship, *Nucleic Acids Res.*, 17 (1989) 1266.
- [54] K.C. Kelley, K.J. Huestis, D.A. Austen, C.T. Sanderson, M.A. Donohue, S.K. Stickel, E.S. Kawasaki, M.S. Osburne, *Gene*, 156 (1995) 33-36.
- [55] N.M. Goodey, S.J. Benkovic, *Nat. Chem. Biol.*, 4 (2008) 474-482.
- [56] M.L. Bianconi, *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 18709-18713.
- [57] M.J. Todd, J. Gomez, *Anal. Biochem.*, 296 (2001) 179-187.
- [58] R.L. Blakley, M. Schrock, K. Sommer, P.F. Nixon, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 186 (1971) 119-130.
- [59] C. Frieden, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 4045-4052.
- [60] L.W. Nichol, W.J. Jackson, D.J. Winzor, *Biochemistry*, 6 (1967) 2449-2456.
- [61] N.C. Brown, P. Reichard, *J. Mol. Biol.*, 46 (1969) 39-55.
- [62] J. Monod, J. Wyman, J.P. Changeux, *J. Mol. Biol.*, 12 (1965) 88-118.
- [63] L. Mascia, M. Cappiello, S. Cherri, P.L. Ipata, *Biochim. Biophys. Acta*, 1474 (2000) 70-74.
- [64] H.M. Kalckar, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 429-443.
- [65] D.J. Porter, *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 7342-7351.
- [66] R.G. Ducati, D.S. Santos, L.A. Basso, *Arch. Biochem. Biophys.*, 486 (2009) 155-164.
- [67] T. Lonhienne, C. Gerday, G. Feller, *Biochim. Biophys. Acta*, 1543 (2000) 1-10.
- [68] T.S.G. Olsson, J.E. Ladbury, W.R. Pitt, M.A. Williams, *Protein Sci.*, 20 (2011) 1607-1618.
- [69] C.J.A. Sigrist, L. Cerutti, N. Hulo, A. Gattiker, L. Falquet, M. Pagni, A. Bairoch A., P. Bucher, *Brief Bioinform.*, 3 (2002) 265-274.
- [70] M. Degano, S.C. Almo, J.C. Sacchettini, V.L. Schramm, *Biochemistry*, 37 (1998) 6277-6285.
- [71] J.G. Robertson, *Biochemistry*, 44 (2005) 5561-5571;
- [72] J.G. Robertson, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 17 (2007) 674-679.
- [73] J.E. Ladbury, G.K. Klebe, E. Freire, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 9 (2010) 23-27.
- [74] D.E. Almonacid, E.R. Yera, J.B.O. Mitchell, P.C. Babbitt, *PLoS Comput. Biol.*, 6 (2010) e10000700.
- [75] A.C. Bishop, V.L. Chen, *J. Chem. Biol.*, 2 (2010) 1-9.

Figure legends

Figure 1: SDS-PAGE (12%) analysis for the three chromatographic steps of purification of recombinant *MtIAGU-NH* (~33 kDa) that yielded homogeneous protein, Lane 1 Molecular Weight Protein Marker (Fermentas); lane 2, crude extract; lane 3, Q-Shepharose anion exchange column; lane 4, Superdex-200 size exclusion; lane 5, MonoQ High Resolution anion exchange column.

Figure 2: *MtIAGU-NH* quaternary structure determination by glutaraldehyde cross-linking experiments. Incubation times (numbers in black) are shown at the bottom of each lane. Lane numbers are shown in white against a solid black background. M: Page Ruler Marker (Fermentas). (A) Apo *MtIAGU-NH*; (B) *MtIAGU-NH* incubated with ribose; (C) *MtIAGU-NH* incubated with hypoxanthine; (D) *MtIAGU-NH* incubated with adenine; (E) *MtIAGU-NH* incubated with uracil; (F) *MtIAGU-NH* incubated with guanine. Formation of dimers, trimers and tetramers can be visualized in (B, C, D, E, F) in addition to monomers that appear in (A).

Figure 3: Steady-state kinetic constants for *MtIAGU-NH*. (A) Varied inosine concentrations; (B) varied adenosine concentrations; (C) varied guanosine concentrations; (D) varied uridine concentration. *MtIAGU-NH* velocity measurements employed absorbance spectroscopy for inosine, adenosine and guanosine; and ITC for uridine. The inset of Fig. 3D gives the heat flow as a function of time ($\mu\text{cal s}^{-1}$) for the hydrolysis of uridine into uracil and ribose. The arrow indicates the time at which the second injection took place (see experimental procedures).

Figure 4: Kinetics of *MtIAGU-NH*-ribose binary complex formation, showing the dependence of the observed association rate constant on ribose concentration. Inset(A) shows a representative curve for the monophasic quench in protein fluorescence upon ribose (7.4 mM) binding to *MtIAGU-NH* (1 μM). Inset(B) shows the hyperbolic increase of the amplitude of fluorescence signals as a function of ribose concentrations.

Figure 5: Two possible allosteric mechanisms. (A) The symmetry or concerted model, with two forms of free enzyme at equilibrium in solution. (B) The sequential or induced-fit model, with only one form of free enzyme and a slow isomerization of the enzyme-ligand binary complex.

Figure 6: Plot of specific activity against $[\text{ribose}]/[\text{water}]$, for acquisition of the equilibrium constant of the *MtIAGU-NH* reaction. (A) Enzyme activity measurements for $[\text{hypoxanthine}]/[\text{inosine}]=1$ at varying $[\text{ribose}]/[\text{water}]$ ratios; (B) Enzyme activity measurements for $[\text{uracil}]/[\text{uridine}]=1$ at varying $[\text{ribose}]/[\text{water}]$ ratios.

Figure 7: Arrhenius plots for the four substrates (temperature dependence of $\log k_{\text{cat}}$): inosine (\blacktriangle), adenosine (\bullet), uridine (\circ), and guanosine (Δ).

Figure 8: The pH dependence data of $\log k_{\text{cat}}$ for inosine hydrolysis were fitted to Eq. 17, yielding a $\text{p}K_{\text{a}}$ value of 5.7.

Figure 9: Sequence alignment of nucleoside hydrolases from *M. tuberculosis* (Mtb), *C. fasciculata* (Cfa), and *L. major* (Lma). The family signature is highlighted. Amino acids involved in the ribose binding mode are indicated by black solid circles (\bullet). Amino acids involved in substrate recognition are shaded. The conserved His residue that plays a role in nucleoside hydrolase catalysis is indicated by a black solid cross (\blackcross). Overall identity between nucleoside hydrolases from *M. tuberculosis* and *C. fasciculata* is 28.35%, (64.18% similarity), and from *M. tuberculosis* and *L. major* is 28.04% (61.99% similarity).

Figure 10: Molecular model for *MtIAGU*-NH associated with nucleosides. (A) *MtIAGU*-NH:adenosine; (B) *MtIAGU*-NH:uridine (C) *MtIAGU*-NH:inosine; (D) *MtIAGU*-NH:guanosine. The α -helices are coloured in light green and β -sheets in light blue. These secondary structures are represented as ribbon diagrams. All ligands are colored by atom (carbon = yellow, nitrogen = blue, oxygen = red and hydrogen = white) and represented as sticks. The residues that are making hydrogen bonds or electrostatic interactions are illustrated as sticks and colored by atom (carbon = grey, nitrogen = blue, oxygen = red and hydrogen = white). Calcium ion is shown as a green sphere. Image generated with PyMol [52].

Graphical abstract

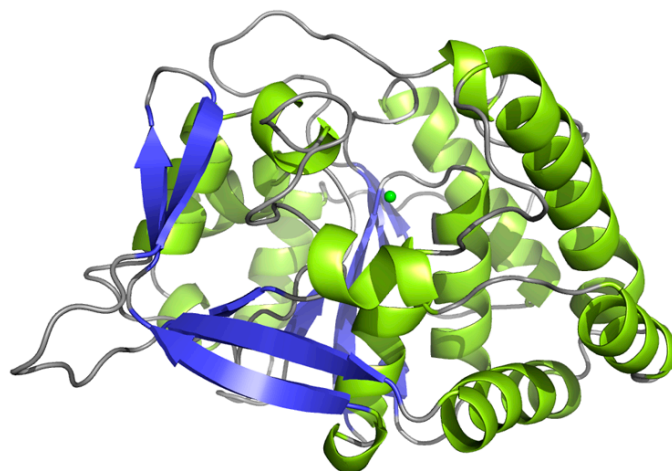


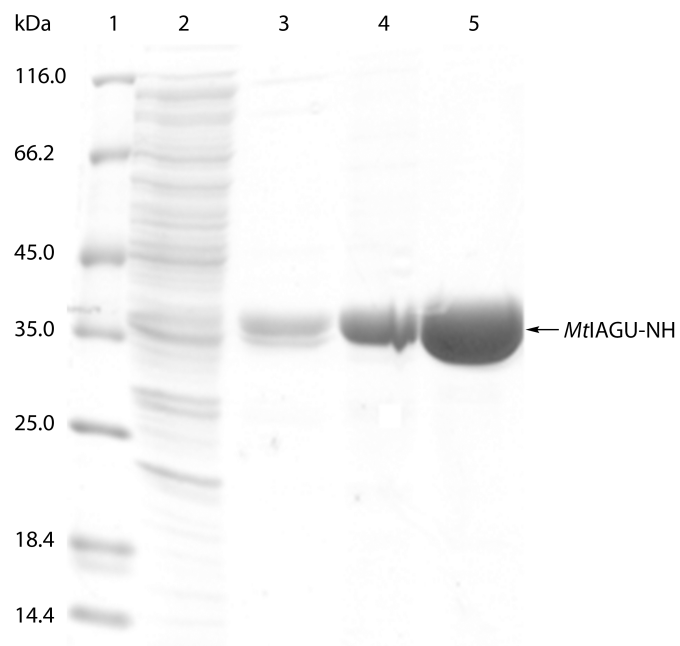
Figure 1.

