

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

DIANA CAROLINA ROSTIROLLA

**CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E BIOQUÍMICA DA ENZIMA INOSINA
MONOFOSFATO DESIDROGENASE (EC 1.1.1.205) DE *Mycobacterium
tuberculosis* COMO ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES**

Porto Alegre

2013

DIANA CAROLINA ROSTIROLLA

**CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E BIOQUÍMICA DA ENZIMA INOSINA
MONOFOSFATO DESIDROGENASE (EC 1.1.1.205) DE *Mycobacterium
tuberculosis* COMO ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, na área de concentração de Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre

2013

DIANA CAROLINA ROSTIROLLA

**CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA E BIOQUÍMICA DA ENZIMA INOSINA
MONOFOSFATO DESIDROGENASE (EC 1.1.1.205) DE *Mycobacterium
tuberculosis* COMO ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, na área de concentração de Farmacologia Bioquímica e Molecular.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Giandra Volpato – IFRS

Dra. Maria Martha Campos – PUCRS

Dra. Carla Denise Bonan – PUCRS

Dr. Walter F. de Azevedo Jr – PUCRS

Porto Alegre

2013

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Diógenes Santiago Santos, agradeço pela oportunidade de desenvolvimento desse trabalho junto ao seu grupo de pesquisa.

Ao Prof. Luiz Augusto Basso, agradeço pelo conhecimento compartilhado, pelas sugestões e correções do trabalho, bem como pelo estímulo durante todo o desenvolvimento do projeto.

Às minhas colegas e amigas, Anne, Priscila W., Zilpa e Priscila V., agradeço pela ajuda e conhecimento compartilhado durante os momentos de dificuldade deste trabalho. Agradeço também pela amizade, pela compreensão, pelo carinho e, principalmente, pelos momentos de descontração.

Aos meus colegas e amigos do CPBMF, com os quais tive o prazer de compartilhar conhecimentos e que sempre se mostraram dispostos a ajudar na realização desse projeto. Agradeço pelos momentos de descontração, de amizade e companheirismo durante todo o tempo que passamos juntos.

Às minhas amigas e amigos, especialmente a Candida e a Amanda, que sempre estiveram presentes durante essa etapa da minha vida e que sem o carinho e compreensão, essa etapa não teria tanto valor.

Aos meus pais, Iolanda J. Rostirolla e Gelson L. Rostirolla, que mesmo longe sempre apoiaram minhas decisões. Agradeço pelos constantes ensinamentos, pelo estímulo e valores que serão para sempre importantes na minha vida.

Ao meu irmão Rafael A. Rostirolla, agradeço pelos ótimos momentos de convívio, pelo carinho e descontração.

RESUMO

A tuberculose (TB) permanece entre as principais causas de morte por doenças infectocontagiosas e estima-se que um terço da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*. Apesar de existirem tratamentos disponíveis há mais de 50 anos, a TB é responsável por causar altas taxas de mortalidade em todo o mundo. A coinfeção com o HIV e a emergência de TB resistente a múltiplas drogas representam um desafio à saúde pública e têm estimulado a pesquisa por novos e mais efetivos agentes terapêuticos contra a doença. Avanços na identificação de novos alvos para drogas contra a TB têm sido possíveis graças ao sequenciamento do genoma do *M. tuberculosis* H37Rv e incluem a elucidação da função de proteínas envolvidas em rotas bioquímicas essenciais para o crescimento micobacteriano. A enzima Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH, EC 1.1.1.205) é uma enzima chave na biossíntese de nucleotídeos de purina, pois participa de uma etapa limitante na síntese *de novo* de nucleotídeos de guanina, a partir de inosina 5'-monofosfato (IMP). Ela catalisa a oxidação de IMP a xantosina 5'-monofosfato (XMP), com concomitante conversão de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) à sua forma reduzida, NADH. Essa reação controla os níveis de nucleotídeos de guanina e inibidores da IMPDH têm sido utilizados como agentes imunossupressores, anticâncer e antivirais. Recentemente, a IMPDH de *M. tuberculosis* (*Mt*IMPDH) foi descrita como um alvo antimicobacteriano promissor e inibidores desta enzima têm sido reportados. Neste trabalho, foi realizada a clonagem da região codificante do gene *guaB2*, a expressão e a purificação da proteína *Mt*IMPDH. A *Mt*IMPDH recombinante apresentou uma massa molecular média de 54.775 Da e a análise através de Espectroscopia de Absorção Atômica em Chama (FAAS) e Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) identificou um íon K⁺ por subunidade. Os experimentos de reação cruzada, utilizando glutaraldeído, mostraram que a *Mt*IMPDH pode existir como um tetrâmero em solução. Os estudos de cinética em estado estacionário revelaram que a atividade catalítica da *Mt*IMPDH é dependente de cátions monovalentes, principalmente K⁺. Os estudos de velocidade inicial e inibição pelos produtos sugeriram que a catálise procede através de um mecanismo cinético sequencial Bi Bi ordenado, no qual o IMP associa-se primeiramente à *Mt*IMPDH, seguido pela ligação do NAD⁺, e que a transferência do hidreto não é a etapa limitante da reação catalisada pela enzima em estudo. Além disso, a inibição pelo substrato NAD⁺ indica que a liberação dos produtos é ordenada, onde o NADH é o primeiro produto a ser liberado. Os estudos de perfil de pH indicaram que a desprotonação de um grupamento com valor de pK em torno de 8,2 é essencial para a atividade catalítica da *Mt*IMPDH e, que aminoácidos cujas cadeias laterais possuem valores de pK próximos de 7,5 e 9,0 estão envolvidos na ligação ao NAD⁺. Os dados aqui apresentados são discutidos com base em estudos

cinéticos e estruturais disponíveis de IMPDHs de diferentes organismos e podem auxiliar no desenvolvimento de compostos inibidores para a enzima em estudo. Além disso, a identificação de genes essenciais para o crescimento bacteriano representa uma etapa importante no desenvolvimento de drogas. Assim, foi realizada a mutagênese sítio-dirigida por substituição gênica, a fim de avaliar a importância do gene *guaB2* no crescimento do *M. tuberculosis* H37Rv. Nossos resultados sugerem que este gene é essencial para o crescimento *in vitro* do *M. tuberculosis* H37Rv e a confirmação da essencialidade permitirá a validação do produto deste gene como um alvo para inibidores. Os dados obtidos a partir da caracterização cinética da enzima e da substituição gênica representaram o ponto de partida para o planejamento, seleção e testes de possíveis inibidores da *Mt*IMPDH. Entre os compostos químicos sintetizados, um deles apresentou valores de K_i na faixa de nanomolar e apresentou perfis de inibição não-competitivo e incompetitivo em relação aos substratos NAD^+ e IMP, respectivamente. A caracterização da *Mt*IMPDH e os resultados preliminares de inibição desta enzima representam passos cruciais no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da TB. Assim, estes dados podem ser úteis para um melhor entendimento sobre o metabolismo do *M. tuberculosis* e podem servir como base para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas objetivando o controle da TB.

Palavras-chave: Tuberculose. Inosina Monofosfato Desidrogenase. Mecanismo cinético. Mutagênese sítio-dirigida. Inibidores.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) remains a leading infectious killer and its causative agent, *Mycobacterium tuberculosis*, infects one third of the world population. Despite 50 years of available drug treatments, TB continues to cause considerable mortality worldwide. The TB-HIV co-infection and the emergence of multidrug and extensively-resistant TB have provided a very alarming challenge to global health and led us to focus on the research for new and more effective therapeutics against the disease. Advances in the identification of new TB drug targets have been driven by the availability of the genome sequence of *M. tuberculosis* H37Rv, and include elucidation of the role played by proteins of essential biochemical pathways for mycobacterial growth. Inosine Monophosphate Dehydrogenase (IMPDH, EC 1.1.1.205) catalyzes the penultimate and rate-limiting step in guanine nucleotide biosynthesis, the oxidation of inosine 5'-monophosphate (IMP) to xanthosine 5'-monophosphate (XMP), with concomitant reduction of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) to NADH. This reaction controls the guanine nucleotide pool and IMPDH inhibitors are used as immunosuppressive, anticancer, and antiviral agents. Recently, IMPDH from *M. tuberculosis* (*Mt*IMPDH) has gained attention as a promising anti-mycobacterial target, associated with a number of distinct inhibitor scaffolds. In the present work, the *guaB2*-encoded *Mt*IMPDH has been cloned, expressed and purified to homogeneity. The recombinant *Mt*IMPDH has a subunit molecular weight of 54,775 Da and Inductively-Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) and Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FAAS) identified a K⁺ ion per subunit. Glutaraldehyde cross-linking analysis suggests that *Mt*IMPDH predominates as a tetramer. Steady-state kinetics showed that *Mt*IMPDH optimal activity is dependent on the presence of a monovalent cation, mainly K⁺. Initial velocity and product inhibition patterns suggested a steady-state ordered Bi Bi kinetic mechanism in which IMP binds first followed by NAD⁺, and hydride transfer is not the rate-limiting step in the *Mt*IMPDH catalyzed reaction. In addition, NAD⁺ substrate inhibition implies that product release is ordered, with NADH released first. The pH-rate profile indicated one deprotonated group essential for catalysis and that groups with pK values of 7.5 and 9.0 are important for NAD⁺ binding. The data presented here are discussed in light of the kinetic and structural information available for IMPDHs investigated to date and should inform us on how to better design inhibitors targeting this enzyme. Additionally, a vital part of drug development is the identification of gene products that are critical for bacterial growth and survival. In this regard, we have performed site-directed mutagenesis by gene replacement in order to evaluate the importance of the *guaB2* gene for mycobacteria growth. Our results suggest that this gene is essential for *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro* growth, and the confirmation of gene essentiality will point out the *guaB2*-encoded IMPDH as a potential drug target. Data

resulting from enzyme's characterization and gene replacement were the starting point for *Mt*IMPDH inhibitors planning, selection and testing. A compound was identified as promising lead molecule, with K_i values in nanomolar range and it was characterized as noncompetitive and uncompetitive inhibitor towards *Mt*IMPDH substrates NAD^+ and IMP, respectively. *Mt*IMPDH characterization and results on primary inhibitors identification are crucial step towards a potential novel drug development for TB treatment. Altogether, these data may be useful for a better understanding about the biology of *M. tuberculosis* and as a framework on which to base efforts towards the development of efficient therapeutic strategies, aiming TB control.

Keywords: Tuberculosis. Inosine Monophosphate Dehydrogenase. Steady-state kinetics. Site-directed mutagenesis. Inhibitors.

LISTA DE SIGLAS

AMP: adenosina 5'-monofosfato

APAD⁺: 3-acetilpiridina adenina dinucleotídeo

ATP: adenosina 5'-trifosfato

CBS: cistationina- β -sintase

6-CI-PRT: 6-cloro-purina ribotídeo

DCO: *double cross-over*

DMAP: dimetilaminopiridina

DMF: dimetilformamida

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTPs: desoxirribonucleosídeos trifosfato

DOTS: Tratamento Diretamente Observado de Curta Duração

DTT: ditionitrito

ESI-MS: espectrometria de massa de ionização por eletrospray

FDA: *Food and Drug Administration*

¹H RMN-60MHz: ressonância magnética nuclear de ¹H

GMP: guanosina 5'-monofosfato

GMPS: GMP sintetase

GTP: guanosina 5'-trifosfato

***h*IMPDH1:** IMPDH humana tipo 1

***h*IMPDH2:** IMPDH humana tipo 2

HIV: vírus da imunodeficiência humana

IMP: inosina 5'-monofosfato

IMPDH: Inosina Monofosfato Desidrogenase

INH: isoniazida

IPTG: isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

LB: *Lysogeny Broth*

LC-MS/MS: espectrometria de massa com fragmentação induzida por colisão

MIC: concentração inibitória mínima

MPA: ácido micofenólico

MtIMPDH: Inosina Monofosfato Desidrogenase de *M. tuberculosis*

NAD⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NTPs: nucleosídeos trifosfato

pb: pares de base

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PDB: *Protein Data Bank*

PRPP: 5'-fosforribosil- α -1-pirofosfato

RIF: rifampicina

RNA: ácido ribonucleico

SDS-PAGE: poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

TB: tuberculose

TDR: totalmente resistente às drogas

MDR: resistente a múltiplas drogas

XDR: extensivamente resistente às drogas

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

XMP: xantosina 5'-monofosfato

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO 1 | 13 |
| INTRODUÇÃO | 14 |
| 1 TUBERCULOSE | 14 |
| 1.1 PATOGENIA | 15 |
| 1.2 TRATAMENTO | 17 |
| 1.3 RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS | 18 |
| 1.4 DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS ANTI-TB | 20 |
| 2 METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS | 22 |
| 2.1 BIOSÍNTESE DE RIBONUCLEOTÍDEOS PURÍNICOS | 23 |
| 2.1.1 Síntese <i>de novo</i> de IMP | 24 |
| 2.1.2 Síntese dos ribonucleotídeos adenina e guanina | 25 |
| 2.1.3 Salvamento de purinas | 26 |
| 2.2 REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE NUCLEOTÍDEOS PURÍNICOS | 27 |
| 2.3 FORMAÇÃO DE DESOXIRRIBONUCLEOTÍDEOS | 28 |
| 3 INOSINA MONOFOSFATO DESIDROGENASE (IMPDH) | 28 |
| 3.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E BIOQUÍMICAS DE IMPDHs | 30 |
| 3.2 IMPDH COMO ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO DE DROGAS | 32 |
| 3.3 IMPDH de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 34 |
| JUSTIFICATIVA | 36 |
| OBJETIVOS | 38 |
| OBJETIVO GERAL | 38 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 38 |
| CAPÍTULO 2 | 40 |
| METODOLOGIA | 41 |
| 1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>guaB2</i>, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE DNA | 41 |
| 2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO PRODUTO DO GENE <i>guaB2</i> | 42 |
| 3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE | 43 |
| 4 ANÁLISE DA ESTRUTURA PRIMÁRIA E CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DA PROTEÍNA ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA | 43 |
| 5 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUATERNÁRIA DA <i>Mt</i>IMPDH | 43 |
| 6 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA <i>Mt</i>IMPDH | 44 |

| | | |
|----|---|-------------------------------|
| 7 | DEPENDÊNCIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA PRESENÇA DE CÁTIONS MONOVALENTES..... | 44 |
| 8 | DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS APARENTES..... | 44 |
| 9 | DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS VERDADEIRAS E PADRÃO DE INTERSECÇÃO DAS RETAS..... | 45 |
| 10 | EXPERIMENTOS DE INIBIÇÃO PELOS PRODUTOS..... | 45 |
| 11 | DETERMINAÇÃO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO..... | 46 |
| 12 | ESTUDOS DE PERFIL DE pH..... | 46 |
| | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 47 |
| 1 | AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO GENE <i>guaB2</i> .. | 47 |
| 2 | EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE..... | 47 |
| 3 | ANÁLISE DA ESTRUTURA PRIMÁRIA E CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DA PROTEÍNA ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA..... | 49 |
| 4 | ESTRUTURA QUATERNÁRIA DA <i>MtIMP</i> DH..... | 50 |
| 5 | DEPENDÊNCIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA PRESENÇA DE CÁTIONS MONOVALENTES..... | 50 |
| 6 | DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS APARENTES EM ESTADO ESTACIONÁRIO..... | 53 |
| 7 | PARÂMETROS CINÉTICOS VERDADEIROS E PADRÃO DE INTERSECÇÃO DAS RETAS..... | 56 |
| 8 | INIBIÇÃO PELOS PRODUTOS..... | 57 |
| 9 | ATIVAÇÃO OU INIBIÇÃO POR EFETORES ALOSTÉRICOS..... | 58 |
| 10 | ENERGIA DE ATIVAÇÃO..... | 59 |
| 11 | ESTUDOS DE PERFIL DE pH..... | 60 |
| | ANÁLISE DOS DADOS..... | 63 |
| | CAPÍTULO 3..... | 65 |
| | Biochemical characterization of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> IMP dehydrogenase: kinetic mechanism, metal activation and evidence of allosteric regulation..... | Erro! Indicador não definido. |
| | CAPÍTULO 4..... | 110 |
| | METODOLOGIA..... | 111 |
| 1 | CONSTRUÇÃO DA SEQUÊNCIA MUTANTE DO GENE <i>guaB2</i> DE <i>M. tuberculosis</i> H37Rv..... | 111 |

| | |
|--|-----|
| 2 CONSTRUÇÃO DA SEQUÊNCIA DO GENE <i>guaB2</i> DE <i>M. smegmatis</i> PARA A COMPLEMENTAÇÃO NA CEPA DE <i>M. tuberculosis</i> H37Rv MUTANTE PARA O GENE <i>guaB2</i> | 114 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 115 |
| 1 CONSTRUÇÃO DA CEPA DE <i>M. tuberculosis</i> H37Rv MUTANTE PARA O GENE <i>guaB2</i> E DA CÓPIA EXTRA DO GENE <i>guaB2</i> DE <i>M. smegmatis</i> | 115 |
| CAPÍTULO 5 | 119 |
| PLANEJAMENTO E METODOLOGIA | 120 |
| 1 PLANEJAMENTO DE POSSÍVEIS COMPOSTOS INIBIDORES DA ATIVIDADE DA <i>Mt</i> IMPDPH | 120 |
| 2 SÍNTESE DE POSSÍVEIS COMPOSTOS INIBIDORES DA ATIVIDADE DA <i>Mt</i> IMPDPH | 122 |
| 2.1 PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DAS BROMO-ACETAMIDAS 3a-l..... | 122 |
| 2.2 PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DA SÉRIE TIAZOIL-BENZIMIDAZOL ACETAMIDAS 5a-l..... | 123 |
| 3 EFEITO INIBITÓRIO TEMPO-DEPENDENTE DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS NA ATIVIDADE DA <i>Mt</i> IMPDPH..... | 124 |
| 4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS SOBRE A ATIVIDADE CATALÍTICA DA <i>Mt</i> IMPDPH | 124 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 126 |
| 1 SÍNTESE E OBTENÇÃO DA SÉRIE TIAZOIL-BENZIMIDAZOL ACETAMIDAS 5a-l..... | 127 |
| 2 DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE IC ₅₀ E DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO EM EQUILÍBRIO (K_i E K_{is})..... | 129 |
| ANÁLISE DOS DADOS..... | 133 |
| CAPÍTULO 6 | 134 |
| REFERÊNCIAS..... | 138 |

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

JUSTIFICATIVA

OBJETIVOS

INTRODUÇÃO

1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que possui uma história antiga e que deixou profundas marcas na história da arte, música e literatura, além de ter influenciado avanços nas ciências biomédicas (1, 2).

Acredita-se que o gênero *Mycobacterium* tenha surgido a mais de 150 milhões de anos (2) e entre as mais de 120 espécies pertencentes a este gênero, encontra-se o *Mycobacterium tuberculosis*. O *M. tuberculosis* é o principal agente etiológico da TB humana e é considerado um dos patógenos humanos mais importantes, infectando um terço da população mundial (3, 4).

As primeiras lesões típicas da doença, encontradas em múmias egípcias e andinas como deformidades na espinha, levaram os historiadores a estabelecer a existência da TB a partir de 4.000 anos A.C. (1, 2). A identificação de material genético do *M. tuberculosis* em tecidos de mamíferos primitivos sugere que a TB é uma doença antiga com ampla distribuição geográfica. A doença foi disseminada no Egito e na Roma antiga e existiu na América antes de Colombo (2). No entanto, a origem e a evolução da espécie *M. tuberculosis* ainda não está totalmente esclarecida. A ideia de que a TB teria sido transmitida de animais domésticos para humanos (2) não é válida (5), uma vez que análises genômicas comparativas demonstraram que o *M. tuberculosis* não surgiu a partir de uma linhagem adaptada de animais. Dados sugerem que o ancestral comum mais recente tenha sido uma linhagem adaptada a humanos. Uma evidência que apóia tal hipótese é que todas as espécies primeiramente adaptadas a animais pertencem a uma linhagem única, identificada por possuir uma deleção da região cromossomal de diferença 9 (RD9), a qual permanece intacta em todas as linhagens de *M. tuberculosis* (4). Uma vez que não existem evidências de recombinação ou aquisição de material genético entre linhagens (4, 6), o ancestral comum mais recente do *M. tuberculosis* deveria conter o repertório completo de genes disponíveis a este patógeno (4).

A epidemia de TB na Europa iniciou, provavelmente, no começo do século XVII e se estendeu pelos 200 anos seguintes. Cidades da Europa e da América do Norte, após a Revolução Industrial, proporcionavam um ambiente favorável à disseminação do patógeno por via aérea, uma vez que a densidade populacional era alta e as condições sanitárias precárias. Devido a este cenário, durante toda a história, a TB foi uma das principais causas de morte nessas regiões (1, 2). A epidemia se disseminou lentamente para diferentes locais, incluindo a África, devido à exploração e colonização pelos Europeus e Norte-Americanos (2).

A falta de tratamento efetivo contra a doença levou Hermann Brehmer a criar, em 1854, o primeiro sanatório, com a crença de que uma alimentação saudável, exercícios e a altitude poderiam curar os pacientes internados que sofriam de TB. Esse modelo foi utilizado para a criação dos subseqüentes sanatórios, principalmente na Europa e Estados Unidos (1, 2). Apesar dos esforços de muitos estudiosos na definição dos sintomas e características, possíveis causas e formas de contágio da TB, apenas em 1882, o alemão Robert Koch (1843-1910) identificou o *M. tuberculosis* como o agente etiológico da TB (1, 2). Trinta e nove anos depois, a vacina desenvolvida a partir da atenuação do *M. bovis* Bacille Calmette-Guérin (BCG) foi introduzida para uso em humanos e se tornou a principal estratégia profilática contra a TB (7).

A descoberta da estreptomicina em 1944 (8, 9) e, o desenvolvimento do ácido *para*-aminosalicílico (10) levaram a um tratamento combinado efetivo que reduziu drasticamente a mortalidade causada pela TB, marcando o fim da era dos sanatórios (1, 9). A posterior introdução de outras drogas, como isoniazida (INH) (1952) (10) e rifampicina (RIF) (1966) (8), associada a campanhas de vacinação em massa (9), pareceu fornecer um arsenal suficiente de agentes contra a doença. Com isso, em 1969, a U.S. Surgeon General afirmou que era hora de “fechar o livro para as doenças infecciosas” (1).

No entanto, a TB nunca foi erradicada e, embora tenha ocorrido uma redução nos casos de TB nas últimas duas décadas (11), ela permanece entre as principais causas de morte por doenças infecciosas mundialmente, especialmente na Ásia e na África (12). Estima-se que, no ano de 2011, tenham ocorrido 8,7 milhões de novos casos de TB e 1,4 milhão de mortes. Epidemiologistas afirmam que neste mesmo ano foram notificados aproximadamente 5,8 milhões de novos casos diagnosticados, 990 mil mortes em indivíduos não portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), e 430 mil mortes em pacientes portadores do HIV. Índia e China contabilizam 40% dos casos de TB notificados no mundo, seguidos pela África (24%). O Brasil encontra-se na lista dos 22 países onde ocorrem 82% dos casos estimados de TB no mundo. Os altos valores estimados, particularmente para países africanos devem-se, em parte, às taxas relativamente altas de coinfeção com o HIV (11).

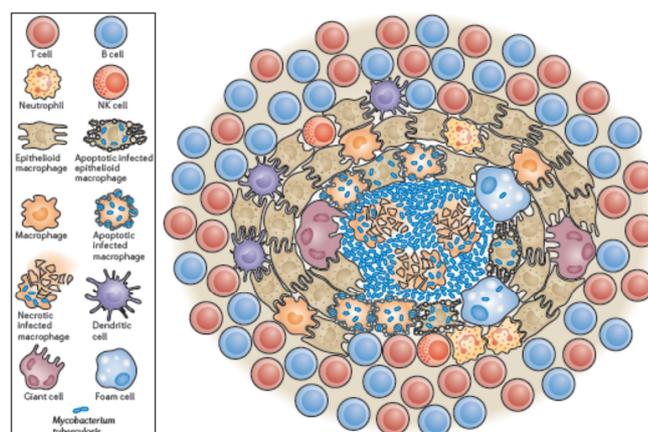
1.1 PATOGENIA

A TB pode ser causada por outras espécies de micobactérias (*M. africanum* e *M. bovis*) (8, 13); porém, o principal agente etiológico da doença em humanos é o *M. tuberculosis*, um microrganismo de crescimento lento (4, 7). Embora este patógeno possa infectar diversos órgãos do hospedeiro (TB extrapulmonar), a TB pulmonar é a manifestação mais comum (3, 14).

A infecção em humanos é normalmente adquirida pela inalação de aerossóis contendo um pequeno número de bacilos (3, 5) através de gotículas (*droplets*) expelidas da garganta e dos pulmões de indivíduos que possuem a forma pulmonar ativa da doença (3, 15). Uma vez nos pulmões, os bacilos são internalizados por fagocitose pelos macrófagos alveolares e induzem uma resposta pró-inflamatória localizada, que leva ao recrutamento de outras células do sistema imune do hospedeiro, como neutrófilos, monócitos e células dendríticas (5, 16, 17). Os macrófagos alveolares ativados por estímulos específicos podem transferir o *M. tuberculosis* fagocitado para os lisossomos, a fim de serem eliminados (3). No entanto, o *M. tuberculosis* tem desenvolvido inúmeras estratégias que evitam a sua eliminação e que permitem a ele sobreviver dentro dos macrófagos (17), uma vez que essas células são capazes de conter o crescimento, mas não de eliminar o patógeno (14).

O primeiro mecanismo utilizado pelo hospedeiro para conter o crescimento do *M. tuberculosis* durante a infecção persistente, bem como, limitar o crescimento bacilar e a disseminação em sítios adicionais de infecção, é a formação dos granulomas (17). Granulomas são agregados organizados de células imunes formados em resposta a um estímulo persistente, de natureza infecciosa ou não infecciosa, e representam a principal característica da TB (18). Eles são formados basicamente por macrófagos, linfócitos, neutrófilos, células dendríticas, fibroblastos e células que secretam componentes da matriz extracelular (**Figura 1**) (5, 18). Regiões de necrose (caseosas), formadas a partir da morte dos componentes celulares, também são observadas (18). Neste estágio, indivíduos capazes de impedir a proliferação do *M. tuberculosis* desenvolvem uma infecção latente (sem manifestação clínica da doença) e assintomática (7, 15), na qual o microrganismo se encontra em um estado metabólico reduzido (7, 19).

Figura 1. Estrutura e constituintes celulares do granuloma da TB



Fonte: Ramakrishnan, 2012 (18).

A infecção de um indivíduo imunocomprometido tipicamente resultará no estabelecimento de uma infecção aguda, caracterizada pela replicação bacilar descontrolada e disseminação do microrganismo. Neste caso, os sintomas da doença aguda incluem fadiga, anorexia, perda de peso, febre baixa e tosse crônica contagiosa (17).

Estima-se que um terço da população mundial está infectado com a forma latente do *M. tuberculosis* e calcula-se que o risco de desenvolvimento da doença em pacientes saudáveis é de aproximadamente 10% ao longo da vida (15). Além disso, acredita-se que 5% destes pacientes saudáveis irão desenvolver a TB ativa em algum estágio da vida (19). No entanto, estudos epidemiológicos mostram que a coinfeção com o HIV aumenta o risco anual de reativação da doença para até 10% (19-21). A TB ativa ocorre como resultado de uma nova infecção ou ainda pela reativação da forma latente (20), resultando em uma infecção secundária aguda no hospedeiro (17). A reativação da doença é frequentemente desencadeada por condições que comprometem o sistema imune do paciente tais como: casos de má nutrição, idade avançada, abuso de drogas, terapia com imunossupressores, diabetes ou coinfeção com HIV (5, 21). A diminuição da resposta imune desencadeia uma série de eventos que podem levar ao rompimento do granuloma, danos ao tecido pulmonar e espalhamento de milhares de partículas infectadas através das vias aéreas (5).

A infecção por HIV representa o maior risco para o desenvolvimento da forma ativa da TB, havendo uma forte associação entre tais doenças, sendo a TB a infecção oportunista mais comum e a principal causa de morte devido a doenças infecciosas em pacientes portadores do HIV. Casos de TB extrapulmonar, em particular a TB meningítica, também são mais comuns nessa população (20).

1.2 TRATAMENTO

Apesar de existirem diferentes regimes de tratamento contra a TB, a Organização Mundial da Saúde recomenda aquele conhecido como Tratamento Diretamente Observado de Curta Duração (DOTS) (13). A quimioterapia consiste em uma associação de fármacos de primeira linha - INH, RIF, pirazinamida e etambutol - durante dois meses, seguida por quatro meses com INH e RIF (19, 22, 23), podendo curar até 95% dos casos de TB (19). Além disso, a estratégia do DOTS inclui outros cinco componentes: i) estabelecer uma rede de indivíduos treinados a administrar e supervisionar o DOTS; ii) criar laboratórios e profissionais habilitados para o diagnóstico da TB; iii) implementar um sistema de fornecimento confiável de medicamentos de alta qualidade (preferencialmente, sem custo aos pacientes); iv) compromisso governamental e v) sistema de monitoramento dos casos, tratamento e resultados (2, 22, 24).

Entre os anos de 1998 e 1999, 127 países haviam adotado estas estratégias, incluindo os 22 países responsáveis por 80% da mortalidade global causada pela TB. Além disso, até o ano de 2005, 89% da população mundial vivia em áreas onde os serviços preconizados pelo DOTS estavam disponíveis (9). Essas estratégias preveniram a ocorrência de novas infecções e, principalmente, dificultaram o surgimento de casos TB resistente a múltiplas drogas (TB-MDR) (13). No entanto, diversos fatores como o aumento da prevalência de coinfeção com o HIV, especialmente em áreas mais pobres, associado ao surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes ao tratamento, levaram ao questionamento da efetividade do DOTS (9).

A falha do tratamento - definida como a presença de culturas positivas após quatro meses de terapia apropriada (25) - pode ser resultado da falta de adesão ao mesmo pelo paciente devido à sua duração e complexidade, possíveis efeitos adversos ou resistência do bacilo às drogas (20, 23). Tais circunstâncias favoreceram o surgimento de organismos resistentes aos medicamentos utilizados no esquema terapêutico (1, 23).

1.3 RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS

Uma potencial ameaça ao controle da TB é a emergência de linhagens de *M. tuberculosis* que não podem ser contidas empregando-se as terapias padrões anti-TB (26).

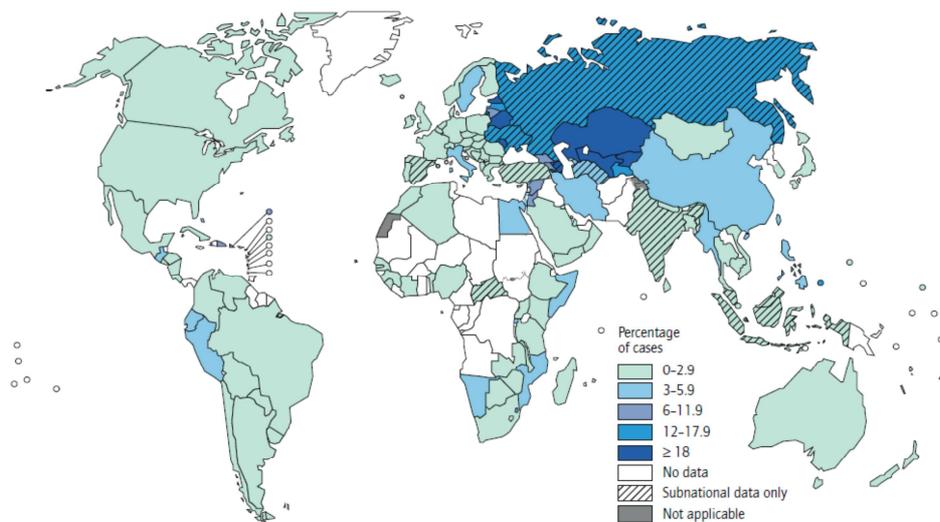
As micobactérias possuem uma alta taxa de resistência intrínseca a maioria dos antibióticos e agentes quimioterápicos devido à difícil permeabilidade da sua parede celular. No entanto, tal barreira não tem capacidade suficiente para produzir níveis significativos de resistência, o que requer um mecanismo adicional (8). No caso da TB, a resistência aos fármacos é devido a mutações genéticas que resultam na perda da susceptibilidade aos antimicrobianos. Estas mutações geralmente ocorrem no alvo ou no ativador das drogas (12). A resistência às drogas anti-TB surge a partir da seleção de cepas mutantes com resistência inata a agentes individuais, devido à exposição a drogas que promoveram uma supressão incompleta do crescimento do bacilo (27). Fármacos de ação lenta, prescrição imprópria, dificuldade de acesso aos medicamentos e, sistemas de saúde ineficientes, têm resultado em tratamento incompleto e relapso, podendo resultar na supressão parcial do crescimento micobacteriano e favorecer o surgimento de populações bacterianas resistentes a drogas altamente eficazes (12, 27).

A TB-MDR é definida como aquela na qual o paciente possui a doença ativa com bacilo resistente a, pelo menos, INH e RIF. A TB-MDR pode ser contraída através de infecção com bacilos já resistentes (resistência primária) ou pode ser desenvolvida no decorrer do tratamento (resistência adquirida) (28). Embora o DOTS seja altamente eficiente no controle da TB susceptível às drogas (ou resistente somente à INH), ele é comumente

insuficiente no controle da TB-MDR (24, 28). Casos de TB-MDR são mais difíceis de curar e requerem um tempo de tratamento mais longo (20 a 28 meses) (25) com medicamentos de segunda linha (fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tioamidas), os quais são menos efetivos e mais tóxicos, com exceção de algumas fluoroquinolonas, além de ter um custo mais elevado que os regimes baseados em medicamentos de primeira linha (24, 26-28).

Estatísticas revelaram que a taxa esperada de cura (75%) para os pacientes com TB-MDR foi alcançada por apenas 30 dos 107 países que reportaram o tratamento destes casos. Estima-se que 27 países responderam por 85% de todos os casos de TB-MDR no ano de 2011 e, entre eles, 60% ocorreram na Índia, China, Federação Russa e África do Sul (11). Na América Latina, o Peru é o país que possui a maior porcentagem de casos de TB-MDR registrados (5,3%) entre os novos casos de infecção (28). Atualmente, 3,7% de novos casos e 20% dos casos previamente tratados podem corresponder a TB-MDR (11). As proporções de novos casos de TB-MDR por países estão apresentadas na **figura 2**.

Figura 2. Índice global (%) de casos de TB-MDR entre os novos casos de TB registrados



Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2012 (11).

Pacientes coinfectados com TB-MDR e HIV são os que possuem o pior prognóstico, uma vez que tal associação tem provocado altas taxas de mortalidade, especialmente quando diagnosticada tardiamente (20, 24).

Um estudo realizado por Kawai e colaboradores, no Peru, demonstrou um excelente prognóstico para indivíduos não portadores do HIV e uma rápida cura da infecção para pacientes com TB não MDR. No entanto, pacientes com TB-MDR tiveram um período de infecção prolongado e, aqueles coinfectados com HIV, morreram nos dois primeiros meses de terapia (55%) (29).

Portanto, é evidente a necessidade de um teste rápido de suscetibilidade a drogas anti-TB para ser realizado principalmente em pacientes HIV positivos, além da melhora nas medidas de controle de infecção e tratamento precoce com terapia antirretroviral para pacientes portadores de HIV e TB-MDR. Essas providências são essenciais para que os casos de TB-MDR sejam detectados e tratados adequadamente, reduzindo assim o risco de infecção e mortalidade (29, 30).

Nos últimos anos, casos de TB extensivamente resistente às drogas (TB-XDR) têm sido relatados em diversos países. A definição mais recente para TB-XDR denota a condição em que os isolados são resistentes à INH e RIF, a alguma fluoroquinolona e a qualquer medicamento injetável de segunda linha (capreomicina, canamicina, amicacina), resultando em limitadas opções de tratamento (28).

Apesar das limitações dos testes laboratoriais para susceptibilidade aos fármacos de segunda linha, a maioria realizada apenas em isolados MDR, dados indicam que a TB-XDR está difundida em 84 países, com ao menos um caso reportado e, que aproximadamente 9% dos casos de TB-MDR são também XDR (11). Indivíduos infectados com TB-XDR possuem um prognóstico ruim, com altos índices de falha do tratamento e alta mortalidade (24). A situação torna-se ainda mais grave em pacientes portadores de HIV. Em um estudo realizado em uma área rural da África do Sul, a maioria dos pacientes (> 90%) coinfectados com TB-XDR e HIV vieram a falecer, com uma média de sobrevivência de apenas 16 dias a partir do diagnóstico (31).

Velayati e colaboradores (32) documentaram o surgimento de novas formas de bacilos encontrados em pacientes diagnosticados com TB-MDR. Esses isolados foram classificados como linhagens totalmente resistentes às drogas (TDR), uma vez que apresentaram resistência *in vitro* a todas as drogas de primeira e segunda linha testadas. Durante o estudo, os pacientes infectados não responderam a nenhuma terapia padrão e permaneceram com culturas positivas após 18 meses de tratamento com drogas de segunda linha (32).

Enquanto a TB-MDR e XDR significam uma ameaça à saúde pública e ao controle da TB no mundo, possíveis casos de TB-TDR aumentam a preocupação quanto a uma futura epidemia de TB incurável (32). Diante de tal cenário, há uma urgente necessidade de pesquisa por novas drogas anti-TB, além da aprovação e uso das que estão em desenvolvimento (15, 24).

1.4 DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS ANTI-TB

O desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da TB envolve mais desafios que a busca por agentes terapêuticos para outras doenças (33). Neste caso, existem

inúmeros fatores básicos envolvidos: reduzir a duração total do tratamento, eficácia contra casos de TB-MDR e XDR, promover tratamento efetivo para casos de infecção latente e manter o mínimo de interações com os medicamentos utilizados no tratamento contra o HIV e outras doenças crônicas, como o diabetes (19, 25, 34, 35).

A emergência de cepas MDR e XDR, bem como a epidemia de HIV, levam a uma urgente necessidade de melhor entendimento sobre os mecanismos moleculares de ação e de resistência aos fármacos, a fim de facilitar a pesquisa por novos compostos anti-TB que sejam efetivos tanto no combate da TB susceptível às drogas quanto em casos MDR/XDR (13). Tratamentos futuros requerem medicamentos com menos efeitos adversos a fim de facilitar a adesão à terapia (30). Esses novos agentes devem, idealmente, possuir atividade bactericida contra o *M. tuberculosis*, tanto no estado de multiplicação ativa quanto no estado de dormência, a fim de combater toda população microbiana presente nos tecidos do hospedeiro (25, 33).

Geralmente, a busca por compostos químicos com ação antimicrobiana é designada para a detecção de drogas que possuam ação rápida contra o crescimento bacteriano em culturas. Estes compostos matam o patógeno rapidamente *in vitro*, porém são muito menos efetivos contra organismos em estados metabólicos diferentes (36). A complexa biologia do *M. tuberculosis*, que permite a sua persistência no hospedeiro em um estado de latência durante anos, torna difícil a identificação das rotas metabólicas envolvidas neste processo, e que sejam essenciais à sobrevivência do microrganismo. Além disso, existe pouca informação disponível a respeito do metabolismo do patógeno durante esta fase e sobre os possíveis locais de infecção no hospedeiro (33, 35). Portanto, para o desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos, novas estratégias de busca são necessárias.

Um estudo baseado na pesquisa por compostos que inibam o crescimento bacteriano *in vitro*, identificou o TMC207 como um novo candidato à droga anti-TB. Andries K. e colaboradores (37) mostraram que esta molécula possui potente atividade *in vitro* contra cepas de *M. tuberculosis* MDR (MIC = 0,06 µg mL⁻¹) e estudos clínicos demonstraram atividade bactericida. Com isso, após 40 anos da introdução de um novo fármaco contra a TB, o TMC207 (denominado bedaquilina) e, cujo alvo é a Adenosina 5'-trifosfato sintase (ATP sintase) de *M. tuberculosis*, recebeu a aprovação do *Food and Drug Administration* (FDA) para ser utilizado em combinação com outros fármacos no tratamento de pacientes adultos com TB-MDR (38).

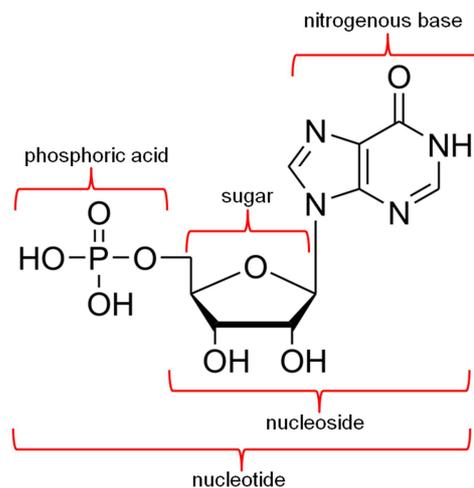
As pesquisas destinadas ao controle da TB têm recebido mais atenção das companhias farmacêuticas e este fato, associado aos investimentos governamentais, tem possibilitado o progresso, tanto no desenvolvimento de novos compostos anti-TB, quanto na área de desenvolvimento de vacinas (19, 39). Além disso, nos últimos cinco anos, estudos clínicos tem sido conduzidos a fim de se investigar a ação de diferentes agentes

terapêuticos em várias combinações de tratamento. Muitos desses candidatos a drogas contra a TB são fármacos que foram desenvolvidos para tratar outras infecções, mas que demonstraram atividade contra o *M. tuberculosis* e sua introdução no esquema terapêutico pode reduzir a duração do tratamento (25). No entanto, ainda se faz necessária a pesquisa por novas drogas e, a identificação e validação de novos alvos no metabolismo do *M. tuberculosis* que possam ser inibidos, levando a morte do patógeno, são componentes cruciais na busca por novos agentes antimicobacterianos (15).

2 METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS

Os nucleotídeos são moléculas biologicamente onipresentes, que atuam como fonte de energia em rotas metabólicas, participam na sinalização celular, na regulação de rotas de biossíntese, além de exercerem outras inúmeras funções. Eles são formados por ésteres de fosfato de um açúcar de cinco átomos de carbono (pentose), nos quais uma base nitrogenada está covalentemente ligada ao C1' do resíduo de açúcar (**Figura 3**). Os ribonucleotídeos constituem as unidades monoméricas do ácido ribonucleico (RNA), no qual a pentose é a D-ribose, enquanto que os desoxirribonucleotídeos possuem a desoxi-D-ribose como pentose e são as unidades monoméricas do DNA (40-42).

Figura 3. Estrutura do nucleotídeo inosina 5'-monofosfato (IMP)



Adaptado de: Voet & Voet, 2011 (40).

Nota: A ligação glicosídica entre o açúcar e a base nitrogenada forma o nucleosídeo. Quando um ácido fosfórico é esterificado com um grupo hidroxila da porção açúcar de um nucleosídeo, forma-se um nucleotídeo. O açúcar encontrado nas moléculas de DNA (2'-desoxi-D-ribose) apresenta apenas um átomo de hidrogênio ligado ao carbono C2' do anel, substituindo o grupamento hidroxila observado no RNA.

As bases nitrogenadas são moléculas planas, aromáticas e heterocíclicas, derivadas de purinas ou pirimidinas. Os principais componentes purínicos dos ácidos nucleicos são os resíduos de adenina (A) e guanina (G); os resíduos pirimidínicos são os de citosina (C), uracila (U), que ocorrem principalmente no RNA, e timina (T), que ocorre no DNA (40). Portanto, os nucleotídeos são classificados em purínicos e pirimidínicos (40-42).

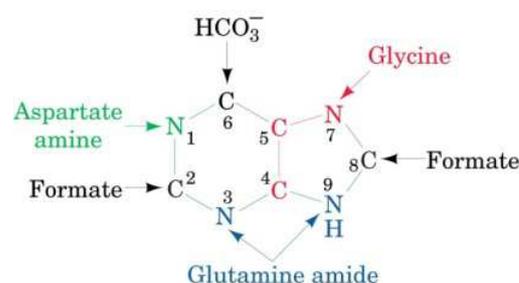
O metabolismo de nucleotídeos requer um controle fino, pois eles devem estar presentes em quantidades específicas e no momento correto para a síntese de ácidos nucleicos, permitindo a replicação celular e a síntese de proteínas, além de serem moléculas carregadas negativamente, cujos níveis devem ser controlados para manter o balanço eletroquímico das células (42).

Enzimas envolvidas na biossíntese de nucleotídeos são essenciais para a proliferação celular. As células podem sintetizar nucleotídeos a partir de duas rotas metabólicas diferentes. Na síntese *de novo*, o anel purínico ou pirimidínico é sintetizado a partir de precursores simples, como os aminoácidos, enquanto na via de salvamento, nucleobases pré-formadas, nucleosídeos e nucleotídeos são reciclados a partir de ácidos nucleicos (40, 41, 43).

2.1 BIOSÍNTESE DE RIBONUCLEOTÍDEOS PURÍNICOS

No ano de 1948, estudos realizados por John Buchanan demonstraram que o átomo N1 do anel purínico é proveniente do grupo amina do aspartato, C2 e C8 originam a partir do formato, N3 e N9 são contribuições do grupo amida da glutamina; C4, C5 e N7 são derivados da glicina (sugerindo que, praticamente, toda a molécula de glicina é incorporada no anel purínico) e C6 é proveniente de HCO_3^- (CO_2) (**Figura 4**) (40).

Figura 4. Origem dos átomos do anel de purina



Fonte: Voet & Voet, 2011 (40).

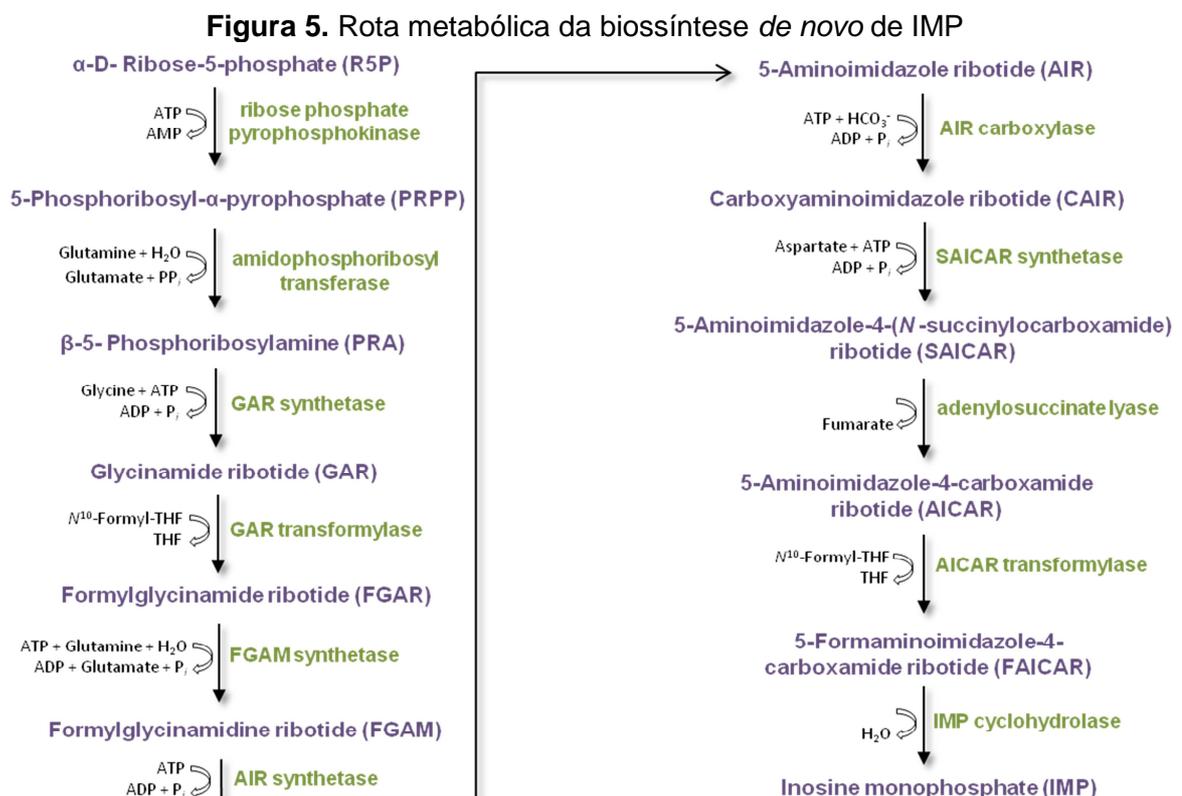
Investigações posteriores sugeriram que o primeiro nucleotídeo purínico a ser sintetizado é o IMP, cuja base nitrogenada é a hipoxantina. Adenosina 5'-monofosfato

(AMP) e guanosina 5'-monofosfato (GMP) são subsequentemente sintetizados a partir de IMP, através de reações enzimáticas diferentes (40, 44).

2.1.1 Síntese *de novo* de IMP

Nucleotídeos purínicos podem ser derivados de purinas exógenas, através da via de salvamento, ou podem ser sintetizados *de novo* a partir de precursores simples. Em ambos os casos, a molécula de 5'-fosforribosil- α -1-pirofosfato (PRPP) é sintetizada a partir de ribose 5'-fosfato. Portanto, purinas são inicialmente sintetizadas como ribonucleotídeos, e não como bases livres (40, 44).

A rota de biossíntese *de novo* de IMP está representada na **Figura 5** e envolve 11 reações enzimáticas, iniciadas a partir de ribose 5'-fosfato e ATP (43). Estudos comparativos indicam padrões únicos de organização dos genes que codificam enzimas dessa via, mecanismos únicos de regulação gênica, e enzimas multifuncionais distintas entre os organismos (44).



Adaptado de: Voet & Voet, 2011 (40).

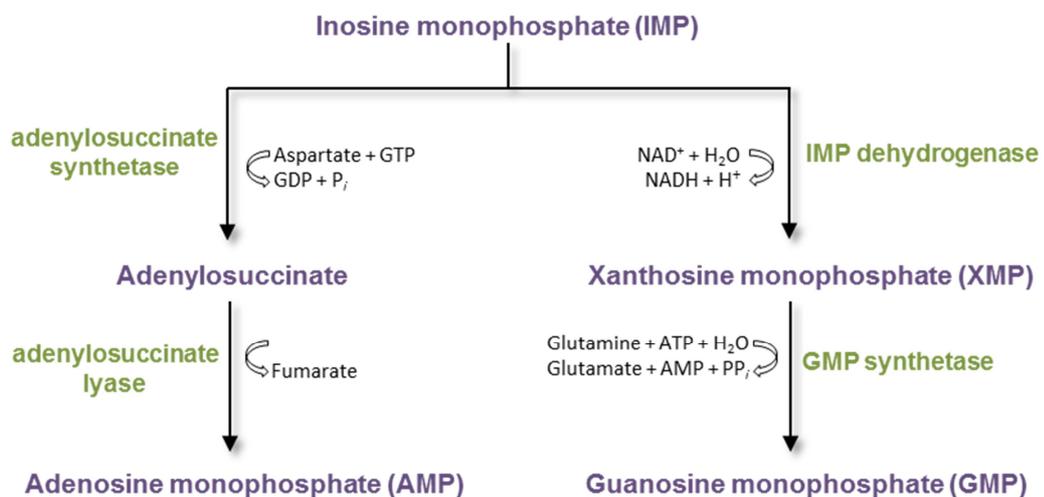
Nota: O resíduo de purina é sintetizado a partir de um anel de ribose, através de 11 reações enzimáticas. As enzimas que catalisam as reações estão citadas (em verde) ao lado de suas reações correspondentes.

2.1.2 Síntese dos ribonucleotídeos adenina e guanina

Após a sua formação, o IMP não se acumula nas células, mas é rapidamente convertido em AMP e GMP, por meio de duas reações anabólicas diferentes (40, 44).

As enzimas Adenylosuccinato sintetase e Adenylosuccinato liase catalisam duas reações sequenciais para a síntese de AMP a partir de IMP, enquanto a síntese de GMP é catalisada pelas enzimas Inosina monofosfato desidrogenase e GMP sintetase (**Figura 6**) (40, 44).

Figura 6. IMP é convertido em AMP ou GMP a partir de duas reações distintas



Adaptado de: Voet & Voet, 2011 (40).

Nota: As enzimas que catalisam as reações estão descritas (em verde) ao lado de suas reações correspondentes.

O sequenciamento do genoma do *M. tuberculosis* H37Rv (45) evidenciou que a síntese *de novo* de purinas no bacilo é mediada por rotas altamente conservadas em outras bactérias. Além disso, a maquinaria celular responsável por converter o produto inicial IMP, em AMP e GMP, encontra-se intacta (46).

Para que ocorra sua incorporação nos ácidos nucléicos, os nucleosídeos monofosfato devem ser convertidos em seus nucleosídeos trifosfato (NTPs) correspondentes. A síntese de NTPs ocorre a partir de sucessivas reações de fosforilação, catalisadas por nucleosídeo monofosfato quinases (específicas para bases purínicas ou pirimidínicas; porém não discriminam entre ribose e desoxirribose) e nucleosídeo difosfato quinases não específicas. Estas enzimas catalisam a transferência reversível de um grupo fosfato por meio de um nucleosídeo trifosfato, geralmente ATP, para os nucleosídeos mono ou difosfatados (40).

2.1.3 Salvamento de purinas

Em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, as rotas de salvamento possuem várias funções. Uma delas é o aproveitamento de bases pré-formadas e nucleosídeos exógenos, para a síntese de nucleotídeos; outra é a reutilização de bases e nucleosídeos endógenos, como resultado da reciclagem de nucleotídeos. Além disso, durante o catabolismo, moléculas de pentose de nucleosídeos exógenos e grupos amina de compostos de adenina contribuem como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente (44).

A maioria das células é capaz de reciclar ácidos nucléicos e, embora a formação de AMP e GMP a partir de IMP seja irreversível, purinas podem ser interconvertidas em adenina, guanina ou hipoxantina. Essas bases livres são então reconvertidas a seus nucleotídeos correspondentes através de rotas de salvamento (40, 46).

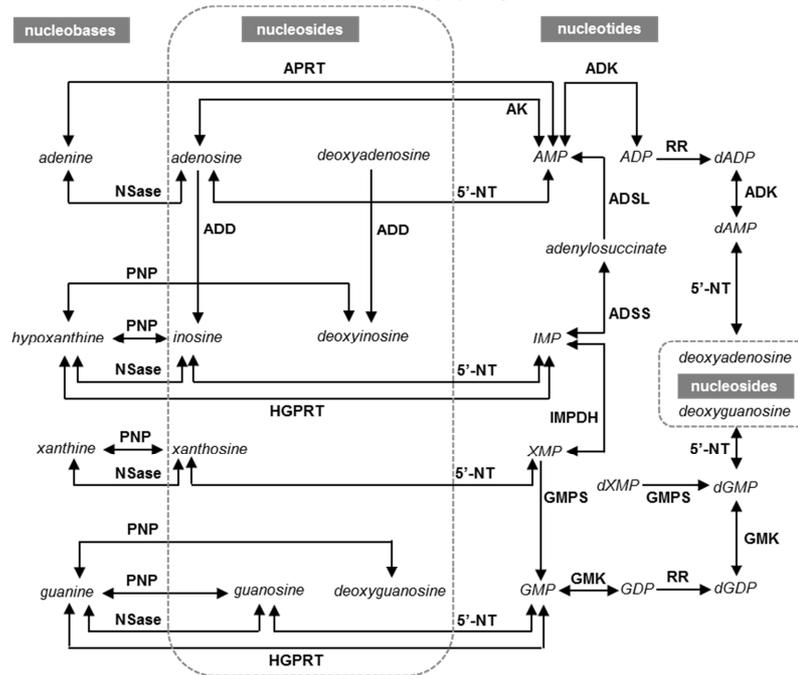
Ao contrário da síntese *de novo*, que é praticamente idêntica em todas as células, vias de salvamento diferem em características e distribuição. Em mamíferos, purinas são, geralmente, salvas por duas enzimas diferentes. A enzima Adenina fosforribosiltransferase medeia a formação de AMP por meio da transferência de adenina para o PRPP, liberando PP_i , de acordo com a reação: $\text{adenina} + \text{PRPP} \leftrightarrow \text{AMP} + PP_i$; enquanto a Hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase catalisa a reação análoga tanto para hipoxantina quanto para guanina: $\text{hipoxantina} + \text{PRPP} \leftrightarrow \text{IMP} + PP_i$ ou $\text{guanina} + \text{PRPP} \leftrightarrow \text{GMP} + PP_i$ (40).

Quando bases livres ou nucleosídeos presentes no meio de crescimento são aproveitadas, as vias de síntese *de novo* são suprimidas. Igualmente, uma vez que as reações químicas envolvidas na síntese *de novo* de IMP requerem alta demanda de energia celular, em condições de baixa viabilidade energética ou multiplicação rápida, a via de salvamento pode ser a principal fonte de nucleotídeos (44, 47).

Embora informações sobre o metabolismo de purinas em *M. tuberculosis* sejam relativamente escassas, acredita-se que a via de salvamento é utilizada quando o bacilo aproveita hipoxantina, guanina e adenina do meio externo, as quais são convertidas em IMP, GMP e xantosina 5'-monofosfato (XMP), respectivamente (47, 48).

Muitas enzimas homólogas da via de salvamento de purinas têm sido identificadas no genoma do *M. tuberculosis* (45). Bases purínicas, nucleosídeos e nucleotídeos podem então ser interconvertidos pela atividade das enzimas descritas na **Figura 7** (47):

Figura 7. Enzimas da via de salvamento de purinas identificadas na sequência genômica de *M. tuberculosis* H37Rv



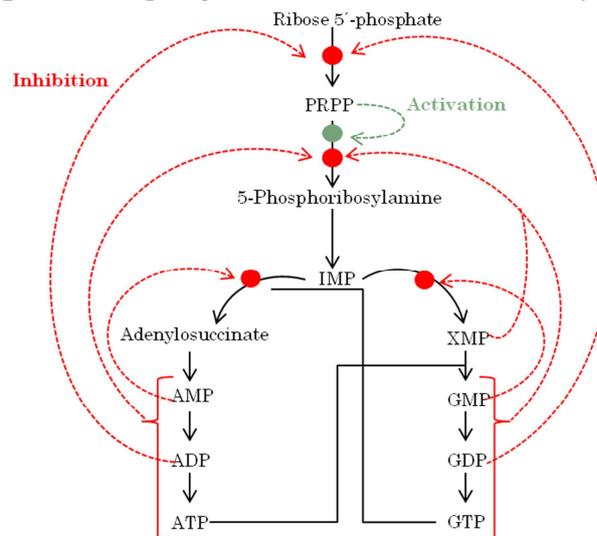
Fonte: Ducati et al, 2011 (47).

Nota: ADD: adenosine deaminase; AK: adenosine kinase; 5'-NT: 5'-nucleotidase; HGPRT: hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; APRT: adenine phosphoribosyltransferase; PNP: purine nucleoside phosphorylase; NSase: purine nucleosidase; IMPDH: inosine monophosphate dehydrogenase; ADSS: adenylosuccinate synthase; ADSL: adenylosuccinate lyase; GMK: guanylate kinase; ADK: adenylate kinase; GMPS: guanosine monophosphate synthase; RR: ribonucleotide reductase.

2.2 REGULAÇÃO DA SÍNTESE DE NUCLEOTÍDEOS PURÍNICOS

As rotas envolvidas no metabolismo de ácidos nucléicos são estritamente reguladas e, da mesma forma, a síntese de IMP, ATP e guanosina 5'-trifosfato (GTP) é regulada individualmente na maioria das células, de modo a não apenas controlar a quantidade total de nucleotídeos purínicos gerada, mas também coordenar a quantidade relativa de ATP e GTP (40).

Essa regulação está representada na **Figura 8**, e indica que a taxa de produção de IMP é independente, porém, sinergicamente controlada pelos níveis de adenina e guanina. AMP e GMP são inibidores competitivos do IMP em sua própria síntese, evitando o acúmulo destes produtos. Além disso, a síntese de nucleotídeos de adenina e guanina é coordenada, uma vez que GTP é consumido durante a síntese de AMP a partir de IMP, enquanto ATP é cofator na síntese de GMP a partir de IMP, garantindo o balanço entre a produção de desses nucleotídeos (40, 44).

Figura 8. Regulação da via de biossíntese de purinas

Adaptado de: Voet & Voet, 2011 (40).

Nota: Círculos vermelhos e círculo verde indicam pontos de regulação. Inibição do tipo *feedback* está indicada por setas tracejadas vermelhas e ativação está representada pela seta tracejada verde.

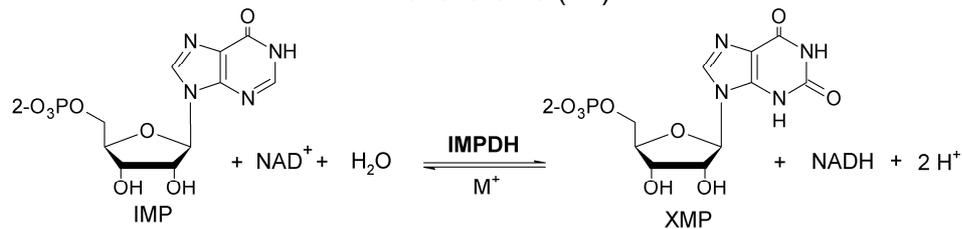
2.3 FORMAÇÃO DE DESOXIRRIBONUCLEOTÍDEOS

Desoxirribonucleotídeos são derivados dos seus ribonucleotídeos correspondentes através da redução do átomo de C2' da D-ribose, formando 2'-desoxi-D-ribose (42). A redução ocorre na molécula durante a etapa de dinucleotídeo e é catalisada por enzimas denominadas ribonucleotídeo-redutases. A última etapa na produção de desoxirribonucleosídeos trifosfato (dNTPs) é a fosforilação dos respectivos desoxirribonucleosídeos difosfato, em uma reação catalisada pela mesma enzima que fosforila ribonucleosídeos difosfato (40, 41).

3 INOSINA MONOFOSFATO DESIDROGENASE (IMPDH)

A enzima Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH, EC 1.1.1.205) é uma enzima chave na biossíntese de nucleotídeos de purina, pois participa de uma etapa limitante na síntese *de novo* de nucleotídeos de guanina, a partir de IMP. Ela catalisa a oxidação de IMP a XMP, com concomitante conversão de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) à sua forma reduzida, NADH (**Figura 9**). Subsequentemente, XMP é convertido a GMP pela ação da enzima GMP sintetase (GMPS, EC 6.3.5.2) (49-51). A partir de sucessivas reações, GMP é convertido a GTP, uma molécula constituinte do RNA, e que participa de inúmeros processos metabólicos, e a dGTP, unidade monomérica do DNA (43).

Figura 9. Esquema da reação catalisada pela IMPDH, na presença de um cátion monovalente (M^+)

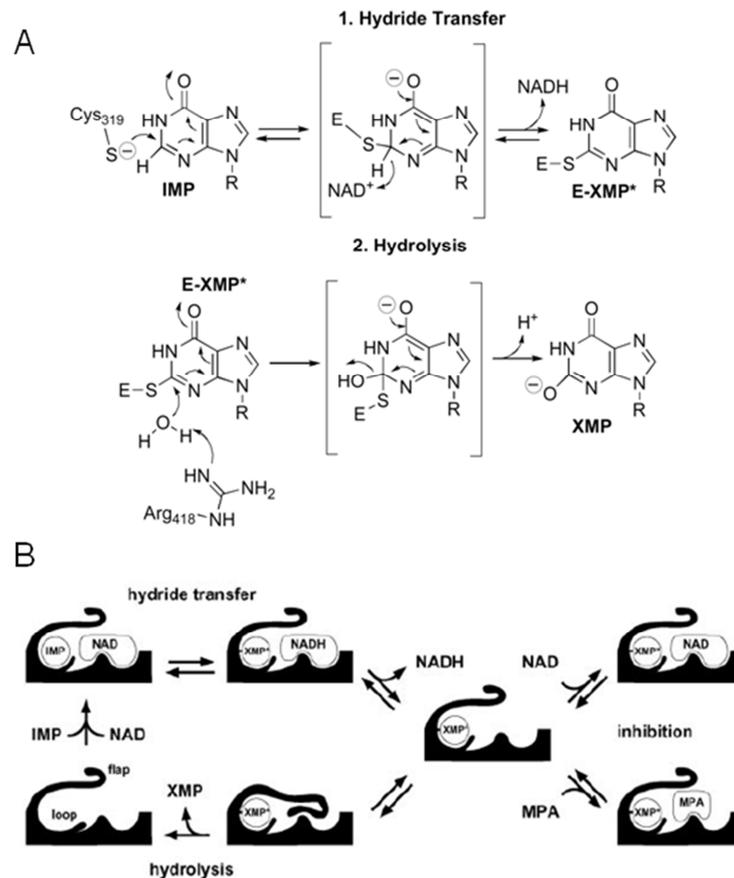


Nucleotídeos de guanina também podem ser sintetizados em vias de salvamento, por meio de reações catalisadas pelas fosforribosiltransferases e/ou nucleosídeo fosfotransferases/quinasas. A preferência de utilização entre a via *de novo* ou a de salvamento determina a suscetibilidade de um organismo aos inibidores da IMPDH (49).

A reação catalisada pela IMPDH envolve duas transformações químicas diferentes: i) uma reação de desidrogenação onde o resíduo catalítico de cisteína realiza um ataque nucleofílico no átomo C2 da molécula de IMP, seguido da transferência do hidreto para a molécula de NAD^+ , formando o intermediário covalente E-XMP*; ii) $NADH$ é liberado e uma reação de hidrólise converte E-XMP* a XMP (**Figura 10A**) (49, 50, 52, 53).

Dados estruturais indicam que as IMPDHs sofrem modificações conformacionais durante a catálise. Durante a reação de desidrogenação, a IMPDH assume uma conformação aberta, que permite a ligação da molécula de NAD^+ e sua redução. Quando $NADH$ é liberado, uma tampa móvel fecha o sítio vago do dinucleotídeo, aproximando um resíduo de arginina e promovendo a hidrólise do intermediário covalente, e a liberação do XMP (**Figura 10B**) (49, 50, 52, 53).

Figura 10. (A) Mecanismo de reação catalisada pela IMPDH e estrutura química dos substratos e produtos. (B) Representação das modificações conformacionais durante a catálise



Nota: (A) Os resíduos Cys319 e Arg418 estão numerados de acordo com a sequência de aminoácidos da IMPDH de *Trichomonas foetus*. (B) Dois elementos móveis sofrem modificações conformacionais durante a catálise. A alça carregando o resíduo catalítico de cisteína se move em direção ao sítio ativo após a ligação do IMP. Após a liberação de NADH, uma tampa móvel se fecha sobre o sítio de ligação do NAD⁺ e o intermediário E-XMP* é hidrolisado (49, 52). A ligação do inibidor MPA também está representada e será detalhada no item 3.2.

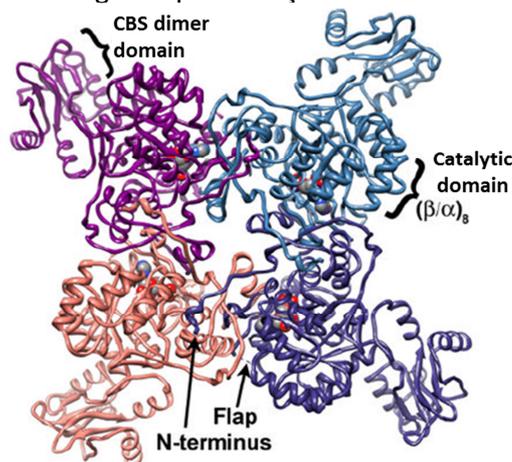
3.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E BIOQUÍMICAS DE IMPDHs

A enzima IMPDH tem sido descrita em procaríotos e eucaríotos, e encontra-se conservada, com 36% de identidade na sequência de aminoácidos entre as IMPDHs humanas e a de *E. coli*. Algumas espécies possuem dois genes que codificam IMPDHs. Ambas as enzimas humanas, *h*IMPDH1 e *h*IMPDH2, contém 514 aminoácidos, possuem 84% de identidade e propriedades cinéticas comparáveis (49, 50). No entanto, enquanto a *h*IMPDH1 está envolvida em diversos processos biológicos como angiogênese e ligação ao DNA, e prevalece em linfócitos e leucócitos normais, a *h*IMPDH2 é superexpressa em células tumorais e de proliferação rápida (50, 54).

A estrutura quaternária das IMPDHs corresponde a um homotetrâmero de aproximadamente 55 kDa por subunidade. Cada monômero contém dois domínios: o domínio catalítico, que é constituído por uma estrutura clássica de barril (α/β)₈, formando o núcleo da enzima tetramérica ativa; e um subdomínio menor, composto por dois domínios do tipo CBS (**Figura 11**). A designação CBS deve-se à identificação desse motivo de dobramento na enzima cistationina- β -sintase (43, 53, 55).

Em IMPDHs, o subdomínio CBS não interage com as outras subunidades na enzima tetramérica ativa e sua deleção não compromete a atividade catalítica *in vitro* da IMPDH (55, 56). Além disso, algumas IMPDHs, como a de *Borrelia burgdorferi* e a de *Cryptosporidium parvum* não possuem este subdomínio (49). Mutações em domínios CBS estão associadas a inúmeras doenças humanas hereditárias (57), no entanto, sua função e como essas mutações podem afetar as propriedades funcionais e/ou estruturais de IMPDHs ainda devem ser investigadas (47). Estudos realizados por Pimkin M. e colaboradores sugerem que o subdomínio CBS está envolvido em coordenar a atividade de algumas das enzimas do metabolismo de nucleotídeos de purina (IMPDH, Adenilossuccinato sintetase e GMP redutase) e que é essencial para manter os níveis normais de ATP e GTP em *E. coli*. Esses autores também atribuíram um possível papel alostérico desse subdomínio na atividade da IMPDH (56, 58).

Figura 11. Estrutura da IMPDH de *Streptococcus pyogenes* resolvida por meio de cristalografia por difração de raios X



Fonte: Zhang et al., 1999 (55).

Nota: Código de acesso no Protein Data Bank (PDB): 1ZFJ. Cada monômero possui uma cor distinta. Os domínios catalíticos e CBS estão identificados.

IMPDHs de vários organismos têm sido extensivamente estudadas como alvo para a descoberta de compostos antivirais, antibacterianos e anticâncer (50). As IMPDHs já caracterizadas foram expressas como proteínas recombinantes em *E. coli* e incluem: IMPDH de *C. parvum* (52, 59), *E. coli* (60, 61), *T. foetus* (62), *Homo sapiens* (63-66), *S. pyogenes* (55), *Leishmania donovani* (67), *B. burgdorferi* (68), *Bacillus anthracis* (69), *Pseudomonas aeruginosa* (70) e *M. tuberculosis* (54). A maioria é purificada por cromatografia, utilizando colunas de afinidade, como a Cibacron Blue Sepharose. A estrutura tetramérica é estável em solução, embora a formação de agregados tenha sido relatada (68, 71-73).

A atividade enzimática *in vitro* é ótima em soluções de pH 8 e 8,5 e todas as IMPDHs estudadas são ativadas por K^+ , podendo ser também ativadas por outros cátions monovalentes (52, 61, 64, 74, 75).

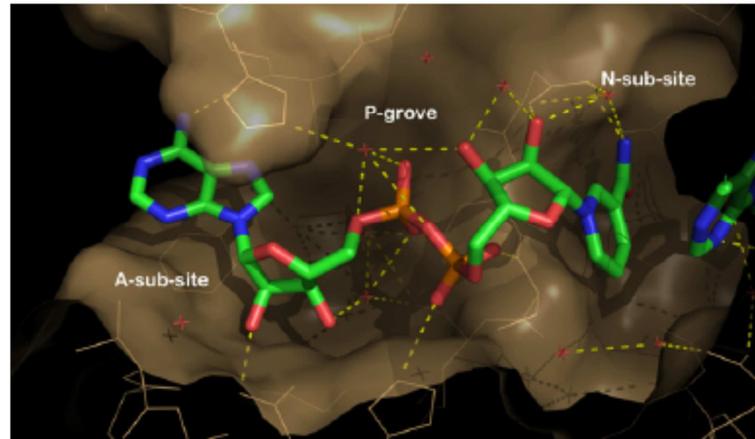
O mecanismo cinético da IMPDH tem sido detalhado, e experimentos de ligação aos substratos e produtos, efeitos isotópicos e cinética em estado estacionário sugerem a adição aleatória dos substratos IMP e NAD^+ , e a liberação ordenada dos produtos, onde a hidrólise do intermediário covalente (E-XMP*) é a etapa limitante da reação (52, 62, 65, 76).

3.2 IMPDH COMO ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO DE DROGAS

IMPDHs têm sido consideradas alvos atrativos para intervenções farmacológicas. Inibição da IMPDH causa uma redução nos níveis de nucleotídeos de guanina e, uma vez que GTP é cofator para a conversão de IMP a AMP, os níveis de nucleotídeos de adenina também diminuem. A subsequente interrupção da síntese de DNA e RNA resulta em citotoxicidade (43, 50). Além disso, visto que os nucleotídeos de guanina atuam como cofatores de proteínas G, reguladores alostéricos e moléculas sinalizadoras, a inibição da IMPDH pode comprometer diversas vias metabólicas (49). Portanto, sua inibição constitui uma estratégia interessante para o tratamento de câncer, doenças autoimunes, bem como para a descoberta de drogas antivirais, antiparasitárias e antibacterianas.

Muitos inibidores da IMPDH competem pelo sítio vago do NAD^+ , impedindo a hidrólise de E-XMP*. Esses inibidores podem interagir com os três sítios de ligação ao cofator (**Figura 12**): o sítio de ligação à porção nicotinamida monofosfato (denominado sítio N), o sítio de ligação à porção AMP (denominado sítio A) e o sítio de ligação ao pirofosfato (denominado sítio P ou P-grove) (77).

Figura 12. Domínio de ligação ao cofator NAD⁺ na *h*IMPDH2



Fonte: Felczak *et al.*, 2011 (77).

Nota: Código de acesso PDB: 1NFB.

A seletividade desses inibidores é determinada tanto pela estrutura do sítio de ligação do NAD⁺ quanto pelas propriedades dinâmicas da enzima. Por exemplo, em IMPDHs de mamíferos, a conformação aberta da tampa é favorecida durante a formação do intermediário, enquanto em enzimas microbianas prevalece a conformação fechada, diminuindo sua suscetibilidade (59, 60, 78). Além disso, IMPDHs procarióticas e eucarióticas possuem propriedades cinéticas e estruturais diferentes, sugerindo que é possível a identificação de inibidores seletivos (53).

O ácido micofenólico (MPA), metabólito ativo do mofetil micofenolato (CellCept[®]), age ligando-se ao sítio N da IMPDH (**Figura 10B**) e sua utilização como imunossupressor foi aprovada pelo FDA na prevenção da rejeição de transplantes (50, 79). O MPA é um potente inibidor das *h*IMPDH1 ($K_i = 11 - 33$ nM) e *h*IMPDH2 ($K_i = 7 - 14$ nM), porém apresenta pouca atividade inibitória em IMPDHs microbianas (53, 80). Essa divergência acontece porque dois resíduos de aminoácidos do sítio de ligação à nicotinamida não são conservados; enzimas de eucariotos contêm arginina na posição 322 e glutamina na posição 441 (numeração de acordo com a sequência da *h*IMPDH2), o que favorece a ligação ao MPA, enquanto enzimas microbianas possuem resíduos de lisina e glutamato nessas posições (52, 53, 81).

Inibidores da IMPDH também podem competir pelo sítio de ligação do IMP. Exemplos de fármacos comerciais incluem o ribavirin (Rebetol[®]), um agente antiviral aprovado pelo FDA e utilizado em combinação com interferon-alfa para o tratamento de hepatite C, e o mizoribine (Bredinin[®]), utilizado no Japão para o tratamento de artrite reumatóide e dermatoses autoimunes (50).

3.3 IMPDH de *Mycobacterium tuberculosis*

A sequência genômica de *M. tuberculosis* H37Rv contém três genes que foram preditos codificar a enzima IMPDH, designados *guaB1* (Rv1843c), *guaB2* (Rv3411c) e *guaB3* (Rv3410c). Os genes *guaB2* e *guaB3* encontram-se organizados em um operon, enquanto o gene *guaB1* está em outra localização no genoma (45) e estudos de mutagênese utilizando transposons sugerem que apenas o gene *guaB2* é essencial para o crescimento do bacilo *in vitro* (82).

Recentemente, Usha e colaboradores (75) clonaram, expressaram em *E. coli* e purificaram o produto desses três genes. A avaliação da atividade enzimática das proteínas recombinantes revelaram que apenas o gene *guaB2* (Rv3411c) codifica uma IMPDH que catalisa a reação de formação de XMP a partir de IMP (75). A IMPDH de *M. tuberculosis* (*Mt*IMPDH) é, portanto, codificada pelo gene *guaB2*, que possui uma sequência de 1.590 pares de bases (pb) e codifica uma proteína de 529 aminoácidos, com um tamanho de aproximadamente 55 kDa.

Igualmente às outras IMPDHs, a atividade catalítica da *Mt*IMPDH é dependente do íon K^+ . Os parâmetros cinéticos aparentes foram determinados para os substratos IMP e NAD^+ , em solução de pH 8,5 e a temperatura de 37 °C. Nesse mesmo estudo, três compostos inibidores apresentaram > 90% de inibição *in vitro* sobre a *Mt*IMPDH, quando testados na concentração de 1 mM. Além disso, eles foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* do *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* (75).

Embora o alinhamento entre a sequência de aminoácidos da *Mt*IMPDH (NP_217928.1) e a *h*IMPDH2 (NP_000875.2) tenha revelado aproximadamente 38% de identidade (**Figura 13**), resíduos presentes no sítio do NAD^+ não encontram-se conservados. Como mencionado anteriormente, as *h*IMPDHs contém uma arginina na posição 322 e glutamina na posição 441, o que favorece a ligação do inibidor MPA, enquanto que enzimas microbianas, incluindo a de *M. tuberculosis*, contém uma lisina e glutamato nessas posições. O resíduo de cisteína do sítio ativo é conservado na *Mt*IMPDH, assim como na maioria das IMPDHs estudadas (49).

JUSTIFICATIVA

Doenças infecciosas representam um motivo de preocupação global ao longo de anos, e o *M. tuberculosis* é responsável por causar mais mortes que qualquer outro agente infeccioso (83). Aproximadamente 95% dos casos de TB ocorrem em países em desenvolvimento e essas estatísticas refletem as restrições financeiras dessas nações, onde poucos recursos são destinados a tratamentos apropriados e onde a infecção pelo HIV é comum (13). A emergência de linhagens de *M. tuberculosis* MDR/XDR evidencia a urgente necessidade de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, o que demanda a identificação de alvos moleculares de interesse.

Novas abordagens para o desenvolvimento de compostos contra doenças complexas, especialmente doenças endêmicas negligenciadas, são baseadas no uso de alvos moleculares definidos (47). Estas abordagens resultam na pesquisa e identificação de compostos líderes, com mecanismos moleculares definidos contra um alvo específico. Além disso, permitem a análise de um número maior de compostos com melhor custo benefício.

IMPDHs humanas são alvos validados para compostos com ação imunossupressora, anticâncer e antiviral. Além disso, um entendimento detalhado sobre o mecanismo de uma série de compostos contra IMPDHs tem resultado em um progresso significativo na descoberta por novos inibidores, mas trabalhos adicionais são requeridos a fim de validar esses compostos para uso clínico (43). No entanto, inibidores de IMPDHs não são comumente explorados para aplicações em terapias antimicrobianas, em parte, pela dificuldade de prever sobre a toxicidade seletiva (84).

Enzimas envolvidas no metabolismo de purinas 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. Apoiando os esforços para o descobrimento de novos alvos, o nosso grupo estuda as enzimas da biossíntese de purinas e pirimidinas, a fim de determinar a sua importância na viabilidade do bacilo causador da TB. O gene *guaB2* foi predito como essencial para o crescimento do *M. tuberculosis* (85) e suas diferenças em relação às enzimas homólogas humanas podem ser exploradas para o desenho de inibidores seletivos.

Deste modo, a caracterização bioquímica detalhada da *Mt*IMPDH é de grande relevância para o entendimento do seu papel na biologia do *M. tuberculosis*. Estudos cinéticos, visando o entendimento do mecanismo de ação da enzima em questão, podem prover uma base sólida para posteriores estudos de inibição. Além disso, estes estudos representam um passo inicial para a pesquisa de inibidores enzimáticos com alvo molecular definido.

Novas ferramentas moleculares e genéticas (83, 86), associadas ao sequenciamento do genoma do *M. tuberculosis* H37Rv (45), possibilitam a predição de alvos importantes para o crescimento, virulência e sobrevivência do bacilo. Dessa forma, os estudos genéticos propostos neste trabalho podem predizer a essencialidade de um gene e, conseqüentemente, avaliar o produto deste gene como um potencial alvo para drogas (15).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi a caracterização cinética e bioquímica da enzima IMPDH de *M. tuberculosis*, assim como a validação desta enzima como alvo para compostos inibidores.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Amplificação da sequência do gene *guaB2* de *M. tuberculosis*, clonagem do fragmento amplificado em vetor procariótico e subclonagem em vetor de expressão pET-23a(+), seguido de sequenciamento genômico do clone pET-23a(+)::*guaB2*;

II. Expressão do produto do gene *guaB2* em *E. coli* a fim de obter a proteína recombinante na forma solúvel;

III. Purificação da proteína recombinante e quantificação de proteína total;

IV. Análise da estrutura primária e confirmação da identidade da proteína através de espectrometria de massa;

V. Caracterização funcional da *Mt*IMPDH;

VI. Dependência da atividade enzimática na presença de cátions monovalentes;

VII. Determinação das constantes cinéticas aparentes;

VIII. Determinação das constantes cinéticas verdadeiras;

IX. Experimentos de inibição pelos produtos;

X. Ativação ou inibição por efetores alostéricos;

XI. Determinação da energia de ativação;

XII. Estudos de perfil de pH;

XIII. Avaliação da importância da enzima IMPDH no metabolismo do *M. tuberculosis* através de nocaute do gene *guaB2*;

XIV. Planejamento e síntese de possíveis compostos inibidores da atividade da *Mt*IMPDH;

XV. Avaliação do potencial inibitório dos compostos sintetizados sobre a atividade catalítica da *Mt*IMPDH (determinação dos valores de IC_{50} e K_i).

Este projeto faz parte do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB) e foi desenvolvido no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), localizado no TECNOPUC - PUCRS.

Os capítulos estão organizados da seguinte forma:

No **Capítulo 2** constam os resultados obtidos da caracterização cinética da enzima *Mt*IMPDPH (**Objetivos específicos I – XII**).

O **Capítulo 3** consiste em um manuscrito submetido à revista *Molecular BioSystems* (fator de impacto: 3,35), onde são apresentados os dados obtidos a partir dos estudos descritos no Capítulo 2.

No **Capítulo 4** são apresentados os resultados obtidos da construção da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv mutante para o gene *guaB2* através de nocaute gênico, bem como as perspectivas deste estudo (**Objetivo específico XIII**).

No **Capítulo 5** estão descritas as etapas de síntese de compostos inibidores da atividade catalítica da *Mt*IMPDPH e os resultados obtidos a partir dos estudos de inibição *in vitro* (**Objetivos específicos XIV e XV**).

No **Capítulo 6** são apresentadas as considerações finais.

Capítulo 2

CARACTERIZAÇÃO
CINÉTICA DA ENZIMA
IMPDH DE *Mycobacterium
tuberculosis*

METODOLOGIA

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ANÁLISE DOS DADOS

METODOLOGIA

1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *guaB2*, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DE DNA

O desenho de oligonucleotídeos iniciadores sintéticos (*primers* direto e reverso), utilizados na amplificação da região codificante do gene *guaB2* e contendo os sítios de restrição para as enzimas NdeI e BamHI, foi realizado utilizando-se como molde a sequência do gene *guaB2* (Rv3411c) da cepa laboratorial *M. tuberculosis* H37Rv (NC_000962) reportada na base de dados do NCBI (87).

O fragmento de 1.590 pb foi amplificado por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a partir do DNA genômico total de *M. tuberculosis* H37Rv. A amplificação da sequência de nucleotídeos foi realizada em uma mistura de reação contendo: DNA polimerase de *Pyrococcus furiosus*, Pfu[®] Turbo DNA Polymerase (Stratagene); tampão de reação 10x Pfu Turbo[®] DNA Polymerase (Stratagene), dNTPs, *primers* sintéticos e a fonte de DNA. As condições para a obtenção dos produtos de amplificação esperados foram otimizadas variando-se fatores como temperatura de anelamento e presença de aditivos, como dimetilsulfóxido (DMSO).

Os produtos da amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo, sob luz ultravioleta. Em seguida, os produtos de PCR foram isolados utilizando-se o *kit* de extração de DNA (Quick Gel Extraction - Invitrogen) e clonados separadamente em vetor plasmidial pCR-Blunt[®] (Invitrogen).

Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células de *E. coli* DH10B (Novagen) eletrocompetentes por meio de eletroporação (Gene Pulser II; Capacitance Extender II; Pulse Controller II, BIO-RAD), com posterior seleção em meio de cultura Lysogeny Broth (LB) sólido, contendo canamicina 50 µg mL⁻¹ (antibiótico de resistência do vetor) e propagação em meio LB líquido, utilizando o mesmo antibiótico (88). O isolamento do DNA plasmidial das células transformadas foi realizado utilizando-se *kit* de purificação (Qiaprep Spin Miniprep - Qiagen).

Subsequentemente, o plasmídeo foi submetido à clivagem com as enzimas de restrição específicas às construções dos *primers* (NdeI e BamHI), e o produto de digestão foi isolado por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. O fragmento de interesse foi extraído do gel utilizando-se o *kit* Quick Gel Extraction e o inserto foi subclonado em vetor de expressão (pET-23a(+)) - Novagen), previamente clivado com as mesmas enzimas de restrição.

Os clones pET-23a(+>::*guaB2*) foram transformados em células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes e as colônias foram selecionadas em meio LB sólido e propagadas em meio LB líquido contendo ampicilina 50 µg mL⁻¹. O DNA plasmidial foi posteriormente

extraído e clivado com as enzimas de restrição citadas anteriormente para confirmação da clonagem.

O DNA plasmidial, contendo o inserto (pET-23a(+):*guaB2*), foi quantificado no espectrofotômetro Ultrospec 3100 pro (Amersham Biosciences). O DNA quantificado foi posteriormente enviado para sequenciamento automático no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot - UFRGS), a fim de verificar a identidade e a integridade da sequência.

2 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DO PRODUTO DO GENE *guaB2*

Posterior a análise da sequência nucleotídica, o vetor pET-23a(+):*guaB2* foi transformado em diferentes cepas de *E. coli* (BL21 (DE3), C43 (DE3), Rosetta-gami (DE3), Rosetta (DE3), BL21 (DE3) pLys e C41 (DE3)) até a obtenção da superexpressão da proteína recombinante na forma solúvel. As células bacterianas contendo o plasmídeo foram selecionadas em meio LB sólido e propagadas em meio LB ou Terrific Broth (TB) líquido, contendo os antibióticos adequados, e incubadas a 37 °C por 16 horas (88).