Figure 2.

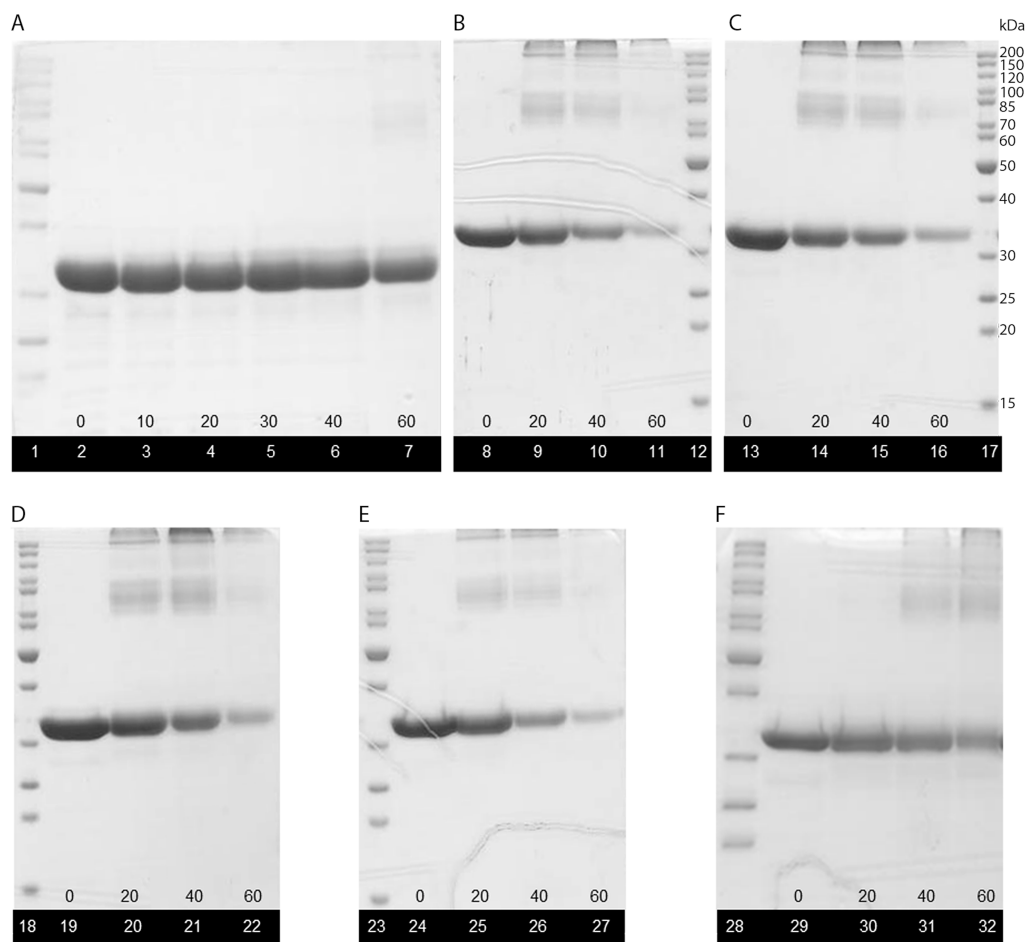


Figure 3.

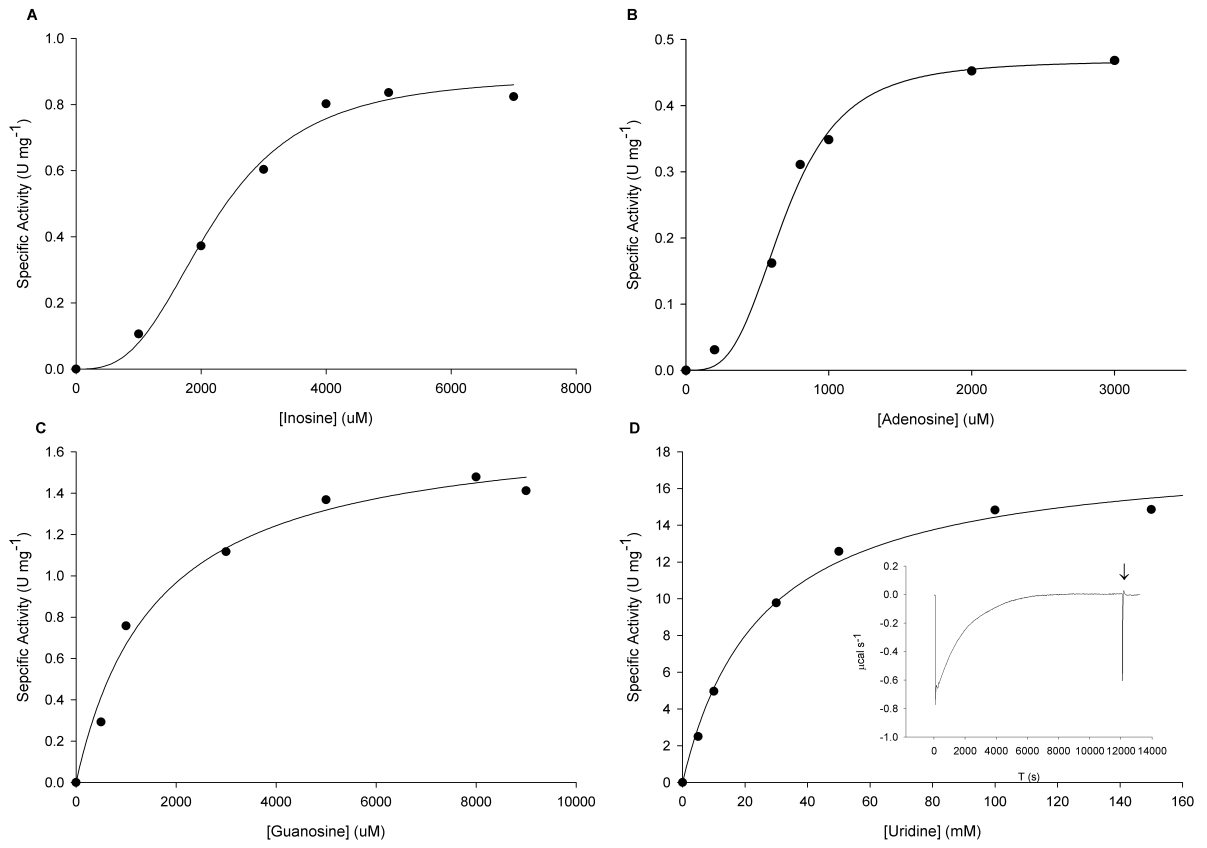


Figure 4.

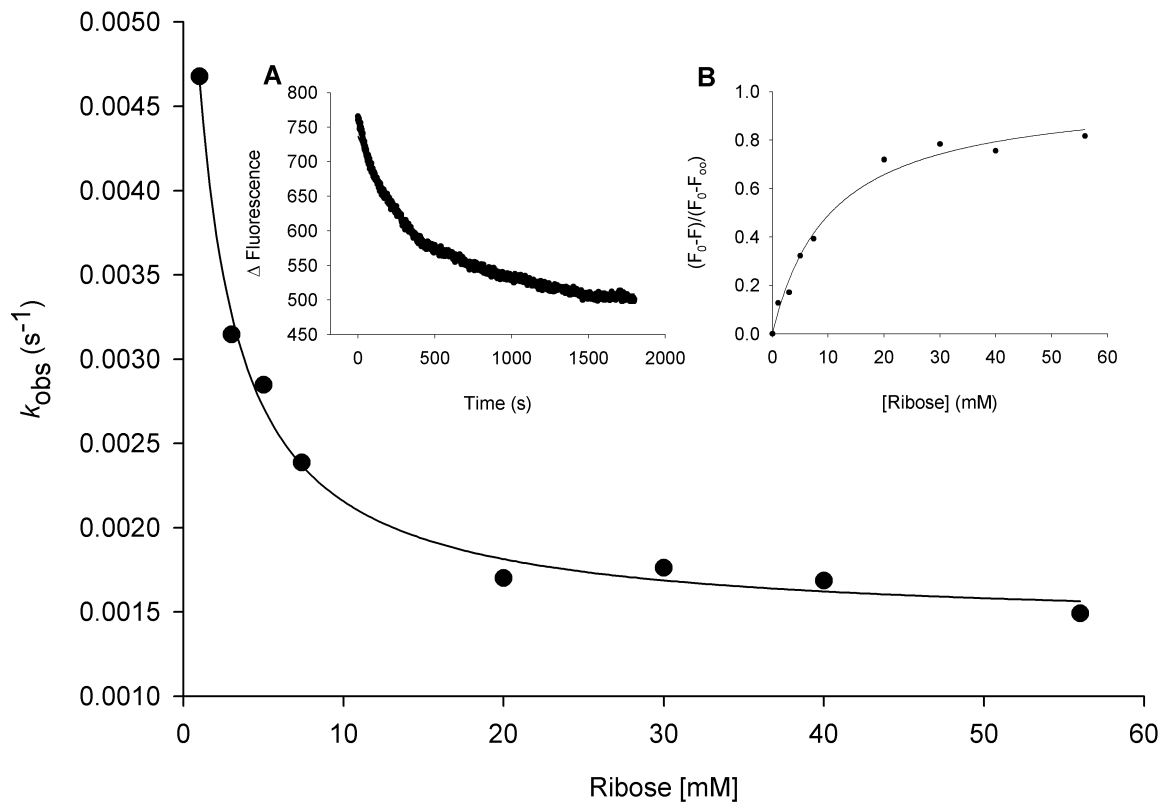
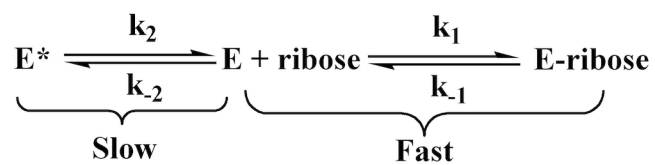


Figure 5.