Os testes de expressão foram realizados em duplicata, para que pudessem ser testadas diferentes condições de expressão, com e sem indução mediada por isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Como controle negativo foram utilizadas colônias da mesma cepa escolhida, porém transformadas com o vetor pET-23a(+) sem o inserto clonado. Em uma das culturas do controle e da amostra, as células foram induzidas com 0,5 ou 1 mM de IPTG quando estas alcançaram uma densidade ótica (OD_{600nm}) entre 0,4 – 0,6.

A partir da indução, alíquotas de 1 mL de cada frasco, contendo as respectivas culturas foram coletadas para posterior análise, nos tempos de 3, 6, 9, 12, 24 e 36 horas. A outra amostra e o controle não foram induzidos, e alíquotas também foram coletadas nos mesmos horários.

Para a análise da expressão proteica, as células bacterianas foram separadas do meio de cultura por centrifugação, ressuspensas em tampão 50 mM Tris HCl pH 7,5, rompidas pela técnica de ultrassom e centrifugadas para a separação das frações. As frações solúveis (sobrenadantes) foram separadas das frações insolúveis (*pellet*) e todas as amostras foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio 12% (SDS – PAGE 12%), corado com Coomassie Brilliant Blue (89).

3 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Depois de obtida a expressão da proteína recombinante na fração solúvel, foram realizadas diversas tentativas de purificação da mesma pela técnica de cromatografia líquida de rápida performance, em equipamento do sistema de purificação ÄKTA (GE Health Care), testando diferentes protocolos de purificação, modificando as colunas cromatográficas utilizadas, bem como diferentes tampões, para a obtenção da proteína homogênea e ativa. A análise das diferentes etapas de purificação foi realizada através da técnica de SDS-PAGE 12%.

Para a determinação da concentração total de proteína foi utilizado o *kit* Bio-Rad Protein Assay (BIORAD), o qual se baseia na técnica desenvolvida por Bradford (90). A curva-padrão é realizada utilizando albumina de soro bovino. Todos os pontos da curva e quantificação da proteína recombinante foram feitos em triplicata em espectrofotômetro Ultrospec 3100 pro.

4 ANÁLISE DA ESTRUTURA PRIMÁRIA E CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DA PROTEÍNA ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA

A proteína homogênea foi submetida à digestão com tripsina e os peptídeos gerados foram submetidos à análise por cromatografia líquida associada à espectrometria de massa com fragmentação induzida por colisão (LC-MS/MS) (91) e os espectros de fragmentação foram interpretados para a identificação das sequências dos peptídeos através de um software de busca (Protein Discoverer, Thermo (92)) a fim de confirmar a identidade da proteína recombinante. A proteína homogênea foi submetida à espectrometria de massa de ionização por eletrospray (ESI-MS) para confirmação de seu peso molecular.

O ensaio foi realizado no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (PUCRS) utilizando os espectrômetros de massas LTQ-XL e LTQ Orbitrap Discovery (Thermo), sob a coordenação do Dr. Cristiano V. Bizarro.

5 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUATERNÁRIA DA *Mt*MPDH

Experimentos descritos por Fadouloglou e colaboradores (93), utilizando-se um agente de ligação cruzada (glutaraldeído), foram utilizados para a determinação da estrutura quaternária da *Mt*MPDH recombinante. Foram utilizadas placas de cultura Linbro (MP Biomedical, Inc.) contendo 120 μ L de uma solução de glutaraldeído 25% (v/v) acidificada com 3 μ L de HCl 5 N. Os poços da placa foram selados com uma placa siliconada contendo uma gota suspensa (15 μ L) da proteína em tampão 50 mM Tris HCl pH 8,5 com ou sem K^+

ou Na^+ . As placas foram incubadas a 30 °C em diferentes intervalos de tempo e as gotas de proteína foram subsequentemente analisadas através de SDS-PAGE 12%.

6 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA *Mt*IMPDPH

A atividade catalítica da *Mt*IMPDPH foi determinada para as frações coletadas de todas as etapas de purificação, através de ensaio direto em um UV-2550 UV/vis espectrofotômetro (Shimadzu), monitorando-se o aumento da absorbância a 340 nm ou a 363 nm, devido a formação de NADH/NADPH ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ou APADH ($\epsilon_{363\text{nm}} = 9,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), respectivamente. O ensaio padrão foi realizado de acordo com Usha e colaboradores (75), com algumas modificações, a 37°C em 50 mM Tris HCl pH 8,5, contendo 2 mM de ditioneitol (DTT), na presença de um cátion monovalente (geralmente K^+), em um volume de reação final de 500 μL . Uma unidade de *Mt*IMPDPH é definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1 μmol de IMP em XMP por minuto, em um caminho óptico de 1 cm. Reações na ausência da *Mt*IMPDPH foram monitoradas a fim de subtrair possíveis artefatos químicos gerados durante a leitura de reação.

7 DEPENDÊNCIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA PRESENÇA DE CÁTIONS MONOVALENTES

Soluções de KCl, NaCl, LiCl, RbCl, NH_4Cl e CsCl foram utilizadas como fonte de cátions monovalentes. Diferentes concentrações dessas soluções foram adicionadas a mistura de reação padrão, para monitoramento da atividade da *Mt*IMPDPH em função da concentração de cátion monovalente. As curvas de saturação e os parâmetros cinéticos aparentes obtidos com K^+ , NH_4^+ , Rb^+ e Cs^+ , foram avaliados em concentrações fixas e saturantes dos substratos IMP (1 mM) e NAD^+ (3 mM). Cátions divalentes, como o Ca^{2+} e Mg^{2+} também foram testados, na concentração de 200 mM, a fim de verificar se cátions divalentes são capazes de ativar a enzima em estudo.

8 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS APARENTES

No presente estudo, o K^+ foi considerado o cátion monovalente essencial. As constantes cinéticas aparentes em estado estacionário foram determinadas variando-se as concentrações de IMP (0,04 - 1 mM) em concentrações fixas e saturantes de NAD^+ (3 mM) e KCl (200 mM), e variando-se as concentrações de NAD^+ (0,3 - 10 mM) em concentrações fixas e saturantes de IMP (1 mM) e KCl (200 mM), nas condições de ensaio padrão.

A especificidade da enzima por NAD^+ foi avaliada monitorando-se a atividade enzimática na presença de diferentes concentrações dos análogos de NAD^+ : nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP^+) (0,8 – 20 mM) e 3-acetilpiridina adenina dinucleotídeo (APAD^+), em concentrações fixas e saturantes de IMP (1 mM) e KCl (200 mM). A dependência dos parâmetros cinéticos para os substratos IMP e NAD^+ foi também investigada na presença dos íons NH_4^+ e Rb^+ , nas concentrações saturantes (200 mM).

9 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS VERDADEIRAS E PADRÃO DE INTERSECÇÃO DAS RETAS

Estudos de velocidade inicial foram realizados a fim de determinar os parâmetros cinéticos verdadeiros em estado estacionário para a reação direta. A atividade enzimática foi monitorada em três experimentos diferentes: i) variando-se a concentração de NAD^+ (0,3 – 3 mM), em concentrações fixas e variantes de K^+ (30, 66, 102, 198 e 240 mM) e concentração saturante de IMP (2 mM); ii) variando-se a concentração de NAD^+ (0,3 – 3 mM), em concentrações fixas e variantes de IMP (0,07, 0,1, 0,3, 0,5 e 1 mM) e concentração saturante de K^+ (240 mM); iii) variando-se a concentração de K^+ (30 – 300 mM), em concentrações fixas e variantes de IMP (0,08, 0,1, 0,24, 0,5 e 1 mM) e concentração saturante de NAD^+ (3 mM) (94, 95).

10 EXPERIMENTOS DE INIBIÇÃO PELOS PRODUTOS

A fim de fornecer informações adicionais sobre o mecanismo cinético enzimático, experimentos de inibição pelos produtos foram realizados, variando-se a concentração de um substrato em concentrações fixas e variadas dos produtos (XMP ou NADH), enquanto que os cossustratos foram mantidos em concentrações não saturantes ($\cong K_m$) (96).

Objetivando analisar se nucleotídeos pirimidínicos exercem algum efeito nos parâmetros cinéticos da *Mt*IMPDPH, foram realizados experimentos no ensaio de reação padrão, em função da variação de concentração de um dos substratos (IMP ou NAD^+), em concentração fixa e saturante dos cossustratos; na ausência ou presença de AMP, ATP, UTP e CTP, na concentração de 500 μM .

Estudos de inibição foram realizados variando-se um dos substratos (IMP ou NAD^+) em concentrações fixas, não saturantes dos cossustratos ($\cong K_m$), em concentrações fixas e variantes de GMP (0, 200, 300, 400, 600 e 800 μM) ou GTP (0, 200, 400 e 800 μM). A inibição por cátions monovalentes foi monitorada variando-se a concentração de K^+ , em concentrações fixas e não saturantes de IMP e NAD^+ , em concentrações fixas e variantes de Na^+ (0, 80, 160 e 240 mM) e Li^+ (0, 80, 120 e 160 mM).

11 DETERMINAÇÃO DA ENERGIA DE ATIVAÇÃO

A fim de determinar a energia de ativação da reação catalisada pela *MtIMP*PDH, experimentos foram realizados em concentrações fixas e saturantes de IMP (2 mM), NAD⁺ (3 mM) e KCl (200 mM), variando-se as temperaturas de 288 a 308 K. A atividade enzimática da *MtIMP*PDH foi monitorada por 2 minutos no ensaio de reação padrão a fim de garantir a estabilidade da enzima nessa faixa de temperatura (97).

12 ESTUDOS DE PERFIL DE pH

Os estudos de pH foram realizados segundo Cook e Cleland (96), nos quais são determinadas as constantes cinéticas aparentes em estado estacionário utilizando um tampão composto (100 mM Mes/Hepes/Ches), em uma determinada faixa de pH. Primeiramente, a enzima foi incubada a 37 °C por 2 minutos em uma ampla faixa de pH e sua atividade foi monitorada na condição de ensaio padrão, a fim de identificar valores de pH desnaturantes e garantir a estabilidade da enzima na faixa de pH testada.

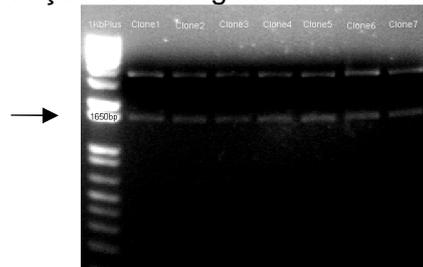
A dependência dos parâmetros cinéticos em função do pH foi analisada monitorando-se a velocidade inicial na presença de concentrações variadas de um substrato, em concentrações fixas e saturantes dos cossubstratos, nos seguintes valores de pH: 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, e 10,0. As constantes catalítica (k_{cat}) e de especificidade (k_{cat}/K_m) para o substrato NAD⁺ foram analisadas em função logarítmica contra os valores de pH. Tais estudos fornecem as constantes de dissociação aparentes de grupos funcionais de cadeias laterais de aminoácidos envolvidos na ligação e/ou catálise (96). Além disso, estes estudos indicam os prováveis aminoácidos envolvidos na formação dos complexos binários e importantes para a catálise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 AMPLIFICAÇÃO, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO GENE *guaB2*

O fragmento amplificado por PCR apresentou um tamanho correspondente aos 1.590 pb da sequência codificante do gene *guaB2* de *M. tuberculosis* H37Rv (dado não apresentado). A melhor condição para amplificação continha uma concentração final de 10% de DMSO na mistura de reação. O fragmento foi purificado do gel de agarose e ligado no vetor de clonagem pCR-Blunt®, seguido da ligação no vetor de expressão pET-23a(+) (Figura 14), como descrito na seção “Amplificação do gene *guaB2*, clonagem e sequenciamento de DNA”. O sequenciamento automático de DNA confirmou a identidade e a ausência de mutações no fragmento clonado.

Figura 14. Confirmação da clonagem em vetor de expressão procariótico



Nota: Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando os fragmentos de aproximadamente 1.590 pb após a clivagem com as enzimas NdeI e BamHI, para a confirmação da clonagem no vetor de expressão pET-23a(+).

2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA RECOMBINANTE

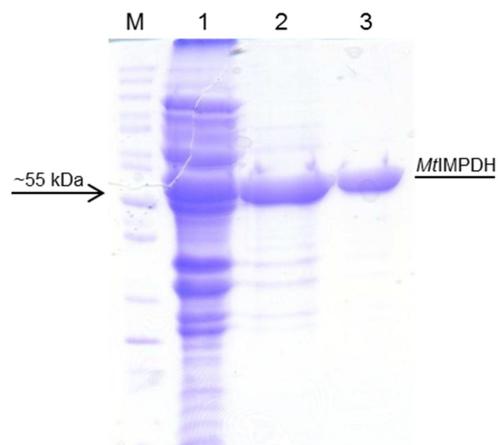
O plasmídeo recombinante pET-23a(+)::*guaB2* foi transformado em diferentes cepas de *E. coli* e foram testadas diversas condições de crescimento para a expressão da proteína recombinante, nas quais foram variadas a temperatura, meio de cultivo e concentração de IPTG. A melhor condição para a expressão do produto do gene *guaB2* foi em células C41(DE3), cultivadas em meio TB, a uma temperatura de 30 °C, coletadas após 36 h da indução com 0,5 mM de IPTG. A análise através de SDS-PAGE 12% indicou que o extrato celular continha a proteína recombinante na fração solúvel e insolúvel (dado não apresentado), com uma massa molecular aparente de 55 kDa, correspondente ao peso molecular predito para a *Mt*IMPDH (54,8 kDa).

A proteína recombinante foi eficientemente purificada utilizando-se duas colunas cromatográficas. Primeiramente, as células (3 g) foram ressuspensas em tampão 50 mM Tris HCl pH 7,5, rompidas por ultrassom e centrifugadas, para separação das frações

solúvel e insolúvel. Ao sobrenadante, foi adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a uma concentração final de 1 M, seguido de agitação por 30 minutos a 4°C, e centrifugação. A fração insolúvel foi ressuspensa em 50 mM Tris HCl pH 7,5 e aplicada na coluna de afinidade HiTrap Blue HP. Para a eluição, foi utilizado um gradiente de NaCl (0 – 900 mM) e a proteína eluiu em, aproximadamente, 560 mM de NaCl. Após a análise por SDS-PAGE 12%, as frações contendo a enzima recombinante foram coletadas e a amostra foi concentrada até o volume final de 10 mL, utilizando uma membrana com poros de 10 kDa, no sistema AMICON (Millipore Corporation, Bedford, MA). Em seguida, a amostra foi aplicada em uma coluna de exclusão por tamanho (HiLoad Superdex 200 26/60) e eluída com tampão 50 mM Tris HCl pH 7,5. A proteína recombinante homogênea foi analisada através de SDS-PAGE 12% (**Figura 15**), concentrada e armazenada a -80 °C. Para a determinação da concentração total de proteína foi utilizado o *kit* Bio-Rad Protein Assay (BIORAD), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

Partindo de 3 g de células, este protocolo de purificação rendeu 3 mg de proteína recombinante, indicando 43% de rendimento proteico (**Tabela 1**). Experimentos de cinética enzimática realizados em todas as etapas de purificação, utilizando-se o ensaio padrão descrito em “*Caracterização funcional da MtIMPDH*”, confirmaram que a enzima recombinante catalisa a oxidação de IMP a XMP.

Figura 15. Análise por SDS-PAGE 12% das frações coletadas em cada etapa de purificação da *MtIMPDH*



Nota: M: marcador de proteína Page Ruler; 1: extrato bruto; 2: eluído da coluna HiTrap Blue HP; 3: eluído da coluna HiLoad Superdex 200 26/60.

Tabela 1. Purificação da *Mtl*MPDH recombinante

| Etapa de purificação | Proteína total (mg) | Atividade enzimática total (U) | Atividade específica (Umg ⁻¹) | Eficiência de purificação | Rendimento (%) |
|----------------------|---------------------|--------------------------------|---|---------------------------|----------------|
| Extrato bruto | 11,6 | 13,9 | 1,2 | 1 | 100 |
| Blue HP | 6,9 | 11,7 | 1,7 | 1,4 | 84 |
| Superdex 200 | 3,0 | 6,0 | 2,0 | 1,7 | 43 |

Nota: Protocolo de purificação a partir de 3 g de células úmidas.

3 ANÁLISE DA ESTRUTURA PRIMÁRIA E CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DA PROTEÍNA ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA

A identidade da proteína recombinante foi confirmada em experimentos de mapeamento peptídico por LC-MS/MS. A partir de 481 espectros, correspondentes a peptídeos diferentes derivados da digestão trípica da proteína recombinante, foram identificados 52 peptídeos, os quais cobriram 96% da sequência primária da *Mtl*MPDH.

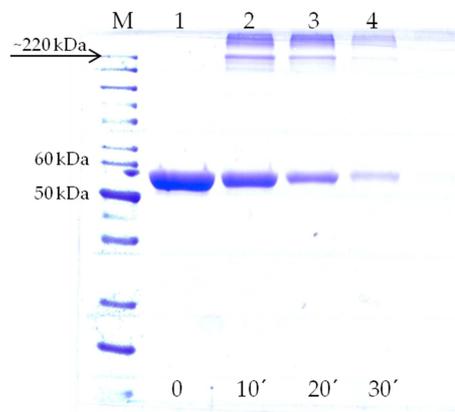
A massa molecular média da *Mtl*MPDH foi determinada experimentalmente através da obtenção de espectros com o analisador de massas Orbitrap utilizando amostras de *Mtl*MPDH intactas. Foi obtida uma massa molecular média de 54.775 Da. É interessante ressaltar que a massa molecular média predita para a *Mtl*MPDH sem a metionina N-terminal é de 54.735,84 Da. Neste caso, sugerimos que o valor encontrado experimentalmente equivale à massa da *Mtl*MPDH predita mais uma molécula do íon K⁺ (massa média: 39,098 Da), o que resultaria em um valor teórico de 54.774,9 Da. Esta análise foi repetida com uma amostra da *Mtl*MPDH dialisada contra um tampão contendo 200 mM NaCl, ao invés de KCl. No entanto, foi obtido um valor muito similar para a massa molecular média da *Mtl*MPDH (54.774 Da). Neste caso, se existe a formação de um aduto *Mtl*MPDH·K⁺, esta interação entre a proteína e o íon é forte o suficiente para resistir ao processo de diálise, sugerindo que o K⁺ detectado corresponde a um íon estrutural.

A fim de confirmar a presença deste íon e determinar a estequiometria de interação, uma amostra de *Mtl*MPDH (1,75 mg ml⁻¹) em tampão 50 mM Tris HCl pH 8,5 foi submetida a análise através de Espectroscopia de Absorção Atômica em Chama (FAAS) e Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES). Os resultados confirmaram a presença do íon K⁺ na amostra, em uma concentração de 1.345 (± 64) µg L⁻¹, equivalente a 1,08 (± 0,05) átomos de K⁺ por subunidade da enzima, validando nossa interpretação baseada na análise por espectrometria de massa.

4 ESTRUTURA QUATERNÁRIA DA *Mtl*IMPDH

A análise dos experimentos utilizando glutaraldeído como agente de reação cruzada, por meio de SDS-PAGE 12%, revelaram a conversão de monômero para tetrâmero (~220 kDa) após 10 minutos de incubação (**Figura 16**). A ausência de cátion monovalente na solução, bem como a substituição de K^+ por Na^+ não alteraram o perfil de migração das bandas (dados não apresentados), sugerindo que a ativação por cátions monovalentes não está envolvida na formação da estrutura quaternária.

Figura 16. Análise por SDS-PAGE 12% da estrutura quaternária da *Mtl*IMPDH



Nota: Os tempos de incubação (em minutos) estão representados abaixo de cada canaleta. 1: marcador de proteína Page Ruler; 2: monômero da *Mtl*IMPDH (~55 kDa); 3, 4 e 5: oligômeros da *Mtl*IMPDH (~220 kDa).

5 DEPENDÊNCIA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA PRESENÇA DE CÁTIONS MONOVALENTES

A ativação de IMPDHs por cátions monovalentes tem sido bem documentada, embora a especificidade por estes íons possa variar entre as espécies (49). Usha e colaboradores (75) reportaram que o K^+ promove uma atividade catalítica máxima para a *Mtl*IMPDH. Dessa forma, a dependência da atividade enzimática da *Mtl*IMPDH foi monitorada adicionando-se diferentes concentrações de cátions monovalentes à mistura de reação e a especificidade da enzima por estes íons foi determinada comparando-se a velocidade e a constante de especificidade obtida em cada curva de saturação. Os parâmetros cinéticos em estado estacionário obtidos com K^+ , NH_4^+ , Rb^+ e Cs^+ , se encontram apresentados na **Tabela 2**. As curvas de saturação para esses cátions apresentaram o perfil hiperbólico de Michaelis-Menten e foram analisadas de acordo com a equação (1), descrita no final deste capítulo, em “Análise dos dados”. Nossos resultados indicaram que o K^+ e o NH_4^+ são os ativadores mais efetivos, enquanto o Cs^+ resultou na menor velocidade obtida. Apesar da

mínima variação nos valores de k_{cat} , as constantes de especificidade (k_{cat}/K_m) para o K^+ e o NH_4^+ são equivalentes (**Tabela 2**), provavelmente devido à similaridade de tamanho dos raios iônicos, e como já reportados para outras IMPDHs (49). A V_{max} e os valores de $K_{0,5}$ ou K_m , obtidos para os substratos IMP e NAD^+ , respectivamente, são similares na presença de K^+ ou NH_4^+ (dados não apresentados). No entanto, a *Mt*IMPDH possui um valor de K_m para o K^+ superior aos valores reportados para outras IMPDHs (60, 64, 67), porém semelhante ao valor encontrado para a IMPDH de *B. burgdorferi* (68).

A ausência de K^+ na reação enzimática resultou em uma redução no valor de k_{cat} de, aproximadamente, 100 vezes. Além disso, íons menores como Na^+ e Li^+ não ativaram a *Mt*IMPDH. Ao contrário, eles inibiram a enzima ativada por K^+ , agindo como inibidores não-competitivos em relação ao K^+ (**Tabela 2**). Íons divalentes, como o Mg^{2+} e o Ca^{2+} também não ativaram a enzima em estudo, mesmo em altas concentrações (200 mM). Estes resultados confirmam o requerimento de cátions monovalentes para a atividade catalítica da *Mt*IMPDH e que o tamanho do raio iônico é importante para a seletividade.

Tabela 2. Constantes cinéticas aparentes para cátions monovalentes

| Cátion | Raio iônico (Å) | k_{cat} (s^{-1}) | K_m (mM) | k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) | K_i (mM) | K_{is} (mM) |
|----------|-----------------|------------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| Li^+ | 0,60 | n.d. ^a | n.d. ^a | n.d. ^a | 129 ± 16 | 380 ± 52 |
| Na^+ | 0,95 | n.d. ^a | n.d. ^a | n.d. ^a | 108 ± 16 | 708 ± 176 |
| K^+ | 1,33 | 2,83 ± 0,09 | 37 ± 5 | 76 ± 10 | n.d. ^a | n.d. ^a |
| NH_4^+ | 1,48 | 2,08 ± 0,04 | 28 ± 2 | 74 ± 5 | n.d. ^a | n.d. ^a |
| Rb^+ | 1,48 | 2,08 ± 0,09 | 44 ± 6 | 47 ± 6 | n.d. ^a | n.d. ^a |
| Cs^+ | 1,69 | 0,76 ± 0,05 | 84 ± 13 | 9 ± 1 | n.d. ^a | n.d. ^a |

Nota: ^a Não determinado.

Há mais de 60 anos, a piruvato quinase tem sido considerada um exemplo clássico de enzima cuja atividade catalítica é dependente de K^+ , sendo também ativada por NH_4^+ e Rb^+ e inibida por Li^+ e Na^+ (98). A ativação por metais tem sido descoberta em diversos sistemas e, o número de enzimas que necessitam de metais para catalisar reações ultrapassa centenas de exemplos (99). Em geral, enzimas dependentes de K^+ , como as quinases e as chaperonas moleculares, são também ativadas por NH_4^+ e Rb^+ , porém não são ativadas (ou pouco ativadas) por cátions maiores, como Cs^+ , ou cátions menores, como Li^+ e Na^+ (100).

O mecanismo de ativação pelo K^+ não está completamente elucidado para as IMPDHs, embora ele não pareça afetar a formação da estrutura tetramérica (64, 68). As estruturas cristalográficas resolvidas das IMPDHs de *Cricetulus griseus* (hamster Chinês) (101) e *T. foetus* (102, 103) revelaram a presença de um sítio de ligação ao K^+ próximo ao resíduo ativo de cisteína, o qual está localizado em uma alça rica em resíduos de glicina. O átomo de oxigênio do grupamento carbonila da Cis319 (numeração de acordo com a IMPDH de *T. foetus*) faz parte do sítio de ligação do cátion e, quando este sítio está ocupado, a cisteína se encontra em uma posição favorável para formar a ligação covalente com o átomo de C2 do IMP (102). Esta observação sugere que este íon é importante na orientação do resíduo de cisteína durante a catálise. Neste caso, a estabilização da alça contendo a Cis319 explicaria a ativação pelo K^+ .

Tem sido demonstrado que o K^+ não afeta a taxa de inativação da *h*IMPDH2 pelo 6-cloro-purina ribotídeo (6-Cl-PRT), nem a hidrólise do 2-cloro-IMP por esta enzima (104). Esta observação corrobora com os estudos de ligação em equilíbrio que revelaram a presença de um sítio de ligação para o IMP e XMP por subunidade, mesmo na ausência do K^+ (64), demonstrando que o íon ativador não modula a reatividade do grupamento sulfidril da cisteína. Além disso, estudos cinéticos e de mutagênese sítio-dirigida têm sugerido um envolvimento deste íon durante as alterações conformacionais envolvidas na ligação ao NAD^+ (61, 66, 74, 104) e, um trabalho recente baseado em experimentos de simulações cinéticas e de energia livre, revela que o K^+ acelera as transições conformacionais da IMPDH que facilitam as etapas de ligação do dinucleotídeo (105). Os autores também demonstraram que a dependência da constante catalítica em função do K^+ deve-se a velocidade de fechamento da tampa móvel, que aumenta na presença deste cátion. Em outras palavras, o modelo propõe que o K^+ diminui a barreira de ativação necessária para o fechamento da tampa. No entanto, mais estudos são necessários a fim de esclarecer a função do íon K^+ durante a reação catalisada pela *Mt*IMPDH.

As enzimas ativadas por metais podem ser classificadas baseando-se na seletividade por estes íons, estabelecida por meio dos estudos cinéticos, e no mecanismo de ativação, determinado através de análises estruturais. Os mecanismos de ativação podem ser do tipo cofator (tipo I) ou alostérico (tipo II). No primeiro caso, o metal é responsável por coordenar a ligação do substrato no sítio ativo da enzima, e é absolutamente necessário para a catálise ou reconhecimento do substrato. No segundo caso, o metal aumenta a atividade enzimática por meio de alterações conformacionais desencadeadas pela ligação a um sítio alostérico, não sendo essencial para a catálise (100). A resolução da estrutura tridimensional da IMPDH de *T. foetus* permitiu a identificação de um sítio de ligação ao K^+ próximo ao sítio de ligação do NAD^+ , na interface dos dímeros (78, 103). Neste caso, o K^+ não faz contato diretamente com os substratos, explicando o porquê

deste íon não ser absolutamente necessário para a catálise. Assim, o K^+ provavelmente age como um efetor alostérico, modulando a conformação do sítio ativo da Cis319 e do sítio de ligação ao NAD^+ . Os resultados dos ensaios cinéticos da *MtIMP*DH sugerem que a enzima em estudo possui características de proteínas com mecanismo de ativação do tipo II, em relação ao requerimento do K^+ para uma atividade catalítica máxima. No entanto, o mecanismo preciso de ativação só poderá ser esclarecido por meio de resolução da estrutura tridimensional da *MtIMP*DH.

Uma vez que as concentrações de Na^+ e K^+ são estritamente controladas *in vivo*, acredita-se que os metais facilitem a catálise e a ligação dos substratos, diminuindo as barreiras energéticas. As metaloenzimas evoluíram devido a disponibilidade de Na^+ fora das células e de K^+ no interior das células, a fim de otimizar suas atividades catalíticas. De fato, existe uma correlação entre a preferência por Na^+ ou K^+ e a localização intracelular ou extracelular de tais enzimas (106). O *M. tuberculosis* desenvolveu diferentes mecanismos para garantir a sua sobrevivência dentro dos macrófagos alveolares (3) e tem adaptado o seu metabolismo de acordo com as mudanças ambientais dos fagossomos (107). A abundância de K^+ em ambientes fisiológicos (108) e, a análise da concentração deste íon dentro dos fagossomos de macrófagos infectados com a micobactéria (107), poderia explicar a preferência da *MtIMP*DH por este íon.

A partir dos resultados obtidos por meio de espectrometria de massa, FAAS e ICP-OES, os quais mostraram a presença de um íon K^+ estrutural, é possível sugerir que a ativação por K^+ , caracterizada nos estudos de cinética enzimática, depende de um segundo sítio de ligação para este íon. Dessa forma, sugerimos que o sítio de ligação para o K^+ possa se tornar disponível ao longo da reação catalisada pela *MtIMP*DH, como proposto para a IMPDH de *C. parvum* (105).

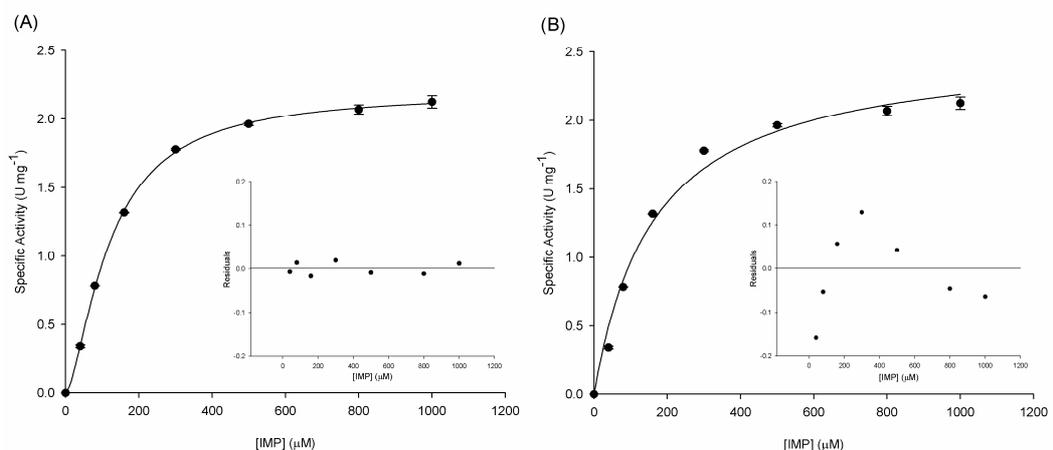
6 DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES CINÉTICAS APARENTES EM ESTADO ESTACIONÁRIO

As constantes cinéticas aparentes foram determinadas através de experimentos realizados no espectrofotômetro, em condições de ensaio padrão. A dependência da velocidade em função da variação do substrato IMP, em concentração saturante de NAD^+ (3 mM) e KCl (200 mM), apresentou perfil sigmoidal (**Figura 17A**), sugerindo cooperatividade positiva para esse substrato ($n > 1$). Neste caso, as constantes cinéticas foram calculadas através da equação de Hill (eq. 3), resultando nos seguintes valores: $k_{cat} = 2,2 (\pm 0,02) s^{-1}$, $K_{0,5} = 120 (\pm 2) \mu M$ e $n = 1,51 (\pm 0,04)$. O coeficiente de Hill (n) pode corresponder ao número total de sítios ativos em uma enzima composta por mais de uma subunidade (109). Neste caso podemos dizer que a *MtIMP*DH possui, no mínimo, dois sítios ativos, uma vez

que ela apresentou um índice de cooperatividade moderado ($n = 1,51$). A curva de saturação com perfil sigmoidal é um indicativo de alosteria, porém, para confirmar este tipo de comportamento, os dados obtidos a partir da curva de saturação do IMP foram também analisados de acordo com a equação de Michaelis-Menten (eq. 1) e, os resíduos calculados (*i.e.*, as diferenças entre os valores preditos e os valores observados das variáveis) para ambas as equações foram comparados. A **figura 17B** ilustra a dependência da velocidade em função da concentração de IMP analisada segundo a equação de Michaelis-Menten (eq. 1), no entanto, os resíduos estimados apresentaram um desvio sistemático da linearidade, sugerindo que as constantes cinéticas aparentes do IMP devem ser calculadas utilizando-se a equação de Hill (eq. 3).

Alosteria pode ser definida como o acoplamento de interações indiretas entre sítios distintos em uma proteína (110) capaz de regular sua função, e tem sido considerada um tipo de controle do metabolismo em muitos organismos (111). Processos alostéricos estão associados com alterações conformacionais de uma proteína induzidas por ligantes e que são propagadas entre os sítios de ligação (110). No entanto, comportamento alostérico na ausência de efetores não é comum entre IMPDHs (49). Experimentos de calorimetria de titulação isotérmica revelaram que o IMP pode interagir com a IMPDH de modo cooperativo, mostrando evidências de que a IMPDH pode apresentar comportamento alostérico em relação a este substrato (112). Além disso, existem relatos de que o GMP induz cooperatividade entre os sítios de ligação ao IMP (113). De qualquer modo, os resultados obtidos evidenciaram uma cooperatividade positiva moderada em relação ao substrato IMP.

Figura 17. Constantes cinéticas aparentes em estado estacionário para o IMP

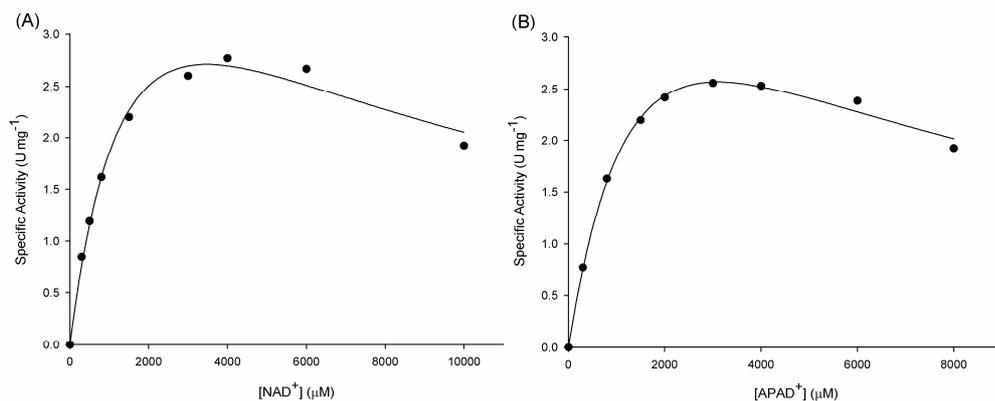


Nota: Os gráficos ilustram a atividade específica (U mg⁻¹) versus [IMP] (μM). (A) Curva de saturação do IMP analisada de acordo com a equação de Hill (eq. 3). (B) Curva de saturação do IMP analisada de acordo com a equação de Michaelis-Menten (eq. 1). Os *insets* dos gráficos (A) e (B) representam os resíduos calculados a partir das análises das equações (3) e (1), respectivamente.

A dependência da velocidade analisada em função de diferentes concentrações de NAD^+ revelou uma inibição por este substrato (**Figura 18A**), em concentração saturante de IMP (1 mM) e KCl (200 mM). Esta inibição já foi observada em estudos cinéticos de IMPDHs de outros organismos e é atribuída à ligação do NAD^+ ao intermediário E-XMP* (52, 54, 60, 62, 68). Além disso, este perfil sugere que a dissociação dos produtos segue um mecanismo ordenado, onde NADH é o primeiro produto a ser liberado (96). O valor de K_i para o NAD^+ é 7 vezes maior que seu valor de K_m ($887 (\pm 36) \mu\text{M}$) (eq. 2) e o valor calculado para o k_{cat} foi de $3,1 (\pm 0,04) \text{ s}^{-1}$.

Não foi possível detectar atividade enzimática substituindo o NAD^+ pelo seu análogo estrutural NADP^+ , mesmo em alta concentração (20 mM), sugerindo que a enzima não utiliza o NADP^+ como cofator na reação enzimática. Em contraste, o análogo estrutural APAD^+ também é substrato para a *Mt*IMPDH e inibição por este substrato também foi observada (**Figura 18B**). As constantes cinéticas obtidas para o APAD^+ foram: $k_{\text{cat}} = 3,1 (\pm 0,1) \text{ s}^{-1}$, $K_m = 907 (\pm 111) \mu\text{M}$ e $K_i = 5 (\pm 1) \text{ mM}$. Apesar da diferença estrutural entre estas duas moléculas, e o fato do APAD^+ possuir um potencial de redução superior ao do NAD^+ (a transferência do hidreto deveria ser mais rápida), os valores de k_{cat} para esses dois substratos são comparáveis. Esta observação sugere que a transferência do hidreto não é a etapa limitante na reação química catalisada pela *Mt*IMPDH. Portanto, a hidrólise de E-XMP* ou a dissociação do complexo E·XMP pode ser a etapa limitante da reação.

Figura 18. Constantes cinéticas aparentes em estado estacionário para o NAD^+ e APAD^+

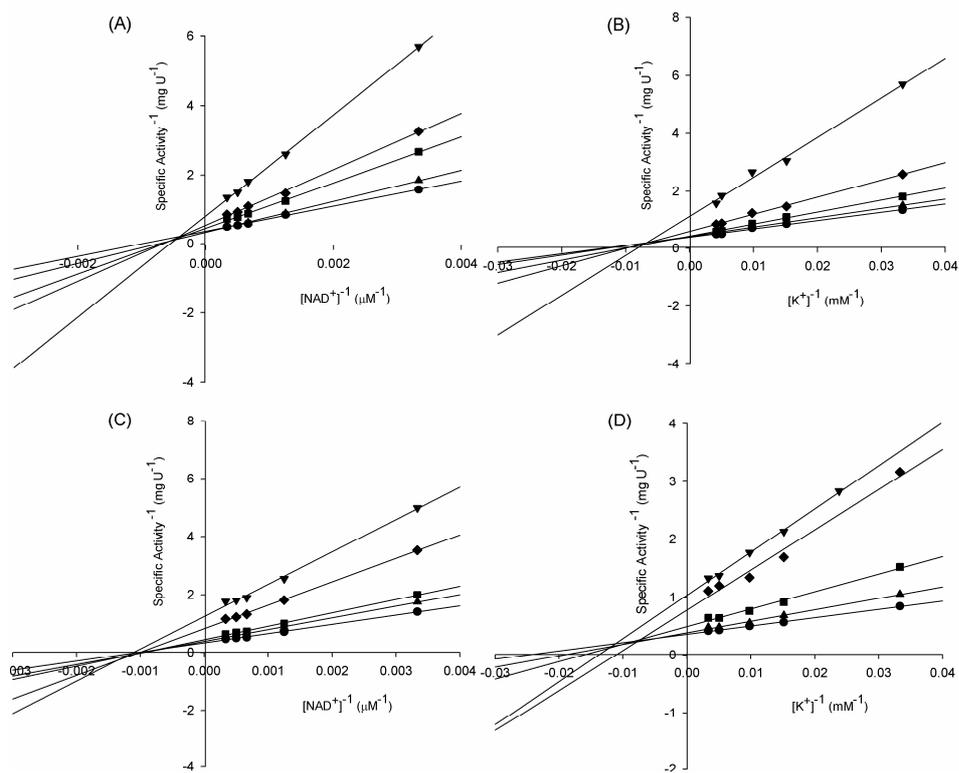


Nota: (A) Atividade específica (U mg^{-1}) versus $[\text{NAD}^+]$ (μM). (B) Atividade específica (U mg^{-1}) versus $[\text{APAD}^+]$ (μM).

7 PARÂMETROS CINÉTICOS VERDADEIROS E PADRÃO DE INTERSECÇÃO DAS RETAS

A fim de determinar os parâmetros cinéticos verdadeiros para os substratos e sugerir o mecanismo cinético enzimático da *Mt*IMPDPH, foram realizadas curvas de saturação variando-se as concentrações de substratos e cossubstratos (IMP, NAD^+ e K^+). Estas curvas foram analisadas em função de seus duplo recíprocos (ou *plot* de Lineweaver-Burk). A família de intersecção de retas resultantes à esquerda do eixo y (**Figura 19A-D**) é consistente com a formação do complexo ternário $\text{E}\cdot\text{IMP}\cdot\text{NAD}^+$ e é um indicativo de mecanismos sequenciais, podendo ser aleatório de equilíbrio rápido ou ordenado em estado estacionário. Deste modo, os parâmetros cinéticos foram calculados a partir da equação (4) e estão apresentados na **Tabela 3**. Os mecanismos de ping-pong ou equilíbrio rápido ordenado foram excluídos, uma vez que esses mecanismos apresentam um perfil de retas paralelas entre si e retas que se cruzam no eixo y , respectivamente (96, 114). As curvas de saturação do substrato IMP não foram incluídas nesta análise, uma vez que o recíproco de curvas sigmoidais não obedece a uma função linear. É interessante mencionar que o mecanismo cinético sequencial já foi reportado para as IMPDPHs de *Aerobacter aerogenes* (74), *h*IMPDPH2 (65) e de *T. foetus* (62, 115).

Figura 19. Padrão de intersecção das retas para a reação catalisada pela *Mt*IMPDPH



Nota: (A) Variação da concentração do NAD^+ em concentrações fixas e variantes do K^+ . (B) Variação da concentração do K^+ em concentrações fixas e variantes do NAD^+ . (C) Variação da concentração do NAD^+ em concentrações fixas e variantes do IMP. (D) Variação da concentração do K^+ em concentrações fixas e variantes do IMP.

Tabela 3. Constantes cinéticas verdadeiras resultantes dos estudos de velocidade inicial

| Substratos variados | Substrato fixo | $K_m^{\text{NAD}^+}$ (μM) | $K_m^{\text{K}^+}$ (mM) | k_{cat} (s^{-1}) |
|------------------------------------|----------------|--|-------------------------|--------------------------------------|
| NAD^+ versus K^+ | IMP | 1092 ± 74 | 102 ± 6 | $3,7 \pm 0,1$ |
| NAD^+ versus IMP | K^+ | 794 ± 57 | n.d. ^a | $3,1 \pm 0,1$ |
| K^+ versus IMP | NAD^+ | n.d. ^a | 44 ± 3 | $3,3 \pm 0,1$ |

Nota: ^a Não determinado.

8 INIBIÇÃO PELOS PRODUTOS

Os estudos de velocidade inicial descritos acima não permitem a distinção entre os mecanismos cinéticos aleatório de equilíbrio rápido ou ordenado em estado estacionário. Portanto, experimentos de inibição pelo produto (XMP ou NADH) foram realizados a fim de se determinar a ordem de adição dos substratos à enzima. É interessante salientar que quando o NAD^+ e o K^+ foram fixos em concentrações não saturantes ($\cong K_m$), os *plots* de duplo recíproco para o substrato IMP apresentaram linearidade. Dessa forma, os estudos de inibição puderam ser realizados em função deste substrato.

Os dados foram analisados de acordo com as equações (5) e (6) que descrevem inibição competitiva e não-competitiva, respectivamente. Os perfis de inibição resultantes e as constantes de dissociação (K_i e K_{is}) da análise de duplo recíprocos estão sumarizados na **Tabela 4**. Os resultados mostram um perfil de inibição competitiva do produto XMP em relação ao substrato IMP e três inibições do tipo não-competitivas com respeito ao IMP e NAD^+ , consistente com um mecanismo cinético Bi Bi ordenado em estado estacionário, onde o IMP se associa à *Mt*IMPDPH livre, seguido pela ligação do NAD^+ para formar o complexo ternário cataliticamente ativo. A inibição pelo substrato NAD^+ , que é mais comum em mecanismos ordenados em estado estacionário, quando um substrato se assemelha estruturalmente a um dos produtos (96), corrobora com as nossas observações. Além disso, os perfis de inibição não-competitivos do NADH em relação a ambos os substrato requer que o complexo E·XMP (ou E·XMP*) exista em estado estacionário, então a liberação do produto XMP pode ser uma das etapas lentas ao longo da reação catalisada pela *Mt*IMPDPH.

A inibição pelos produtos em relação ao K^+ permite propor que este cátion não se associa à enzima livre ao menos que o IMP ou o NAD^+ (ou ambos) estejam ligados à *Mt*IMPDPH. Portanto, é possível que o sítio de ligação deste íon se torne disponível durante o decorrer da reação catalítica, ou seja, que o K^+ possa se ligar em intermediários formados

ao longo da reação, como proposto para as IMPDHs de *T. foetus* e *S. pyogenes*, a partir de análises das estruturas cristalográficas resolvidas (55, 78, 103). Além disso, foi proposto que este íon desempenha um papel dinâmico, associando-se transitoriamente próximo ao resíduo ativo de cisteína, estabilizando o complexo E-XMP*. Em outras palavras, o íon K⁺ poderia se associar e dissociar durante o ciclo catalítico, permitindo à IMPDH adotar diferentes conformações a cada etapa (116). De qualquer modo, os resultados de inibição pelos produtos, combinados com a formação do complexo cataliticamente inativo E-XMP*·NAD⁺, permite inferir que o produto NADH se dissocia primeiro, seguido da liberação do XMP.

Tabela 4. Perfis e constantes de inibição para os produtos XMP e NADH

| Substrato variado | Inibidor | K _i (μM) | K _{is} (μM) | Tipo de inibição |
|-------------------|----------|---------------------|----------------------|------------------|
| IMP | XMP | 265 ± 33 | n.d. ^a | competitivo |
| | NADH | 360 ± 121 | 466 ± 70 | não-competitivo |
| NAD ⁺ | XMP | 1881 ± 443 | 1290 ± 132 | não-competitivo |
| | NADH | 312 ± 58 | 878 ± 197 | não-competitivo |
| K ⁺ | XMP | 460 ± 47 | 2614 ± 350 | não-competitivo |
| | NADH | 361 ± 94 | 412 ± 54 | não-competitivo |

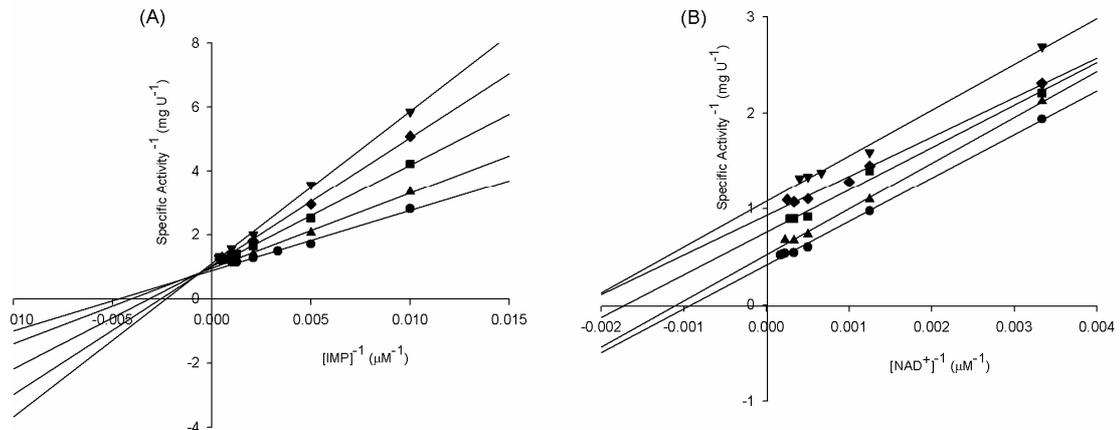
Nota: ^a Não determinado.

9 ATIVAÇÃO OU INIBIÇÃO POR EFETORES ALOSTÉRICOS

A adição dos nucleotídeos pirimidínicos AMP, ATP, UTP e CTP (500 μM) à reação não modificou as constantes cinéticas do IMP e NAD⁺, sugerindo que eles não ativam e nem inibem a enzima *Mt*IMPDH.

A dependência da velocidade em função de diferentes concentrações de GMP, analisada através de duplo recíprocos, mostrou que este nucleotídeo é um inibidor não-competitivo em relação ao substrato IMP ($K_i = 471 (\pm 51) \mu\text{M}$ e $K_{is} = 3986 (\pm 637) \mu\text{M}$) e incompetitivo em relação ao NAD⁺ ($K_{is} = 396 (\pm 30) \mu\text{M}$) (**Figura 20A e B**). O nucleotídeo GMP já havia sido descrito como inibidor de IMPDHs, porém os perfis de inibição para a *Mt*IMPDH diferiram da maioria já reportada (68, 72, 74). Esta inibição sugere que o GMP atua como um regulador do tipo *feedback*, uma vez que ele é produto da reação catalisada pela GMPS (49). No entanto, o nucleotídeo GTP, inibidor da IMPDH de *L. donovani* (67), não foi capaz de inibir a enzima em estudo.

Figura 20. Análises dos duplo recíprocos na presença de diferentes concentrações de GMP

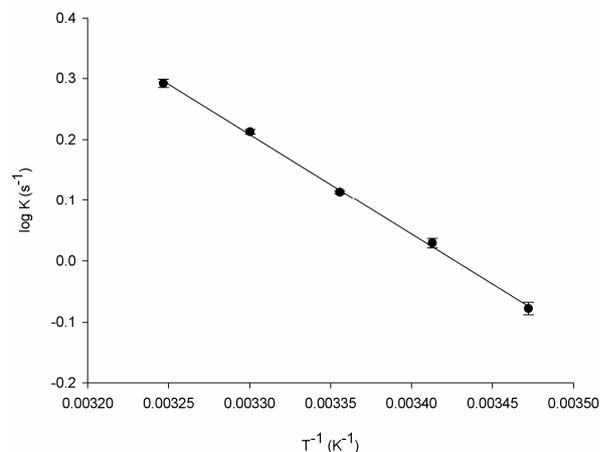


Nota: (A) Atividade específica⁻¹ (mg U⁻¹) versus [IMP]⁻¹ (μM⁻¹) em concentrações fixas e diferentes de GMP. (B) Atividade específica⁻¹ (mg U⁻¹) versus [NAD⁺]⁻¹ (μM⁻¹) em concentrações fixas e diferentes de GMP.

10 ENERGIA DE ATIVAÇÃO

A energia de ativação (E_a) da reação química catalisada pela enzima *MtlMPDH* foi avaliada medindo-se a dependência da constante catalítica (k_{cat} (s⁻¹)) em função da temperatura (**Figura 21**). A E_a foi calculada a partir da equação (8), resultando em um valor de 7,54 kcal mol⁻¹, o qual representa a quantidade mínima de energia necessária para iniciar a reação química catalisada pela *MtlMPDH*. A linearidade do *plot* de Arrhenius também sugere que não existe mudança na etapa limitante da reação, na faixa de temperatura utilizado no ensaio.

Figura 21. Dependência do log k_{cat} em função da variação da temperatura (288 a 308 K)



11 ESTUDOS DE PERFIL DE pH

A dependência dos parâmetros cinéticos em função da variação do pH foi avaliada a fim de se obter informações sobre o mecanismo químico da reação catalisada pela *Mt*IMPDPH, bem como inferir resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise ou na ligação aos substratos.

O resultado da análise da variação da constante catalítica (k_{cat}) em função do pH indicou que a protonação de um átomo da cadeia lateral de um aminoácido diminui a atividade catalítica da *Mt*IMPDPH (**Figura 22A**). Os dados analisados através da equação (9) indicam que a desprotonação de um grupamento com valor de pK aparente de 8,2 ($\pm 0,6$) diminui a atividade catalítica da *Mt*IMPDPH. Uma vez que as moléculas de IMP e NAD^+ não possuem grupos dissociáveis com este valor de pK , este grupo se encontra provavelmente na cadeia lateral de um aminoácido da enzima (104). Este valor de pK pode refletir na ionização do grupamento tiol da Cis331 (numeração de acordo com a *h*IMPDPH2) na enzima livre, o qual deve estar desprotonado para atacar o C2 da molécula de IMP e então iniciar a catálise.

O grupamento tiol da cisteína geralmente ioniza em pHs levemente alcalinos, e o ânion tiolato resultante é a espécie reativa que age como um nucleófilo, e representa um dos grupos funcionais mais reativos encontrados em proteínas (117). Além disso, a habilidade de ionização deste resíduo parece ser crítica na reação envolvendo o ataque nucleofílico, uma vez que a substituição da cisteína por alanina (Cis331Ala) aboliu a atividade da IMPDPH (66, 101). A Cis331 ativa tem sido identificada em estudos com inibidores irreversíveis (118), no isolamento de intermediários enzimáticos e na análise tridimensional de estruturas cristalográficas de IMPDPHs (101). Sintchak e colaboradores (101) resolveram a estrutura tridimensional da IMPDPH de hamster Chinês em complexo com o inibidor MPA e o intermediário de reação XMP^* , e demonstraram que ambas as moléculas estão ligadas simultaneamente no sítio ativo da enzima. Esta estrutura da IMPDPH também revelou um aduto covalente entre a Cis331 e a molécula de C2 do XMP^* , confirmando o papel da cisteína durante a catálise. Baseando-se nestas observações, podemos sugerir que a protonação da cadeia lateral da cisteína (Cis341 na *Mt*IMPDPH) elimina a atividade catalítica da enzima em estudo.

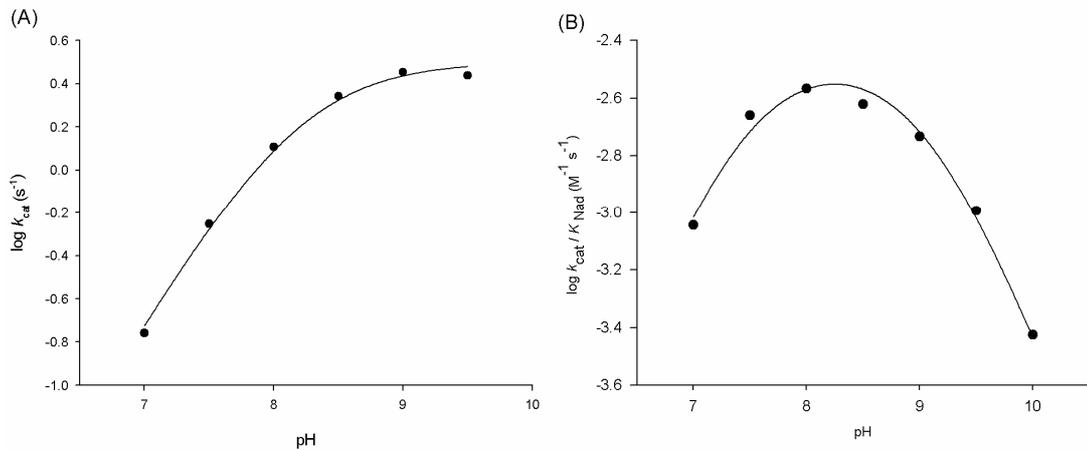
As análises resultantes do k_{cat}/K_{NAD^+} em função do pH (**Figura 22B**), a partir da equação (10), resultaram em valores de pK aparentes de 7,5 ($\pm 0,7$) e 9,0 ($\pm 0,6$), para grupos que devem ser desprotonados e protonados, respectivamente. Tem sido descrito que o valor de pK obtido para o grupamento ácido pode refletir a ionização do grupamento tiol da cisteína em ambientes alterados (119). Um grupo com valor de pK de 6,9 ($\pm 0,2$) também foi considerado importante na ligação ao substrato para a *h*IMPDPH2 e, uma vez que

a molécula de NAD^+ não possui um valor de pK nesta faixa, os autores sugeriram que os grupos ionizáveis estão localizados no complexo enzima-IMP. A taxa de inativação desta enzima pelo 6-CI-PRT em função do pH também foi avaliada, atribuindo um valor de pK de $7,5 (\pm 1)$ ao grupamento tiol da Cis331(104). Em outras palavras, é provável que os valores de pK encontrados em ambas as análises de k_{cat} e $k_{\text{cat}}/K_{\text{NAD}^+}$ correspondem ao mesmo grupamento. Desta forma, pode-se propor que o valor de pK do grupamento sulfidril da Cis341 (numeração de acordo com a *Mt*IMPDH) é em torno de 7,5 no complexo enzima-nucleotídeo.

O aminoácido cuja cadeia lateral possui um valor de pK de 9,0, e que deve estar protonada para a ligação ao substrato NAD^+ , pode corresponder ao resíduo conservado de Arg344 (numeração de acordo com a *Mt*IMPDH), o qual participa de ligações de hidrogênio com o grupamento carboxamida do análogo do NAD^+ β -metileno-TAD, na estrutura resolvida da IMPDH de *T. foetus* (78). Nesta estrutura, os grupamentos carboxamida e adenosina fazem interações distintas com a IMPDH quando comparados ao complexo da *h*IMPDH2 e o análogo SAD (120), e não foram observadas interações entre o β -metileno-TAD e o monômero adjacente. Além disso, enquanto IMPDHs de procariotos geralmente contém uma arginina (Arg344), a maioria das IMPDHs de eucariotos possuem o aminoácido glutamina nesta posição.

O valor de pK do grupamento guanidina da arginina em solução é em torno de 12. No entanto, foi descrito que em alguns casos, os valores de pK calculados não podem ser atribuídos a um resíduo de aminoácido específico, pois eles vêm refletir um conjunto de interações entre resíduos de uma enzima, criando um centro ácido-básico. Ainda, o interior hidrofóbico dos sítios ativos de enzimas pode perturbar o valores de pK de muitos aminoácidos (109). No entanto, estudos de mutagênese sítio-dirigida e a determinação da estrutura tridimensional da *Mt*IMPDH devem ser conduzidos a fim de confirmar quais são os aminoácidos envolvidos na catálise e ligação aos substratos.

Figura 22. Perfil de pH



Nota: (A) Dependência do $\log k_{\text{cat}}$ em função da variação do pH. (B) Dependência do $\log k_{\text{cat}} / K_{\text{NAD}}$ em função da variação do pH.

A dependência da ligação do substrato IMP em função da variação do pH não pode ser incluída nesta análise uma vez que as curvas de saturação apresentaram perfil sigmoidal. No entanto, medindo-se as velocidades em função da concentração de IMP na faixa de pH de 7,0 a 10,0, foi observado que o índice de cooperatividade (n) aumentava a medida que o valor de pH diminuía e que, em valores de pH mais básicos, ambos os valores de k_{cat} e $K_{0,5}$ aumentaram (Tabela 5). Este comportamento é interessante, uma vez que o pH pode atuar como um efetor alostérico de enzimas (121). De qualquer modo, estes resultados representam uma evidência adicional do comportamento alostérico da *MtIMP* em função do IMP.

Tabela 5. Dependência dos parâmetros cinéticos do IMP em função da variação do pH

| pH | $k_{\text{cat}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ | n^a | $K_{0,5} \text{ (}\mu\text{M)}^b$ |
|------|--|-----------------|-----------------------------------|
| 7,0 | $0,202 \pm 0,003$ | $2,4 \pm 0,2$ | 93 ± 3 |
| 7,5 | $0,755 \pm 0,005$ | $1,84 \pm 0,06$ | 58 ± 1 |
| 8,0 | $1,39 \pm 0,02$ | $1,7 \pm 0,1$ | 69 ± 2 |
| 8,5 | $2,24 \pm 0,01$ | $1,58 \pm 0,04$ | 106 ± 1 |
| 9,0 | $2,55 \pm 0,05$ | $1,5 \pm 0,1$ | 148 ± 6 |
| 9,5 | $3,4 \pm 0,2$ | $1,1 \pm 0,1$ | 348 ± 36 |
| 10,0 | $3,06 \pm 0,08$ | $1,18 \pm 0,05$ | 1077 ± 62 |

Nota: ^a n = coeficiente de Hill; ^b $K_{0,5}$ = concentração do substrato onde $v = 0,5 V_{\text{max}}$

ANÁLISE DOS DADOS

Os valores dos parâmetros cinéticos e seus respectivos erros foram calculados a partir de equações apropriadas, utilizando o *software* SigmaPlot 9.0 (SPSS, Inc.).

Curvas de saturação com perfil hiperbólico foram analisadas de acordo com a equação de Michaelis-Menten (1) ou de acordo com a equação de inibição pelo substrato (2) (122), onde v é a velocidade inicial em estado estacionário, V_{\max} é a velocidade máxima, $[S]$ é a concentração do substrato, K_m é a constante de Michaelis-Menten e K_i é a constante de dissociação para inibição pelo substrato. Curvas com perfil sigmoidal foram analisadas segundo a equação de Hill (3), onde $K_{0,5}$ representa a concentração de substrato onde $v = 0,5 V_{\max}$ e n é o coeficiente de Hill (indicando o índice de cooperatividade) (96, 123):

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}} \quad (2)$$

$$v = \frac{V_{\max}[S]^n}{K_{0,5}^n + [S]^n} \quad (3)$$

O padrão de intersecção das retas à esquerda do eixo y nas análises de duplo recíproco foi analisado de acordo com a equação (4), que descreve um mecanismo envolvendo a formação de um complexo ternário e ligação sequencial dos substratos; onde v é a velocidade inicial, V é a velocidade máxima, A e B são as concentrações de IMP, NAD^+ ou K^+ , K_a e K_b são suas respectivas constantes de Michaelis-Menten, e K_{ia} é a constante de dissociação para a formação do complexo binário enzima-substrato A (96, 114):

$$v = \frac{VAB}{K_{ia}K_b + K_aB + K_bA + AB} \quad (4)$$

Os valores das constantes de dissociação para os complexos EI ou ESI , nos estudos de inibição, foram analisados de acordo com as equações que descrevem inibição competitiva (5), inibição não-competitiva (6) e inibição incompetitiva (7), onde $[I]$ é a concentração de inibidor, K_i é a constante de dissociação do complexo binário EI e K_{is} é a constante de dissociação do complexo ternário ESI (123):

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

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

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

A fim de determinar a dependência da reação em função da variação de temperatura, a constante catalítica (k_{cat}) foi analisada através do *plot* de Arrhenius. Onde k é a velocidade máxima de reação, E_a é a energia de ativação, T é a temperatura em Kelvin ($T = ^\circ\text{C} + 273,15$), R é a constante dos gases ($1,987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ou $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), A é um fator pré-exponencial que correlaciona a frequência de colisão e a probabilidade de uma reação ocorrer quando moléculas reatantes colidem e k_{cat} é dado em s^{-1} (97):

$$\log k = -\left(\frac{E_a}{2,3R}\right)\left(\frac{1}{T}\right) + \log A \quad (8)$$

Os dados obtidos nos estudos de pH foram analisados de acordo com as equações (9) e (10), onde y representa os parâmetros cinéticos (k_{cat} ou k_{cat}/K_m), C é o valor de y independente do pH, H é a concentração de prótons e K_a e K_b são, respectivamente, as constantes de dissociação ácida e básica dos grupamentos ionizáveis (96):

$$\log y = \log\left(\frac{C}{1 + \frac{H}{K_a}}\right) \quad (9)$$

$$\log y = \left(\frac{C}{1 + \frac{H}{K_a} + \frac{K_b}{H}}\right) \quad (10)$$

Capítulo 3

Biochemical characterization of
Mycobacterium tuberculosis IMP
dehydrogenase: kinetic
mechanism, metal activation and
evidence of allosteric regulation

Artigo científico submetido à revista
Molecular BioSystems

Biochemical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* IMP dehydrogenase: kinetic mechanism, metal activation and evidence of allosteric regulation

Diana Carolina Rostirolla^{ab}, Thiago Milech de Assunção^c, Cristiano Valim Bizarro^a, Luiz Augusto Basso^{ab*} and Diogenes 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 Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cGastroenterology Research Unit, Mayo Clinic, Rochester, MN 55905, USA.

*Corresponding authors: Luiz A. Basso or Diogenes 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 IMP dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*.

Summary

Enzymes from the nucleotide biosynthesis pathway have been considered potential targets for identification or development of novel anti-mycobacterial agents. Inosine 5'-monophosphate (IMP) dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*IMPDH) catalyzes the oxidation of IMP to XMP, with concomitant conversion of NAD^+ to NADH. In the present work, the *guaB2*-encoded *Mt*IMPDH has been cloned, expressed and purified to homogeneity. The recombinant *Mt*IMPDH has a subunit molecular weight of 54,775 Da and Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES) and Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FAAS) identified a K^+ ion per subunit. Glutaraldehyde cross-linking analysis suggests that *Mt*IMPDH predominates as a tetramer. Steady-state kinetics showed that *Mt*IMPDH optimal activity is dependent on the presence of a monovalent cation, mainly K^+ . Initial velocity and product inhibition patterns suggested a steady-state ordered Bi Bi kinetic mechanism in which IMP binds first followed by NAD^+ , and hydride transfer is not the rate-limiting step in the *Mt*IMPDH catalyzed reaction. In addition, NAD^+ substrate inhibition implies that product release is ordered, with NADH released first. The pH-rate profile indicated one deprotonated group essential for catalysis and that groups with $\text{p}K$ values of 7.5 and 9.0 are important for NAD^+ binding. Temperature studies were employed to determine the activation energy of the reaction. The data presented here are discussed in light of the kinetic and structural information available for IMPDHs investigated to date and should help our understanding of *Mt*IMPDH mode of action.

Keywords: nucleotide biosynthesis; inosine 5'-monophosphate dehydrogenase; steady-state kinetics; monovalent cation; substrate inhibition; pH-rate profile.

Introduction

In 1993, the World Health Organization (WHO) declared tuberculosis (TB) a global public health emergency and, although control efforts are making an impact on the incidence of TB in many areas of the world, this disease remains a serious global threat. The increasing prevalence of TB-HIV co-infection, especially in the African region,¹ and the emergence of multi and extensively drug-resistant (MDR-TB and XDR-TB, respectively) strains of *Mycobacterium tuberculosis*^{2,3} have highlighted the need for new control measures. Novel regimens to treat all forms of TB are emerging, but in spite of this, the current TB treatment options are suboptimal and new anti-TB drugs are needed.^{4,5} In order to find and validate new molecular targets for drug discovery, it is crucial to understand the biochemistry of mycobacteria,⁶ which thereby prompts basic research on *M. tuberculosis* metabolism as an worth pursuing effort. Advances in the identification of new TB drug targets have been driven by the availability of the genome sequence of *M. tuberculosis* H37Rv,⁷ and include elucidation of the role played by proteins of essential biochemical pathways for mycobacterial growth.⁸

Inosine 5'-monophosphate (IMP) dehydrogenase (IMPDH) represents an interesting target for the above mentioned efforts. IMPDH (EC 1.1.1.205) is a key enzyme of the *de novo* purine nucleotide biosynthesis and has long been recognized as an important target in the quest for drugs in the antiviral, antibacterial and anticancer therapeutic areas.⁹⁻¹⁴ This enzyme catalyzes the oxidation of IMP to xantosine 5'-monophosphate (XMP) with concomitant reduction of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) (Fig. 1), which represents a rate-limiting step in guanine nucleotide biosynthesis. XMP is then converted to guanosine 5'-monophosphate (GMP) by GMP synthetase (GMPS). Inhibition of IMPDH causes an overall reduction in guanine nucleotide pools and, as phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) synthetase and ribonucleotide reductase are allosterically regulated by these nucleotides, it may affect several metabolic pathways. Moreover, interruption of DNA and RNA synthesis and signal transduction results in cytotoxicity.^{11,14} Although IMPDH is not generally considered an essential enzyme, since microorganisms can salvage guanine and/or xanthine *via* phosphoribosyltransferase reactions, the mere presence of a salvage enzyme does not guarantee that the organism can establish an infection in the absence of IMPDH activity.¹⁵

The structure and biochemistry of IMPDHs have been extensively investigated.¹⁶ Some organisms, including humans, have a double gene copy for IMPDH, denoted type I and type II, which encodes related proteins of 514 amino acid residues, showing 84% identity and

similar kinetic properties.^{12,17} In general, IMPDHs are homotetramers, with subunit molecular masses of 43-58 kDa.¹⁸⁻²⁰ Each monomer has a core domain consisting of an eight-stranded α/β barrel structure which contains the active site located on the C-terminal end of the β -sheets.^{21,22} In addition, IMPDHs have an evolutionary conserved subdomain composed of two cystathione β -synthase (CBS) motifs which is not required for enzymatic activity, and whose function is not yet well understood.^{18,21,23,24}

All IMPDHs characterized to date are activated by K^+ , although cations with similar ionic radius also activate these enzymes.^{25,26} The IMPDH reaction requires two different chemical transformations, involving large conformational rearrangements in each step of the catalytic cycle.^{16,27,28} In the rapid redox step, Cys331 (human type II numbering) attacks the C2 carbon atom on the IMP ring producing NADH and the covalent intermediate E-XMP*. NADH is released and a mobile flap docks in the vacant dinucleotide site, changing the enzyme into a hydrolase. E-XMP* is then hydrolyzed and XMP is released.^{25,28-31}

Prokaryotic and eukaryotic IMPDHs have distinct structural features and kinetic properties, which make the development of species-selective inhibitors feasible.^{15,32} Particularly, microbial IMPDHs differ from mammalian enzymes in their lower affinity for inhibitors such as mycophenolic acid (MPA) and thiazole-4-carboxamide adenine dinucleotide (TAD),^{32,33} and parasite-selective inhibitors have recently been reported.^{34,35} Several $NAD^+/NADH$ binding site IMPDH inhibitors compete with the vacant dinucleotide binding site, preventing XMP release and, while the open conformation is favored in mammalian enzymes, the closed one is preferred in microbial enzymes.^{25,28,31,36} In this case, the conformational equilibrium is a more important determinant of inhibitor susceptibility than the residues that contact the inhibitor.^{36,37} Incidentally, Chen *et al.*³⁸ showed that MPA, and other active analogues against human type II IMPDH are weak inhibitors of *M. tuberculosis* IMPDH. Additionally, despite having primary sequence similarity of approximately 38%, amino acids residues which account for MPA sensitivity in human type II IMPDH,³⁹ are not conserved in the mycobacterial enzyme. These observations suggest that the structure and dynamic properties of the cofactor binding site can be exploited to develop selective inhibitors.

The IMPDH from *M. tuberculosis* (*Mt*IMPDH) is encoded by the *guaB2* gene (Rv3411c) and has been proposed as a potential molecular target to inhibitors.^{14,15} IMPDH activity was also hypothetically attributed to the *guaB1* (Rv1843c) and *guaB3* (Rv3410c) genes; however, Usha *et al.*⁴⁰ have recently demonstrated that only the *guaB2* gene encodes a functional IMPDH enzyme. The *guaB2*-gene has been predicted to be required for optimal *in*

vitro growth of *M. tuberculosis* H37Rv strain by *HimarI*-based transposon mutagenesis.⁴¹ Furthermore, a Bayesian statistical model analysis applied to deep-sequencing data for transposon-insertion libraries has supported the *guaB2* essentiality.⁴²

The rational design of chemotherapeutic agents may be divided into mechanism- and structure-based designs. Augmenting the knowledge of mode of action, regulation and molecular structure of an enzyme helps lay the foundations on which to the development of novel IMPDH inhibitors. Accordingly, here we describe cloning of the *guaB2* gene (Rv3411c) from *M. tuberculosis* H37Rv, expression and the purification of recombinant *Mt*IMPDH. We also describe the activation and specificity of recombinant *Mt*IMPDH for monovalent cations (M^+). Steady-state kinetics and product inhibition studies including the M^+ activator were performed to provide further evidence of *Mt*IMPDH kinetic mechanism. In addition, we suggest that neither hydride transfer nor NADH release is the rate-limiting step. The chemical steps involved in the reactions catalyzed by IMPDH involve various proton transfers. Based on pH-rate profiles, amino acid residues involved in either catalysis or substrate binding are proposed.

Results and discussion

Amplification and cloning of *guaB2* gene

A PCR amplification product consistent with the expected *M. tuberculosis guaB2* (1590 bp) coding sequence was detected by agarose gel electrophoresis (data not shown), purified and inserted into the pCR-Blunt[®] vector. The cloned sequence was digested with NdeI and BamHI enzymes, purified and ligated into the pET-23a(+) expression vector. Automated DNA sequencing confirmed the identity of the pET-23a(+>::*guaB2* construct and ensured that no mutations were introduced during PCR.

Expression and purification of the recombinant *Mt*IMPDH

The resulting pET-23a(+>::*guaB2* recombinant plasmid was transformed into C41(DE3) *E. coli* cells and cultures were grown in TB medium at 30 °C, for 36 h, as described in Experimental procedures section. Analysis by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE (data not shown) revealed expression in the soluble form of a protein with subunit molecular mass of approximately 55 kDa in agreement with the predicted MW for *Mt*IMPDH (54.7 kDa).

IMPDHs are readily purified using affinity chromatography^{18,19,43} and ionic effects on protein stability and activity have been described,^{44,45} as well as the ability of various ions to induce the precipitation of proteins in solution. At high concentrations of salt, protein solubility drops sharply (salting-out) and this phenomenon forms the basis of many protein purification strategies.⁴⁶ Accordingly, recombinant *Mt*IMPDH protein was efficiently purified to homogeneity using a combination of (NH₄)₂SO₄ precipitation and a two-step protocol, consisting of an affinity column (HiTrap Blue HP) and a size exclusion column (HiLoad Superdex 200). Enzyme catalytic activity was measured in the standard assay (see Experimental procedures section), at saturating concentrations of IMP (1 mM) and NAD⁺ (3 mM), for all purification steps. These enzyme activity measurements showed that indeed recombinant *Mt*IMPDH catalyzes the oxidation of IMP to XMP, with concomitant reduction of NAD⁺ to NADH. The 1.7-fold purification protocol yielded 3 mg of recombinant protein from 3 g of cells, indicating 43% protein yield (Table 1). Total protein concentration was determined by the method of Bradford⁴⁷ and the homogenous *Mt*IMPDH was fast frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

Table 1

Purification protocol of recombinant *Mt*IMPDH from *E. coli* C41(DE3) (3 g wet cell paste)

| Purification step | Total protein (mg) | Total enzyme activity (U) | Specific activity (U mg ⁻¹) | Purification fold | Yield (%) |
|---------------------|--------------------|---------------------------|---|-------------------|-----------|
| Crude extract | 11.6 | 13.9 | 1.2 | 1 | 100 |
| HiTrap Blue HP | 6.9 | 11.7 | 1.7 | 1.4 | 84 |
| HiLoad Superdex 200 | 3.0 | 6.0 | 2.0 | 1.7 | 43 |

***Mt*IMPDH identification by Mass Spectrometry**

The identity of *Mt*IMPDH was confirmed by LC-MS/MS peptide mapping (see Experimental procedures section). Of 481 spectra, 52 different peptides were identified covering 96% of *Mt*IMPDH primary sequence.

Determination of *Mt*IMPDH molecular mass and structural characterization of K⁺ binding

The average molecular mass of recombinant *Mt*IMPDH was determined using an Orbitrap analyzer (see Experimental procedures section). Peaks spanning charge states from 40+ to 71+ were detected. From the deconvoluted spectra, a value of 54,775 Da was found for the average molecular mass of recombinant *Mt*IMPDH. Interestingly, this experimentally determined molecular mass corresponds to the value expected for *Mt*IMPDH (with N-terminal methionine removed) with a single K⁺ ion strongly associated with the enzyme (theoretical molecular mass of 54,774.9 Da). The MS analysis was repeated using homogeneous *Mt*IMPDH sample dialyzed against a buffer containing 200 mM NaCl instead of KCl salt. However, virtually the same result was obtained for the molecular mass of *Mt*IMPDH dialyzed against the NaCl-containing buffer (54,774 Da). These results showed that there exists a strong interaction between *Mt*IMPDH and K⁺ that could not be weakened by extensive dialysis, probably corresponding to a structural K⁺ ion bound to the enzyme.

In order to confirm the presence of K⁺ ions and to determine the stoichiometry of protein subunits and ion species, homogeneous recombinant *Mt*IMPDH was analyzed by Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FAAS) and Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES). A value of 1.08 (\pm 0.05) K⁺ ions per *Mt*IMPDH subunit was determined, thereby lending support to formation a stable binary complex between *Mt*IMPDH and K⁺, as suggested by the MS analysis.

Quaternary structure of *Mt*IMPDH

*Mt*IMPDH quaternary structure could not be assigned by analytical HPLC gel filtration chromatography because the enzyme eluted as different species depending on its concentration, indicating the presence of different aggregated forms. This elution profile was similar in the absence of a M⁺, and in the presence of both K⁺ (activator) and Na⁺ (inhibitor), suggesting that M⁺ activation (or inhibition) is not linked to protein oligomerization. Cross-linking experiments were thus performed and 12% SDS-PAGE analysis revealed the conversion from monomer to tetramer (*ca.* 220 kDa) after 10 min incubation time (Fig. 2). To ascertain whether the absence of M⁺ and replacement of K⁺ with Na⁺ could affect the tetramer formation, *Mt*IMPDH was dialyzed against buffer A without M⁺ and buffer A containing Na⁺. No difference in the migration of polypeptide chains could be observed in SDS-PAGE (data not shown). Molecular mass analysis of IMPDH from different sources, using a variety of

methods, also provided evidence of higher-level association,^{22,25,48-50} however the basis of this behavior has been only speculated.^{22,48} At any rate, our results indicate that *Mt*IMPDH exists as tetramer and may form higher-order aggregates as observed for other IMPDHs.

Apparent steady-state kinetics

The apparent steady-state parameters were collected under standard assay conditions (see Experimental procedures section). The dependence of velocity on increasing concentrations of NAD⁺ (Fig. 3A), at saturating IMP concentration (1 mM), revealed substrate inhibition at high NAD⁺ levels (> 3 mM), as had been reported by Chen *et al.*³⁸ The apparent steady-state parameters derived from data fitting to Eq. (1) yielded the following values: $k_{\text{cat}} = 3.10 (\pm 0.04) \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{m}}^{\text{NAD}} = 887 (\pm 36) \mu\text{M}$. More appropriately, data fitting to Eq. (2) to account for substrate inhibition yielded values of $5.2 (\pm 0.8) \text{ s}^{-1}$ for k_{cat} , $1.9 (\pm 0.5) \text{ mM}$ for $K_{\text{m}}^{\text{NAD}}$, and $6.3 (\pm 1.9) \text{ mM}$ for K_{i} . The latter results are in reasonably good agreement with values reported by Chen *et al.*³⁸ for $K_{\text{m}}^{\text{NAD}}$ (1 mM) and K_{i} (5 mM), except for k_{cat} (0.53 s^{-1}). This discrepancy in k_{cat} values is likely due the lower temperature of assay measurements used by Chen *et al.* (25 °C) as compared to 37 °C for the results here described. The $K_{\text{m}}^{\text{NAD}}$ value is larger than that reported by Usha *et al.*⁴⁰ (610 μM), which was derived from data fitting to Michaelis-Menten equation in the absence of substrate inhibition (varying NAD⁺ concentration from 0.03 to 4.5 mM). The substrate inhibition is commonly observed in IMPDHs and has been reported to be uncompetitive,^{9,18,25,51} presumably resulting from the formation of a nonproductive E-XMP*.NAD⁺ complex.²⁰ This behavior also suggests that product dissociation follows an ordered mechanism, in which NADH is the first product released.⁵²

No *Mt*IMPDH catalytic activity could be detected for varying nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺) concentrations up to 20 mM. The NAD⁺ analog acetylpyridine adenine dinucleotide (APAD⁺) is a substrate for *Mt*IMPDH and the dependence of velocity on increasing concentrations of APAD⁺ (Fig. 3B) also displayed substrate inhibition. The apparent steady-state parameters derived from data fitting to Eq. (2), which accounts account for substrate inhibition, yielded values of $5.4 (\pm 0.6) \text{ s}^{-1}$ for k_{cat} , $2.0 (\pm 0.4) \text{ mM}$ for $K_{\text{m}}^{\text{APAD}}$, and $5 (\pm 1) \text{ mM}$ for K_{i} . The calculated values for the apparent specificity constants ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) for NAD⁺ and APAD⁺ are, respectively, $2.7 (\pm 0.7) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $2.7 (\pm 0.5) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, employing the apparent steady-state kinetic parameters derived from data fitting to Eq. (2). Despite the differences in the structures and reduction potentials between NAD⁺ and APAD⁺,⁵³ the k_{cat} values are comparable. This observation suggests that hydride-transfer is likely not rate-limiting since this rate should be different for reduced APADH.¹⁶

Moreover, uncompetitive substrate inhibition versus IMP represents additional evidence that the release of XMP can limit the overall reaction.⁵² Therefore, hydrolysis of E-XMP* or release of XMP is the most likely rate-limiting step in the *Mt*IMPDH reaction.^{20,30,51}

The saturation curve for IMP (Fig. 4A) deviates from Michaelis-Menten kinetics, and it appears to exhibit cooperative kinetics. Experimental data were thus fitted to the Hill equation, Eq. (3), with values of $k_{\text{cat}} = 2.20 (\pm 0.02) \text{ s}^{-1}$, $K_{0.5} = 120 (\pm 2) \mu\text{M}$ and $n = 1.51 (\pm 0.04)$. The Hill coefficient (n) value larger than one suggests positive cooperativity,⁵⁴ although moderate. To ascertain whether or not *Mt*IMPDH dependence on IMP concentration was best described by a sigmoidal rather than a hyperbolic (Eq. 1) system, the residuals (*i.e.*, the differences between the predicted and observed values of the dependent variables) of data fitting to, respectively, Eq. (3) (Fig. 4A) and Eq. (1) (Fig. 4B) were analyzed. This straightforward analysis lends support to the proposal that IMP kinetics is best described by a cooperative system (Fig. 4A - inset) as compared to a Michaelis-Menten one (Fig. 4B - inset), as the latter shows a systematic deviation from the theoretical values.

Allostery is the coupling of indirect interactions between distinct specific binding sites⁵⁵ that regulate protein function, and has long been shown to control metabolism either through positive or negative regulation.⁵⁶ Allosteric processes are closely associated with ligand-induced conformational changes that propagate between the allosterically coupled binding sites for oligomeric proteins.⁵⁵ In this case ($n > 1$), the binding of one IMP molecule increases the affinity of substrate to of a second protein binding site. The Monod, Wyman and Changeux (MWC) model⁵⁵ suggests that the subunits in each protein assembly interconvert between two conformation states (T of low affinity, and R of high affinity), in a concerted manner; that is, a conformational change in one subunit causes an equivalent change in all others. Alternatively, Koshland *et al.*⁵⁷ proposed the sequential model, where subunits change conformation, one at a time. However, further experimental data should be sought to distinguish between these two models for *Mt*IMPDH. To the best of our knowledge, this is the first example of an IMPDH enzyme that shows sigmoidal dependence of velocity on ligand concentration, as it has been pointed out that IMPDH appears not to be controlled by allosteric effectors.¹⁶ Nevertheless, titration calorimetry of ligand binding revealed that IMP can interact with hamster IMPDH type II in a negatively cooperative manner and showed evidence this enzyme is an allosteric protein.⁵⁸ Moreover, previous work reported that GMP induces cooperativity between IMP binding sites for *E. coli* IMPDH.⁵⁹ Interestingly, the k_{cat} and $K_{0.5}$ values for IMP, at saturating concentration of APAD⁺ (3 mM), were similar to those measured at saturating concentration of NAD⁺ (data not shown).

The k_{cat} values are similar to those reported for bacterial^{18,25} and parasitic IMPDHs,^{20,51} and the K_m and K_i values for NAD^+ are in reasonably good agreement with those previously reported for *Mt*IMPDH.^{38,40} On the other hand, the k_{cat} value for *Mt*IMPDH is larger than that for human type II IMPDH,²⁹ implying that the rate of hydrolysis of E-XMP* can be greater and that the *Mt*IMPDH resistance to MPA³⁸ would result from this feature.^{36,60}

Monovalent cation (M^+) activation

The activation of IMPDHs by M^+ is well documented, although the cation specificity varies for IMPDHs from different sources.¹⁶ Usha *et al.*⁴⁰ have recently reported that K^+ promotes the maximal catalytic activity for *Mt*IMPDH. To further characterize the effect of M^+ on *Mt*IMPDH activity, the dependence of reaction velocity on increasing concentrations of K^+ , NH_4^+ , Rb^+ and Cs^+ was evaluated. The saturation curves displayed hyperbolic kinetics (data not shown) and the steady-state kinetics parameters were thus obtained from data fitting to Eq. (1). These parameters are given in Table 2. The results indicate that K^+ , NH_4^+ and Rb^+ are the most effective activators, while Cs^+ produces the lowest increase in activity. Despite a slight variation on the k_{cat} values, the k_{cat}/K_m for K^+ and NH_4^+ are equivalent and fairly close to Rb^+ (Table 2), as observed for other IMPDHs.¹⁶ The activation by, and similar steady-state parameters for, K^+ , NH_4^+ , and Rb^+ are not surprising as these cations have similar values for ionic radii in crystals, ion mobility, and estimated size of hydrated ion.⁶² *Mt*IMPDH showed a K_m value for K^+ larger than those usually observed for other IMPDHs,^{19,25,43} but which resembles the value reported for IMPDH from *Borrelia burgdorferi*.¹⁸

Table 2

Apparent kinetic constants for monovalent cations^a.

| Cation | Ionic radius ^b (Å) | k_{cat} (s^{-1}) | K_m (mM) | k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) | K_{is} (mM) ^c | K_{ii} (mM) ^d |
|-----------------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Li^+ | 0.60 | n.a. ^e | n.a. ^e | n.a. ^e | 129 ± 16 | 380 ± 52 |
| Na^+ | 0.95 | n.a. ^e | n.a. ^e | n.a. ^e | 108 ± 16 | 708 ± 176 |
| K^+ | 1.33 | 2.83 ± 0.09 | 37 ± 5 | 76 ± 10 | n.a. ^e | n.a. ^e |
| NH_4^+ | 1.48 | 2.08 ± 0.04 | 28 ± 2 | 74 ± 5 | n.a. ^e | n.a. ^e |
| Rb^+ | 1.48 | 2.08 ± 0.09 | 44 ± 6 | 47 ± 6 | n.a. ^e | n.a. ^e |
| Cs^+ | 1.69 | 0.76 ± 0.05 | 84 ± 13 | 9 ± 1 | n.a. ^e | n.a. ^e |

^a All assays were performed as described in the Experimental procedures section.

^b The values for cation radii from crystal data were taken from references^{61,62}

^c K_{is} = the slope inhibition constant.

^d K_{ii} = the intercept inhibition constant.

^e Not applicable.