A



B

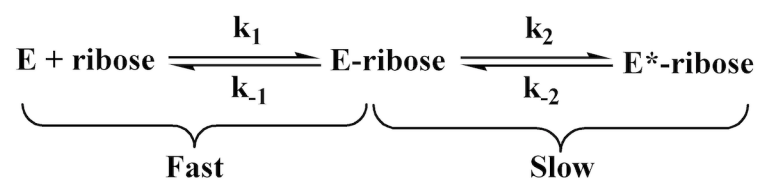


Figure 6.

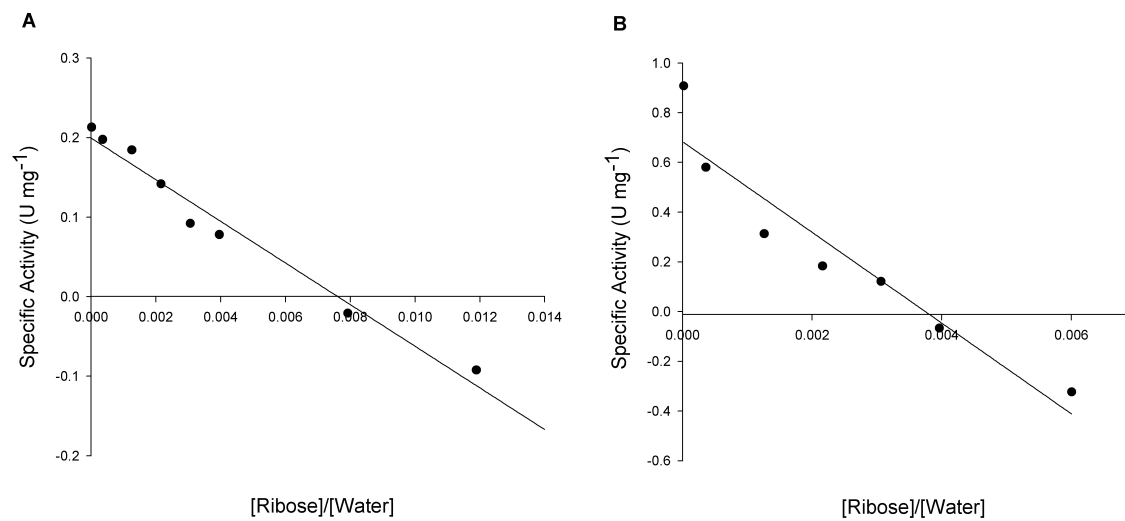


Figure 7.

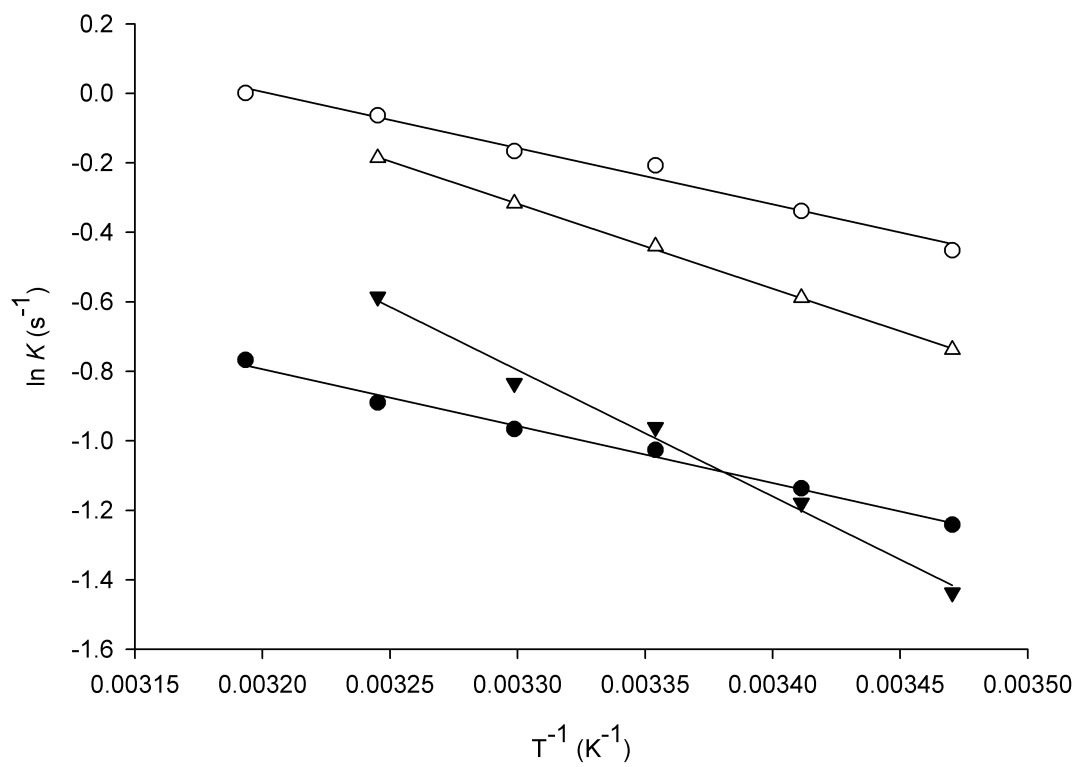


Figure 8.

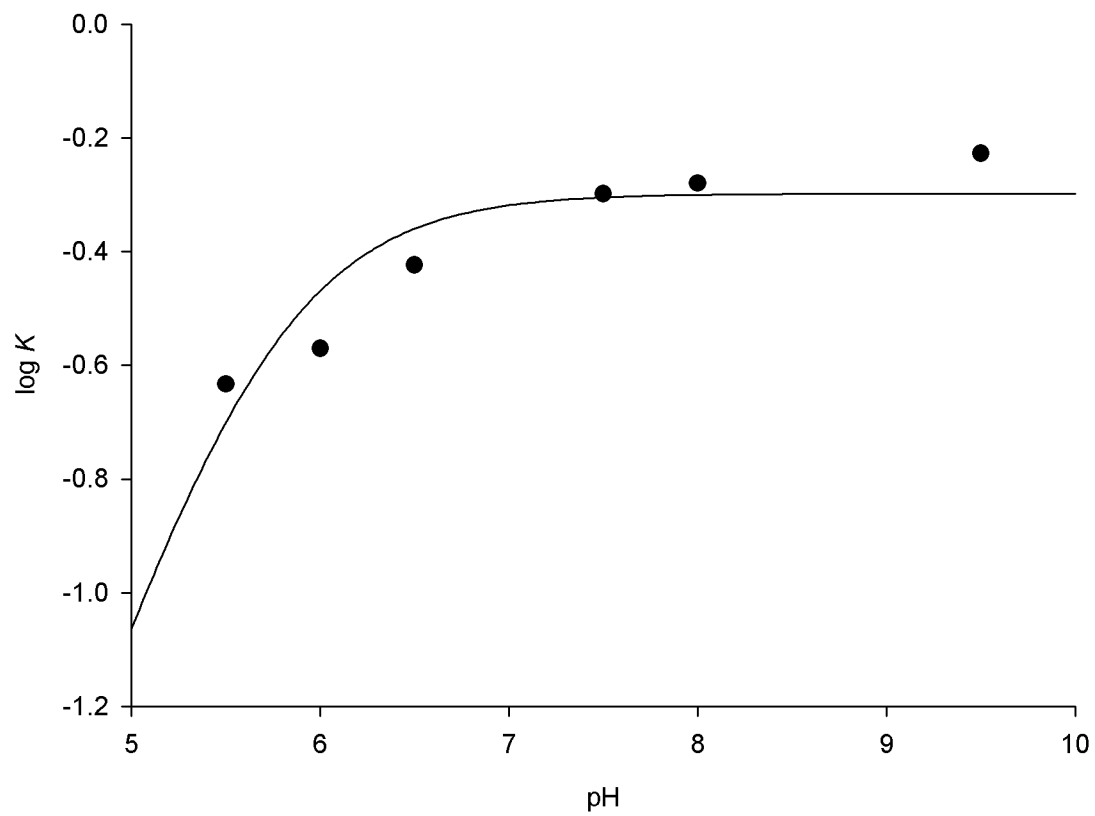
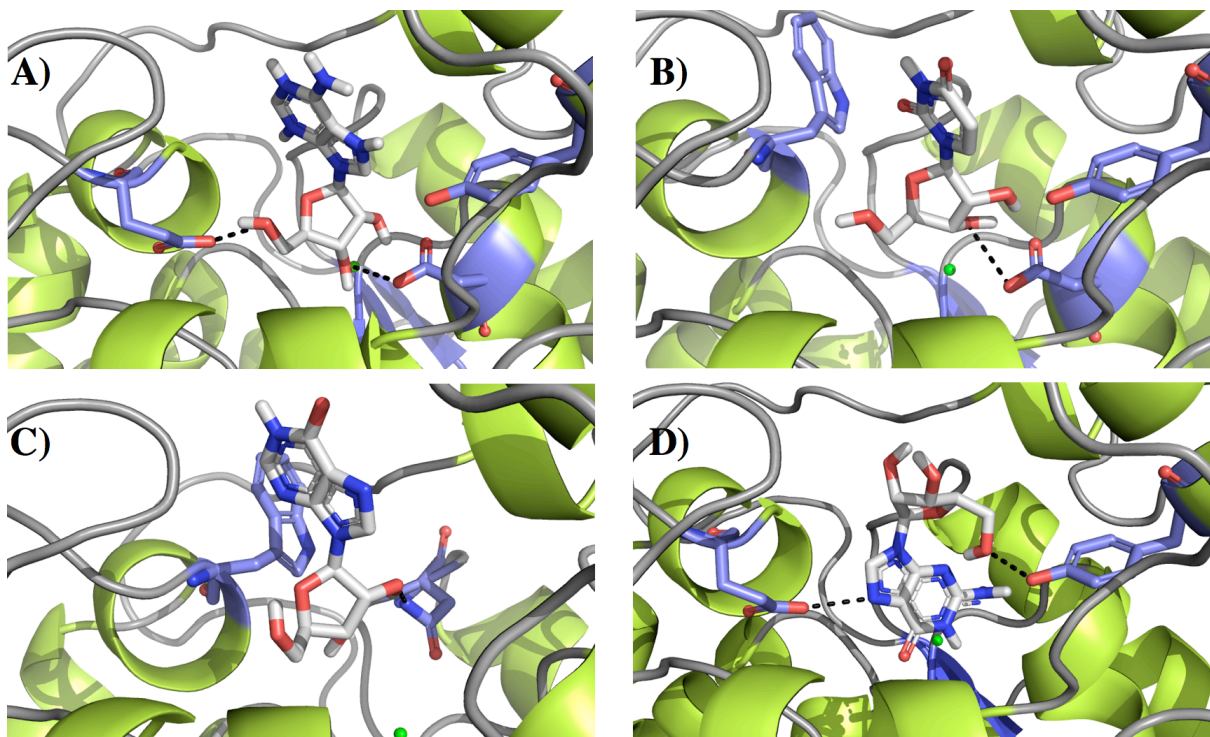