It is noteworthy that neither Na^+ nor Li^+ , which have lower ionic radii than K^+ , activated the *Mt*IMPDH. On the contrary, they inhibit *Mt*IMPDH, acting as noncompetitive inhibitors (Table 2). Divalent cations, such as Mg^{2+} and Ca^{2+} , also did not activate this enzyme even at 200 mM. These results suggest the requirement of M^+ for increased enzyme activity, and that ionic radius plays a role in monovalent cation specificity as the k_{cat}/K_m for Cs^+ is larger than those for K^+ , NH_4^+ , and Rb^+ (Table 2).

At approximately 70 years ago, pyruvate kinase (PK) was described as a classical example of an enzyme that only expresses appreciable catalytic activity in the presence of K^+ .⁶² PK is also activated by NH_4^+ and Rb^+ , as well as inhibited by Li^+ and Na^+ .⁶² Similar metal effects have been discovered in other systems, and the field of enzymes requiring metals for optimal activity encompasses hundreds of examples as reviewed elsewhere.^{63,64} In general, enzymes requiring K^+ such as kinases and molecular chaperones are also activated by NH_4^+ and Rb^+ , but are not activated as well or at all by the larger cation Cs^+ or the smaller cations Na^+ and Li^+ .⁶⁴ To further characterize the selectivity for M^+ , the effects of K^+ , NH_4^+ and Rb^+ on the apparent kinetic parameters for IMP and NAD^+ were studied. These experiments could not be carried out in the presence of Cs^+ as a consequence of the reduced rate obtained with this cation that precluded acquisition of reliable data. The $K_{0.5}$ and K_m values for the substrates were nearly identical, resulting in minor differences in their k_{cat} values (data not shown), suggesting that M^+ does not interact directly with the substrates or that it is not related with substrate binding affinity, as previously observed.^{19,65,66} Notwithstanding, site-direct mutagenesis and crystallographic studies will have to be pursued to assign any relationship between substrate binding and M^+ activation for *Mt*IMPDH.

The mechanism of K^+ activation is not completely understood, although it does not appear to affect the formation of IMPDH tetramers.^{18,19} The crystal structures of IMPDHs from Chinese hamster²¹ and *Tritrichomonas foetus*^{67,68} have revealed the presence of a potassium-binding site near the active cysteine, which is located in a glycine-rich loop. The carbonyl oxygen from the catalytic Cys319 (*T. foetus* numbering) forms part of the cation-binding site and when this site is occupied, the cysteine is in a favorable position to form the covalent bond with the C2 carbon of IMP.⁶⁷ This observation suggests that this ion is

important in coordinating the active cysteine residue in an orientation required for catalysis. In this case, stabilization of the Cys319 loop provides an explanation for K^+ activation.

It has been shown that K^+ does not affect the rate of 6-chloro-purine ribotide (6-Cl-PRT) inactivation of human type II IMPDH, nor the hydrolysis of 2-chloro-IMP by this enzyme.⁶⁵ This finding is in agreement with previous equilibrium binding studies which showed the presence of one binding site per subunit for IMP and XMP even in the absence of K^+ ,¹⁹ demonstrating that the M^+ activator does not modulate the reactivity of the sulfhydryl group. Kinetic and mutagenesis studies have argued for a link between potassium ion and conformational changes involved in NAD^+ binding.^{26,65,69,70} More recently, based on kinetic and free energy simulations analyses, Riera *et al.* showed that K^+ accelerates IMPDH conformational transitions that facilitate the dinucleotide binding steps in *Cryptosporidium parvum* IMPDH.⁶⁶ Riera *et al.* have also demonstrated that the K^+ dependence of k_{cat} derives from the rate of flap closure, which increases in the presence of this cation.⁶⁶ The model put forward by Riera *et al.* suggests that K^+ preorganizes IMPDH protein thereby decreasing the activation barrier for flap closure.⁶⁶ In addition, these authors presented computational simulation results showing that K^+ mobilizes residues on the Cys319 loop by providing alternative interactions for the main chain carbonyl oxygens, facilitating the conformational changes required for completion of the catalytic cycle.⁶⁶ Incidentally, Riera *et al.* have chosen *C. parvum* IMPDH enzyme to carry out these studies as it contains only one conserved monovalent cation binding site.⁶⁶

A classification of metal-activated enzymes can be based on the selectivity of the effect, as established by kinetic studies, and the mechanism of activation, as shown from structural analysis.⁶⁴ The mechanism of activation is cofactor-like (type I) or allosteric (type II). In the former case, substrate anchoring to the enzyme active site is mediated by M^+ coordination, which is absolutely required for catalysis or substrate recognition. In the latter, M^+ enhances enzyme activity through conformational transitions triggered by binding to an allosteric site and is not expected to be absolutely required for either binding or catalysis.⁶⁴ The structure of the IMPDH from *T. foetus* have identified an additional K^+ binding site near the NAD^+ binding site at the dimer interface.^{28,68} In this case, K^+ does not contact the substrate or cofactor, which could explain the lack of absolute requirement for catalysis. Most likely, K^+ acts as an allosteric effector (type II activation) in this system by modulating the conformation of the active site Cys319 and the NAD^+ binding site. Although the kinetic results here reported suggest that *Mt*IMPDH is likely a type II (allostetic) K^+ -activated

enzyme regarding its M^+ requirement for optimal activity, further studies are needed to propose a similar role as shown for *C. parvum* IMPDH.⁶⁶

Because the concentration of Na^+ and K^+ is tightly controlled *in vivo*, it is believed that metals facilitate substrate binding and catalysis by lowering energy barriers in the ground and/or transition states. Enzymes activated by metals evolved to take advantage of the large availability of Na^+ outside the cell and K^+ inside the cell to optimize their catalytic function. Indeed, a strong correlation exists between the preference for K^+ or Na^+ and the intracellular or extracellular localization of such enzymes.⁷¹ *M. tuberculosis* has evolved multiple mechanisms to survive within the host alveolar macrophages^{72,73} and has adapted its lifestyle to accommodate the changing environment within the phagosomes.⁷⁴ The abundance of K^+ in physiological environments⁷⁵ and the analysis of K^+ concentration inside phagosomes of macrophages infected with mycobacteria,⁷⁴ would explain the *Mt*IMPDH preference for this ion.

Here, we have shown by Mass Spectrometry, FAAS and ICP-OES spectroscopy analysis that the apo form of *Mt*IMPDH stably binds K^+ ions in a 1:1 stoichiometry. This ion-protein interaction detected is strong enough to withstand the harsh conditions of electrospray ionization, suggesting that it is likely a structural ion. The likely type II activation mediated by K^+ detected in *Mt*IMPDH kinetic analysis may suggest a second K^+ binding site as observed at the interface between two monomers for the crystal structure of *T. foetus* IMPDH in complex with IMP and β -methylene thiazole-4-carboxamide adenine dinucleotide.²⁸ However, ideally, crystal structure of *Mt*IMPDH with K^+ ion(s) bound should be provided to both ascertain whether or not there are two metal binding sites and its/their mechanism of activation. Interestingly, it has recently been pointed out that those crystal structures of IMPDHs that do not include K^+ are unlikely to be catalytically relevant.³¹

Initial velocity patterns

A complete mechanism for *Mt*IMPDH catalysis should take into account the monovalent cation as it has been shown here that addition of K^+ is required for increased enzyme activity. To determine the true steady-state kinetic parameters and to provide information about the *Mt*IMPDH enzyme mechanism in the presence of K^+ , initial velocity as a function of substrate concentration (NAD^+ or K^+) was plotted as a linear function of double reciprocal of initial velocity against the reciprocal of substrate concentration. It should be pointed out, however, that plots for increasing IMP concentrations were not included in the analysis since kinetic data deviated from linearity ($n = 1.51$) at low concentrations and saturating levels of NAD^+

and K^+ . Intersecting families of double-reciprocal (or Lineweaver-Burk) plots were obtained for both NAD^+ at saturating IMP concentration and fixed-varied K^+ concentrations (Fig. 5A) and K^+ at saturating IMP concentration and fixed-varied NAD^+ concentrations (Fig. 5B). These patterns are consistent with a sequential mechanism.⁷⁶ Data were plotted in reciprocal form and fitted to the equation for a sequential initial velocity pattern (Eq. (4)), and the true steady-state parameters are summarized in Table 3. Interestingly, a sequential mechanism has also been reported for the bacteria *Aerobacter aerogenes*,⁶⁹ human type II²⁹ and the protozoan parasite *T. foetus* IMPDHs.^{20,77}

Table 3

Kinetic parameters obtained from initial velocity studies of *Mt*IMPDH^a.

| Varied substrate / cofactor ^b | Fixed substrate ^c | k_{cat} (s^{-1}) | K_m^{NAD} (μM) | K_m^K (mM) |
|---|------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------|
| NAD^+ against K^+ | IMP | 3.7 ± 0.1 | 1092 ± 74 | 102 ± 6 |
| NAD^+ against IMP | K^+ | 3.1 ± 0.1 | 794 ± 57 | n.a. ^d |
| K^+ against IMP | NAD^+ | 3.3 ± 0.1 | n.a. ^d | 44 ± 3 |

^a All assays were performed as detailed in the Experimental procedures section.

^b In all of the pairs of varied substrates, the first one was varied and the second was maintained at different fixed-varied concentrations.

^c All of the fixed substrates were maintained at saturating concentrations.

^d Not applicable.

Inhibition studies

The initial velocity studies described above ruled out ping-pong and rapid equilibrium ordered mechanisms as the former gives double reciprocal plots displaying parallel lines and the latter a family of lines intersecting on the y-axis.⁷⁶ However, these data cannot distinguish between a steady-state ordered mechanism and rapid equilibrium random system.⁷⁶ Accordingly, product (either XMP or NADH) inhibition measurements were carried out to elucidate the order, if any, of substrate addition to *Mt*IMPDH enzyme. Remarkably, when NAD^+ and K^+ were fixed at non-saturating concentrations ($\cong K_m$), IMP double-reciprocal plots were linear. Accordingly, inhibition studies could also be carried out as a function of IMP concentrations. Product inhibition data were fitted to equations for competitive (Eq. (5)) and noncompetitive (Eq. (6)) inhibition. Table 4 summarizes the product inhibition patterns and the respective inhibition constants. The results showed a pattern of competitive inhibition of XMP with

respect to IMP (Table 4). The remaining three inhibition patterns were noncompetitive (Table 4). These results are consistent with a steady-state ordered Bi Bi kinetic mechanism, in which IMP binds to free *Mt*IMPDH enzyme first followed by NAD⁺ binding to form the catalytically competent ternary complex. The substrate inhibition, which is more common in steady-state ordered mechanisms, when one substrate resembles one of the products structurally,⁵² is in agreement with our observations. Moreover, the noncompetitive inhibition profile of NADH requires that E·XMP (or E-XMP*) exist in the steady-state, so that release of XMP may be at least one of the slow steps along the reaction pathway. However, these results are different from the random mechanism reported for the *T. foetus*²⁰ and human type II IMPDHs^{29,30} based on measurements of isotope effects and transient kinetics. It should be pointed out that the ordered addition of substrates to IMPDH enzymes has been called into question.¹⁶ However, the order of product release appears to hold for IMPDHs.¹⁶

The product inhibition results showed that XMP and NADH are noncompetitive inhibitors with respect to K⁺ (Table 4). These data suggest that XMP and NADH products can bind to *Mt*IMPDH regardless the presence or absence of added K⁺. As described above, FAAS, ICP-OES and MS data suggest formation of a stable binary complex between *Mt*IMPDH and K⁺.

Table 4

Product inhibition patterns for *Mt*IMPDH^a.

| Variable substrate | Inhibitor | Type of inhibition | K_{is} (μM) ^b | K_{ii} (μM) ^c |
|--------------------|-----------|--------------------|---|---|
| IMP | XMP | competitive | 265 ± 33 | n.a. ^d |
| IMP | NADH | noncompetitive | 360 ± 121 | 466 ± 70 |
| NAD ⁺ | XMP | noncompetitive | 1881 ± 443 | 1290 ± 132 |
| NAD ⁺ | NADH | noncompetitive | 312 ± 58 | 878 ± 197 |
| K ⁺ | XMP | noncompetitive | 460 ± 47 | 2614 ± 350 |
| K ⁺ | NADH | noncompetitive | 361 ± 94 | 412 ± 54 |

^a All assays were performed as described in the Experimental procedures section.

^b K_{is} = the slope inhibition constant.

^c K_{ii} = the intercept inhibition constant.

^d Not applicable.

It has been shown that GMP, the product of the next reaction in the *de novo* guanine nucleotide pathway, is a common inhibitor for IMPDHs.^{18,43,69,78} To evaluate the inhibitory effect of GMP on *Mt*IMPDH enzyme velocity, measurements of steady-state rates were

carried out as described in the Experimental procedures section. The double-reciprocal plots at different GMP concentrations as a function of either IMP (Fig. 6A) or NAD^+ (Fig. 6B) displayed distinct patterns. GMP usually acts as a competitive inhibitor towards IMP.^{18,48,69} However, this appears not to hold for *Mt*IMPDH as GMP showed a pattern of noncompetitive inhibition with respect to IMP. Data fitting to Eq. (6) yielded K_{is} and K_{ii} values of, respectively, $471 (\pm 51) \mu\text{M}$ and $3983 (\pm 637) \mu\text{M}$. The inhibition pattern of parallel lines indicates that GMP acted as an uncompetitive inhibitor with respect to NAD^+ , in which both V_{max} and K_m values were simultaneously reduced. Data fitting to Eq. (7) for uncompetitive inhibition yielded a K_{ii} value of $396 (\pm 30) \mu\text{M}$. These results suggest that GMP may act as a negative feedback regulator of the mycobacterial enzyme, maintaining a balance of the guanine nucleotides synthesis in the cell. On the other hand, GTP did not inhibit *Mt*IMPDH as has been reported for *Leishmania donovani* IMPDH.⁴³

In an attempt to find nucleotides that can act as regulators of *Mt*IMPDH, the dependence, if any, of enzyme velocity on increasing IMP and NAD^+ concentrations was evaluated. These measurements were carried out in the presence of a fixed concentration ($500 \mu\text{M}$) of AMP, ATP, UTP and CTP, and compared to *Mt*IMPDH rates in the absence of these nucleotides. No noticeable effect on the *Mt*IMPDH kinetic properties towards IMP and NAD^+ could be observed. These results are in agreement with data showing that IMPDHs are not allosterically regulated by these nucleotides.¹⁶

pH-rate profiles

The dependence of kinetic parameters on varying pH values was studied out to probe acid-base catalysis and to gain information on the chemical mechanism of *Mt*IMPDH. The pH-rate profiles obtained for the *Mt*IMPDH reaction show catalysis decrease in the acidic limb with a slope of +1, indicating that protonation of a single group abolishes activity (Fig. 7A).⁷⁹ Data fitted to Eq. (8) indicate that deprotonation of a group with p*K* value of $8.2 (\pm 0.6)$ plays a critical role in *Mt*IMPDH catalysis. IMP and NAD^+ have no dissociating groups with this p*K* value, indicating that this group is probably an amino acid chain of the enzyme.⁶⁵ This p*K* value has been shown to reflect the ionization of the reactive Cys331 (human type II numbering) thiol group in the free enzyme which must be deprotonated to attack the C2 of IMP in the course of catalysis.

The cysteine thiol group usually ionizes at slightly alkaline pH values, and the resulting thiolate anion is the reactive species that acts as a nucleophile, which is one of the most reactive functional groups found in proteins.⁸⁰ In addition, the ability of the thiol residue

to ionize appears to be critical for the reaction involving nucleophilic attack, since the Cys331Ala mutation abolished IMPDH activity.^{21,70} The active site Cys331 has been clearly identified by the use of irreversible inhibitors,⁸¹ isolation of enzyme intermediates under turnover conditions as well as direct observation by X-ray crystallography.^{21,32} Sintchak *et al.*²¹ solved the crystal structure of the Chinese hamster IMPDH in complex with MPA and an IMP reaction intermediate (XMP*) that is generated during substrate turnover, and demonstrated that both molecules are simultaneously bound in the active site. This IMPDH structure also revealed a covalent adduct between Cys331 and the C2-position of the XMP*, confirming cysteine role in catalysis. In the *T. foetus* IMPDH crystal structure, this residue is located in a disordered loop, suggesting a high degree of flexibility needed for the catalytic cycle to occur,²² but which becomes ordered during ternary complex formation.²⁸ Based on these observations, it is thus tempting to suggest that the cysteine (Cys341 in *Mt*IMPDH) side chain is the general basic group whose protonation abolishes the *Mt*IMPDH catalytic activity.

The bell-shaped pH-rate data for $k_{\text{cat}}/K_{\text{NAD}^+}$ (Fig. 7B) were fitted to Eq. (9), yielding apparent pK values of 7.5 (\pm 0.7) and 9.0 (\pm 0.6), for groups that must be deprotonated and protonated, respectively, for NAD^+ binding. Slopes of +1 for the acidic limb and -1 for the basic limb indicate participation of a single ionizable group in each limb. It has been pointed out that the pK value obtained for the acidic group may reflect the ionization of the reactive cysteine thiol group in altered environments.⁸² A group with a pK value of 6.9 (\pm 0.2) was also found to be important for substrate binding to human type II IMPDH and, since NAD^+ does not have pK values in this range, the authors have suggested that the ionizing groups are located in the enzyme·IMP complex. The rate of inactivation of the enzyme by 6-Cl-PRT as a function of pH was also determined, assigning the thiol group of Cys331 as the residue with a pK value of 7.5 (\pm 1).⁶⁵ Accordingly, it is likely that the pK values in the acidic limb for both k_{cat} and $k_{\text{cat}}/K_{\text{NAD}^+}$ are reporting on the same group.

The crystal structure of *T. foetus* IMPDH showed that the carboxamide group of the NAD^+ analogue β -methylene-TAD forms hydrogen bonds with Ser262, Gly312, Gly314, and Arg322.²⁸ The amino acid side chain having a pK_a value of 9.0 that has to be protonated for NAD^+ binding to *Mt*IMPDH (Fig. 7B) may thus tentatively be ascribed to the conserved Arg344 (*M. tuberculosis* numbering) residue. Interestingly, the carboxamide and adenosine moieties of β -methylene-TAD make very different interactions in this structure compared to the human type II enzyme SAD complex⁸³ and, unlike human IMPDH, no interactions are observed between β -methylene-TAD and the adjacent monomer. Moreover, while prokaryotic IMPDHs generally contain Arg344, most eukaryotic organisms contain Gln at this position.

The pK_a value of the δ -guanido group of arginine in solution is usually about 12. How can one reconcile the pK_a value of 9.0 for amino acid side chains involved in NAD^+ binding? It has been pointed out by Copeland⁸⁴ that in some cases the pK_a values that are measured cannot be correctly ascribed to a particular amino acid, but rather reflect a specific set of residue interactions within an enzyme molecule that create *in situ* a unique acid-base center. Moreover, the hydrophobic interior of enzyme active sites that undergo domain closure can greatly perturb the pK_a values of amino acid side chains relative to their typical pK_a values in aqueous solution. Notwithstanding, site-direct mutagenesis and crystal structure determination will have to be pursued to assign any role in substrate binding and catalysis to a particular amino acid residue in *Mt*IMPDH.

The pH dependence on IMP binding was not included in the analysis, since saturation curves were sigmoidal. However, measurements of initial velocities as a function of increasing IMP concentrations over pH values ranging from 7.0 to 10.0 showed that the cooperative index (n) of IMP increases with decreasing pH values (Table 5). It is interesting to note that, as has been pointed out in a review showing a timeline of evolution of allostery as a concept,⁸⁵ pH is now considered an allosteric effector. In addition, it could be observed that at higher pH levels, both k_{cat} and $K_{0.5}$ values were simultaneously increased. These results represent an additional evidence of *Mt*IMPDH allosteric properties regarding the substrate IMP.

Table 5
pH dependence of the IMP kinetic parameters^a.

| pH | k_{cat} (s^{-1}) | n^b | $K_{0.5}$ (μM) ^c |
|------|------------------------|-----------------|------------------------------------|
| 7.0 | 0.202 ± 0.003 | 2.4 ± 0.2 | 93 ± 3 |
| 7.5 | 0.755 ± 0.005 | 1.84 ± 0.06 | 58 ± 1 |
| 8.0 | 1.39 ± 0.02 | 1.7 ± 0.1 | 69 ± 2 |
| 8.5 | 2.24 ± 0.01 | 1.58 ± 0.04 | 106 ± 1 |
| 9.0 | 2.55 ± 0.05 | 1.5 ± 0.1 | 148 ± 6 |
| 9.5 | 3.4 ± 0.2 | 1.1 ± 0.1 | 348 ± 36 |
| 10.0 | 3.06 ± 0.08 | 1.18 ± 0.05 | 1077 ± 62 |

^a All assays were performed as described in the Experimental procedures section.

^b n = the Hill coefficient

^c $K_{0.5}$ = a constant correlated to K_m which contains terms related to the effect of substrate occupancy at one site on the substrate affinity of other sites.

Energy of activation

The energy of activation for the enzyme-catalyzed chemical reaction was assessed by measuring the dependence of k_{cat} (s^{-1}) on temperature (Fig. 8). These data were calculated by determining the slope of the Arrhenius plot (Eq. (10)), yielding a value of $7.5 \text{ kcal mol}^{-1}$, which represents the minimal amount of energy required to initiate the *Mt*IMPDH-catalyzed chemical reaction,⁸⁶ since we measured the enzyme activity at saturating concentrations of substrates. The linearity of the Arrhenius plot also suggests that there is no change in the rate-limiting step over the temperature range utilized in the assay.

Conclusion

The identification of new metabolic targets has been a challenge in the search for anti-mycobacterial agents. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) is the rate-limiting enzyme in the *de novo* biosynthesis of guanine nucleotides. Bacterial and mammalian IMPDH enzymes appear to have unique structural and biochemical characteristics, which have been exploited in the development of species-selective inhibitors.^{32,34,35} *Mt*IMPDH appears to be a promising drug target as DNA metabolism is maintained in both active and latent forms of TB, and the purine biosynthesis has been predicted to be essential for mycobacteria *in vitro* growth.⁴¹ The results here described showed that *Mt*IMPDH displays kinetic properties typical of bacterial IMPDHs, although with particular characteristics. The cooperative kinetics with respect to IMP is an indicative of allosteric properties and GMP inhibition also represents a mechanism of allosteric regulation. It has been pointed out that IMPDH reaction involves several conformational rearrangements^{20,28,31} and that M^+ activation may be an example of allostery for some IMPDHs.^{66,71} In any case, allostery appears to be an intrinsic IMPDH property during the catalytic cycle. Such allosteric signals can arise from a variety of mechanisms, and growing evidence supports the notion that many, if not all, proteins utilize allostery.⁵⁶ Accordingly, the data presented here show additional evidence that *Mt*IMPDH activity may be regulated by allosteric control. Regulation of activity through metal ion complexation plays a key role in many enzyme-catalyzed reactions and over one-third of known proteins are metalloproteins.⁷¹ A kinetic analysis of metal interactions and *Mt*IMPDH has been described. The requirement of M^+ for the *Mt*IMPDH activity has been demonstrated and the Michaelis constants for these ions determined. Nevertheless, *Mt*IMPDH structural information of M^+ binding sites has to be pursued to provide the molecular basis for the cation activation. In addition, here a sequential kinetic mechanism is proposed for *Mt*IMPDH based on steady-state kinetics, which is consistent with ternary complex formation, as well as an

ordered addition of substrates and release of products, supported by product inhibition studies, with K^+ association as the catalysis proceeds.

The potential of IMPDH in antimicrobial chemotherapy is beginning to be exploited as recent reports of parasite-selective inhibitors^{34,35} and an *in silico* approach has yielded several novel *Mt*IMPDH inhibitors with *in vitro* activity against *M. tuberculosis* H37Rv.⁸⁷ The target-based rational design of new agents with anti-TB activity includes functional and structural efforts. Accordingly, mechanistic analysis should be included in enzyme-targeted drug programs aiming at the rational design of potent enzyme inhibitors. Understanding the mode of action of *Mt*IMPDH will inform us on how to better design inhibitors targeting this enzyme. Moreover, elucidation of particular signatures of the *Mt*IMPDH will provide insight into the catalytic mechanism of this enzyme and the foundation for the development of specific inhibitors.⁴⁵ These inhibitors may also be useful tools to chemical biologists to loss-of-function experiments to reveal the biological role of *Mt*IMPDH in the context of whole *M. tuberculosis* cells. In addition, it is hoped that the results here described may contribute to our understanding of the biology of *M. tuberculosis*.

Experimental procedures

Materials

Oligonucleotide primers were synthesized by Invitrogen. All restriction enzymes were purchased from New England Biolabs and thermostable *Pfu*[®] DNA polymerase was from Stratagene. Quick Gel Extraction kit, T4 DNA ligase and pCR-Blunt[®] vector were from Invitrogen and Qiaprep Spin Miniprep kit was from Qiagen. *E. coli* strains and pET-23a(+) expression vector were purchased from Novagen. Chemicals were of analytical or reagent grade and were obtained from Sigma-Aldrich, except for XMP and dithiothreitol (DTT) that were from, respectively, Santa Cruz Biotechnology and Acros Organics. All purification steps were carried out on an ÄKTA system (GE Healthcare) at 4 °C with UV detection at 215, 254 and 280 nm, and fractions were analyzed by 12% SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue.⁸⁸ AMICON stirred ultrafiltration cell, regenerated cellulose ultrafiltration membranes were from Millipore Corporation. Bovine serum albumin and Bradford reagent were from Bio-Rad Laboratories. Linbro cell culture plate was from MP Biomedical, Inc. Siliconized coverslips and vacuum grease sealant were purchased from Hampton Research. The mass spectrometer LTQ-XL and LTQ Orbitrap Discovery were from Thermo and the

nanoLC Ultra 1D plus was from Eksigent. Steady-state kinetic experiments were performed on an UV-2550 UV/Visible spectrophotometer (Shimadzu).

Amplification, cloning and DNA sequencing of the *guaB2* gene

Primers were designed using the annotated *M. tuberculosis guaB2* gene (Rv3411c) sequence available on Tuberculist database.⁸⁹ Synthetic oligonucleotides used (forward primer, 5'-CACATATGTCCCGTGGCATGTCCGGCCTG-3'; and reverse primer, 5'-GGGGATCCTCAGCGCGCGTAGTAGTTGG-3') were designed to contain, respectively, NdeI and BamHI restriction sites (underlined). The full-length *guaB2* coding region (1590 bp) was PCR amplified using the genomic DNA from *M. tuberculosis* H37Rv as template and a high fidelity proof-reading thermostable *Pfu*[®] DNA polymerase, in the presence of 10% dimethyl sulfoxide (DMSO, final concentration). The isolated DNA fragment was cloned into pCR-Blunt[®] vector, transformed into *E. coli* strain DH10B and selected on LB medium containing 50 µg mL⁻¹ kanamycin. The resulting plasmid was isolated utilizing the Qiaprep Spin Miniprep kit. Subsequently, the fragment was cleaved with NdeI and BamHI endonucleases and inserted into the pET-23a(+) expression vector, previously treated with the same restriction enzymes. The complete *guaB2* nucleotide sequence was determined by automated DNA sequencing to corroborate sequence identity, integrity and to check the absence of mutations in the cloned fragment.

Expression of recombinant *Mt*IMPDPH

The recombinant plasmid pET-23a(+)::*guaB2* was transformed into C41(DE3) *E. coli* electrocompetent host cells, and cells carrying the recombinant vector were selected on LB agar plates containing 50 µg mL⁻¹ ampicillin.⁹⁰ A single colony was used to inoculate 50 mL of LB medium containing the same antibiotic and grown overnight at 37 °C. Aliquots of this culture (5 mL) were used to inoculate 500 mL of Terrific Broth (TB) medium in 5 x 1 L flasks supplemented with ampicillin (50 µg mL⁻¹) and grown at 37 °C and 180 rpm to an optical density (OD_{600nm}) of 0.4 – 0.6. At this growth stage, the temperature was lowered to 30 °C and 0.5 mM of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to induce protein expression. After 36 h, the cells (19 g) were harvested by centrifugation, at 11,800g for 30 min at 4 °C and stored at -20 °C. The same protocol was employed for C41(DE3) *E. coli* cell transformed with pET-23a(+) as control. The expression of the recombinant protein was confirmed by 12% SDS-PAGE and Coomassie Brilliant Blue staining.

Purification of recombinant *Mt*IMPDH

All subsequent steps were carried out at 4 °C, unless otherwise specified. Approximately 3 g of wet cell paste were suspended in 30 mL of 50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris, buffer A) pH 7.5. Cells were disrupted by sonication (ten pulses of 10 s, with cooling intervals of 1 min, at 60% amplitude) and the lysate was centrifuged at 38,900g for 30 min to remove cell debris. The supernatant was treated with buffer A containing 2 M (NH₄)₂SO₄, to a final concentration of 1 M, stirred for 30 min, and centrifuged at 38,900g for 30 min. The resulting precipitate containing *Mt*IMPDH was resuspended in 8 mL of buffer A (crude extract) and loaded on a 5 mL HiTrap Blue HP column, pre-equilibrated with buffer A. The column was washed with 15 column volumes of buffer A, and the protein elution was carried out using a 0-900 mM NaCl linear gradient in buffer A (25 column volumes), at a flow rate of 1 mL min⁻¹.

Fractions containing *Mt*IMPDH in NaCl (*ca.* 600 mM) were pooled and concentrated to approximately 8 mL using an AMICON ultrafiltration membrane (MWCO = 10 kDa). The soluble sample was loaded on a HiLoad Superdex 200 26/60 size exclusion column, which was previously equilibrated with buffer A. Proteins were isocratically eluted at 1 mL min⁻¹ flow rate, and fractions containing the homogeneous *Mt*IMPDH were pooled, concentrated and stored at -80 °C. Protein concentration was determined by Bradford's method,⁴⁷ using serum albumin as standard.

***Mt*IMPDH identification by mass spectrometry**

Aliquots of 1 nmol of *Mt*IMPDH were digested with trypsin and the peptides were separated by nanochromatography (nanoLC Ultra 1D plus – Eksigent, USA) using 15 cm capillary columns (150 µM i.d., Kinetex C18 core-shell particles – Phenomenex, Inc.). The separated peptides were detected by mass spectrometry using an LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer (Thermo Electron Corporation). The chromatographic method used a linear gradient from mobile phase A (0.1% formic acid in water) to mobile phase B (0.1% formic acid in acetonitrile) of 2-80% B over 60 min. We performed MS/MS fragmentation using collision-induced dissociation (CID) with an activation Q of 0.250, an activation time of 30.0 ms, and an isolation width of 1.0 Da. Using the Proteome Discoverer software (v. 1.3), we compared experimentally obtained MS and MS2 spectra with the *in-silico* trypsin digestion of the *M. tuberculosis* H37Rv proteome. We allowed a precursor tolerance of 10 ppm, a fragment tolerance of 0.8 Da, static carbamidomethylation on cysteines, and oxidation on

methionine residues. We restricted our analysis to matches with a Xcorr score > 2.0 for doubly charged ions and Xcorr score > 2.5 for triply charged ions.

Determination of *Mt*IMPDH molecular mass

Homogeneous samples of *Mt*IMPDH were desalted, reconstituted in acetonitrile 50%:water 47%:formic acid 3% and directly injected into an IonMax electrospray ion source. The electrospray parameters were as follows: positive ion mode, 4 kV of applied voltage, 25V of capillary voltage, 300 °C of capillary temperature, and 94 V of tube lens voltage. High-resolution full spectra (750-2000 m/z range) were collected on a Thermo Orbitrap Discovery XL using the Orbitrap analyser (FTMS mode) at a nominal resolution of 7500. The average spectrum was processed with the software MagTran⁹¹ for charge state deconvolution.

Determination of *Mt*IMPDH quaternary structure

Gel filtration chromatography was performed on a Superdex 200 (HR 10/30) column pre-equilibrated with buffer A, and containing 200 mM KCl or 200 mM NaCl, at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹, as described elsewhere,⁹² and homogeneous *Mt*IMPDH was loaded on the column at different concentrations (0.2, 0.6 and 1 mg mL⁻¹). In addition, cross-linking studies were performed to probe for the quaternary structure of the *Mt*IMPDH employing the method described by Fadouloglou *et al.*,⁹³ using crystallization supports with 120 µL of 25% (v/v) glutaraldehyde acidified with HCl in the reservoir. A siliconized coverslip was used to seal the reservoir, containing a 15 µL drop of protein suspension (0.6 mg mL⁻¹ homogeneous recombinant *Mt*IMPDH in buffer A without M⁺, or containing either 200 mM KCl or 200 mM NaCl). The plates were incubated at 30 C° for different time intervals and protein drops were subsequently analyzed by 12% SDS-PAGE.

Enzyme activity assays

The standard enzyme activity assay was performed at 37 °C and the buffer, if not stated otherwise, contained 50 mM Tris pH 8.5, 1 mM DTT and 200 mM KCl (500 µL final volume), as described by Usha *et al.*,⁴⁰ with minimal modifications (no EDTA was added to assay mixture). KCl, NaCl, RbCl, LiCl, CsCl and NH₄Cl were used as sources of the monovalent cations, and MgCl₂ and CaCl₂ as the divalent cations. The reaction was initiated by the addition of recombinant *Mt*IMPDH, and the production of NADH was monitored spectrophotometrically at 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) and corrected for non-catalyzed chemical reactions in the absence of *Mt*IMPDH. The production of APADH (reduced form of

acetylpyridine adenine dinucleotide) was monitored at 363 nm ($\epsilon_{363\text{nm}} = 9.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) and the standard oxidation-reduction potentials for NAD^+ and APAD^+ (oxidized form of acetylpyridine adenine dinucleotide) are -0.320 V and -0.258 V, respectively.⁵³ One unit of *Mt*IMPDH is defined as the amount of enzyme necessary to convert 1 μmol of substrate into product per min, in an optical path of 1 cm.

Steady-state kinetics

Determination of the apparent steady-state kinetic parameters were evaluated at varying concentrations of IMP (0.04 –1 mM) and fixed-saturating concentration of NAD^+ (3 mM), and at varying concentrations of NAD^+ (0.3–10 mM) and fixed-saturating level of IMP (1 mM), under standard assay conditions. The enzyme specificity for NAD^+ was evaluated measuring the enzymatic reaction in the presence of varying concentrations of NADP^+ (0.8–20 mM) or APAD^+ (0.3–8 mM), at fixed-saturating concentration of IMP (1 mM). To assess the effect of monovalent cations on *Mt*IMPDH activity, initial velocity parameters were calculated as a function of different concentrations of Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Rb^+ and Cs^+ , at saturating concentrations of IMP (1 mM) and NAD^+ (3 mM). The dependence of the apparent kinetic constants for IMP and NAD^+ were also investigated varying the concentrations of these substrates in the presence of K^+ , NH_4^+ or Rb^+ , at saturating concentration (200 mM).

Additionally, initial velocity studies were carried out to determine the true steady-state kinetic parameters and the intersecting initial velocity patterns. For these experiments, the role of K^+ was regarded as an essential monovalent cation and the concentrations of two substrates were varied while maintaining the third substrate at a fixed-saturating concentration. Of the two different substrates, the concentration of one was varied whereas the second was maintained at different fixed concentrations.^{19,69,76,94,95} The experimental conditions were as follows: i) varying NAD^+ concentrations (0.3–3 mM), fixed saturating level of IMP (2 mM) and fixed-varied K^+ concentrations (30, 66, 102, 198 and 240 mM); ii) varying NAD^+ concentrations (0.3–3 mM), fixed saturating level of K^+ (240 mM) and fixed-varied IMP concentrations (0.07, 0.1, 0.3, 0.5 and 1 mM); iii) varying K^+ concentrations (30–300 mM), fixed saturating level of IMP (2 mM) and fixed-varied NAD^+ concentrations (0.3, 0.8, 1.5, 2, 3 and 4 mM); and iv) varying K^+ concentrations (30–300 mM), fixed saturating level of NAD^+ (3 mM) and fixed-varied IMP concentrations (0.08, 0.1, 0.24, 0.5 and 1 mM).

Product inhibition kinetics

Product inhibition patterns were examined by measuring initial rates at varying concentrations of one substrate (IMP, NAD⁺ or K⁺), fixed non-saturating concentration of the co-substrate, and fixed-varying levels of products (either XMP or NADH).⁵² Inhibition by monovalent cations were performed at varying concentrations of K⁺, fixed non-saturating concentrations of both IMP and NAD⁺, and at fixed-varied concentrations of Na⁺ (0, 80, 160 and 240 mM) and Li⁺ (0, 80, 120 and 160 mM). Inhibition studies were also carried out as a function of IMP and NAD⁺ concentrations, in the presence of different fixed GMP or GTP concentrations (0, 200, 300, 400, 600 and 800 μM).

Kinetic parameters were also analyzed as a function of IMP and NAD⁺ concentrations, at saturating concentrations of the co-substrates, in the absence or presence of a fixed concentration of AMP, ATP, UTP and CTP (500 μM) to verify whether these nucleotides have any effect on the kinetic properties of *Mt*IMPDH.

pH-rate profiles

Initial velocities measurements were carried out with increasing amounts of one substrate (IMP, NAD⁺ or K⁺) and saturating levels of the other two co-substrates, in 100 mM 2-(*N*-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES)/Hepes/2-(*N*-cyclohexylamino)-ethanesulfonic acid (CHES) buffer mixture, over the following pH values: 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 and 10.0, at 37 °C.⁷⁹ Prior to performing pH-rate studies, *Mt*IMPDH was incubated at the pH values cited above and assayed under standard conditions to ensure enzyme stability at the experimental pH values over the course of reaction.

Energy of activation

The energy of the *Mt*IMPDH-catalyzed chemical reaction was determined using saturating concentrations of IMP (2 mM) and NAD⁺ (3 mM), in the standard activity assay, at temperatures ranging from 288 to 308 K. *Mt*IMPDH was incubated for several minutes at all temperatures tested and assayed under standard conditions to ensure enzyme stability.⁸⁶

Data analysis

Initial velocity data and their respective errors were obtained by fitting the data to the appropriate equations by using the nonlinear regression function of SigmaPlot 9.0 2004 (SPSS, Inc.). Hyperbolic saturation curves were fitted by nonlinear regression analysis to the Michaelis-Menten equation,⁹⁶ Eq. (1), in which v is the initial velocity, V_{\max} is the maximal rate, $[S]$ is the substrate concentration, and K_m is the Michaelis-Menten constant. The substrate inhibition constant (K_i) was calculated using the substrate inhibition equation,⁹⁷ Eq. (2), in which K_i represents the dissociation constant for the inhibitory complex, and the remaining variables are as for Eq. (1). Sigmoidal curves were fitted to Eq. (3), where $K_{0.5}$ is a constant correlated to K_m , but also contains terms related to the effect of substrate occupancy at one site on the substrate affinity of other sites, and n is the Hill coefficient (related to the cooperative index):⁵⁴

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_i}} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]^n}{K_{0.5}^n + [S]^n} \quad \text{Eq. (3)}$$

Intersecting initial velocity patterns were fitted to Eq. (4), which describes a mechanism involving ternary complex formation and a sequential mechanism, where v is the initial velocity, V_{\max} is the maximal initial velocity, $[A]$ and $[B]$ are the concentrations of IMP, NAD^+ or K^+ , K_A and K_B are their respective Michaelis constants, and K_{ia} is the dissociation constant for enzyme-substrate A binary complex formation. In Eq. (4), A and B refer to substrates K^+ and NAD^+ , respectively, when IMP was the fixed substrate. When K^+ was fixed at saturating concentration, A refers to IMP and B to NAD^+ . Similarly, when NAD^+ was the fixed substrate, A refers to IMP and B to K^+ .⁷⁶

$$v = \frac{V_{\max} [A][B]}{K_{ia}K_B + K_A[B] + K_B[A] + [A][B]} \quad \text{Eq. (4)}$$

Inhibition measurements were analyzed by fitting the data to competitive (Eq. (5)), noncompetitive (Eq. (6)) and uncompetitive (Eq. (7)) equations, where $[I]$ is the inhibitor concentration, K_{is} is the dissociation constant for the binary EI complex and K_{ii} is the dissociation constant for the ternary ESI complex.^{52,86,98}

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{is}} \right)} \quad \text{Eq. (5)}$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{ii}} \right) + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_{is}} \right)} \quad \text{Eq. (6)}$$

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_{ii}} \right) + K_m} \quad \text{Eq. (7)}$$

Data for pH-rate profiles were fitted to Eq. (8) and (9), where y represents the kinetic parameter (k_{cat} or k_{cat}/K_m), C is the pH-independent value of y , H is the proton concentration, and K_a and K_b are, respectively, the apparent acid and base dissociation constants for ionizing groups.⁷⁹

$$\log y = \log \left(\frac{C}{1 + \frac{H}{K_a}} \right) \quad \text{Eq. (8)}$$

$$\log y = \log \left(\frac{C}{1 + \frac{H}{K_a} + \frac{K_b}{H}} \right) \quad \text{Eq. (9)}$$

The data for temperature effects were fitted to Eq. (10), where k is the maximal reaction rate, E_a is the energy of activation, which was calculated from the slope ($-E_a/R$) of the Arrhenius plot, T is the temperature in Kelvin, R is the gas constant ($8.314 \text{ J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) and A is a pre-exponential factor that correlates collision frequency and the probability of the reaction occurring when reactant molecules collide.⁸⁶

$$\log k = -\left(\frac{E_a}{2.3R}\right)\left(\frac{1}{T}\right) + \log A \quad \text{Eq. (10)}$$

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) and D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06) are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). D.C.R. is recipient of a PhD student scholarship awarded by CNPq.

References

- 1 World Health Organization, 2012. Global tuberculosis report 2012. WHO/HTM/TB/2012.6.
- 2 E. M. Zager and R. McNerney, *BMC Infect. Dis.*, 2008, **8**, DOI: 10.1186/1471-2334/8/10.
- 3 M. Jassal and W. R. Bishai, *Lancet Infect. Dis.*, 2009, **9**, 19-30.
- 4 E. S. Guy and A. Mallampalli, *Ther. Adv. Respir. Dis.*, 2008, **2**, 401-408.
- 5 A. Zumla, P. Nahid and S. T. Cole, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2013, **12**, 388-404.
- 6 C. Sala and R. C. Hartkoorn, *Future Microbiol.*, 2011, **6**, 617-633.
- 7 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 and B. G. Barrell, *Nature*, 1998, **393**, 537-544.
- 8 R. G. Ducati, L. A. Basso and D. S. Santos, *Curr. Drug Targets*, 2007, **8**, 423-435.
- 9 L. Hedstrom and C. C. Wang, *Biochemistry*, 1990, **29**, 849-854.
- 10 E. De Clercq, *Adv Virus. Res.*, 1993, **42**, 1-55.
- 11 A. C. Allison and E. M. Eugui, *Immunopharmacology*, 2000, **47**, 85-118.
- 12 M. D. Sintchak and E. Nimmesgern, *Immunopharmacology*, 2000, **47**, 163-184.