Figure 10.



Capítulo 3

Nocautе gênico da sequência de DNA
correspondente ao gene *iunH* de
Mycobacterium tuberculosis H37Rv

Nocaute gênico da sequência de DNA correspondente ao gene *iunH* de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

O nocaute gênico, substituição gênica ou troca alélica é uma técnica de mutagênese direcionada que explora os mecanismos naturais de recombinação homóloga de um organismo. Tal metodologia permite a substituição específica de uma determinada sequência genômica por uma cópia contendo mutações definidas, obtida por recombinação homóloga. A construção e caracterização de mutantes são essenciais à análise biológica de qualquer organismo, permitindo que a função e regulação de genes específicos sejam determinadas e melhor compreendidas (66).

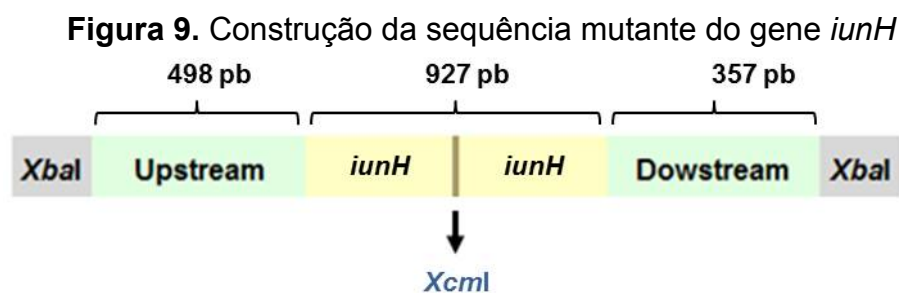
A estratégia de mutagênese sítio-dirigida por substituição gênica é uma técnica genética fundamental à avaliação não apenas da função de um gene, mas também de sua relevância à patogênese e virulência do microrganismo. Além disso, linhagens mutantes podem ser utilizadas na elucidação do modo de ação de fármacos e na validação de alvos moleculares cujo estudo visa o desenvolvimento de futuros fármacos antibacterianos. E, como certos mutantes de bactérias patogênicas exibem um fenótipo atenuado, os mesmos podem ser usados no desenvolvimento de novas vacinas (67).

As estratégias de substituição gênica, em geral, envolvem três passos: 1) clonagem de um gene ou região genômica em um vetor apropriado e geração de uma mutação; 2) transferência de DNA mutante à bactéria hospedeira; e 3) seleção de mutantes. A recombinação entre as sequências homólogas presentes no cromossomo da micobactéria e no vetor de transferência leva à inserção do DNA transformante no genoma. Desta forma, a recombinação homóloga é utilizada para a inserção de uma sequência vetorial em um local apropriado do cromossomo através de um evento de *crossover* simples (SCO). Um evento de *crossover* duplo (DCO) pode tanto restaurar a estrutura original do cromossomo como resultar na deleção do gene esperado. Caso o gene-alvo seja essencial ao organismo, o único *crossover* possível de acontecer será aquele que preserva o gene, sem deletá-lo (67).

O uso de um sistema como este, além da eficiência e confiança da técnica, facilita a geração rápida de novas cepas mutantes. A recombinação homóloga em *M. tuberculosis* ocorre em frequência baixa, o que dificulta a obtenção de mutantes definidos nessa micobactéria (68). Portanto, o sucesso no isolamento de mutantes em *M. tuberculosis* é dependente da habilidade de técnicas genéticas e protocolos

utilizados para compensar para a baixa eficiência de transformação e possibilitar a detecção eficiente ou seleção de mutantes de troca alélica entre a população total de transformantes (69). O pPR27xylE consiste em um vetor replicativo e integrativo que, devido às suas propriedades seletivas, evita os problemas decorrentes da baixa eficiência de transformação, é eficientemente perdido em determinadas condições e permite a eliminação de clones que ainda contenham o vetor, possibilitando assim a detecção de eventos genéticos muito raros (70). Um sistema com estas características foi desenvolvido, utilizando as propriedades seletivas do gene *sacB*, do gene *xylE* e da origem de replicação micobacteriana termossensível, permitindo a seleção de mutantes de inserção positivos (70). O protocolo utilizado está descrito detalhadamente abaixo.

O fragmento de DNA, incluindo o gene *iunH* (927 pb) e as regiões flanqueadoras *upstream* (498 pb) e *downstream* (357 pb) ao gene (tamanho total de 1.782 pb) (Figura 9), foi amplificado a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv utilizando dois oligonucleotídeos iniciadores (5'-TTTTTCTAGAGCAGCAGGCGATGCGCCAGG-3' e 5'-TTTTTCTAGAGACCCGTCGCCGGCGGTGC-3') complementares às porções 5' e 3' das regiões flanqueadoras do gene *iunH*, contendo sítios para a enzima de restrição *Xba*I (New England Biolabs) (sublinhados).



Nota: Fragmento amplificado a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv, mostrando o sítio para a enzima de restrição *Xcm*I que existe naturalmente na sequência do gene *iunH* (tipo selvagem). Em verde estão representadas as regiões que flanqueiam o gene *iunH* que foram incluídas na construção.

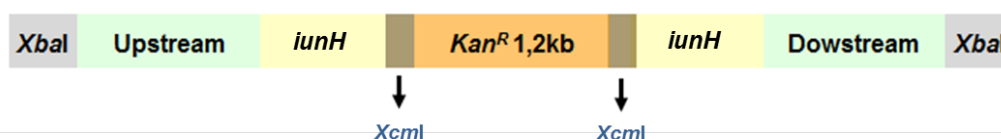
Este fragmento de DNA foi clonado no vetor pUC19 (Invitrogen) utilizando o sítio de restrição *Xba*I. O vetor pUC19 é um vetor com alta taxa de replicação e possui um gene *lacZ*, codificante para a enzima β -galactosidase, responsável por catalisar a clivagem da galactose e que pode ser induzido por isopropil β -D-

tiogalactopiranosídeo (IPTG). Quando não há a inserção do fragmento de DNA de interesse, o gene *lacZ* é transcrito normalmente. O reagente 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo (X-Gal), um análogo da galactose, é utilizado como substrato no meio de cultura e, depois de metabolizado, torna as colônias azuis. As bactérias contendo o plasmídeo com o inserto de interesse não transcrevem o gene *lacZ* e não metabolizam o X-Gal, gerando colônias brancas facilmente distintas das células não recombinantes.

A seguir, os plasmídeos recombinantes foram transformados em células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes com seleção em meio de cultura Luria-Bertani (LB) sólido, contendo ampicilina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (antibiótico de resistência do vetor), X-Gal $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,5 \text{ mM}$ de IPTG com posterior propagação em meio LB líquido contendo o mesmo antibiótico. O isolamento do DNA plasmidial das células transformadas foi realizado utilizando-se kit de purificação (Qiaprep Spin Miniprep, Qiagen). O sequenciamento automático de DNA confirmou a identidade e integridade do gene *iunH* e das regiões flangeadoras, mostrando que nenhuma mutação ocorreu na etapa de amplificação.

Subsequentemente, o cassete contendo o gene que confere resistência à canamicina (kan^R) (1252 pb, extraído do vetor pUC4K com a enzima de restrição *HincII*) foi inserido no vetor pUC19::*iunH* utilizando o sítio de restrição *XcmI* (New England Biolabs), o qual está presente naturalmente na sequência do gene *iunH* (Figura 10).