- 13 Q. Shu and V. Nair, *Antiviral Chem. Chemother.*, 2007, **18**, 245-258.
- 14 Q. Shu and V. Nair, *Med. Res. Rev.*, 2008, **28**, 219-232.
- 15 L. Hedstrom, G. Liechti, J. B. Goldberg and D. R. Gollapalli, *Curr. Med. Chem.*, 2011, **18**, 1909-1918.
- 16 L. Hedstrom, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 2903-2928.
- 17 Y. Natsumeda, S. Ohno, H. Kawasaki, Y. Konno, G. Weber and K. Suzuki, *J. Biol. Chem.*, 1990, **265**, 5292-5295.
- 18 X. Zhou, M. Cahoon, P. Rosa and L. Hedstrom, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 21977-21981.
- 19 B. Xiang, J. C. Taylor and G. D. Markham, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 1435-1440.
- 20 J. A. Digits and L. Hedstrom, *Biochemistry*, 1999, **38**, 2295-2306.
- 21 M. D. Sintchak, M. A. Fleming, O. Futer, S. A. Raybuck, S. P. Chambers, P. R. Caron, M. A. Murcko and K. P. Wilson, *Cell*, 1996, **85**, 921-930.
- 22 F. G. Whitby, H. Luecke, P. Kuhn, J. R. Somoza, J. A. Huete-Perez, J. D. Phillips, C. P. Hill, R. J. Fletterick and C. C. Wang, *Biochemistry*, 1997, **36**, 10666-10674.
- 23 E. Nimmesgern, J. Black, O. Futer, J. R. Fulghum, S. P. Chambers, C. L. Brummel, S. A. Raybuck and M. D. Sintchak, *Protein Expression Purif.*, 1999, **17**, 282-289.
- 24 R. Zhang, G. Evans, F. J. Rotella, E. M. Westbrook, D. Beno, E. Huberman, A. Joachimiak and F. R. Collart, *Biochemistry*, 1999, **38**, 4691-4700.
- 25 K. M. Kerr and L. Hedstrom, *Biochemistry*, 1997, **36**, 13365-13373.

- 26 K. M. Kerr, M. Cahoon, D. A. Bosco and L. Hedstrom, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, **375**, 131-137.
- 27 E. Nimmesgern, T. Fox, M. A. Fleming and J. A. Thomson, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 19421-19427.
- 28 L. Gan, G. A. Petsko and L. Hedstrom, *Biochemistry*, 2002, **41**, 13309-13317.
- 29 W. Wang and L. Hedstrom, *Biochemistry*, 1997, **36**, 8479-8483.
- 30 B. Xiang and G. D. Markham, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1997, **348**, 378-382.
- 31 T. V. Riera, W. Wang, H. R. Josephine and L. Hedstrom, *Biochemistry*, 2008, **47**, 8689-8696.
- 32 R. Zhang, G. Evans, F. Rotella, E. Westbrook, E. Huberman, A. Joachimiak and F. R. Collart, *Curr. Med. Chem.*, 1999, **6**, 537-543.
- 33 J. A. Digits and L. Hedstrom, *Biochemistry*, 2000, **39**, 1771-1777.
- 34 C. R. Johnson, S. K. Gorla, M. Kavitha, M. Zhang, X. Liu, B. Striepen, J. R. Mead, G. D. Cuny and L. Hedstrom, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 1004-1007.
- 35 S. K. Gorla, M. Kavitha, M. Zhang, J. E. W. Chin, X. Liu, B. Striepen, M. Makowska-Grzyska, Y. Kim, A. Joachimiak, L. Hedstrom and G. D. Cuny, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 4028-4043.
- 36 L. Hedstrom, L. Gan, Y. G. Schlippe, T. Riera and M. Seyedsayamdost, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, 2003, **3**, 97-98.
- 37 D. R. Gollapalli, I. S. MacPherson, G. Liechti, S. K. Gorla, J. B. Goldberg and L. Hedstrom, *Cell Press Chemistry & Biology*, 2010, **17**, 1084-1091.

38 L. Chen, D. J. Wilson, Y. Xu, C. C. Aldrich, K. Felczak, Y. Y. Sham and K. W. Pankiewicz, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 4768-4778.

39 J. A. Digits and L. Hedstrom, *Biochemistry*, 1999, **38**, 15388-15397.

40 V. Usha, S. S. Gurcha, A. L. Lovering, A. J. Lloyd, A. Papaemmanouil, R. C. Reynolds and G. S. Besra, *Microbiology*, 2011, **157**, 290-299.

41 C. M. Sasseti, D. H. Boyd and E. J. Rubin, *Mol. Microbiol.*, 2003, **48**, 77-84.

42 M. A. DeJesus, Y. J. Zhang, C. M. Sasseti, E. J. Rubin, J. C. Sacchettini and T. R. Ioerger, *Bioinformatic*, 2013, **29**, 695-703.

43 F. Dobie, A. Berg, J. M. Boitz and A. Jardim, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2007, **152**, 11-21.

44 M. C. Pinna, A. Salis, M. Monduzzi and B. W. Ninham, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 5406-5408.

45 D. N. Okamoto, M. Y. Kondo, J. A. N. Santos, S. Nakajima, K. Hiraga, K. Oda, M. A. Juliano, L. Juliano and I. E. Gouvea, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1794**, 367-373.

46 R. L. Baldwin, *Biophys. J.*, 1996, **71**, 2056-2063.

47 M. M. Bradford, R. A. Mcroire and W. L. Williams, *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.

48 H. J. Gilbert, C. R. Lowe and W. T. Drabble, *Biochem. J.*, 1979, **183**, 481-494.

49 Y. Ji, J. Gu, A. M. Makhov, J. D. Griffith and B. S. Mitchell, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 206-212.

50 E. Heyde and J. F. Morrison, *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, **429**, 635-644.

- 51 N. N. Umejiego, C. Li, T. Riera, L. Hedstrom and B. Striepen, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 40320-40327.
- 52 P. F. Cook and W. W. Cleland, in *Enzyme Kinetics and Mechanism*, Garland Science Publishing, New York, 2007, ch. 6, pp. 121-204.
- 53 J. D. Hermes, S. W. Morrical, M. H. O'Leary and W. W. Cleland, *Biochemistry*, 1984, **23**, 5479-5488.
- 54 R. A. Copeland, in *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, Wiley-VCH, New York, 2000, ch. 12, pp. 367-384.
- 55 J. Monod, J. Wyman, J. P. Changeux, *J. Mol. Biol.*, 1965, **12**, 88-118.
- 56 K. Gunasekaran, B. Ma and R. Nussinov, *Proteins*, 2004, **57**, 433-443.
- 57 D. E. Koshland Jr., G. Némethy and D. Filmer, *Biochemistry*, 1966, **5**, 365-385.
- 58 F. J. Bruzzese and P. R. Connelly, *Biochemistry*, 1997, **36**, 10428-10438.
- 59 P. R. Lambden and W. T. Drabble, *Biochem. J.*, 1973, **133**, 607-608.
- 60 L. Hedstrom and L. Gan, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, **10**, 520-525.
- 61 J. P. Glusker, *Adv Protein Chem.*, 1991, **42**, 1-76.
- 62 J. F. Kachmar and P. D. Boyer, *J. Biol. Chem.*, 1953, **200**, 669-682.
- 63 C. H. Suelter, *Science*, 1970, **168**, 789-795.
- 64 E. Di Cera, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 1305-1308.

- 65 G. D. Markham, C. L. Bock and C. Schalk-Hihi, *Biochemistry*, 1999, **38**, 4433-4440.
- 66 T. V. Riera, L. Zheng, H. R. Josephine, D. Min, W. Yang and L. Hedstrom, *Biochemistry*, 2011, **50**, 8508-8518.
- 67 G. L. Prorise, J. Z. Wu and H. Luecke, *J. Biol. Chem.*, 2002, **277**, 50654-50659.
- 68 G. L. Prorise and H. Luecke, *J. Mol. Biol.*, 2003, **326**, 517-527.
- 69 E. Heyde, A. Nagabhushanam, M. Vonarx and J. F. Morrison, *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, **429**, 645-660.
- 70 O. Futer, M. D. Sintchak, P. R. Caron, E. Nimmesgern, M. T. DeCenzo, D. J. Livingston and S. A. Raybuck, *Biochim. Biophys. Acta*, 2002, **1594**, 27-39.
- 71 M. J. Page and E. Di Cera, *Physiol. Rev.*, 2006, **86**, 1049-1092.
- 72 S. H. E. Kaufmann, *Nat. Rev. Immunol.*, 2001, **1**, 20-30.
- 73 J. D. Ernst, *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, **12**, 581-591.
- 74 D. Wagner, J. Maser, B. Lai, Z. Cai, C. E. Barry III, K. H. zu Bentrup, D. G. Russell and L. E. Bermudez, *J. Immunol.*, 2005, **174**, 1491-1500.
- 75 S. Rana, N. Pozzi, L. A. Pelc and E. Di Cera, *PNAS*, 2011, **108**, 5221-5225.
- 76 P. F. Cook and W. W. Cleland, in *Enzyme Kinetics and Mechanism*, Garland Science Publishing, New York, 2007, ch. 5, pp. 59-120.
- 77 R. Verham, T. D. Meek, L. Hedstrom and C. C. Wang, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1987, **24**, 1-12.

- 78 S. F. Carr, E. Papp, J. C. Wu and Y. Natsumeda, *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 27286-27290.
- 79 P. F. Cook and W. W. Cleland, in *Enzyme Kinetics and Mechanism*, Garland Science Publishing, New York, 2007, ch. 10, pp. 325-366.
- 80 G. Bulaj, T. Kortemme and D. P. Goldenberg, *Biochemistry*, 1998, **37**, 8965-8972.
- 81 L. C. Antonino, K. Straub and J. C. Wu, *Biochemistry*, 1994, **33**, 1760-1765.
- 82 G. H. Peters, T. M. Frimurer and O. H. Olsen, *Biochemistry*, 1998, **37**, 5383-5393.
- 83 T. D. Colby, K. Vanderveen, M. D. Strickler, G. D. Markham and B. M. Goldstein, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, **96**, 3531-3536.
- 84 R. A. Copeland, in *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, Wiley-VCH, New York, 2000, ch. 7, pp. 241-248.
- 85 N. M. Goodey and S. J. Benkovic, *Nat. Chem. Biol.*, 2008, **4**, 474-482.
- 86 I. H. Segel, in *Enzyme kinetics, behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1975, ch. 11, pp. 926-934.
- 87 V. Usha, J. V. Hobrath, S. S. Gurcha, R. C. Reynolds and G. S. Besra, *PLoS One*, 2012, **7**, e33886.
- 88 U. K. Laemmli, *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
- 89 Tuberculist *Mycobacterium tuberculosis* Database. <http://tuberculist.epfl.ch/>.
- 90 J. Sambrook, D. W. Russel, in *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2011, vol. 3, ch. 15, pp. 15.14-15.60.

- 91 Z. Zhang and A. G. Marshall, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1998, **9**, 225-233.
- 92 D. C. Rostirolla, A. Breda, L. A. Rosado, M. S. Palma, L. A. Basso and D. S. Santos, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2011, **505**, 202-212.
- 93 V. E. Fadouloglou, M. Kokkinidis and N. M. Glykos, *Anal. Biochem.*, 2008, **373**, 404-406.
- 94 C. Frieden, *J. Biol. Chem.*, 1959, **234**, 2891-2896.
- 95 J. Y. Bhat, B. G. Shastri and H. Balaram, *Biochem. J.*, 2008, **409**, 263-273.
- 96 R. A. Copeland, in *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2005, ch. 2, pp. 21-47.
- 97 I. J. MacRae and I. H. Segel, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, **361**, 277-282.
- 98 R. A. Copeland, in *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2005, ch. 3, pp. 48-81.

Figures

Figure 1: Chemical reaction catalyzed by IMPDH in the presence of a monovalent cation (M^+).

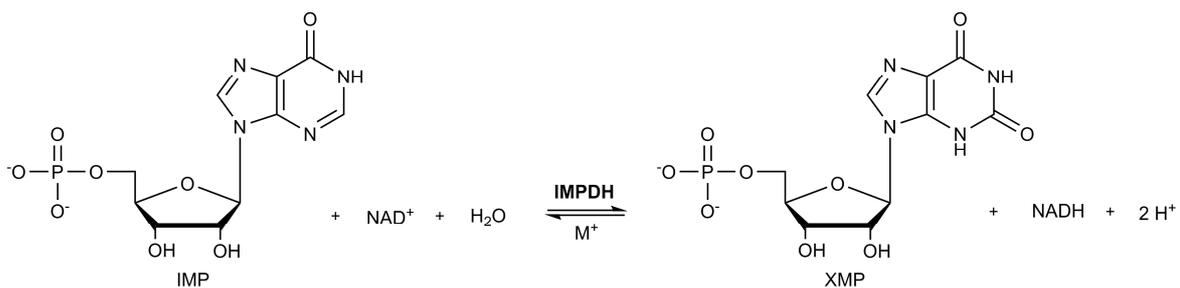


Figure 2: *Mt*IMPDH quaternary structure assignment by glutaraldehyde cross-linking experiments. Incubation times (in minutes) are shown at the bottom of each lane. Lane 1, Page Ruler Marker (Fermentas); Lane 2, *Mt*IMPDH monomer (*ca.* 55 kDa); Lane 3, 4 and 5, *Mt*IMPDH oligomers (*ca.* 220 kDa).

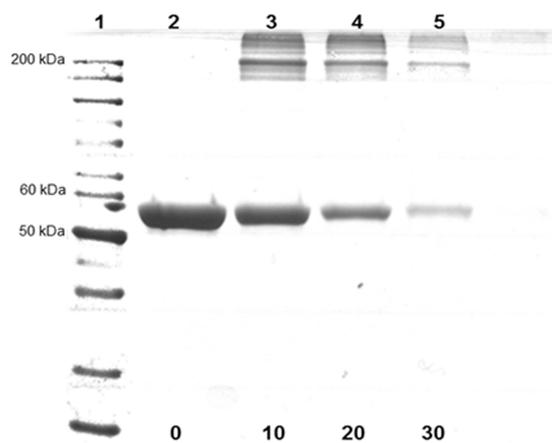


Figure 3: Apparent steady-state kinetic parameters measured under standard assay conditions.

(A) Specific activity (U mg^{-1}) versus $[\text{NAD}^+]$ (μM) at fixed concentration of IMP (1 mM);

(B) Specific activity (U mg^{-1}) versus $[\text{APAD}^+]$ (μM) at fixed concentration of IMP (1 mM).

Data were analyzed using Eq. (1) and (2).

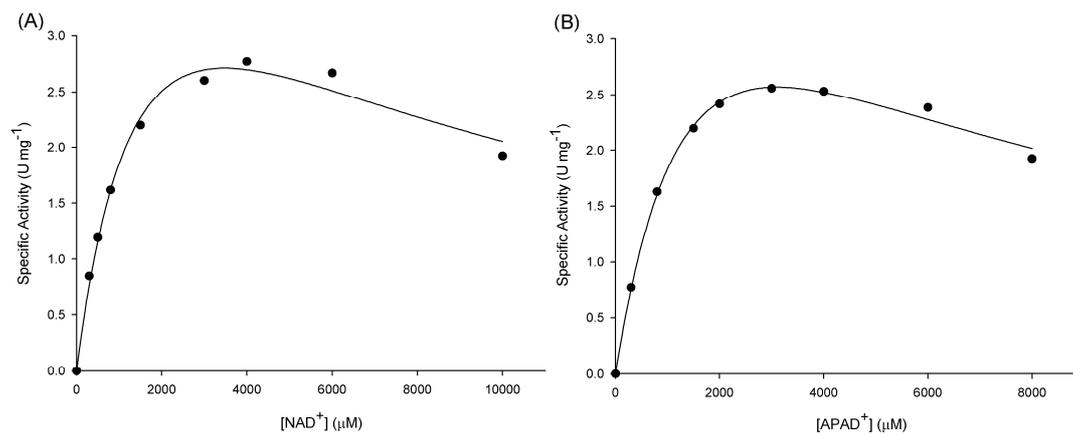


Figure 4: Velocity as a function of IMP concentration. (A) Specific activity (U mg^{-1}) versus $[\text{IMP}]$ (μM) at fixed concentration of NAD^+ (3 mM), when data were fitted to the Hill equation. (B) Representative plot for specific activity (U mg^{-1}) versus $[\text{IMP}]$ (μM) at fixed concentration of NAD^+ (3 mM), when data were fitted to the Michaelis-Menten equation. The insets of (A) and (B) display the calculated residual values plotted against IMP concentration using Eq. (3) and (1), respectively.

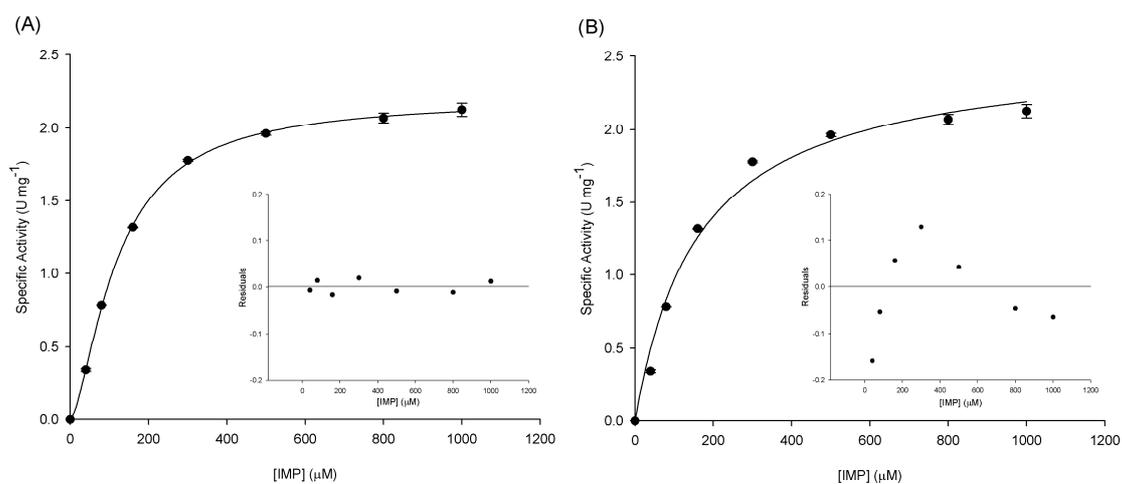


Figure 5: Intersecting initial velocity patterns for *Mt*IMPDH. (A) NAD^+ as the variable substrate at fixed saturating level of IMP (2 mM) and fixed-varied K^+ concentrations (30, 66, 102, 198 and 240 mM); (B) K^+ as the variable substrate at fixed saturating level of IMP (2 mM) and fixed-varied NAD^+ concentrations (0.3, 0.8, 1.5, 2, 3 and 4 mM). (C) NAD^+ as the variable substrate at fixed saturating level of K^+ (240 mM) and fixed-varied IMP concentrations (0.07, 0.1, 0.3, 0.5 and 1 mM); (D) K^+ as the variable substrate at fixed saturating level of NAD^+ (3 mM) and fixed-varied IMP concentrations (0.08, 0.1, 0.24, 0.5 and 1 mM).

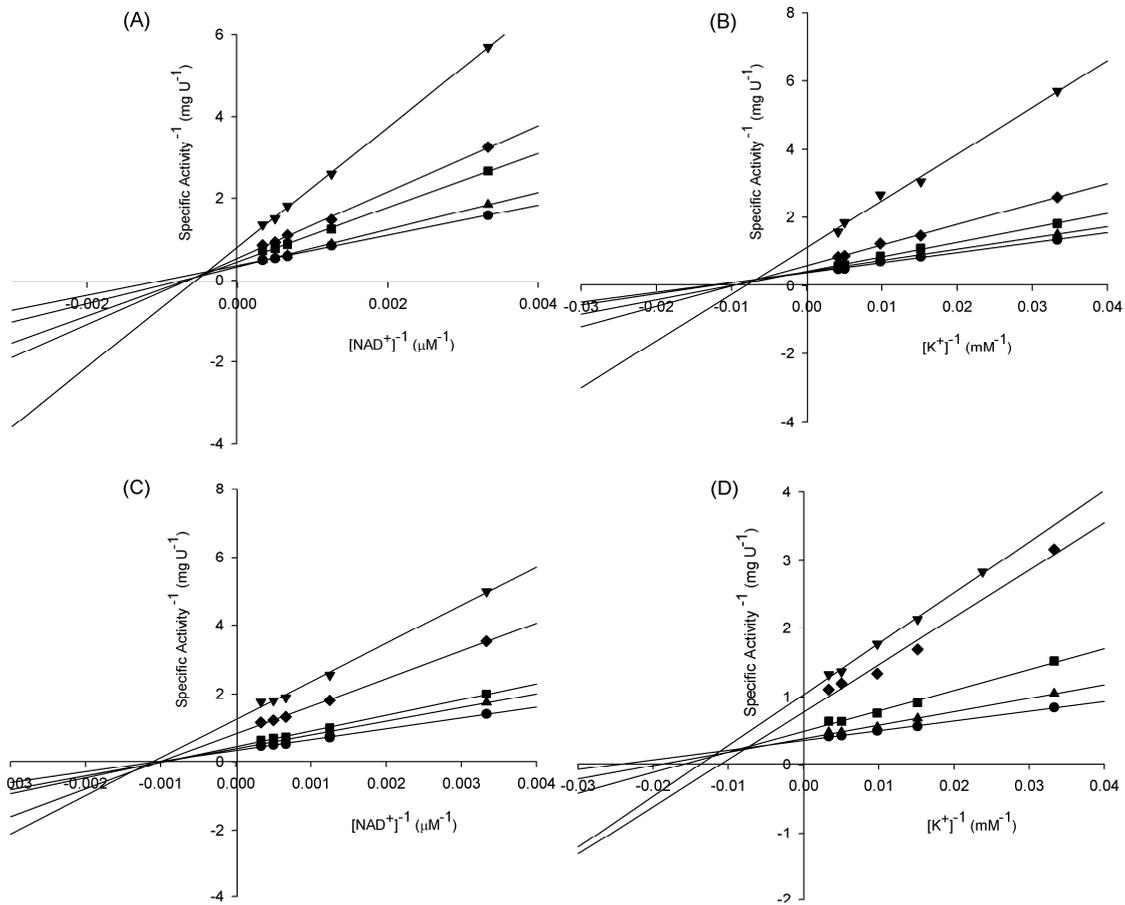


Figure 6: Double-reciprocal plots for *Mt*IMPDPH inhibition by GMP. (A) Specific activity⁻¹ (mg U⁻¹) versus [IMP]⁻¹ (μM⁻¹) at fixed concentrations of GMP; (B) Specific activity⁻¹ (mg U⁻¹) versus [NAD⁺]⁻¹ (μM⁻¹) at fixed concentrations of GMP. Data were analyzed using Eq. (6) and (7), respectively.

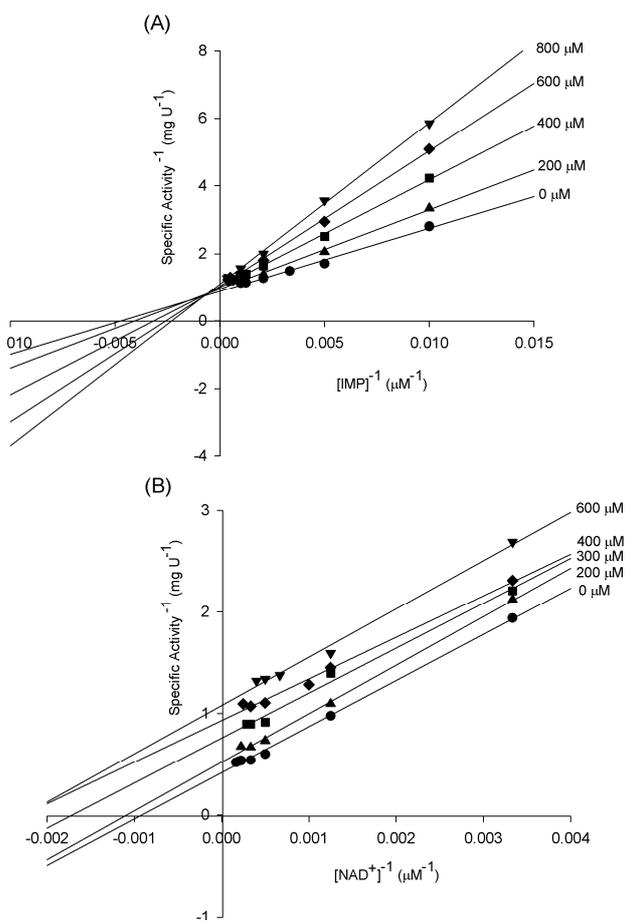


Figure 7: pH-rate profiles for *Mt*IMPDPH catalyzed reaction. (A) pH dependence of $\log k_{\text{cat}}$; (B) pH dependence of $\log k_{\text{cat}}/K_{\text{NAD}^+}$. Experimental data were fitted to Eq. (8) and (9).

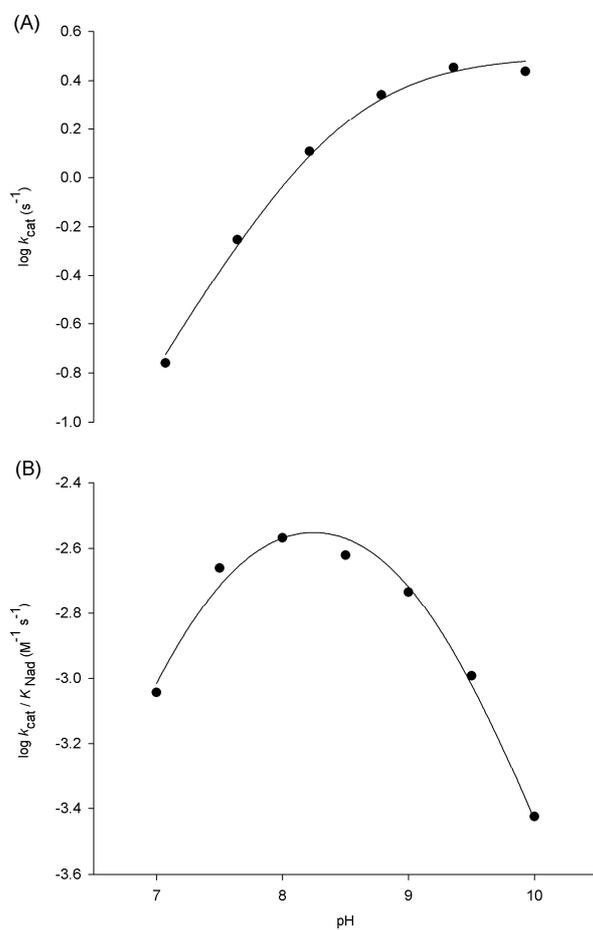
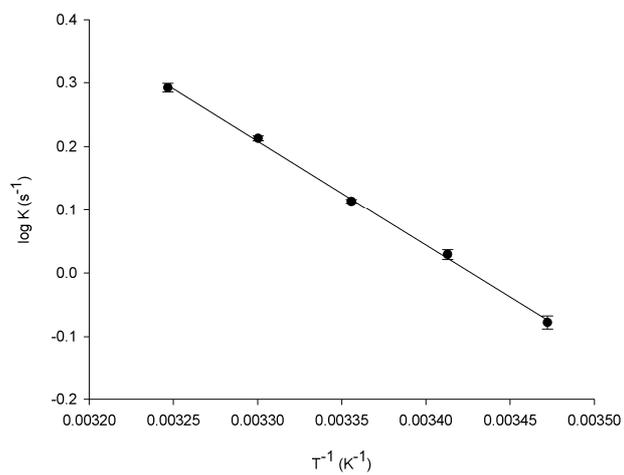


Figure 8: Temperature dependence of $\log k_{\text{cat}}$. Saturating concentrations of IMP, NAD^+ and K^+ were employed to measure the maximum velocity as a function of temperature ranging from 288 to 308 K. Data were fitted to Eq. (10).



Capítulo 4

NOCAUTE DO GENE *guaB2*

METODOLOGIA

RESULTADOS E DISCUSSÃO

METODOLOGIA

1 CONSTRUÇÃO DA SEQUÊNCIA MUTANTE DO GENE *guaB2* DE *M. tuberculosis* H37Rv

O fragmento de DNA incluindo o gene *guaB2* (Rv3411c) foi amplificado por meio de duas reações de PCR, permitindo a construção do mutante de forma sequencial, onde uma parte interna do gene *guaB2* (838 pb) foi deletada (**Figura 23**). O primeiro fragmento de DNA (*guaB2* I) incluindo uma parte do gene *guaB2* (381 pb) e a região flanqueadora *upstream* (572 pb) ao gene foi amplificado (tamanho total de 953 pb) a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv utilizando dois *primers* (5'-TTTTGAGCTCACTAGTCGAAGCATCGGCATATCCC-3' e 5'-TTTTGGATCCCGGCCTCGGATCGCTTCAC-3') complementares as porções 5' e 3' da sequência do fragmento *guaB2* I, contendo sítios para as enzimas de restrição *SacI* e *SpeI* (*primer* direto) e para a enzima *Bam*HI (*primer* reverso) (sublinhados). O segundo fragmento de DNA (*guaB2* II), contendo uma porção do gene *guaB2* (371 pb) foi amplificado (tamanho total de 961 pb) a partir da mesma fonte de DNA utilizando *primers* (5'-TTTTGGATCCCGGTGAGCTGATCTTCGT-3' e 5'-TTTTGCATGCACTAGTTGTCTGAGCTCGGAGATGAAG-3'), contendo sítios para as enzimas de restrição *Bam*HI (*primer* direto) e *Sph*I e *SpeI* (*primer* reverso) (**Figura 23**).

Figura 23. Construção da sequência mutante do gene *guaB2*.



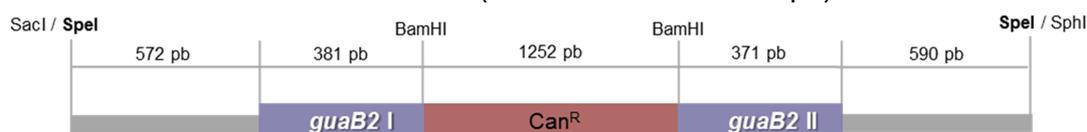
Os produtos da amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo brometo de etídeo, sob luz ultravioleta. Em seguida, os produtos de PCR foram isolados e clonados em vetor pUC19 (Invitrogen). O vetor pUC19 é um vetor com alta taxa de replicação e possui um gene *lacZ*, codificante para a enzima β -galactosidase, responsável por catalisar a clivagem da galactose e que pode ser induzido por IPTG. Quando não há inserção do fragmento de DNA de interesse, o gene *lacZ* é transcrito normalmente. O reagente 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídido (X-gal), um análogo da galactose, é utilizado como substrato no meio de cultura e, depois de metabolizado, torna a colônia azul. As bactérias contendo o plasmídeo com o inserto de interesse não irão

transcrever o gene *lacZ* e não metabolizarão X-gal, gerando colônias brancas facilmente distintas das células não recombinantes (124, 125).

Assim, os plasmídeos recombinantes foram transformados em células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes com seleção em meio de cultura LB sólido, contendo ampicilina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (antibiótico de resistência do vetor), X-gal $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,5 \text{ mM}$ IPTG com posterior propagação em meio LB líquido, utilizando o mesmo antibiótico. O isolamento do DNA plasmidial das células transformadas foi realizado utilizando-se *kit* de purificação (Qiaprep Spin Miniprep - Qiagen).

Subsequentemente, o cassete contendo o gene que confere resistência à canamicina (Can^R) (1252 pb, extraído do vetor pUC4K com a enzima de restrição HincII) foi inserido no vetor pUC19::*guaB2* utilizando o sítio de restrição da enzima BamHI, o qual estava presente em ambas as sequências *guaB2* I e *guaB2* II inseridas (**Figura 24**).

Figura 24. Construção da sequência do gene *guaB2* mutante contendo o cassete de resistência à canamicina (tamanho total de 3166 pb)



Os clones pUC19 *guaB2*::*can* foram transformados em células de *E. coli* DH10B eletrocompetentes e as colônias foram selecionadas em meio LB sólido e propagadas em meio LB líquido contendo canamicina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. O DNA plasmidial foi posteriormente extraído e clivado com a enzima de restrição SpeI para a confirmação da clonagem. O fragmento foi isolado e clonado no vetor pPR27*xyIE* utilizando o sítio de restrição SpeI.

O vetor pPR27*xyIE* possui algumas características que facilitam a seleção positiva de mutantes por inserção em *M. tuberculosis*, como:

- i) Origem de replicação micobacteriana termossensível: a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ o vetor replica e a $39 \text{ }^\circ\text{C}$ ele não replica, facilitando o evento de recombinação homóloga;
- ii) Presença do gene *sacB*: a expressão do gene é letal na presença de sacarose;
- iii) Presença do gene *xyIE*: expressão do gene pode ser verificada com catecol, colônias amarelas são obtidas (86).

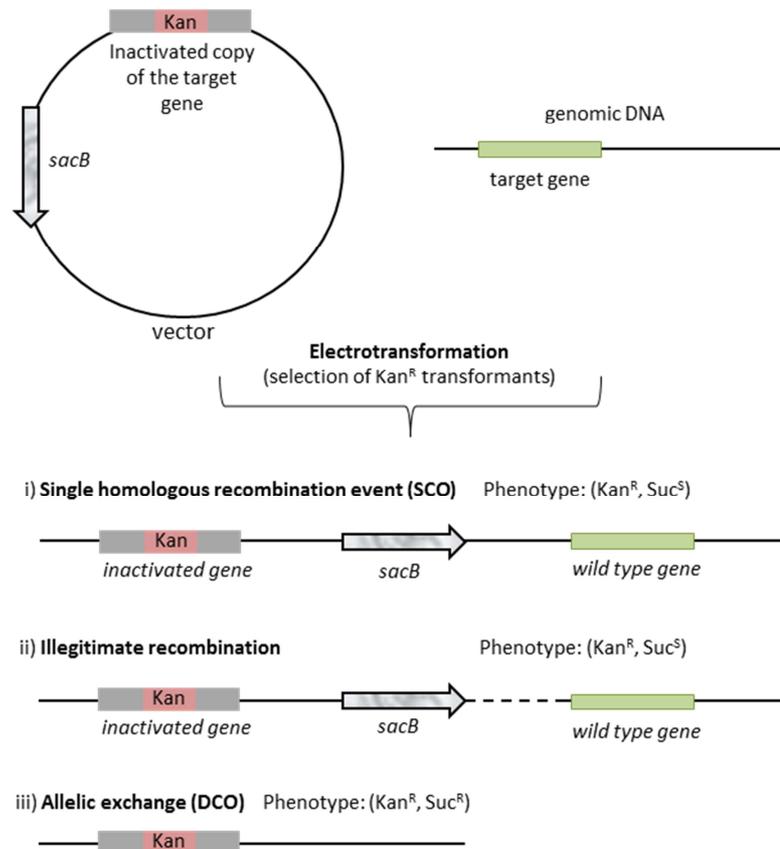
As etapas descritas a seguir, foram realizadas pela Dra. Anne Villela, que possui treinamento para trabalhar em laboratório de biossegurança NB3. A construção pPR27*xyIE* *guaB2*::*can* foi transformada por eletroporação em *M. tuberculosis* H37Rv. As células foram recuperadas em 5 mL do meio de cultura Middlebrook 7H9 tween 80 0,05%, ADC 10%

(complexo contendo albumina, dextrose e catalase) e canamicina $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 48 horas a $32 \text{ }^\circ\text{C}$, foram plaqueadas em meio de cultura Middlebrook 7H10 OADC 10% (complexo contendo ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), canamicina $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e incubadas a $32 \text{ }^\circ\text{C}$. Após aproximadamente um mês, as colônias foram verificadas com 1% de catecol, e as colônias amarelas (Can^{R} e XylE^+) foram inoculadas em 5 mL do meio de cultura Middlebrook 7H9 tween 80 0,05%, ADC 10%, canamicina $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e incubadas a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ por aproximadamente um mês. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada (10^{-1} , 10^{-2}) utilizando meio de cultura, e 200 μL de cada diluição foi plaqueado em Middlebrook 7H10 OADC 10%, canamicina $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ contendo sacarose 2%. As placas foram incubadas a $39 \text{ }^\circ\text{C}$ por seis semanas e então as colônias foram verificadas novamente com catecol onde, o crescimento de colônias com coloração branca sugere que a troca alélica ocorreu, enquanto que colônias amarelas indicam que há a presença do gene XylE , indicando que não houve a perda do corpo do vetor pPR27 xylE .

Para verificar a obtenção de mutantes, ou seja, eventos de *double cross-over* (DCO), dois oligonucleotídeos iniciadores (5'-CCGACGAGGCGACGAATC-3' E 5'-CTCGTCGGTCGTCGTCAC-3') que anelam fora da região clonada no vetor pPR27 xylE serão utilizados na reação de PCR. Três eventos diferentes ocorrer após a transformação da construção pPR27 xylE $\text{guaB2}::\text{can}$ vetor no *M. tuberculosis* (**Figura 25**) (126):

- i) *Single cross-over*: nenhum fragmento seria observado, uma vez que o fragmento a ser amplificado seria muito grande (aproximadamente 15 kb) devido a inserção do corpo do vetor pPR27 xylE no DNA genômico juntamente com a cópia do gene guaB2 interrompida e a cópia selvagem.
- ii) Recombinação ilegítima: um fragmento do tamanho de 2990 pb seria observado, que é o tamanho referente à cópia selvagem do gene guaB2 e das regiões flanqueadoras, uma vez que a recombinação do pPR27 xylE $\text{guaB2}::\text{can}$ ocorreria de forma não homóloga entre qualquer parte do plasmídeo e do cromossomo, sendo inserido em qualquer região.
- iii) DCO: um fragmento de 3400 pb seria obtido devido a presença do cassete contendo o gene que confere resistência à canamicina, interrompendo o gene guaB2 .

Figura 25. Eventos que podem ocorrer após a transformação do vetor contendo uma mutação no gene alvo



Adaptado de: Jackson M. *et al.*, 2011 (126).

2 CONSTRUÇÃO DA SEQUÊNCIA DO GENE *guaB2* DE *M. smegmatis* PARA A COMPLEMENTAÇÃO NA CEPA DE *M. tuberculosis* H37Rv MUTANTE PARA O GENE *guaB2*

A cepa de *M. tuberculosis* H37Rv mutante para o gene *guaB2* será complementada com o vetor pNIP40 contendo uma cópia extra do gene *guaB2* de *M. smegmatis*. Assim, dois pares de oligonucleotídeos (5'-TTTTTCTAGACGTACGGATCGTCGGCGAACG-3' e 5'-TTTTTCTAGACGACGGGACGATCGTGACATCT-3') contendo sítios para a enzima de restrição XbaI (sublinhado) foram utilizados para amplificar o gene *guaB2* de *M. smegmatis* (tamanho total de 1841 pb). Este fragmento de DNA foi clonado em vetor pNIP40 (pNIP40::Ms_*guaB2*), seguindo os mesmos passos de seleção de culturas e isolamento plasmidial citados acima, porém com o antibiótico de resistência específico para este vetor.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 CONSTRUÇÃO DA CEPA DE *M. tuberculosis* H37Rv MUTANTE PARA O GENE *guaB2* E DA CÓPIA EXTRA DO GENE *guaB2* DE *M. smegmatis*

Drogas devem agir em alvos críticos para o crescimento ou para a sobrevivência de bactérias durante a infecção. No caso da TB, a identificação de um gene essencial ao crescimento do *M. tuberculosis* pode levar à descoberta de drogas com diferentes mecanismos e ação e, possivelmente, mais efetivas (127).

O gene *guaB2* foi predito como essencial para o crescimento *in vitro* do *M. tuberculosis* H37Rv, a partir de estudos de mutagênese utilizando transposons (82) e, um modelo estatístico publicado recentemente, suporta esta hipótese (85). No entanto, outros estudos são necessários, visto que a primeira evidência da essencialidade de um gene resulta da incapacidade de obtenção de mutantes do gene em questão (127).

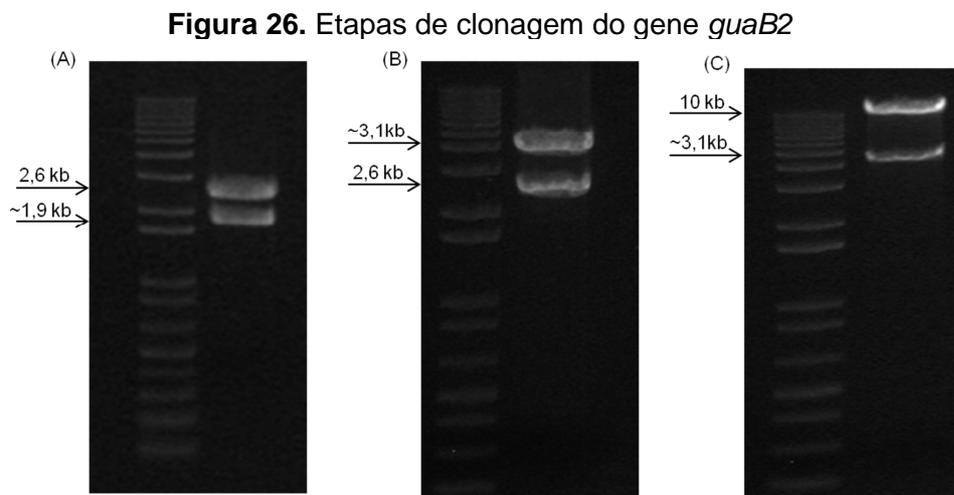
A mutagênese sítio-dirigida por substituição gênica é uma técnica genética importante que permite a obtenção de mutações definidas em um gene específico, onde a substituição do alelo selvagem pelo alelo mutado é obtida através de recombinação homóloga (126). No entanto, se este gene é essencial, o único evento de recombinação possível é aquele que preserva o alelo selvagem e a essencialidade pode ser posteriormente confirmada fornecendo uma cópia adicional do gene alvo. Neste caso, se o evento de DCO ocorrer apenas na presença de uma cópia extra, pode-se sugerir fortemente que o gene em estudo é essencial para o crescimento do microrganismo (127).

A substituição gênica visa caracterizar funções de proteínas e identificar fatores de virulência no *M. tuberculosis* (126). No entanto, a recombinação homóloga ocorre em frequência baixa neste organismo (10^{-3} eventos por célula), o que tem dificultado a obtenção de mutantes definidos (128). Assim, o sucesso no isolamento de mutantes em *M. tuberculosis* é dependente da habilidade de técnicas genéticas e protocolos utilizados para compensar pela baixa eficiência de transformação e possibilitar a detecção eficiente ou seleção de mutantes de troca alélica entre a população total de transformantes (126). Portanto, o uso de um vetor replicativo e integrativo evita os problemas decorrentes da baixa eficiência de transformação, admite que o vetor seja perdido em determinadas condições e permite a eliminação de clones que ainda contenham este vetor, possibilitando a detecção de eventos genéticos muito raros (86).

Os fragmentos (*guaB2* I e *guaB2* II) amplificados por PCR apresentaram tamanhos correspondentes a 953 e 961 pb, respectivamente (dados não apresentados). Os fragmentos, que somados equivalem a ~1,9 kb, foram purificados do gel de agarose e

ligados no vetor de clonagem pUC19 (2,6 kb) (**Figura 26A**), seguido da inserção do cassete contendo o gene que confere resistência à canamicina (Can^R) (**Figura 26B**).

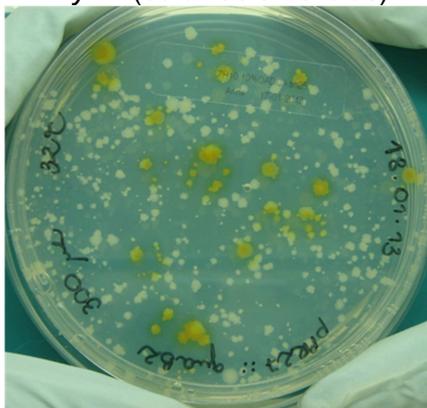
Posterior à clivagem com a enzima de restrição específica (*SpeI*), o fragmento de ~3,1 kb foi purificado do gel de agarose e clonado no vetor pPR27*xyIE*, e a inserção do fragmento de interesse foi confirmada através da clivagem com a enzima *SpeI* (**Figura 26C**). O sequenciamento automático de DNA confirmou a identidade e integridade das regiões do gene *guaB2* e das regiões flanqueadoras, mostrando que nenhuma mutação ocorreu durante as etapas de amplificação e clonagens.



Nota: (A) Clivagem do pUC19::*guaB2* com *SpeI*, confirmando a ligação do fragmento de interesse (~1,9 kb). (B) Clivagem do pUC19 *guaB2*::*can* com *SpeI* para purificação da banda de ~3,1 kb. (C) Clivagem do pPR27*xyIE* *guaB2*::*can* com *SpeI* para a confirmação da ligação do fragmento de interesse (~3,1kb).

A construção do pPR27*xyIE* *guaB2*::*can* foi transformada em *M. tuberculosis* H37Rv e, após incubação a 32 °C, foi possível visualizar o crescimento de colônias amarelas, confirmando a presença do vetor recombinante nestas células (**Figura 27**).

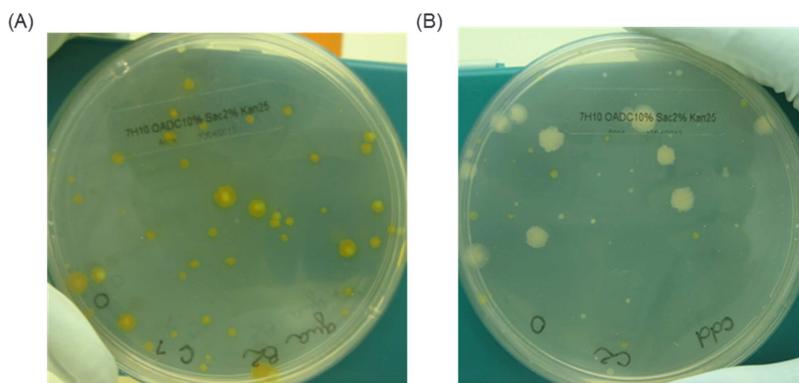
Figura 27. Visualização das colônias de *M. tuberculosis* H37Rv, cultivadas a 32 °C, Can^R e XylE⁺ (colônias amarelas)



Nota: o teste com catecol não foi realizado em todas as colônias para evitar contaminação, assim, ainda é possível observar colônias com coloração branca.

Após a propagação das culturas em meio sólido contendo sacarose 2%, a 39 °C, foi possível observar o crescimento de colônias após seis semanas (**Figura 28A**) que, quando verificadas com catecol, desenvolveram coloração amarela. O crescimento de colônias amarelas indica que o corpo do plasmídeo não foi perdido e que não houve o evento de DCO, além disso, reflete uma falha na seleção de mutantes uma vez que, na presença do gene *sacB* em meio contendo sacarose, as colônias não deveriam crescer. Este resultado é um indicativo de que o gene *guaB2* é essencial para o crescimento *in vitro* do *M. tuberculosis* H37Rv e que o surgimento de colônias foi resultado da falha dos controles de seleção. Como pode ser observado na **Figura 28B**, mutantes cujos genes não são essenciais apresentam colônias brancas após o teste com catecol, quando cultivadas por quatro semanas nas condições descritas.

Figura 28. Visualização das colônias de *M. tuberculosis* H37Rv, cultivadas a 39 °C, em meio de cultura contendo sacarose 2%



Nota: (A) Colônias amarelas do *M. tuberculosis* transformado com a construção pPR27xyIE *guaB2::can*. (B) Colônias brancas do *M. tuberculosis* transformado com a construção pPR27xyIE *cdd::can* (gene *cdd*: não essencial).

Estes experimentos serão repetidos e as culturas serão plaqueadas em meio sólido contendo sacarose 2%, com e sem guanina, devido à possibilidade de se obter uma cepa mutante de *M. tuberculosis* auxotrófico para guanina. Para a confirmação da essencialidade do gene *guaB2* no crescimento *in vitro* do *M. tuberculosis* H37Rv será fornecida uma cópia extra do gene *guaB2* de *M. smegmatis*. Após a obtenção de colônias brancas, será realizada a extração do DNA genômico e os produtos de PCR irão confirmar se o evento de substituição alélica ocorreu, validando assim o produto do gene *guaB2* como alvo molecular para o desenvolvimento de inibidores.

O produto de amplificação referente ao gene *guaB2* de *M. smegmatis* foi purificado do gel de agarose, clivado com a enzima de restrição XbaI e inserido no vetor pNIP40 (7,3 kb). A ligação do fragmento *guaB2* (~1,8 kb) foi confirmada em gel de agarose após clivagem com XbaI (dado não apresentado). O sequenciamento automático de DNA confirmou a identidade e integridade do gene *guaB2* de *M. smegmatis*.

Capítulo 5

ESTUDOS DE INIBIÇÃO DA
ATIVIDADE CATALÍTICA DA
*Mt*IMPDPH

PLANEJAMENTO E METODOLOGIA

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ANÁLISE DOS DADOS

PLANEJAMENTO E METODOLOGIA

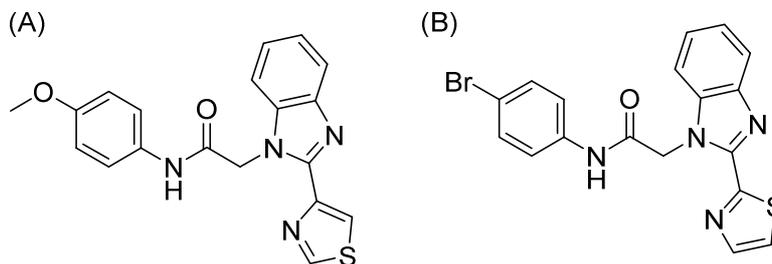
1 PLANEJAMENTO DE POSSÍVEIS COMPOSTOS INIBIDORES DA ATIVIDADE DA *Mt*IMPDH

Enzimas são consideradas pela indústria farmacêutica alvos atrativos para intervenções farmacológicas, uma vez que elas desempenham papéis essenciais em diversos processos biológicos e patológicos. Além disso, os sítios ativos de enzimas são susceptíveis à inibição por moléculas de baixo peso molecular (facilmente absorvidas e distribuídas *in vivo*) (123) e inibidores enzimáticos representam quase metade das drogas comercializadas nos Estados Unidos (129). Enzimas catalisam reações químicas, convertendo substratos em produtos e, as inúmeras alterações conformacionais dos seus sítios ativos e/ou alostéricos adotados durante a catálise representam diferentes oportunidades de interação com moléculas inibidoras. A importância da enzimologia no desenvolvimento de fármacos deve-se à natureza quantitativa das informações obtidas nestes estudos e da utilidade direta destes dados durante a otimização de compostos inibidores (123). Dessa forma, a caracterização bioquímica de uma enzima como alvo molecular, bem como a determinação do seu mecanismo cinético, deve ser considerada prioridade no desenvolvimento racional de potentes inibidores enzimáticos.

Uma vez que a importância da enzima IMPDH no metabolismo do *M. tuberculosis* foi avaliada e suas características cinéticas determinadas, compostos sintéticos foram propostos para os estudos de inibição da enzima alvo. Diferentes estratégias poderiam ser utilizadas para a pesquisa de compostos com potencial inibitório sobre a *Mt*IMPDH: i) partindo-se de moléculas cujo potencial inibitório sobre IMPDHs já tenha sido reportado, seguido de derivatizações químicas das mesmas; ii) através de métodos de triagens disponíveis, pesquisando moléculas em bibliotecas de compostos químicos comerciais, empregando a bioinformática como ferramenta de busca (114).

Umejiego e colaboradores (130) utilizaram a segunda estratégia de pesquisa e identificaram dez compostos químicos capazes de inibir a atividade da IMPDH de *C. parvum* *in vitro* (valores de IC_{50} de 0,1 – 20 μ M) e que apresentaram atividade antiparasitária em células infectadas. Neste estudo, foram selecionados os compostos com afinidade de ligação ao sítio do NAD^+ , uma vez que este sítio não é conservado entre IMPDHs de vários organismos, e que não possuíam atividade inibitória sobre a *h*IMPDH1 e *h*IMPDH2 ($IC_{50} > 50$ μ M). Recentemente, MacPherson e colaboradores (131) publicaram a estrutura resolvida da IMPDH de *C. parvum* (código de acesso PDB: 3KHJ) complexada com o substrato IMP e um derivado do inibidor C (**Figura 29A**) avaliado no estudo anterior (130), denominado C64 (**Figura 29B**), e que apresentou um valor de $IC_{50} = 28 (\pm 9)$ nM.

Figura 29. Estruturas químicas de dois inibidores seletivos da IMPDH de *C. parvum*



Nota: (A) Estrutura química do inibidor C identificado pela técnica de *high throughput screen* (130). (B) Estrutura química do inibidor C64 complexado com a IMPDH de *C. parvum* e o substrato IMP, na estrutura tridimensional resolvida por raios X (código de acesso PDB: 3KHJ) (131).

A resolução da estrutura tridimensional possibilitou a identificação de resíduos de aminoácidos que interagem diretamente com o inibidor e, a partir do alinhamento da sequência de aminoácidos das enzimas IMPDH de *C. parvum* e da *MtIMPDH* (**Figura 30**), foi possível observar que estes resíduos se encontram conservados na *MtIMPDH* (exceto o resíduo de Ser354, substituído por Ala483 na *MtIMPDH*). Com exceção do aminoácido Thr221, todos os resíduos envolvidos na ligação ao C64 são diferentes nas IMPDHs humanas, sugerindo que estas interações podem ser responsáveis pela inibição seletiva deste composto (131). Além disso, a partir deste alinhamento, foi possível observar que a maioria dos resíduos do sítio de ligação ao NAD⁺ na IMPDH de *C. parvum* se encontra conservada na *MtIMPDH* (dado não apresentado). Estas similaridades estruturais facilitaram o desenvolvimento de compostos químicos com analogia estrutural àqueles cujo potencial inibitório já foi avaliado em relação à IMPDH de *C. parvum*.

Figura 30. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína *Mt*IMPDPH e *Cp*IMPDPH

```

MtIMPDPH      MSRGMGLEDDSSDLVVSFYVVMGGLTTDFVPTGGDDPHKAVMLGLTFDDVLLLPASDVVEPATADTSSQLTKKIRLKVPLVSSAMDTVTESRMAIAMARA
CpIMPDPH      -----MG---TKNIGKG-----LTFEDILLVPNYSEVLEPREVSLETKLTKNVSFKIPLISSAMDTVTEHLMVAVMGMRAL
                **  *  .  .  *                ***:*:*:*  *:*:*  .  .  :*:*:  **:*:*****  **:.**

MtIMPDPH      GGMGVLHRNLFVAEQAGQVEMVKRSEAGMVTDPVTCRPDNTLAQVDALCARFRI SGLFVVDGDDGALVGIITNRDMRFEVDQSKQVAEVMTKAPLITAQEG
CpIMPDPH      GGIGIIHKNDMESQVNEVLKVKNS-----
                **:*:*:*:  .  .  .  *  **.*

MtIMPDPH      VSASAALGLLRRNKIEKLPVVDGRGRLTGLITVKDFVKTEQHPLATKDSGRLLVGAAVGVGGDAWVRAMMLVDAQVDVLDVVDTHAHNRLVLDVMVGKLR
CpIMPDPH      -----GG-LRVGAAIGVN--EIERAKLLVEAGVDVIVLDSAHGSLNIIRTLKEIK
                .  *  ***:*:*  .  .  .  *  **:*:*****:*:*:*  .  .  :*:*:

MtIMPDPH      SEVGDREVEVGGNVATRSAAAALVDAGADAVKVGVPGSICTIRVVAGVGAPOITALEAVAACRPAGVFPVIADGGLOYSGDIKALAAGASTAMLGSL
CpIMPDPH      SKMN--IDVIVGNVTEEATKELIENGADGIKVGIGPSICTIRIVAGVGVPOITALEKCSSVASKFGIPIIADGGIRYSGDIGKALAVGASSVMIGSIL
                *:.  .  .  :*:  **.*:*:*  *:.  .  .  *  **:*:*****:*:*:*  .  .  .  *  **:*:*****:*:*:*  .  .  .  *  **:*:*****:*:*:*

MtIMPDPH      AGTAEAPGELIFVNGKQYKSYRGMGSLGAMRGRGGATSYSKDRYFADDALSEDKLVPEGIEGRVFPFRGPLSSVIHQLTGGLRPPAMGYTGSPTIEVLQO-A
CpIMPDPH      AGTEESPGKELIGDVTYKYRGMGSVGAMK-----SGSGDRYFQEKRP-ENKMPVEGIEGRVKYRGEVGVYQLVGGLRSCMGYLGASIEELWKK
                ***  *:*:*  :.  .  .  *  **:*:*****:*:*  .  .  .  *  **:*:*****:*:*:*  .  .  .  *  **:*:*****:*:*:*  .  .  .  *  **:*:*****:*:*:*

MtIMPDPH      QFVRITPAGLKESHPHDVAMTVEAPNYAR
CpIMPDPH      SYVEITTSGLRESHVHDVEIVKEVMNYSK-
                .:*:*:*:*:*  ***  .  .  .  *  **

```

Nota: *, :, . indicam, respectivamente, identidade, similaridade forte e similaridade fraca entre os resíduos de aminoácidos. Os resíduos conservados entre a *Mt*IMPDPH e a *Cp*IMPDPH, que interagem com o inibidor C64, estão destacados em verde: Ser22, Pro26, Ala165, Thr221, Glu329, Gli357 e Tyr358 (numeração de acordo com a IMPDPH de *C. parvum*). Destaque em vermelho para os resíduos divergentes, porém com similaridade forte, Ser354/Ala483.

Assim, a síntese dos compostos planejados como possíveis inibidores da atividade catalítica da *Mt*IMPDPH foi realizada no laboratório de química do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF). O trabalho sintético experimental foi realizado pela Dr^a Kenia Pissinate sob a orientação do Prof. Dr. Pablo Machado.

2 SÍNTESE DE COMPOSTOS INIBIDORES DA ATIVIDADE DA *Mt*IMPDPH

2.1 PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DAS BROMO-ACETAMIDAS **3a-I**

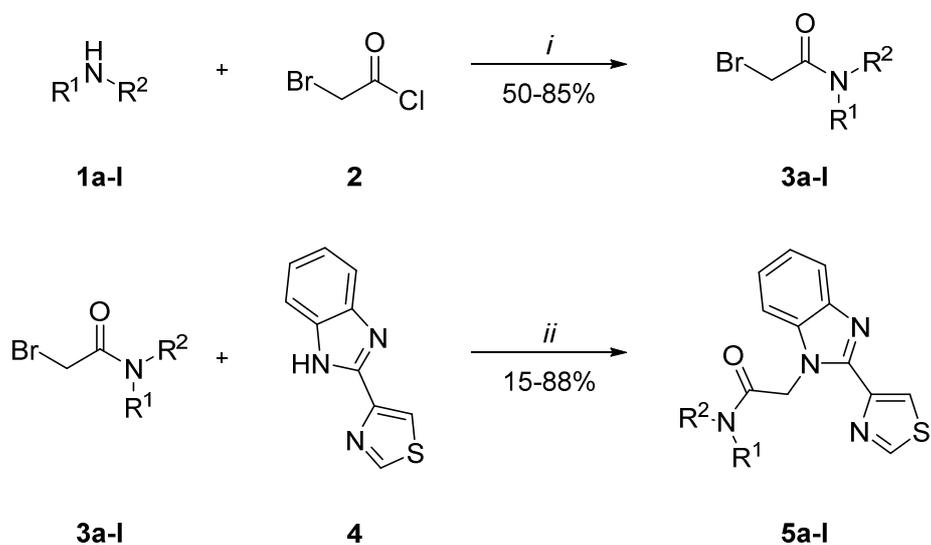
A mistura de reação contendo amina **1a-I** (4,1 mmol) e uma quantidade catalítica de dimetilaminopiridina (DMAP) (30 mmol %) em diclorometano seco (20 mL) foi mantida em banho de gelo sob atmosfera de argônio. Em seguida, foi adicionado à solução, gota-a-gota, o cloreto de bromoacetila (**2**; 5,1 mmol). A solução foi mantida em agitação a 0 °C por 30 min e, em seguida, a temperatura foi elevada para 25 °C e a solução foi mantida sob agitação por três horas. Após esse período, a solução foi diluída com éter etílico e lavada com uma solução de HCl (1M; 2 x 100 mL) seguida de água (1 x 100 mL) e solução saturada de bicarbonato de sódio (2 x 100 mL) e salina (130). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O produto bruto foi purificado em cromatografia em coluna de sílica-gel com clorofórmio/metanol (40:1) e

caracterizados por ressonância magnética nuclear de ^1H (^1H RMN 60 MHz) e ESI-MS. Os compostos **3a-l** foram obtidos com 50 – 85% de rendimento (**Esquema I**).

2.2 PROCEDIMENTO GERAL PARA A SÍNTESE DA SÉRIE TIAZOIL-BENZIMIDAZOL ACETAMIDAS **5a-l**

A solução contendo as bromo-acetamidas **3** (0,5 mmol) e um excesso de K_2CO_3 (1,56 mmol), em 4 mL de dimetilformamida (DMF) e tiabendazol **4** (0,51 mmol) foi mantida sob atmosfera de argônio em agitação por oito horas (130). Após este tempo, a mistura de reação foi dissolvida em 200 mL de água destilada. O produto precipitado foi filtrado, lavado com água e seco sob vácuo. A purificação do composto foi feita por meio de cromatografia em coluna de sílica-gel com variação do gradiente clorofórmio/metanol. A confirmação da estrutura química dos compostos **5a-l** foi realizada por ^1H RMN-60MHz e ESI-MS conforme descrito nas tabelas do **Anexo A**.

Esquema I: Síntese das tiazol-benzimidazol acetamidas **5a-l** sintetizadas a partir de arilaminas substituídas, piperidina e tiabendazol



i = CH_2Cl_2 , DMAP, 0 °C-RT, 3 h

ii = DMF, K_2CO_3 , RT, 8 h.

| Compostos 1,3 e 5 | R ¹ | R ² |
|-------------------|---|----------------|
| a | Ph | H |
| b | F-4-C ₆ H ₄ | H |
| c | Cl-4-C ₆ H ₄ | H |
| d | Cl-3-C ₆ H ₄ | H |
| e | Br-4-C ₆ H ₄ | H |
| f | I-4-C ₆ H ₄ | H |
| g | O ₂ N-4-C ₆ H ₄ | H |
| h | NC-4-C ₆ H ₄ | H |
| i | (MeO) ₂ -4,2-C ₆ H ₃ | H |
| j | PrO-3-C ₆ H ₄ | H |
| k | Me-2-C ₆ H ₄ | H |
| l | CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₂ | |

3 EFEITO INIBITÓRIO TEMPO-DEPENDENTE DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS NA ATIVIDADE DA *Mtl*MPDH

Alguns inibidores ligam-se ou dissociam-se de enzimas lentamente, e dependem do tempo para atingir um equilíbrio e obter-se a inibição (123). Para avaliar se o efeito inibitório dos compostos sintetizados neste trabalho é dependente do tempo, foram realizadas medidas da atividade catalítica da enzima, em condição experimental padrão previamente descrita, onde as concentrações de ambos os substratos foram mantidas em níveis não saturantes ($\cong K_{0,5}/K_m$). A *Mtl*MPDH foi previamente incubada com o inibidor (na concentração de 10 μ M), a temperatura ambiente, e alíquotas de enzima foram retiradas e adicionadas à mistura de reação padrão, para monitoramento de sua atividade, em intervalos de 5 min, por um período de tempo de 20 min.

4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS SOBRE A ATIVIDADE CATALÍTICA DA *Mtl*MPDH

Ensaio bioquímico *in vitro* foram utilizados para a avaliação da atividade inibitória dos compostos sintetizados pelo grupo sobre a atividade da *Mtl*MPDH. O valor de IC₅₀ define a concentração de inibidor necessária para saturar metade dos sítios da enzima (e causar uma redução de 50% na atividade enzimática) e representa uma avaliação preliminar da afinidade relativa de diferentes compostos para uma enzima alvo. Desta forma, os ensaios de inibição para a *Mtl*MPDH foram realizados em espectrofotômetro a 37 °C, monitorando-se o aumento linear da absorbância devido a formação de NADH a 340 nm, em

tampão 50 mM Tris HCl pH 8,5, contendo 2 mM de DTT e 200 mM KCl. Todos os compostos testados foram solubilizados em DMSO 100% e diluídos a fim de atingir uma concentração final de 1% desse solvente nas misturas de reação (ou seja, 5 μ L da solução estoque do inibidor foram adicionados em 500 μ L de reação) durante todas as medidas de atividade. Primeiramente, a atividade enzimática foi determinada na ausência de inibidor, na presença de DMSO 1% (referente a 100% da atividade catalítica), em concentrações fixas e não saturantes dos substratos IMP e NAD^+ ($\cong K_{0,5}/K_m$). Posteriormente, foram realizadas medidas da absorbância adicionando-se diferentes concentrações de inibidor à mistura de reação, até que nenhuma atividade enzimática pôde ser detectada. Para o cálculo do valor de IC_{50} , a porcentagem (%) de inibição da atividade enzimática foi analisada em função da concentração do inibidor (123).

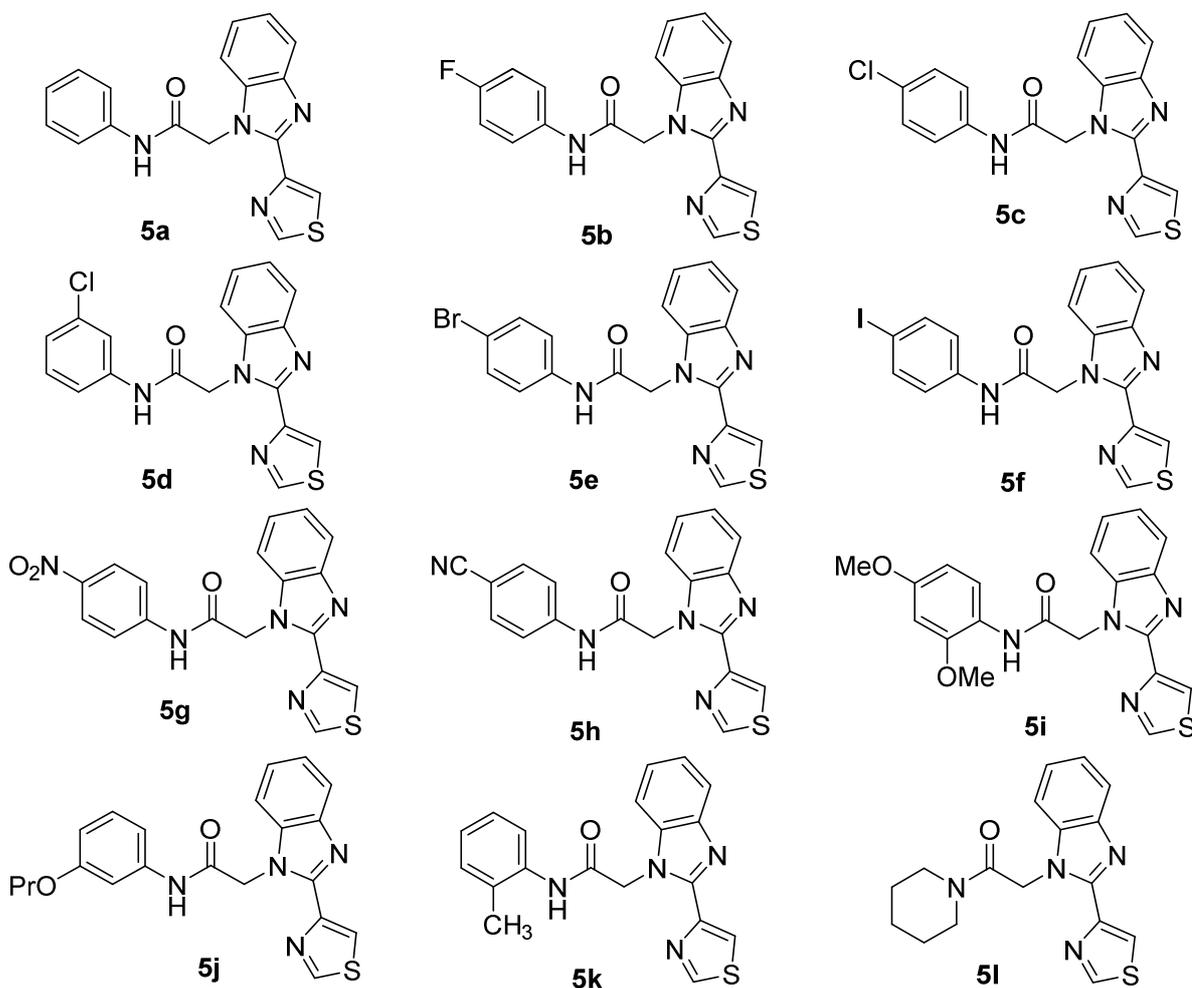
A afinidade de um composto pela enzima alvo é quantificada através da determinação da constante de dissociação em equilíbrio (K_i), calculada por meio de experimentos que definem o mecanismo de inibição de um composto, em função de cada substrato. Estes ensaios foram realizados para o inibidor que apresentou o menor valor de IC_{50} entre os compostos avaliados. Dessa forma, os ensaios foram realizados nas condições experimentais previamente estabelecidas, fixando-se um dos substratos (IMP ou NAD^+) em uma concentração não saturante (concentração correspondente ao valor de $K_{0,5}/K_m$) e variando-se o outro, na presença de concentrações fixas e diferentes do inibidor.

Para cada substrato, foram realizadas quatro curvas de saturação, sendo a primeira delas realizada na ausência do inibidor (o qual foi substituído por DMSO na mistura de reação). As curvas de saturação para o IMP foram realizadas variando-se a concentração deste substrato (40 – 1000 μ M), em uma concentração fixa de NAD^+ (1 mM), na ausência e na presença de 0,5, 1 e 1,5 μ M do inibidor **5e**. Para o substrato NAD^+ , fixou-se o IMP em uma concentração de 100 μ M, variando-se o NAD^+ em uma faixa de 0,2 – 4 mM, na ausência e na presença de 0,5, 1 e 1,5 μ M do inibidor **5e**. O padrão de intersecção das retas no duplo recíproco foi determinado e foi aplicada a equação apropriada para a determinação da constante de dissociação do complexo EI (K_i) ou ESI (K_{is}).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram sintetizados 12 compostos da série tiazol-benzimidazol acetamidas substituídas e analisado o potencial inibitório destas moléculas (**Figura 31**) em relação à atividade da *Mt*IMPDPH. A confirmação da estrutura química dos compostos **5a-l** foi realizada por ^1H RMN-60MHz e ESI-MS. Estes dados estão sumarizados na **Tabela 6** e detalhados no **Anexo A**.

Figura 31. Estrutura química da série tiazol-benzimidazol acetamidas **5a-l**

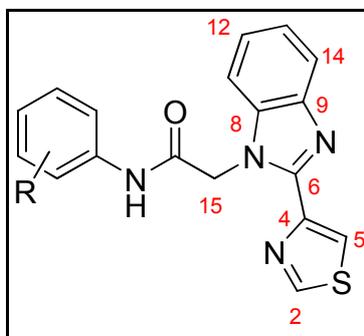


1 SÍNTESE E OBTENÇÃO DA SÉRIE TIAZOIL-BENZIMIDAZOL ACETAMIDAS 5a-I

Os compostos da série tiazolil-benzimidazol acetamidas substituídas foram sintetizados em duas etapas, segundo a metodologia descrita por Umejjeo e colaboradores (130). A primeira etapa da rota sintética foi realizada a partir da reação de substituição nucleofílica das anilinas **1a-k** ou da piperidina (**1l**) com o cloreto de bromo acetila **2**, em presença de quantidades catalíticas de DMAP, para a obtenção das bromo-acetamidas **3a-l**. A segunda etapa da rota sintética foi baseada na reação de *N*-alquilação do tiabendazol **4** com as bromo-acetamidas **3a-l**, em presença de K_2CO_3 e DMF, para a obtenção das tiazolil-benzimidazol acetamidas **5a-l** (**Esquema I**). Os rendimentos obtidos para as tiazolil-benzimidazol acetamidas **5a-l** variaram entre 15 - 88%, segundo padrão de substituição (R) do anel arílico (**Tabela 6**).

No espectro de 1H RMN-60MHz foram observados o simpleto referente aos hidrogênios metilênicos (CH_2) em torno de 5,64 a 5,77ppm e os dupletos dos hidrogênios H2 e H5 do anel tiazolil com acoplamento de 2,1Hertz (*J*). As estruturas químicas foram confirmadas por ESI-MS (**Tabela 6**).

Tabela 6. Rendimentos, deslocamentos químicos dos hidrogênios **2**, **5** e **15**, constantes de acoplamentos (H_2 e H_5) e ESI-MS das tiazolil-benzimidazol acetamidas **5a-l**.



| Comp. | Rendimiento (%) | ¹ H RMN, DMSO-d ₆ (60 MHz) | | | FTMS (ESI +) |
|-------|-----------------|--|---|------------------------------------|----------------------------------|
| | | d H ₂ (ppm) (d, J = 2,1 Hz, 1H) | d H ₅ (ppm) (d, J = 2,1 Hz, 1H) | d H ₁₅ (ppm) (s, 2H) | m/z Experimental (Teórica) |
| 5a | 35 | 9,30 | 8,57 | 5,72 | 335,0946 (335,0961) |
| 5b | 75 | 9,30 | 8,55 | 5,68 | 353,0847 (353,0867) |
| 5c | 85 | 9,03 | 8,57 | 5,71 | 369,0555 (359,0571) |
| 5d | 18 | 9,31 | 8,59 | 5,72 | 369,0563 (359,0571) |
| 5e | 70 | 9,30 | 8,57 | 5,70 | 413,0045 (413,0066) |
| 5f | 43 | 9,27 | 8,54 | 6,69 | 460,9938 (460,9928) |
| 5g | 88 | 9,22 | 8,59 | 5,77 | 380,0805 (380,0812) |
| 5h | 66 | 9,29 | 8,57 | 5,72 | 360,0895 (360,0914) |
| 5i | 27 | 9,35 | 8,57 | 5,72 | 395,1177 (395,1172) |
| 5j | 15 | 9,30 | 8,56 | 5,75 | 393,1378 (393,1380) |
| 5k | 40 | 9,30 | 8,53 | 5,70 | 349,1122 (349,1118) |
| 5l | 44 | 8,36 | 8,37 | 5,64 | 327,1273 (327,1274) |

2 DETERMINAÇÃO DOS VALORES DE IC_{50} E DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO EM EQUILÍBRIO (K_i E K_{is})

Após verificar que a série de compostos químicos sintetizada como possíveis inibidores da *Mt*IMPDH não apresentou inibição dependente do tempo, a atividade catalítica da enzima foi monitorada na presença de 10 μ M de cada composto individualmente, no ensaio de reação padrão. Os resultados mostraram que o efeito eletrônico dos substituintes (R) na porção arilamida da molécula foi um dos fatores importantes para a atividade dos inibidores. Na concentração de 10 μ M, os compostos com grupos retiradores de elétrons na posição *para* (**5b**, **5c** e **5e-h**) apresentaram atividade inibitória de 25 a 80%, enquanto que os compostos com substituintes doadores de elétrons (**5i** e **5k**) não foram tão efetivos em inibir a atividade catalítica da *Mt*IMPDH (**Tabela 7**).

Segundo dados da literatura, os análogos benzimidazóis com substituintes retiradores de elétrons são mais ativos frente à IMPDH de *C. parvum* devido ao aumento da força de ligação de hidrogênio entre o resíduo Glu329 da IMPDH de *C. parvum* (Glu458 na *Mt*IMPDH) e o NH da amida das moléculas de inibidores (132). Nossos resultados preliminares corroboram com o efeito inibitório quanto ao padrão de substituição eletrônica destes análogos em relação à IMPDH de *C. parvum*, sugerindo um mecanismo de ação similar à *Mt*IMPDH.

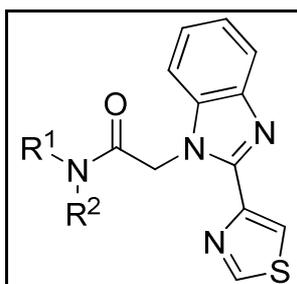
A determinação do valor de IC_{50} foi realizada para os compostos **5c**, **5e-g** e **5j** que resultaram em uma inibição da atividade enzimática superior a 50% na concentração testada (ou seja, $IC_{50} < 10 \mu$ M). Os valores de IC_{50} foram calculados a partir da equação (11), descrita no final deste capítulo, e estão representados na **Tabela 7**.

Embora os análogos com substituintes doadores de elétrons não tenham sido tão efetivos na redução da atividade catalítica da enzima em estudo ($IC_{50} > 10 \mu$ M), o composto **5j** apresentou valor de $IC_{50} = 5,1 (\pm 0,5) \mu$ M. Neste caso, a cadeia alifática do radical 4-*N*-propoxi confere ao composto a presença de grupo hidrofóbico volumoso, o que poderia favorecer entropicamente o deslocamento da molécula de água na cavidade do sítio de ligação, conforme descrito para o análogo 2-naftila (C90) em relação à atividade da IMPDH de *C. parvum* ($IC_{50} = 7 - 8$ nM) (132).

A modificação estrutural do substituinte 4-cloro (**5c**) para 4-bromo (**5e**) contribuiu para o aumento da atividade com redução no valor de IC_{50} de 4,5 ($\pm 0,4$) μ M para 3,0 ($\pm 0,3$) μ M, respectivamente. Em contrapartida, o composto **5f** com substituinte 4-iodo, mais hidrofóbico dentre os análogos halogenados, mostrou-se menos potente com valor de $IC_{50} = 9 (\pm 3) \mu$ M (**Tabela 7**). Na estrutura resolvida da IMPDH de *C. parvum* complexada com o composto C64, a porção de bromoanilina interage com o resíduo tirosina (Tyr358) do monômero adjacente, o qual forma uma rede de ligações de hidrogênio envolvendo os

resíduos Glu329, Ser354, Thr221 e, possivelmente, o N da amida do C64. Nesta estrutura, os resíduos Ser22', Pro26', Ala126 e Gli357' (o símbolo ' indica resíduos da subunidade adjacente) formam o restante do sítio de ligação do inibidor (131).

Tabela 7. Inibição da *Mt*IMPDPH e valores de IC₅₀ para os compostos sintetizados. Em destaque o composto **5e** que apresentou o melhor potencial inibitório sobre a atividade da *Mt*IMPDPH.



| Compostos | R ¹ | R ² | Inibição (%) 10 μM | IC ₅₀ (μM) |
|-----------|---|----------------|--------------------|-----------------------|
| 5a | Ph | H | < 2% | >10 |
| 5b | F-4-C ₆ H ₄ | H | 25% | >10 |
| 5c | Cl-4-C ₆ H ₄ | H | 67% | 4,5 ± 0,4 |
| 5d | Cl-3-C ₆ H ₄ | H | < 2% | >10 |
| 5e | Br-4-C₆H₄ | H | 80% | 3,0 ± 0,3 |
| 5f | I-4-C ₆ H ₄ | H | 60% | 9 ± 3 |
| 5g | O ₂ N-4-C ₆ H ₄ | H | 64% | 8,0 ± 0,3 |
| 5h | NC-4-C ₆ H ₄ | H | 50% | ≥10 |
| 5i | (MeO) ₂ -4,2-C ₆ H ₃ | H | < 4% | >10 |
| 5j | PrO-3-C ₆ H ₄ | H | 65% | 5,1 ± 0,5 |
| 5k | Me-2-C ₆ H ₄ | H | < 4% | >10 |
| 5l | CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₂ | | < 3% | >10 |

Como pode ser observado, o composto **5e** apresentou o melhor potencial inibitório sobre a *Mt*IMPDPH, com um valor de IC₅₀ = 3,0 (± 0,3) μM. É interessante mencionar que este composto possui a mesma estrutura química do inibidor C14, sintetizado por MacPherson e colaboradores (131), que resultou em valores de IC₅₀ = 60 nM e ≥ 20.000 nM contra a IMPDPH de *C. parvum* e *hIMPDPH2*, respectivamente (131).

Dessa forma, foram determinados os valores das constantes de dissociação em equilíbrio (K_i e K_{is}) para o composto químico **5e**, variando-se a concentração de ambos os substratos (IMP e NAD^+), em concentrações fixas e diferentes deste inibidor. O perfil de intersecção das retas resultantes da análise do duplo recíproco para o substrato NAD^+ , à esquerda do eixo y e abaixo do eixo x (**Figura 32A**), indica um tipo de inibição não-competitiva, onde $\alpha < 1$. Um inibidor não-competitivo é capaz de se ligar tanto na enzima livre (E) quanto no complexo enzima-substrato (ES) e, dessa forma, a afinidade de ligação é definida através de duas constantes de dissociação: a constante de dissociação do complexo binário EI (K_i) e a constante de dissociação do complexo ternário ESI (K_{is}). A constante α , por sua vez, define o grau em que a ligação do inibidor afeta a afinidade da enzima pelo substrato. Quando $\alpha < 1$, o inibidor liga-se preferencialmente ao complexo ES , e ambos os valores de K_m e V_{max} diminuem em função do aumento da concentração do inibidor (123). As constantes de dissociação K_i e K_{is} foram calculadas a partir da equação (12), resultando em valores de $K_i = 2 (\pm 1) \mu\text{M}$ e $K_{is} = 0,7 (\pm 0,1) \mu\text{M}$. Os resultados obtidos mostram que o valor de K_i é três vezes superior ao valor de K_{is} , corroborando com o padrão de intersecção de retas obtido, onde $\alpha < 1$.

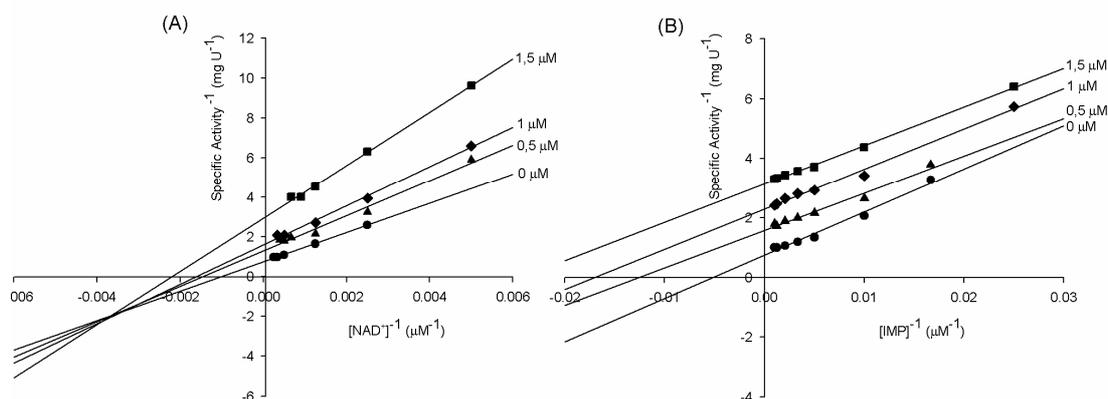
As retas resultantes a partir da análise do duplo recíproco para o substrato IMP em função de diferentes concentrações do composto **5e** foram paralelas entre si (**Figura 32B**), indicando que o **5e** age como um inibidor incompetitivo em relação a este substrato, com um valor de $K_{is} = 0,55 (\pm 0,02) \mu\text{M}$, calculado a partir da equação (13).

Para enzimas que catalisam reações utilizando dois substratos, o perfil de inibição irá depender do mecanismo cinético da enzima em estudo. Portanto, ao utilizar os termos competitivo, não-competitivo e incompetitivo, devemos especificar a qual substrato a modalidade de inibição se refere. Em teoria, os inibidores de IMPDHs que se ligam no sítio do cofator podem apresentar os três tipos de inibição, dependendo da afinidade pelos complexos E , $E\cdot\text{IMP}$, ou $E\cdot\text{XMP}^*$ (considerando o mecanismo cinético Bi Bi ordenado, no qual o IMP liga-se primeiro e o XMP dissocia-se por último da IMPDH). Na prática, a maioria dos inibidores são não-competitivos, sugerindo afinidades comparáveis pelas formas $E\cdot\text{IMP}$ e $E\cdot\text{XMP}^*$, enquanto o tipo de inibição incompetitiva indica uma forte preferência pelo complexo $E\cdot\text{XMP}^*$ (133). Ao contrário de inibidores competitivos (os quais competem com o substrato pela enzima livre, E), a inibição incompetitiva não é revertida em altas concentrações de substrato, podendo ser uma vantagem *in vivo*, quando o contexto fisiológico expõe a enzima a concentrações elevadas de substrato.

Por fim, os perfis de inibição obtidos para o **5e** indicam que este inibidor é capaz de se ligar no complexo ES ou em intermediários formados ao longo da reação catalisada pela *Mt*IMPDH (por exemplo, $E\cdot\text{XMP}^*$). No entanto, uma vez que o perfil de inibição não-competitivo em função do NAD^+ apresentou uma constante $\alpha < 1$, podemos sugerir que este

inibidor não se liga exclusivamente no sítio do NAD^+ (ou pelo menos não ocupa os três sítios de ligação, **Figura 12**) e mais experimentos deverão ser realizados futuramente a fim de identificar o sítio específico de ligação do composto na *MtIMPDH*.

Figura 32. Análises dos duplo recíprocos na presença de diferentes concentrações do inibidor **5e**



Nota: (A) Atividade específica⁻¹ (mg U⁻¹) versus $[\text{NAD}^+]^{-1}$ (μM^{-1}) em concentrações fixas e diferentes do composto **5e**. (B) Atividade específica⁻¹ (mg U⁻¹) versus $[\text{IMP}]^{-1}$ (μM^{-1}) em concentrações fixas e diferentes do composto **5e**.

ANÁLISE DOS DADOS

Os valores das constantes de dissociação para os complexos *EI* ou *ESI*, nos estudos de inibição, foram analisados de acordo com as equações que descrevem inibição não-competitiva (6) e inibição incompetitiva (7), onde $[I]$ é a concentração de inibidor, K_i é a constante de dissociação do complexo binário *EI* e K_{is} é a constante de dissociação do complexo ternário *ESI* (123):

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

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

Os valores de IC_{50} para os compostos químicos sintetizados foram calculados de acordo com a equação (11), onde v_i representa a velocidade inicial na presença do inibidor, v_0 é a velocidade inicial na ausência do inibidor, $[I]$ é a concentração do inibidor e, IC_{50} representa a concentração de inibidor que inibe 50% da atividade enzimática (123):

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{IC_{50}}} \quad (11)$$

Capítulo 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa e o desenvolvimento de compostos mais efetivos contra a TB representam uma necessidade urgente à saúde pública mundial. Embora isso envolva políticas governamentais, financiamento e transferência de tecnologia, um melhor entendimento sobre a biologia molecular do bacilo é indispensável para o desenvolvimento de futuros tratamentos que sejam mais efetivos no combate à doença. Neste contexto, as rotas metabólicas envolvidas em processos bioquímicos essenciais à viabilidade do bacilo compartilham inúmeros alvos potenciais para drogas. Enzimas indispensáveis para a sobrevivência do bacilo e que são ausentes, ou não se assemelham às enzimas presentes em humanos, são alvos promissores para o desenho racional de inibidores.

A importância da caracterização da enzima *Mt*IMPDH advém do fato de IMPDHs serem alvos moleculares validados para fármacos utilizados na clínica. Além disso, uma vez que as IMPDHs bacterianas e de protozoários possuem características bioquímicas e cinéticas distintas das isoformas humanas, o potencial da IMPDH na quimioterapia antimicrobiana tem sido cada vez mais explorado, especialmente após a identificação de inibidores seletivos (49, 69, 84). A *Mt*IMPDH representa um alvo potencial para inibidores pois ela catalisa uma reação importante na síntese dos nucleotídeos de guanina e a rota de biossíntese de purinas tem sido descrita como essencial para o crescimento *in vitro* do *M. tuberculosis* (82).