Figura 10. Construção da sequência do gene *iunH* mutante contendo o cassete resistente à canamicina



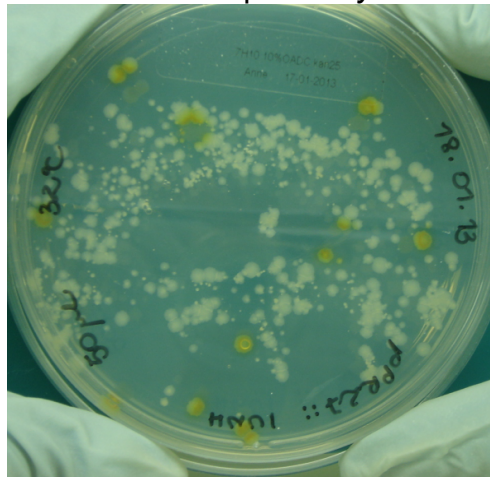
Nota: O cassete contendo o gene que confere resistência à canamicina foi inserido no gene *iunH* utilizando o sítio *XcmI* que existe naturalmente na sequência do gene (tipo selvagem). Em amarelo estão representadas as regiões que flanqueiam o gene *iunH* que foram incluídas na construção.

O fragmento foi isolado e clonado no vetor pPR27*xyIE* utilizando o sítio de restrição *XbaI*. O vetor pPR27*xyIE* possui algumas características que facilitam a seleção de mutantes por inserção em *M. tuberculosis*, como 1) origem de replicação

micobacteriana termossensível: a 32 °C o vetor replica e a 39 °C ele não replica, facilitando o evento de recombinação homóloga; 2) presença do gene *sacB*: a expressão do gene é letal na presença de sacarose; 3) presença do gene *xyIE*: a expressão do gene pode ser verificada com catecol, quando colônias amarelas são obtidas (70).

A construção pPR27*xyIE* iunH::kan foi transformada por eletroporação em *M. tuberculosis* H37Rv. As células foram recuperadas em 5 mL do meio de cultura Middlebrook 7H9 Tween 80 0,05%, OADC 10% (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), canamicina 25 mg mL⁻¹ por 48 horas a 32 °C, foram semeadas em meio de cultura Middlebrook 7H10 OADC 10%, canamicina 25 mg mL⁻¹ e incubadas a 32 °C. Após aproximadamente um mês de cultivo, colônias amarelas foram verificadas após a adição de 1% de catecol nas colônias (**Figura 11**).

Figura 11. Visualização das colônias amarelas de *M. tuberculosis* H37Rv transformadas com pPR27*xyIE* iunH::kan

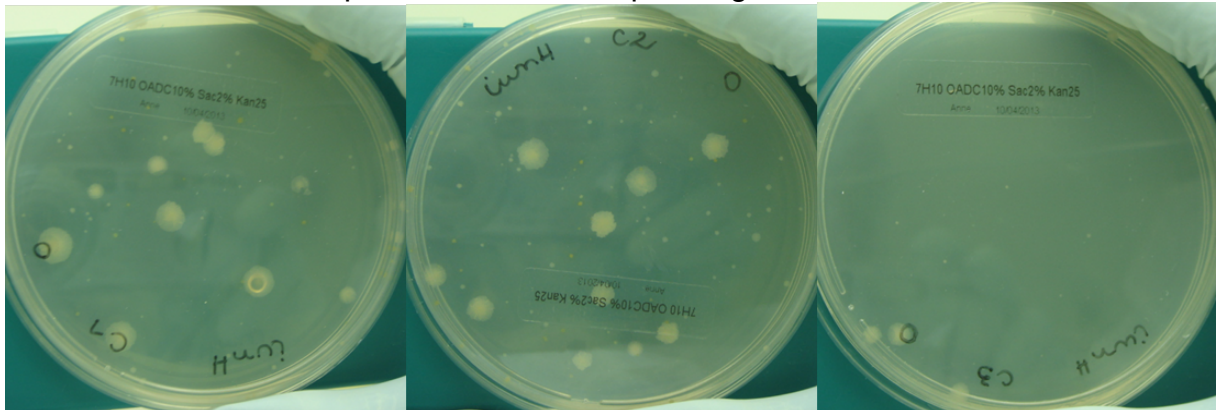


Nota: Colônias cultivadas a 39 °C, são kan^R e *XyIE*⁺. O catecol foi adicionado em apenas algumas colônias para evitar a contaminação.

Três colônias amarelas (kan^R e *XyIE*⁺) foram inoculadas, separadamente, em 5 mL do meio de cultura Middlebrook 7H9 Tween 80 0,05%, OADC 10%, canamicina 25 mg mL⁻¹ a 32 °C e incubadas por aproximadamente um mês. A seguir, as culturas foram diluídas (0, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴) utilizando meio de cultura e 200 µL de cada diluição foi semeado em Middlebrook 7H10 OADC 10% contendo canamicina 25 mg mL⁻¹ e sacarose 2%. As placas foram incubadas a 39 °C durante aproximadamente um mês e, então, as colônias foram selecionadas após a adição de 1% de catecol. Todas as colônias grandes apresentaram coloração branca (sac^R, kan^R e *xyIE*⁻)

(Figura 12), sugerindo que a troca alélica ocorreu. Nove colônias brancas foram inoculadas, separadamente, em 5 mL do meio de cultura Middlebrook 7H9 Tween 80 0,05%, OADC 10%, canamicina 25 mg mL⁻¹ a 37 °C e incubadas durante aproximadamente um mês. O DNA genômico das cepas foi extraído.

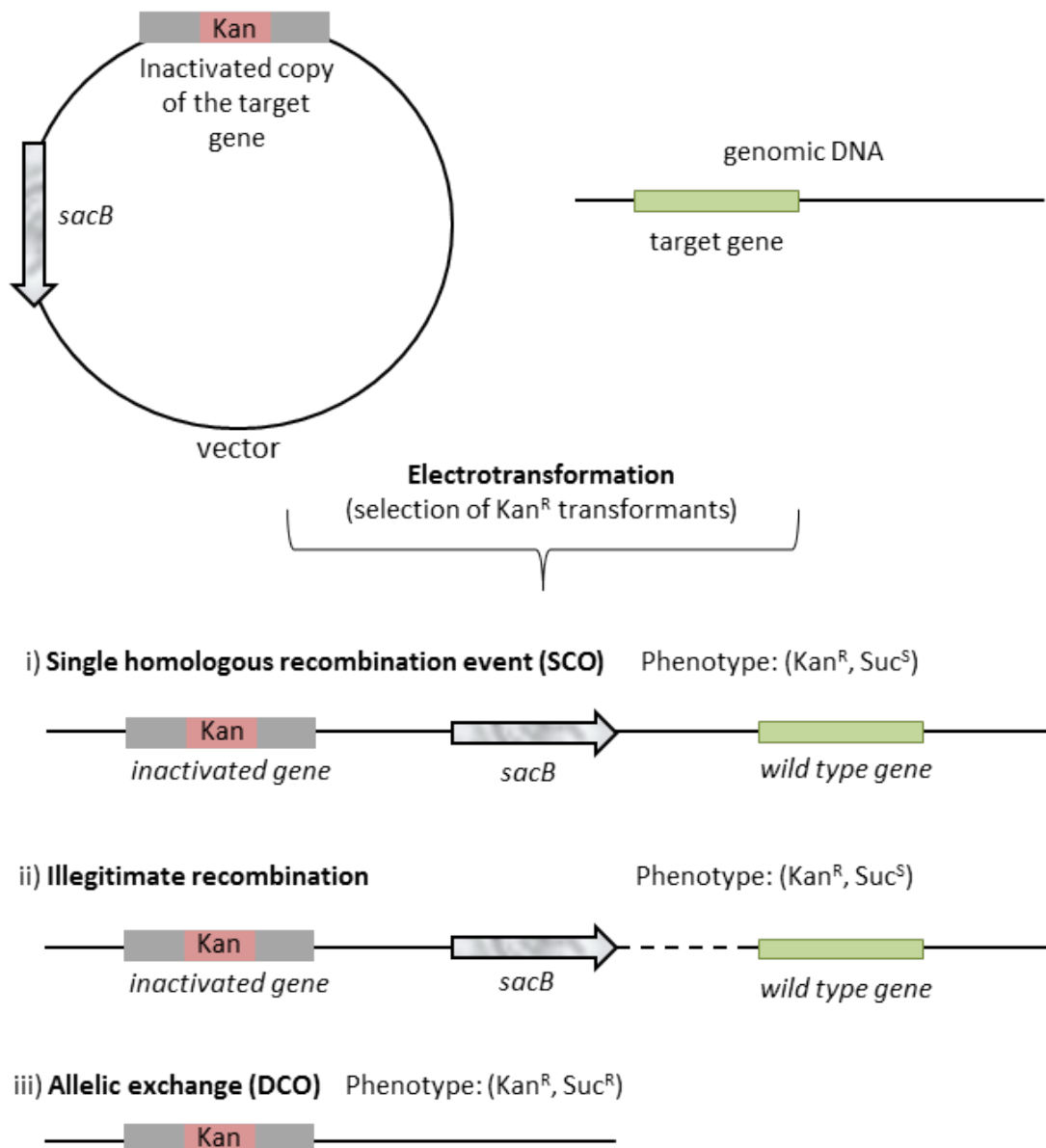
Figura 12. Visualização das colônias brancas de *M. tuberculosis* H37Rv como prováveis mutantes para o gene *iunH*



Nota: Colônias cultivadas a 32 °C, são *sac*^R, *kan*^R e *xyIE*. Os três clones apresentaram 100% de colônias grandes brancas quando testadas com catecol, sugerindo que o gene *iunH* não é essencial para o crescimento de *M. tuberculosis* nestas condições testadas.

Para verificar a obtenção de mutantes, ou seja, eventos de DCO, dois oligonucleotídeos iniciadores (5'-TTCAGGAAACGAGCGAAGGT-3' e 5'-GTGCTATCCGGCGGACAC-3') que anelam fora da região clonada no vetor pPR27*xyIE* foram utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR). A Figura 13 ilustra os três diferentes eventos que podem ter ocorrido (69): i) DCO: um fragmento de 3.254 pb seria obtido devido à presença do cassete contendo o gene que confere resistência à canamicina interrompendo o gene *iunH*; ii) SCO: nenhum fragmento seria observado, uma vez que o fragmento a ser amplificado seria muito grande (aproximadamente 15.000 pb) devido à inserção do corpo do vetor pPR27*xyIE* no DNA genômico juntamente com a cópia do gene *iunH* interrompida e a cópia selvagem; iii) recombinação ilegítima: um fragmento do tamanho de 2.002 pb seria observado, que é o tamanho referente à cópia selvagem do gene *iunH* e das regiões flangeadoras, uma vez que a recombinação do pPR27*xyIE iunH::kan* ocorreria de forma não homóloga entre qualquer parte do plasmídeo e do cromossomo, sendo inserido em qualquer região.

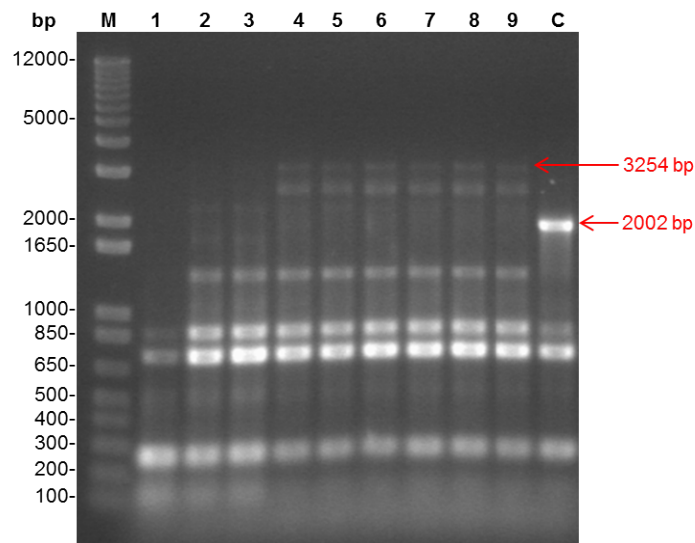
Figura 13. Possíveis eventos ocorridos após a obtenção de cepas de *M. tuberculosis* H37Rv mutantes



Fonte: Adaptado de Jackson et al, 2001.

Nove clones foram analisados e conforme mostrado na **Figura 14**, seis dos clones possuíam o gene *iunH* interrompido pelo cassete de canamicina (DCO) e a ausência da cópia selvagem do gene (clones 4, 5, 6, 7, 8 e 9). Diante deste contexto, o gene *iunH* não é essencial para o crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv, nas condições empregadas no experimento.

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR para verificação da obtenção de cepas de *M. tuberculosis* H37Rv mutantes para o gene *iunH*



Nota: M: marcador de peso molecular; 1-9: PCR realizado com o DNA genômico extraído dos mutantes; C: controle, PCR realizado com o DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv tipo selvagem.

Construção da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv mutante para o gene *iunH* complementada com uma cópia extra do gene *iunH*:

A cepa de *M. tuberculosis* H37Rv mutante para o gene *iunH* está sendo complementada com uma cópia extra do gene *iunH*, para ser utilizada como controle nos experimentos subsequentes, mostrando que a estratégia de nocaute utilizada afetou apenas o gene em questão. Assim, a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv mutante para o gene *iunH* foi complementada com o vetor pNIP40 contendo uma cópia extra do gene *iunH* de *Mycobacterium smegmatis* (Msmeag_1621, gene ortólogo ao gene *iunH* de *M. tuberculosis*). Dois pares de oligonucleotídeos iniciadores (5'-TTTTTCTAGACGAGCCCCGGCCTGCATCGA-3' e 5'-TTTTTCTAGACGGCGCGCGCAGGTGCT-3') contendo sítios para a enzima de restrição *Xba*I (sublinhados) foram utilizados para amplificar o gene *iunH* de *M. smegmatis* (tamanho total de 1.348 pb). Este fragmento de DNA foi clonado no vetor pNIP40 utilizando o sítio de restrição *Xba*I (pNIP40::Ms_ *iunH*) e seguindo os mesmos passos de seleção de culturas e isolamento descritos acima, porém com o antibiótico de resistência específico para este vetor. O sequenciamento automático de DNA confirmou a identidade e integridade do gene *iunH*, mostrando que nenhuma mutação ocorreu nas etapas de amplificação e clonagem.

Capítulo 4

Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A TB é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo *M. tuberculosis*. Apesar da disponibilidade do tratamento padrão preconizado pela OMS (DOTS) e da existência da vacina BCG, o que resultou na redução nos casos de TB nas últimas duas décadas, ela permanece entre as principais causas de morte por doenças infecciosas mundialmente, especialmente na Ásia e na África, com grande incidência de novos casos a cada ano (4). Com o aumento no número de indivíduos infectados com o HIV, torna-se preocupante o número de hospedeiros com a TB ativa capazes de transmitir a doença (20). Além disso, a emergência de linhagens de *M. tuberculosis* MDR e XDR evidencia a urgente necessidade de desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para controlar a TB no mundo.

O desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes, menos tóxicos, com menor duração de tratamento e que sirvam para tratar todas as formas de TB, bem como a vacinação em massa com vacinas mais efetivas que a BCG são fundamentais para diminuir a incidência global da TB (4). Neste contexto, as enzimas envolvidas no metabolismo de purinas e pirimidinas tornam-se alvos moleculares interessantes para compostos inibidores, uma vez que são responsáveis pela biossíntese dos precursores do DNA e RNA e, portanto, essenciais à progressão da TB. Do mesmo modo, a reutilização de bases purínicas e pirimídicas pela via de salvamento é preferencialmente utilizada porque demanda menos energia. Assim, o estudo das enzimas da via de salvamento de purinas e pirimidinas, a fim de determinar a sua importância no metabolismo do bacilo causador da TB, parece ser de grande importância para o descobrimento de novos alvos potenciais para novos fármacos. Além disso, a investigação do papel dos produtos dos genes envolvidos nestas vias durante o crescimento *in vitro* e *in vivo* do *M. tuberculosis* H37Rv podem fornecer informações fundamentais possibilitando a atenuação desta cepa como futura candidata à nova vacina contra a TB.

Os resultados obtidos neste trabalho incluíram a amplificação do gene *iunH*, a expressão da proteína recombinante na cepa de *E. coli* C41(DE3) e a purificação da MtlAGU-NH funcional a partir de um protocolo de três etapas cromatográficas. A determinação da massa molecular intacta e o sequenciamento peptídico confirmaram a identidade da proteína recombinante. Além disso, foi possível identificar a presença de um íon cálcio por subunidade da enzima, indicando que a

*Mtl*AGU-NH é uma metaloenzima, assim como as outras NHs já estudadas, onde o íon de cálcio é responsável pela estabilização da ligação da enzima à porção ribose do substrato (1).

A cromatografia de exclusão por tamanho sugere que a *Mtl*AGU-NH não complexada a ligantes (forma apo) é monomérica em solução, enquanto que os resultados obtidos por meio da técnica de reação cruzada, utilizando glutaraldeído, indicaram que a enzima pode apresentar estados oligoméricos variados dependendo da associação dos seus ligantes.

Os resultados cinéticos em estado estacionário indicaram que a proteína recombinante possui uma ampla especificidade pelo substrato, aceitando a inosina, adenosina, guanosina e uridina. A inosina e adenosina apresentam cinética de cooperatividade homotrópica positiva, sendo um indicativo de alosteria, diferente das NHs produzidas de protozoários, cujas curvas de saturação para os substratos purínicos e pirimídicos apresentam perfil hiperbólico. Por outro lado, a guanosina e a uridina apresentaram curvas de saturação hiperbólicas, e a técnica de ITC foi utilizada para determinar as constantes cinéticas para a uridina, devido à saturação não ter sido atingida utilizando o ensaio espectrofotométrico. Isto se deve ao fato de o valor de K_M para a uridina ser muito alto e maior que os valores encontrados para a inosina, adenosina e guanosina. Entretanto, o valor de atividade máxima para a uridina (V_{max}) também foi maior do que os valores encontrados para os outros substratos testados. As constantes de segunda ordem encontradas para a uridina e guanosina mostram que as constantes de especificidade para estes substratos são similares. Infelizmente, esta constante não pôde ser estimada para a inosina e adenosina, porque ambos os substratos apresentaram curvas de saturação sigmoidais.

As medidas cinéticas da ligação da ribose à *Mtl*AGU-NH por espectroscopia fluorimétrica sugerem a existência de duas formas da enzima em equilíbrio, E e E*, com a ribose ligando-se efetivamente em E e pouco em E*. Neste mecanismo, acredita-se que a isomerização é mais lenta comparada às etapas de ligação da *Mtl*AGU-NH à ribose. Acredita-se que o equilíbrio $E^* \rightleftharpoons E$ formado pela ligação da ribose à enzima é devido à existência de estados oligoméricos da *Mtl*AGU-NH diferentes, como pôde ser observado nos resultados do experimento de reação cruzada utilizando glutaraldeído.

As concentrações intracelulares de inosina, uridina, hipoxantina e uracil, no bacilo *M. tuberculosis*, foram determinadas por HPLC para que as constantes de equilíbrio para os substratos inosina e uridina pudessem ser determinadas e, conseqüentemente, os parâmetros termodinâmicos estimados. As constantes de equilíbrio (K_{eq}) foram determinadas e a energia livre padrão (ΔG°) pôde ser calculada, sugerindo que ambas as reações não são espontâneas. Por outro lado, levando-se em conta as concentrações intracelulares de inosina, uridina, hipoxantina e uracil obtidas por HPLC, foi possível inferir a concentração mínima de ribose necessária para que o processo seja favorável ($\Delta G < 0$). Para tal, a concentração intracelular de α -ribose deve ser menor que 0,3 M para a reação com inosina e 2 M para a reação com uridina. Dessa forma, acredita-se que estes processos sejam favoráveis no meio intracelular do bacilo. Entretanto, existem outras proteínas de *M. tuberculosis* que catalisam as reações que podem produzir as bases livres hipoxantina e uracil, como a purina nucleosídeo fosforilase (PNP), que está envolvida no metabolismo tanto de purinas como de pirimidinas podendo, de certo modo, justificar a baixa espontaneidade das reações catalisadas pela *MtIAGU-NH* (72).

Os parâmetros termodinâmicos de ativação (E_a , ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger) para as reações químicas catalisadas pela *MtIAGU-NH* foram determinados por meio do ensaio de energia de ativação com os substratos inosina, adenosina, guanosina e uridina. Verificou-se que a energia necessária para que o início da reação ocorra para a inosina e uridina é menor comparado à adenosina e guanosina. Não houve diferença nos valores obtidos para ΔG^\ddagger (energia livre de ativação), sugerindo que não há diferença de espontaneidade para que as quatro reações diferentes ocorram. Com isso, há uma compensação entalpia-entropia, resultando em valores de ΔG^\ddagger que independem da variação da temperatura, comumente encontrado em interações proteína:ligante (73).

O ensaio de perfil de pH indicou que a protonação de um grupo com o valor de pK_a de aproximadamente 5,7 afeta a catálise e, como a inosina não possui grupos ionizáveis nesta faixa de pH, este valor de pK_a representa um grupo ionizável da enzima, o qual está envolvido na catálise. O alinhamento da sequência de aminoácidos da NH de *M. tuberculosis* com enzimas homólogas de *C. fasciculata* e *L. major*, cujas estruturas terciária e quaternária estão depositadas no PDB, mostrou que os resíduos envolvidos na catálise estão conservados entre as NHs. Assim,

analisando os resultados obtidos com o experimento de perfil de pH e os dados do alinhamento de sequências, há evidências de que o aminoácido His241 da *MtIAGU-NH* esteja envolvido na catálise. Este resíduo está conservado entre as NHs e parece ser essencial durante a catálise, uma vez que a substituição da histidina por alanina (His241Ala) resultou em grande perda da atividade enzimática da NH de *C. fasciculata* (52).

Experimentos de modelagem e docagem molecular foram realizados a fim de comparar as diferenças de ligação dos substratos inosina, adenosina, guanosina e uridina à *MtIAGU-NH* e, os padrões de interação, como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas foram estudados. De acordo com a modelagem molecular, a cadeia lateral dos resíduos Asp2, Asp9 e Asp14 são estabilizados pelo íon cálcio presente na estrutura da enzima *MtIAGU-NH*. A docagem molecular apresentou um padrão de ligação similar para inosina, adenosina e uridina ao comparar os resíduos de aminoácidos envolvidos no modo de ligação da porção da ribose à estrutura da *MtIAGU-NH* com os de NHs de diferentes organismos, sugerindo que os experimentos de docagem molecular reproduziram o modo correto de ligação da porção da ribose dos nucleosídeos. De acordo com a docagem molecular, a guanosina apresentou um padrão de ligação diferente, com a porção da base voltada para o interior do sítio. No entanto, análises por dinâmica molecular são necessárias para averiguar se o complexo obtido por meio da docagem molecular é estável.

Estes resultados possibilitaram a caracterização da enzima NH de *M. tuberculosis* codificada pelo gene *iunH* e a validação do seu papel bioquímico. Além disso, os dados apresentados podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias profiláticas eficientes para reduzir a incidência global da TB. Os resultados obtidos com os estudos bioquímicos da *MtIAGU-NH*, apresentados no **Capítulo 2**, foram reunidos em um manuscrito que foi submetido à revista internacional *Archives of Biochemistry and Biophysics* que possui um fator de impacto de 3,37.

Visando analisar a importância da enzima *MtIAGU-NH* na rota de salvamento de purinas e pirimidinas e no metabolismo do *M. tuberculosis*, o nocaute do gene *iunH* em *M. tuberculosis* H37Rv foi realizado por meio de recombinação homóloga, onde pôde-se verificar que o gene não é essencial para o crescimento do *M. tuberculosis* H37Rv nas condições empregadas no experimento que estão descritas no **Capítulo 3**. Os níveis da proteína *MtIAGU-NH*, produto do gene *iunH*, nas cepas

mutantes contendo o gene *iunH* inativado, selvagem e complementada com uma cópia extra do gene *iunH*, serão analisados utilizando duas estratégias complementares baseadas em espectrometria de massa. Os peptídeos proteotípicos obtidos a partir de experimentos de LC-MS/MS com os extratos proteicos das cepas selvagem, mutante e complementada de *M. tuberculosis* para o gene *iunH* serão analisados. Espera-se que a proteína *MtIAGU-NH* esteja presente somente nas cepas selvagem e complementada e ausente na cepa mutante, validando assim a deleção do gene *iunH*. Como estratégia de validação complementar, serão realizados experimentos de proteômica comparativa entre essas três cepas. Espera-se que os resultados obtidos para a expressão da proteína com o monitoramento de peptídeos proteotípicos, de maior sensibilidade, sejam confirmados pela análise proteômica global. Além disso, pretende-se, com a análise proteômica, avaliar se ocorrem alterações inesperadas ou ainda não caracterizadas no perfil proteômico dessas três cepas. Alterações compartilhadas entre as cepas mutante e complementada seriam resultantes dos processos de manipulação requeridos pela técnica, ao passo que alterações exclusivamente encontradas na cepa mutante estariam relacionadas à ausência da *MtIAGU-NH* nesses organismos.

Além disto, a cepa mutante também será validada funcionalmente, confirmando que, de fato, não possui atividade de *MtIAGU-NH*. Para tal, o nucleosídeo purínico inosina deuterado na porção ribosídica será utilizado, de forma que o produto ribose resultante da hidrólise pela *MtIAGU-NH* seja deuterado, o que possibilitará a sua detecção por espectrometria de massa. A ausência de detecção de ribose deuterada na cepa mutante confirmará a ausência de atividade *MtIAGU-NH*, validando o nocaute do gene.

Serão realizadas curvas de crescimento para as cepas *M. tuberculosis* mutante para o gene *iunH*, complementada e tipo selvagem, para avaliar se a ausência do gene *iunH* afeta o crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv.

A análise da expressão da *MtIAGU-NH* em um modelo *in vitro* que mimetize a latência também será realizada, de modo que se verifique se a enzima pode estar envolvida em condições de latência de *M. tuberculosis*. Além disso, os mutantes serão avaliados quanto à sua capacidade de infecção em macrófagos e em modelo animal, a fim de verificar a sua capacidade de infecção e de virulência.

Estes experimentos que investigarão a virulência do *M. tuberculosis* mutante para o gene *iunH* fornecerão informações fundamentais quanto à atenuação desta cepa e futuro uso como candidata a uma nova vacina contra a TB.

Os resultados aqui apresentados proporcionaram um maior entendimento sobre o modo de ação da enzima *MtIAGU-NH* no metabolismo de nucleotídeos do *M. tuberculosis* H37Rv e permitiram propor que esta micobactéria depende de outras enzimas alternativas para suprir as necessidades de hipoxantina, adenina, guanina e uracil na ausência da proteína em estudo.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393(6685):537-44.
2. Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption -- a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(7):697-714.
3. Palomino J, Leão S, Ritacco V. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007. Available from: www.TuberculosisTextbook.com.
4. Global Tuberculosis Report 2012. Geneva: World Health Organization, 2012.
5. Jain A, Mondal R. Extensively drug-resistant tuberculosis: current challenges and threats. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;53(2):145-50.
6. Pieters J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe*. 2008;3(6):399-407.
7. Yew WW, Leung CC. Update in tuberculosis 2007. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(5):479-85.
8. Maartens G, Wilkinson RJ. Tuberculosis. *Lancet*. 2007;370(9604):2030-43.
9. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;123(1-2):11-8.
10. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:29-63.
11. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161(4 Pt 1):1376-95.
12. Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: Here today, and here tomorrow. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(8):569-77.
13. Young D, Stark J, Kirschner D. Systems biology of persistent infection: tuberculosis as a case study. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(7):520-8.
14. Stewart GR, Robertson BD, Young DB. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol*. 2003;1(2):97-105.
15. Basso LA, da Silva LH, Fett-Neto AG, de Azevedo WF, Moreira leS, Palma MS, et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined

molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(6):475-506.

16. Bloom BR, Murray CJ. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*. 1992;257(5073):1055-64.
17. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA*. 1999;282(7):677-86.
18. Hoft DF. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet*. 2008;372(9633):164-75.
19. Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*. 1998;6(3):107-12.
20. Manabe YC, Bishai WR. Latent *Mycobacterium tuberculosis* - persistence, patience, and winning by waiting. *Nature Medicine*. 2000;6(12):1327-9.
21. Nolan CM. Nosocomial multidrug-resistant tuberculosis--global spread of the third epidemic. *J Infect Dis*. 1997;176(3):748-51.
22. Elston JW, Thaker HK. Co-infection with human immunodeficiency virus and tuberculosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2008;74(3):194-9.
23. Kaufmann SHE. A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: Those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis*. 2003;83(1-3):86-90.
24. Burman WJ. Rip Van Winkle wakes up: development of tuberculosis treatment in the 21st century. *Clin Infect Dis*. 2010;50 Suppl 3:S165-72.
25. Zumla A, Nahid P, Cole ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(5):388-404.
26. Dorman SE, Chaisson RE. From magic bullets back to the Magic Mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nature Medicine*. 2007;13(3):295-8.
27. Ginsberg AM, Spigelman M. Challenges in tuberculosis drug research and development. *Nat Med*. 2007;13(3):290-4.
28. Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, Tabarsi P, Ghanavi J, ZiaZarifi AH, et al. Emergence of New Forms of Totally Drug-Resistant Tuberculosis Bacilli Super Extensively Drug-Resistant Tuberculosis or Totally Drug-Resistant Strains in Iran. *Chest*. 2009;136(2):420-5.

29. Velayati AA, Farnia P, Masjedi MR, Ibrahim TA, Tabarsi P, Haroun RZ, et al. Totally drug-resistant tuberculosis strains: evidence of adaptation at the cellular level. *European Respiratory Journal*. 2009;34(5):1202-3.
30. Udwardia ZF. Totally drug resistant tuberculosis in India: who let the djinn out? *Respirology*. 2012;7(10):1440-843.
31. Loewenberg S. India reports cases of totally drug-resistant tuberculosis. *Lancet*. 2012;379(9812):205.
32. Duncan K. Progress in TB drug development and what is still needed. *Tuberculosis*. 2003;83(1-3):201-7.
33. Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet*. 2006;367(9517):1173-80.
34. Kaufmann SH. A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis (Edinb)*. 2003;83(1-3):86-90.
35. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5th ed. New York: W H Freeman; 2002.
36. el Kouni MH. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacol Ther*. 2003;99(3):283-309.
37. Xu Y, Johansson M, Karlsson A. Human UMP-CMP kinase 2, a novel nucleoside monophosphate kinase localized in mitochondria. *J Biol Chem*. 2008;283(3):1563-71.
38. Moffatt BA, Ashihara H. Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis Book*. 2002;1:e0018.
39. Parker WB, Long MC. Purine metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* as a target for drug development. *Curr Pharm Des*. 2007;13(6):599-608.
40. Ducati RG, Breda A, Basso LA, Santos DS. Purine Salvage Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Med Chem*. 2011;18(9):1258-75.
41. Wheeler PR. Enzymes for purine synthesis and scavenging in pathogenic mycobacteria and their distribution in *Mycobacterium leprae*. *J Gen Microbiol*. 1987;133(11):3013-8.
42. Neuhard J, Kelln RA. *Biosynthesis and conversion of pyrimidines*. 2nd ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1996.
43. Moffatt B, Ashihara H. Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. Rockville, MD, Online publication: American Society of Plant Biologists; 2002.

44. Villela AD, Sánchez-Quitian ZA, Ducati RG, Santos DS, Basso LA. Pyrimidine salvage pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Med Chem*. 2011;18(9):1286-98.
45. Versées W, Steyaert J. Catalysis by nucleoside hydrolases. *Curr Opin Struct Biol*. 2003;13(6):731-8.
46. Takagi Y, Horecker BL. Purification and properties of a bacterial riboside hydrolase. *J Biol Chem*. 1957;225(1):77-86.
47. Terada M, Tatibana M, Hayaishi O. Purification and properties of nucleoside hydrolase from *Pseudomonas fluorescens*. *J Biol Chem*. 1967;242(23):5578-85.
48. Ogawa J, Takeda S, Xie SX, Hatanaka H, Ashikari T, Amachi T, et al. Purification, characterization, and gene cloning of purine nucleosidase from *Ochrobactrum anthropi*. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(4):1783-7.
49. Petersen C, Møller LB. The RihA, RihB, and RihC ribonucleoside hydrolases of *Escherichia coli*. Substrate specificity, gene expression, and regulation. *J Biol Chem*. 2001;276(2):884-94.
50. Parkin DW, Horenstein BA, Abdulah DR, Estupiñán B, Schramm VL. Nucleoside hydrolase from *Crithidia fasciculata*. Metabolic role, purification, specificity, and kinetic mechanism. *J Biol Chem*. 1991;266(31):20658-65.
51. Estupiñán B, Schramm VL. Guanosine-inosine-preferring nucleoside N-glycohydrolase from *Crithidia fasciculata*. *J Biol Chem*. 1994;269(37):23068-73.
52. Gopaul DN, Meyer SL, Degano M, Sacchettini JC, Schramm VL. Inosine-uridine nucleoside hydrolase from *Crithidia fasciculata*. Genetic characterization, crystallization, and identification of histidine 241 as a catalytic site residue. *Biochemistry*. 1996;35(19):5963-70.
53. Pellé R, Schramm VL, Parkin DW. Molecular cloning and expression of a purine-specific N-ribohydrolase from *Trypanosoma brucei brucei*. Sequence, expression, and molecular analysis. *J Biol Chem*. 1998;273(4):2118-26.
54. Shi W, Schramm VL, Almo SC. Nucleoside hydrolase from *Leishmania major*. Cloning, expression, catalytic properties, transition state inhibitors, and the 2.5-Å crystal structure. *J Biol Chem*. 1999;274(30):21114-20.
55. Kurtz JE, Exinger F, Erbs P, Jund R. The URH1 uridine ribohydrolase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 2002;41(3):132-41.
56. Cui L, Rajasekariah GR, Martin SK. A nonspecific nucleoside hydrolase from *Leishmania donovani*: implications for purine salvage by the parasite. *Gene*. 2001;280(1-2):153-62.
57. Ribeiro JM, Valenzuela JG. The salivary purine nucleosidase of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2003;33(1):13-22.

58. Versées W, Van Holsbeke E, De Vos S, Decanniere K, Zegers I, Steyaert J. Cloning, preliminary characterization and crystallization of nucleoside hydrolases from *Caenorhabditis elegans* and *Campylobacter jejuni*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2003;59(Pt 6):1087-9.
59. Parkin DW, Schramm VL. Binding modes for substrate and a proposed transition-state analogue of protozoan nucleoside hydrolase. *Biochemistry*. 1995;34(42):13961-6.
60. Degano M, Gopaul DN, Scapin G, Schramm VL, Sacchettini JC. Three-dimensional structure of the inosine-uridine nucleoside N-ribohydrolase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry*. 1996;35(19):5971-81.
61. Versées W, Decanniere K, Pellé R, Depoorter J, Brosens E, Parkin DW, et al. Structure and function of a novel purine specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax*. *J Mol Biol*. 2001;307(5):1363-79.
62. Parkin DW. Purine-specific nucleoside N-ribohydrolase from *Trypanosoma brucei brucei*. Purification, specificity, and kinetic mechanism. *J Biol Chem*. 1996;271(36):21713-9.
63. Mitterbauer R, Karl T, Adam G. *Saccharomyces cerevisiae* URH1 (encoding uridine-cytidine N-ribohydrolase): functional complementation by a nucleoside hydrolase from a protozoan parasite and by a mammalian uridine phosphorylase. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(3):1336-43.
64. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol*. 2003;48(1):77-84.
65. Griffin JE, Gawronski JD, Dejesus MA, Ioerger TR, Akerley BJ, Sassetti CM. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog*. 2011;7(9):e1002251.
66. Parish T, Stoker NG. Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* tlyA plcABC mutant by gene replacement. *Microbiology*. 2000;146 (Pt 8):1969-75.
67. Wei JR, Rubin EJ. The many roads to essential genes. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008;88 Suppl 1:S19-24.
68. McFadden J. Recombination in mycobacteria. *Mol Microbiol*. 1996;21(2):205-11.
69. Jackson M, Camacho LR, Gicquel B, Guilhot C. *Mycobacterium Tuberculosis* Protocols. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2001.
70. Pelicic V, Jackson M, Reyrat JM, Jacobs WR, Gicquel B, Guilhot C. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(20):10955-60.

71. Lamichhane G. Novel targets in *M. tuberculosis*: search for new drugs. *Trends Mol Med*. 2010.
72. Mascia L, Cappiello M, Cherri S, Ipata PL. In vitro recycling of alpha-D-ribose 1-phosphate for the salvage of purine bases. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1474(1):70-4.
73. Olsson TS, Ladbury JE, Pitt WR, Williams MA. Extent of enthalpy-entropy compensation in protein-ligand interactions. *Protein Sci*. 2011;20(9):1607-18.

Anexo

Carta de aceite - *Archives of
Biochemistry and Biophysics*

From: ees.yabbi.0.234a69.7a2796db@eesmail.elsevier.com [ees.yabbi.0.234a69.7a2796db@eesmail.elsevier.com] on behalf of ABB [abb@elsevier.com]
Sent: Saturday, August 17, 2013 12:33 PM
To: Luiz Augusto Basso
Subject: Acceptance of ABBI-13-243R1

Ms. No.: ABBI-13-243R1

Title: Biochemical characterization of recombinant nucleoside hydrolase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv
Archives of Biochemistry and Biophysics

Dear Dr Basso,

Thank you for submitting your revised paper to Archives of Biochemistry and Biophysics. The review process has concluded, and I am pleased to inform you that your recently revised manuscript has been accepted for publication in Archives of Biochemistry and Biophysics.

The publisher has been notified of this decision, and you will receive confirmation from them shortly.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Sincerely,

Helmut Sies, MD, PhD(hon)
Executive Editor
Archives of Biochemistry and Biophysics