Os resultados obtidos neste trabalho incluíram a amplificação do gene *guaB2*, a expressão da proteína recombinante em *E. coli* e a purificação da *Mt*IMPDH funcional, a partir de duas 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 K^+ por subunidade, possivelmente estrutural, não relacionado à atividade catalítica da *Mt*IMPDH.

A cinética cooperativa em relação ao IMP é um indicativo de alosteria e a inibição pelo GMP também representa um mecanismo de regulação alostérica. Uma análise detalhada da dependência da atividade enzimática da *Mt*IMPDH em função de cátions monovalentes foi descrita, e as constantes de especificidade para cada íon testado foram calculadas, classificando a *Mt*IMPDH como uma metaloenzima. Tem sido descrito que as IMPDHs adotam diferentes conformações enquanto catalisam duas reações químicas distintas, e que cátions monovalentes facilitam esses rearranjos, atuando como efetores alostéricos (49, 105). De qualquer modo, os resultados obtidos no presente trabalho permitem propor que a *Mt*IMPDH possui propriedades alostéricas.

A determinação das constantes cinéticas verdadeiras em estado estacionário forneceu dados para a obtenção dos gráficos de duplo recíproco e, os padrões de intersecção das retas, associados aos experimentos de inibição pelos produtos, sugeriram um mecanismo sequencial Bi Bi ordenado, onde o IMP associa-se à enzima livre, seguido

pela adição do NAD^+ , e o XMP é o último produto a ser liberado. Além disso, a inibição pelo substrato NAD^+ também sugere que a liberação dos produtos é ordenada e, a comparação dos valores da constante catalítica entre o NAD^+ e o seu análogo estrutural APAD⁺, permite inferir que a transferência do hidreto não é a etapa limitante da reação catalisada pela *Mt*IMPDH.

A dependência dos parâmetros cinéticos em função do pH foi avaliada a fim de inferir os resíduos de aminoácidos envolvidos durante a catálise ou ligação dos substratos à *Mt*IMPDH. Os resultados obtidos sugerem que o resíduo de cisteína é, de fato, essencial para a reação catalítica da *Mt*IMPDH, assim como para IMPDHs de outros organismos (55, 66, 73, 101). As análises do perfil de pH também permitiram propor que a cadeia lateral de um resíduo de arginina está envolvida na ligação ao NAD^+ . A dependência dos parâmetros cinéticos do IMP em função do pH corroboram com as propriedades alostéricas em função deste substrato, observadas nos experimentos previamente mencionados.

Os resultados obtidos da caracterização cinética da *Mt*IMPDH, apresentados no **Capítulo 2**, foram reunidos em um manuscrito submetido para a revista internacional *Molecular BioSystems*, que possui um fator de impacto de 3,35 (no ano de 2013). Estes dados permitem que características exclusivas da enzima *Mt*IMPDH sejam exploradas no desenvolvimento de inibidores de ação seletiva, onde a caracterização de alvos moleculares definidos é considerada a primeira etapa no processo de desenvolvimento de um novo fármaco (134). No entanto, estes alvos devem preencher uma série de requisitos para avançarem em estudos de inibição futuros e alvos promissores para fármacos anti-TB devem possuir características particulares (12).

Um dos critérios a ser avaliado é a essencialidade deste alvo molecular no crescimento e/ou persistência do patógeno (12, 134) e o gene *guaB2* foi predito como essencial para o crescimento *in vitro* do *M. tuberculosis* H37Rv (82, 85). Visando analisar a importância da IMPDH no metabolismo do *M. tuberculosis* H37Rv e confirmar sua essencialidade, foi realizado o nocaute do gene *guaB2*, onde a substituição do alelo tipo selvagem pelo alelo mutado é obtida por meio de recombinação homóloga. Os resultados preliminares sugerem que o gene *guaB2* é essencial para o crescimento do *M. tuberculosis* H37Rv nas condições empregadas nos experimentos descritos no **Capítulo 4**. A confirmação da essencialidade validará o produto deste gene como um alvo promissor para compostos que possam ser futuramente utilizados no tratamento da TB.

Outro fator importante para o desenvolvimento de inibidores, é a busca por alvos cuja atividade possa ser modulada por meio da ligação de moléculas pequenas (*i.e.*, o alvo de ser “*druggable*”) (12, 134). Neste contexto, IMPDHs têm sido descritas como alvo de fármacos utilizados no tratamento do câncer e outras doenças, indicando que compostos químicos são capazes de suprimir suas atividades catalíticas *in vivo* (49). O uso de

informações derivadas da caracterização de um alvo específico, como a identificação das etapas químicas e o detalhamento do mecanismo cinético de reação de uma enzima, já foi descrito no desenvolvimento de inibidores da IMPDH (52). Além disso, as diferenças observadas no sítio de ligação ao NAD^+ entre a IMPDH de *C. parvum* e a *h*IMPDH2 têm sido exploradas e inibidores seletivos foram recentemente reportados (130, 133, 135).

Durante este trabalho foram sintetizados compostos químicos análogos estruturais aos que inibem a IMPDH de *C. parvum*, uma vez que os resíduos de aminoácidos que interagem com um dos inibidores avaliados (131) encontram-se conservados na sequência da *Mt*IMPDH. A determinação das constantes de inibição e do perfil de inibição através de ensaio espectrofotométrico indicou que um dos compostos testados (**5e**) apresentou inibição do tipo não-competitiva em relação ao NAD^+ e do tipo incompetitiva em relação ao IMP. Uma vez que estas moléculas tiveram suas estruturas baseadas no sítio de ligação ao NAD^+ , e este substrato só é capaz de se ligar ao sítio ativo da *Mt*IMPDH após a ligação do substrato IMP, os resultados de inibição estão de acordo com o mecanismo cinético proposto para a enzima em estudo.

Um entendimento detalhado do mecanismo de inibição de diversos compostos em relação às IMPDHs de vários organismos tem resultado em um progresso significativo na pesquisa por novos inibidores. No entanto, muitos estudos são necessários a fim de avaliar a efetividade destes compostos em testes clínicos, uma vez que o desenvolvimento de novos medicamentos envolve inúmeras etapas e, o tempo requerido para a aprovação de um novo fármaco pode variar de 10 a 15 anos (134). A caracterização da *Mt*IMPDH e os resultados de inibição *in vitro* desta enzima representam passos preliminares no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da TB. Assim, estes dados podem ser úteis para um melhor entendimento sobre o metabolismo do *M. tuberculosis* e podem servir como base para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas objetivando o controle da TB.

Referências

1. Bloom BR, Murray CJ. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*. 1992;257(5073):1055-64.
2. Palomino J, Leão S, Ritacco V. Tuberculosis 2007: From basic science to patient care 2007. Available from: www.TuberculosisTextbook.com.
3. Kaufmann SHE. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*. 2001;1:20-30.
4. Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon SV. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:537-44.
5. Russell DG. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(1):39-47.
6. Behr MA. *Mycobacterium* du jour: what's on tomorrow's menu? *Microbes Infect*. 2008;10:968-72.
7. Kaufmann SH. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol*. 2005;26:660-7.
8. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;123(1-2):11-8.
9. Lienhardt C, Glaziou P, Uplekar M, Lonnroth K, Getahun H, Raviglione M. Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10:407-16.
10. Vilcheze C, Jacobs WR, Jr. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol*. 2007;61:35-50.
11. Global Tuberculosis Report 2012. Geneva: World Health Organization, 2012.
12. Sacchettini JC, Rubin EJ, Freundlich JS. Drugs versus bugs: in pursuit of the persistent predator *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6:41-52.
13. 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.
14. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:93-129.
15. Lamichhane G. Novel targets in *M. tuberculosis*: search for new drugs. *Trends Mol Med*. 2011;17(1):25-33.
16. Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:581-91.

17. Zahrt TC. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect.* 2003;5:159-67.
18. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:352-66.
19. Koul A, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature.* 2011;469:483-90.
20. Elston JW, Thaker HK. Co-infection with human immunodeficiency virus and tuberculosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008;74(3):194-9.
21. Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 1998;6:107-12.
22. Treatment of Tuberculosis: guidelines for national programmes. Geneva: World Health Organization, 2003.
23. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis.* 1998;79(1):3-29.
24. Yew WW, Leung CC. Management of multidrug-resistant tuberculosis: Update 2007. *Respirology.* 2008;13(1):21-46.
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. Zager EM, McNerney R. Multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infect Dis.* 2008;8:10.
27. Dorman SE, Chaisson RE. From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nat Med.* 2007;13(3):295-8.
28. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response. Geneva: World Health Organization, 2010.
29. Kawai V, Soto G, Gilman RH, Bautista CT, Caviedes L, Huaroto L, et al. Tuberculosis mortality, drug resistance, and infectiousness in patients with and without HIV infection in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(6):1027-33.
30. Jassal M, Bishai WR. Extensively drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(1):19-30.
31. Gandhi NR, Moll A, Sturm AW, Pawinski R, Govender T, Lalloo U, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet.* 2006;366:1575-80.
32. 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;136:420-5.

33. Balganesh TS, Alzari PM, Cole ST. Rising standards for tuberculosis drug development. Trends Pharmacol Sci. 2008;29(11):576-81.

34. de Souza MV. Promising drugs against tuberculosis. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2006;1(1):33-44.

35. O'Brien RJ, Nunn PP. The need for new drugs against tuberculosis. Obstacles, opportunities, and next steps. Am J Respir Crit Care Med. 2001;163(5):1055-8.

36. Sasseti CM, Rubin EJ. The open book of infectious diseases. Nat Med. 2007;13:279-80.

37. Andries K, Verhasselt P, Guillemont J, Gohlmann HW, Neefs JM, Winkler H, et al. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 2005;307:223-7.

38. Cohen J. Infectious disease. Approval of novel TB drug celebrated--with restraint. Science. 2013;339:130.

39. Kaufmann SH, Parida SK. Changing funding patterns in tuberculosis. Nat Med. 2007;13:299-303.

40. Voet D, Voet JG. Biochemistry. Fourth ed. USA:2011.

41. Smith C, Marks A, Lieberman M. Marks' Basic Medical Biochemistry - A Clinical Approach. Second ed. USA:2005.

42. Nelson D, Cox M. Lehninger - Principles of Biochemistry. Fourth ed. New York:2005.

43. Sintchak MD, Nimmegern E. The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors. Immunopharmacology. 2000;47:163-84.

44. Zalkin H, Nygaard P. Biosynthesis of Purine Nucleotides. In: Neidhardt FC, editor. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. Second ed. Washington, DC:1996. p. 561-79.

45. 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.

46. Mizrahi V, Buckstein M, Rubin H. Nucleic Acid Metabolism. In: Cole S, editor. Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. Washington, DC:2005. p. 369-78.

47. Ducati RG, Breda A, Basso LA, Santos DS. Purine Salvage Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. Curr Med Chem. 2011;18(9):1258-75.

48. Biazus G, Schneider CZ, Palma MS, Basso LA, Santos DS. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning, expression, and biochemical characterization. *Protein Expr Purif.* 2009;66(2):185-90.
49. Hedstrom L. IMP dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition. *Chem Rev.* 2009;109(7):2903-28.
50. Shu Q, Nair V. Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) as a target in drug discovery. *Med Res Rev.* 2008;28(2):219-32.
51. Franco TM, Rostirolla DC, Ducati RG, Lorenzini DM, Basso LA, Santos DS. Biochemical characterization of recombinant guaA-encoded guanosine monophosphate synthetase (EC 6.3.5.2) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain. *Arch Biochem Biophys.* 2012;517(1):1-11.
52. Umejiego NN, Li C, Riera T, Hedstrom L, Striepen B. *Cryptosporidium parvum* IMP dehydrogenase: identification of functional, structural, and dynamic properties that can be exploited for drug design. *J Biol Chem.* 2004;279(39):40320-7.
53. Hedstrom L, Liechti G, Goldberg JB, Gollapalli DR. The antibiotic potential of prokaryotic IMP dehydrogenase inhibitors. *Curr Med Chem.* 2011;18(13):1909-18.
54. Chen L, Wilson DJ, Xu Y, Aldrich CC, Felczak K, Sham YY, et al. Triazole-linked inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase from human and *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Chem.* 2010;53(12):4768-78.
55. Zhang R, Evans G, Rotella FJ, Westbrook EM, Beno D, Huberman E, et al. Characteristics and crystal structure of bacterial inosine-5'-monophosphate dehydrogenase. *Biochemistry.* 1999;38(15):4691-700.
56. Pimkin M, Markham GD. The CBS subdomain of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase regulates purine nucleotide turnover. *Mol Microbiol.* 2008;68(2):342-59.
57. Kemp BE. Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract. *J Clin Invest.* 2004;113(2):182-4.
58. Pimkin M, Pimkina J, Markham GD. A regulatory role of the Bateman domain of IMP dehydrogenase in adenylate nucleotide biosynthesis. *J Biol Chem.* 2009;284(12):7960-9.
59. Riera TV, Wang W, Josephine HR, Hedstrom L. A kinetic alignment of orthologous inosine-5'-monophosphate dehydrogenases. *Biochemistry.* 2008;47(33):8689-96.
60. Kerr KM, Hedstrom L. The roles of conserved carboxylate residues in IMP dehydrogenase and identification of a transition state analog. *Biochemistry.* 1997;36(43):13365-73.
61. Kerr KM, Cahoon M, Bosco DA, Hedstrom L. Monovalent cation activation in *Escherichia coli* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 2000;375(1):131-7.

62. Digits JA, Hedstrom L. Kinetic mechanism of *Tritrichomonas foetus* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *Biochemistry*. 1999;38(8):2295-306.
63. Carr SF, Papp E, Wu JC, Natsumeda Y. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J Biol Chem*. 1993;268(36):27286-90.
64. Xiang B, Taylor JC, Markham GD. Monovalent cation activation and kinetic mechanism of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1996;271(3):1435-40.
65. Wang W, Hedstrom L. Kinetic mechanism of human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type II: random addition of substrates and ordered release of products. *Biochemistry*. 1997;36:8479-83.
66. Futer O, Sintchak MD, Caron PR, Nimmesgern E, DeCenzo MT, Livingston DJ, et al. A mutational analysis of the active site of human type II inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1594(1):27-39.
67. Dobie F, Berg A, Boitz JM, Jardim A. Kinetic characterization of inosine monophosphate dehydrogenase of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*. 2007;152(1):11-21.
68. Zhou X, Cahoon M, Rosa P, Hedstrom L. Expression, purification, and characterization of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase from *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem*. 1997;272(35):21977-81.
69. Makowska-Grzyska M, Kim Y, Wu R, Wilton R, Gollapalli DR, Wang XK, et al. *Bacillus anthracis* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in action: the first bacterial series of structures of phosphate ion-, substrate-, and product-bound complexes. *Biochemistry*. 2012;51(31):6148-63.
70. Rao VA, Shepherd SM, Owen R, Hunter WN. Structure of *Pseudomonas aeruginosa* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2013;69(Pt 3):243-7.
71. Ji Y, Gu J, Makhov AM, Griffith JD, Mitchell BS. Regulation of the interaction of inosine monophosphate dehydrogenase with mycophenolic Acid by GTP. *J Biol Chem*. 2006;281(1):206-12.
72. Gilbert HJ, Lowe CR, Drabble WT. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Purification by affinity chromatography, subunit structure and inhibition by guanosine 5'-monophosphate. *Biochem J*. 1979;183(3):481-94.
73. Whitby FG, Luecke H, Kuhn P, Somoza JR, Huete-Perez JA, Phillips JD, et al. Crystal structure of *Tritrichomonas foetus* inosine-5'-monophosphate dehydrogenase and the enzyme-product complex. *Biochemistry*. 1997;36(35):10666-74.
74. Heyde E, Nagabhushanam A, Vonarx M, Morrison JF. Studies on inosine monophosphate dehydrogenase. Steady state kinetics. *Biochim Biophys Acta*. 1976;429(3):645-60.

75. Usha V, Gurcha SS, Lovering AL, Lloyd AJ, Papaemmanouil A, Reynolds RC, et al. Identification of novel diphenyl urea inhibitors of Mt-*GuaB2* active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*. 2011;157(Pt 1):290-9.
76. Xiang B, Markham GD. Probing the mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase with kinetic isotope effects and NMR determination of the hydride transfer stereospecificity. *Arch Biochem Biophys*. 1997;348(2):378-82.
77. Felczak K, Chen L, Wilson D, Williams J, Vince R, Petrelli R, et al. Cofactor-type inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase via modular approach: targeting the pyrophosphate binding sub-domain. *Bioorg Med Chem*. 2011;19(5):1594-605.
78. Gan L, Petsko GA, Hedstrom L. Crystal structure of a ternary complex of *Tritrichomonas foetus* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase: NAD⁺ orients the active site loop for catalysis. *Biochemistry*. 2002;41:13309-17.
79. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology*. 2000;47:85-118.
80. Digits JA, Hedstrom L. Drug selectivity is determined by coupling across the NAD⁺ site of IMP dehydrogenase. *Biochemistry*. 2000;39:1771-7.
81. Digits JA, Hedstrom L. Species-specific inhibition of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase by mycophenolic acid. *Biochemistry*. 1999;38(46):15388-97.
82. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol*. 2003;48(1):77-84.
83. Pelicic V, Reyrat JM, Gicquel B. Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol*. 1998;28(3):413-20.
84. Gollapalli DR, Macpherson IS, Liechti G, Gorla SK, Goldberg JB, Hedstrom L. Structural determinants of inhibitor selectivity in prokaryotic IMP dehydrogenases. *Chem Biol*. 2010;17(10):1084-91.
85. DeJesus MA, Zhang YJ, Sassetti CM, Rubin EJ, Sacchettini JC, Ioerger TR. Bayesian analysis of gene essentiality based on sequencing of transposon insertion libraries. *Bioinformatics*. 2013;29(6):695-703.
86. Pelicic V, Jackson M, Reyrat JM, Jacobs WR, Jr., 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.
87. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D25-30.
88. Sambrook J, Russel D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York:2001.

89. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
90. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
91. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*. 1996;68(5):850-8.
92. Zhang Z, Marshall AG. A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1998;9(3):225-33.
93. Fadouloglou VE, Kokkinidis M, Glykos NM. Determination of protein oligomerization state: two approaches based on glutaraldehyde crosslinking. *Anal Biochem*. 2008;373(2):404-6.
94. Bhat JY, Shastri BG, Balaram H. Kinetic and biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* GMP synthetase. *Biochem J*. 2008;409(1):263-73.
95. Frieden C. Glutamic dehydrogenase. III. The order of substrate addition in the enzymatic reaction. *J Biol Chem*. 1959;234:2891-6.
96. Cook PF, Cleland W. *Enzyme Kinetics and Mechanism*. New York, USA:2007.
97. Segel IH. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. USA:1975.
98. Kachmar JF, Boyer PD. Kinetic analysis of enzyme reactions. II. The potassium activation and calcium inhibition of pyruvic phosphoferase. *J Biol Chem*. 1953;200(2):669-82.
99. Suelter CH. Enzymes activated by monovalent cations. *Science*. 1970;168(3933):789-95.
100. Di Cera E. A structural perspective on enzymes activated by monovalent cations. *J Biol Chem*. 2006;281(3):1305-8.
101. Sintchak MD, Fleming MA, Futer O, Raybuck SA, Chambers SP, Caron PR, et al. Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant mycophenolic acid. *Cell*. 1996;85(6):921-30.
102. Prosis GL, Wu JZ, Luecke H. Crystal structure of *Tritrichomonas foetus* inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the inhibitor ribavirin monophosphate reveals a catalysis-dependent ion-binding site. *J Biol Chem*. 2002;277(52):50654-9.
103. Prosis GL, Luecke H. Crystal structures of *Tritrichomonas foetus* inosine monophosphate dehydrogenase in complex with substrate, cofactor and analogs: a structural basis for the random-in ordered-out kinetic mechanism. *J Mol Biol*. 2003;326(2):517-27.

104. Markham GD, Bock CL, Schalk-Hihi C. Acid-base catalysis in the chemical mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase. *Biochemistry*. 1999;38(14):4433-40.
105. Riera TV, Zheng L, Josephine HR, Min D, Yang W, Hedstrom L. Allosteric activation via kinetic control: potassium accelerates a conformational change in IMP dehydrogenase. *Biochemistry*. 2011;50(39):8508-18.
106. Page MJ, Di Cera E. Role of Na⁺ and K⁺ in enzyme function. *Physiol Rev*. 2006;86(4):1049-92.
107. Wagner D, Maser J, Lai B, Cai Z, Barry CE, 3rd, Honer Zu Bentrup K, et al. Elemental analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *J Immunol*. 2005;174(3):1491-500.
108. Rana S, Pozzi N, Pelc LA, Di Cera E. Redesigning allosteric activation in an enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(13):5221-5.
109. Copeland RA. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*. Second ed:2000.
110. Monod J, Wyman J, Changeux J-P. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *Journal of Molecular Biology*. 1965;12:88-118.
111. Gunasekaran K, Ma B, Nussinov R. Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins? *Proteins*. 2004;57(3):433-43.
112. Bruzzese FJ, Connelly PR. Allosteric properties of inosine monophosphate dehydrogenase revealed through the thermodynamics of binding of inosine 5'-monophosphate and mycophenolic acid. Temperature dependent heat capacity of binding as a signature of ligand-coupled conformational equilibria. *Biochemistry*. 1997;36(34):10428-38.
113. Lambden PR, Drabble WT. Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase of *Escherichia coli* K12: the nature of the inhibition by guanosine 5'-monophosphate. *Biochem J*. 1973;133(3):607-8.
114. Smith JH, Simons C. *Enzymes and Their Inhibition Drug Development*. USA:2005.
115. Verham R, Meek TD, Hedstrom L, Wang CC. Purification, characterization, and kinetic analysis of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase of *Trichomonas foetus*. *Mol Biochem Parasitol*. 1987;24:1-12.
116. Hedstrom L, Gan L. IMP dehydrogenase: structural schizophrenia and an unusual base. *Curr Opin Chem Biol*. 2006;10(5):520-5.
117. Bulaj G, Kortemme T, Goldenberg DP. Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry*. 1998;37:8965-72.

118. Antonino LC, Straub K, Wu JC. Probing the active site of human IMP dehydrogenase using halogenated purine riboside 5'-monophosphates and covalent modification reagents. *Biochemistry*. 1994;33(7):1760-5.
119. Peters GH, Frimurer TM, Olsen OH. Electrostatic evaluation of the signature motif (H/V)CX5R(S/T) in protein-tyrosine phosphatases. *Biochemistry*. 1998;37:5383-93.
120. Colby TD, Vanderveen K, Strickler MD, Markham GD, Goldstein BM. Crystal structure of human type II inosine monophosphate dehydrogenase: implications for ligand binding and drug design. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(7):3531-6.
121. Goodey NM, Benkovic SJ. Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route. *Nat Chem Biol*. 2008;4(8):474-82.
122. MacRae IJ, Segel IH. Adenosine 5'-phosphosulfate (APS) kinase: diagnosing the mechanism of substrate inhibition. *Arch Biochem Biophys*. 1999;361:277-82.
123. Copeland RA. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*. New Jersey:2005.
124. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 1985;33(1):103-19.
125. Vieira J, Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*. 1982;19(3):259-68.
126. Jackson M, Camacho L, Gicquel B, Guilhot C. *Mycobacterium tuberculosis* protocols. Totowa, NJ:2001. p. 59-75.
127. Wei JR, Rubin EJ. The many roads to essential genes. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008;88(Suppl 1):S19-24.
128. McFadden J. Recombination in mycobacteria. *Mol Microbiol*. 1996;21(2):205-11.
129. Robertson JG. Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry*. 2005;44(15):5561-71.
130. Umejiego NN, Gollapalli D, Sharling L, Volftsun A, Lu J, Benjamin NN, et al. Targeting a prokaryotic protein in a eukaryotic pathogen: identification of lead compounds against cryptosporidiosis. *Chem Biol*. 2008;15:70-7.
131. MacPherson IS, Kirubakaran S, Gorla SK, Riera TV, D'Aquino JA, Zhang M, et al. The structural basis of *Cryptosporidium* -specific IMP dehydrogenase inhibitor selectivity. *J Am Chem Soc*. 2010;132(4):1230-1.
132. Kirubakaran S, Gorla SK, Sharling L, Zhang M, Liu X, Ray SS, et al. Structure-activity relationship study of selective benzimidazole-based inhibitors of *Cryptosporidium parvum* IMPDH. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22:1985-8.

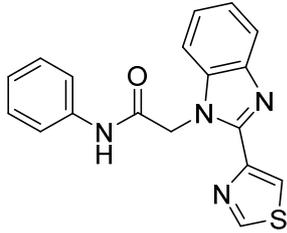
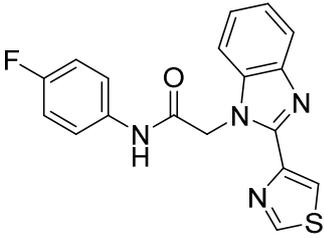
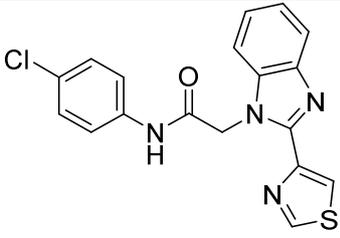
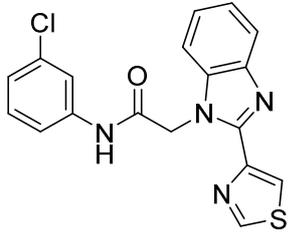
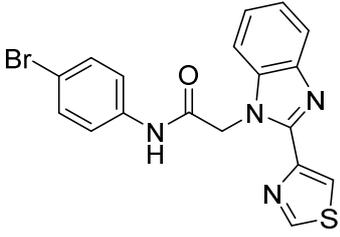
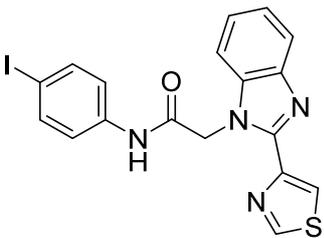
133. Gorla SK, Kavitha M, Zhang M, Chin JE, Liu X, Striepen B, et al. Optimization of Benzoxazole-Based Inhibitors of *Cryptosporidium parvum* Inosine 5'-Monophosphate Dehydrogenase. *J Med Chem*. 2013;56(10):4028-43.
134. Hasan S, Daugelat S, Rao PS, Schreiber M. Prioritizing genomic drug targets in pathogens: application to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Comput Biol*. 2006;2(6):e61.
135. Johnson CR, Gorla SK, Kavitha M, Zhang M, Liu X, Striepen B, et al. Phthalazinone inhibitors of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase from *Cryptosporidium parvum*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(4):1004-7.

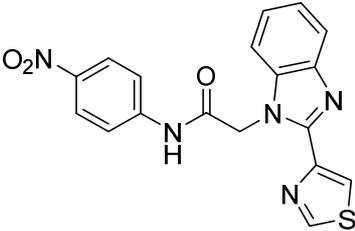
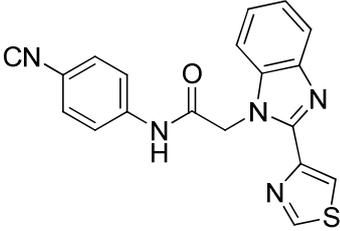
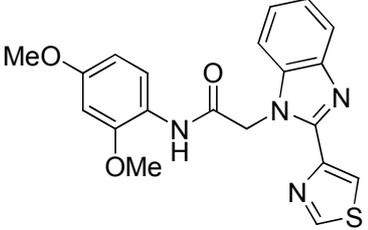
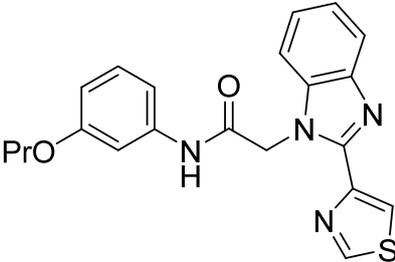
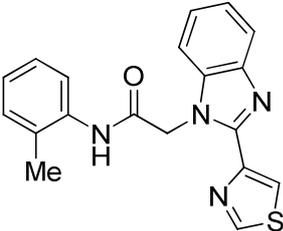
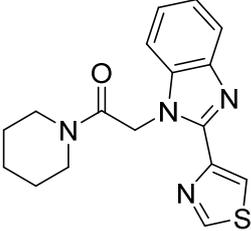
Anexos

- A. Dados complementares provenientes da caracterização química da série tiazol-benzimidazol acetamidas substituídas **5a-l**.
 - B. Carta de submissão à revista *Molecular BioSystems*
 - C. Artigo publicado – UMP kinase from *Mycobacterium tuberculosis*: mode of action and allosteric regulations, and their likely role in pyrimidine metabolism regulation
 - D. Artigo publicado – Biochemical characterization of recombinant *guaA*-encoded guanosine monophosphate synthetase (EC 6.3.5.2) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain
 - E. Artigo publicado – Kinetic mechanism and energetics of binding of phosphoryl group acceptors to *Mycobacterium tuberculosis* Cytidine Monophosphate Kinase
 - F. Artigo aceito para publicação – Discovery of New Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* InhA Enzyme using Virtual Screening and a 3D-Pharmacophore-Based Approach
 - G. Artigo submetido para publicação – Production of recombinant human annexin V by fed-batch cultivation
-

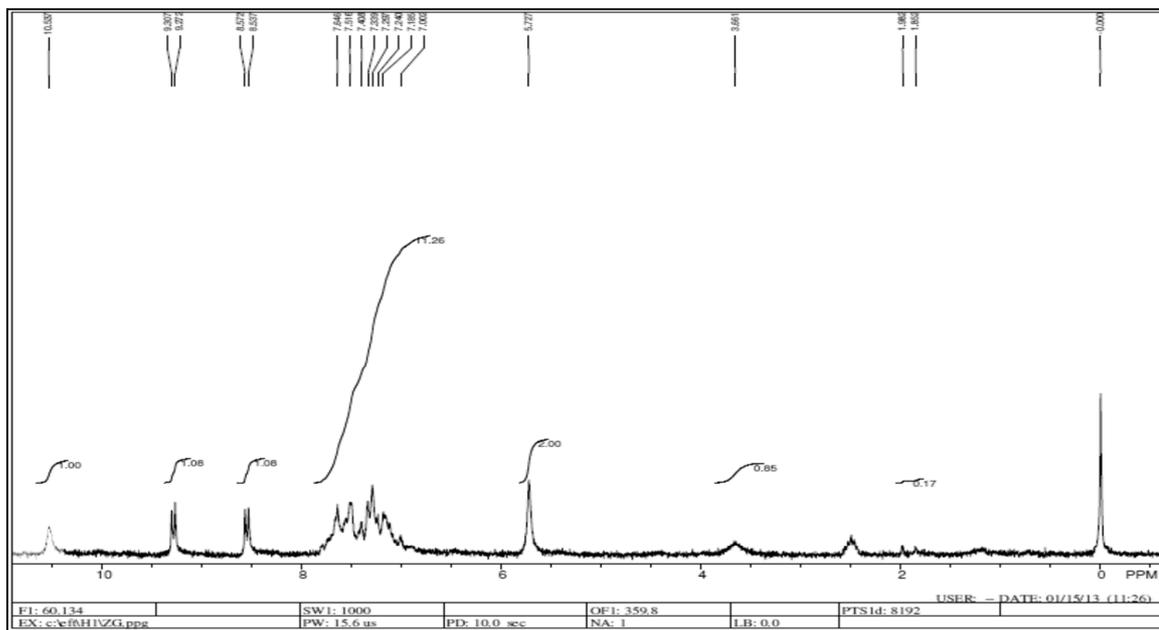
Anexo A

Dados complementares provenientes
da caracterização química da série
tiazol-benzimidazol acetamidas **5a-l**

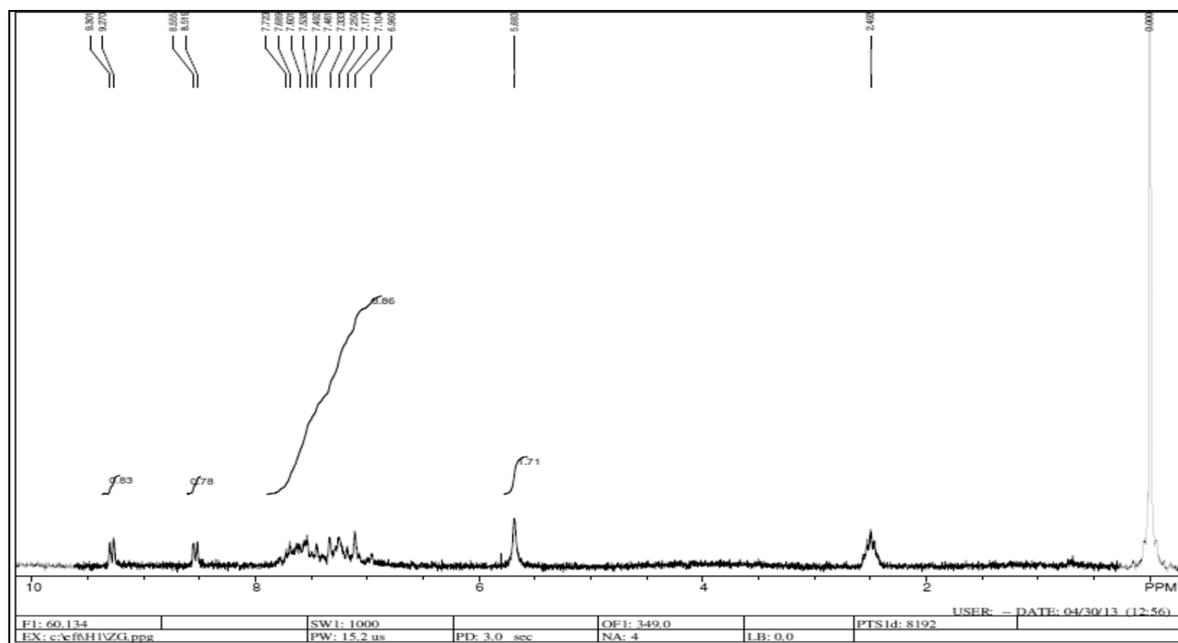
| Composto | Nome | Estrutura | ESI-MS e ¹ H RMN (60 MHz) |
|----------|--|--|--|
| 5a | <i>N</i> -fenil-2-(2-(tiazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida |  | C ₁₈ H ₁₄ N ₄ OS m/z: 335,0946. ¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 60 MHz) δ 5,72 (s, 2H), 7,00-7,64 (m, 11H), 8,57 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 9,30 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 10,53 (s, 1H). |
| 5b | <i>N</i> -(4-fluorfenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida |  | C ₁₈ H ₁₃ FN ₄ OS m/z: 353,0847. ¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 60 MHz) δ 5,68 (s, 2H), 6,96-7,72 (m, 8H), 8,57 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 9,30 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H). |
| 5c | <i>N</i> -(4-clorofenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida |  | C ₁₈ H ₁₃ ClN ₄ OS m/z: 369,0555. ¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 60 MHz) δ 5,71 (s, 2H), 7,19-7,80 (m, 8H), 8,57 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 9,03 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H). |
| 5d | <i>N</i> -(3-clorofenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida |  | C ₁₈ H ₁₃ ClN ₄ OS m/z: 369,0563. ¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 60 MHz) δ 5,72 (s, 2H), 7,20-7,78 (m, 10H), 8,59 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 9,31 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 10,64 (s, 1H). |
| 5e | <i>N</i> -(4-bromofenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida |  | C ₁₈ H ₁₃ BrN ₄ OS m/z: 413,0045. ¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 60 MHz) δ 5,70 (s, 2H), 7,19-7,79 (m, 8H), 8,57 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 9,30 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H). |
| 5f | <i>N</i> -(4-iodofenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida |  | C ₁₈ H ₁₃ IN ₄ OS m/z: 460,9938. ¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 60 MHz) δ 5,89 (s, 2H), 7,18-7,74 (m, 8H), 8,54 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H), 9,27 (d, <i>J</i> = 2,1 Hz, 1H). |

| | | | |
|----|---|--|--|
| 5g | <i>N</i> -(4-nitrofenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida |  | $C_{18}H_{13}N_5O_3S$ m/z : 380,0805. 1H NMR (DMSO- d_6 , 60 MHz) δ 5,77 (s, 2H), 7,20-7,36 (m, 2H), 7,61-7,87 (m, 4H) 8,14-8,30 (d, J = 9,6 Hz, 2H), 8,59 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 9,22 (d, J = 2,1 Hz, 1H). |
| 5h | <i>N</i> -(4-cianofenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida |  | $C_{19}H_{13}N_5OS$ m/z : 360,0895. 1H NMR (DMSO- d_6 , 60 MHz) δ 5,70 (s, 2H), 7,18-7,74 (m, 8H), 8,57 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 9,29 (d, J = 2,1 Hz, 1H). |
| 5i | <i>N</i> -(2,4-dimetoxifenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida |  | $C_{20}H_{18}N_4O_3S$ m/z : 395,1177. 1H NMR (DMSO- d_6 , 60 MHz) δ 3,74 (s, 3H), 3,86 (s, 3H), 5,72 (s, 2H), 6,35-6,62 (m, 2H), 7,21-7,76 (m, 5H), 8,57 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 9,35 (d, J = 2,1 Hz, 1H). |
| 5j | -(3-propoxifenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida |  | $C_{21}H_{20}N_4O_2S$ m/z : 393,1378. 1H NMR (DMSO- d_6 , 60 MHz) δ 0,93 (t, J = 7 Hz, 3H), 0,93 (t, J = 7 Hz, 3H), 1,65 (m, 2H), 3,84 (t, J = 7 Hz, 2H), 6,53-7,67 (m, 9H), 8,56 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 9,30 (d, J = 2,1 Hz, 1H). 10,42 (s, 1H). |
| 5k | 2-(2-(tiazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)- <i>N</i> -o-tolilacetamida |  | $C_{19}H_{16}N_4OS$ m/z : 349,1122. 1H NMR (DMSO- d_6 , 60 MHz) δ 2,21 (s, 3H), 5,70 (s, 2H), 6,91-7,77 (m, 8H), 8,53 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 9,30 (d, J = 2,1 Hz, 1H). |
| 5l | 1-(piperidin-1-il)-2-(2-(tiazol-4-il)-1H-benzo[d]imidazol-1-il)acetamida |  | $C_{17}H_{18}N_4OS$ m/z : 327,1273. 1H NMR (DMSO- d_6 , 60 MHz) δ 1,63 (m, 6H) 5,64 (s, 2H), 7,25-7,818 (m, 4H), 8,31 (d, J = 2,1 Hz, 1H), 8,83 (d, J = 2,1 Hz, 1H). |

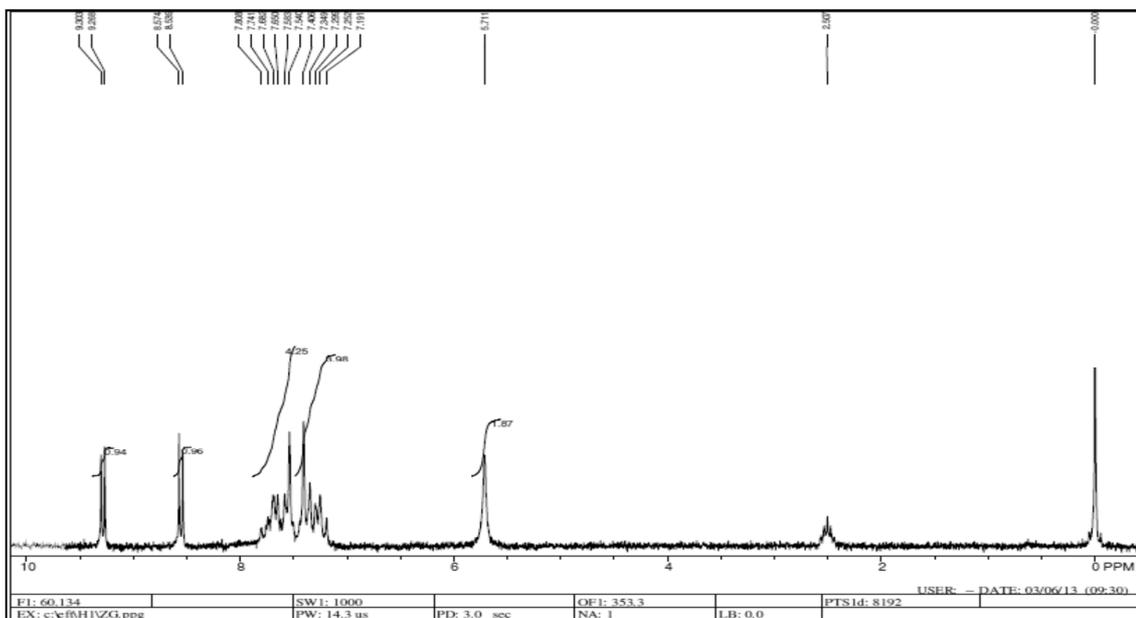
Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H das tiazol-benzimidazol acetamidas **5a-l** obtidos em 60 MHz.



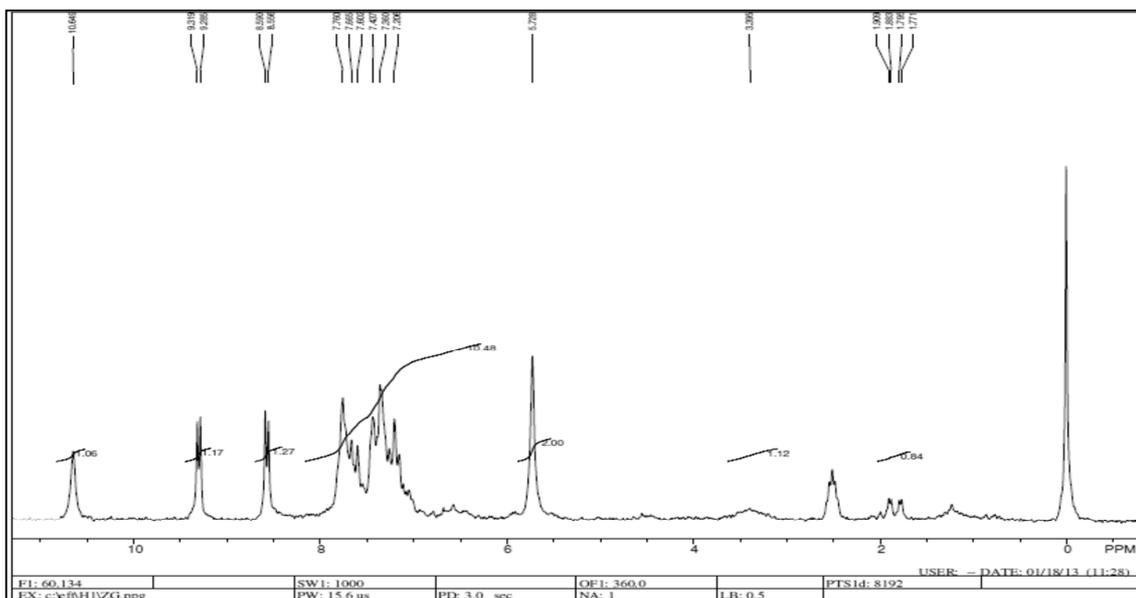
Espectro 1. Espectro de ^1H RMN 60 MHz da *N*-fenil-2-(2-(tiazol-4-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetamida (**5a**) em $\text{DMSO-}d_6$ (60 MHz).



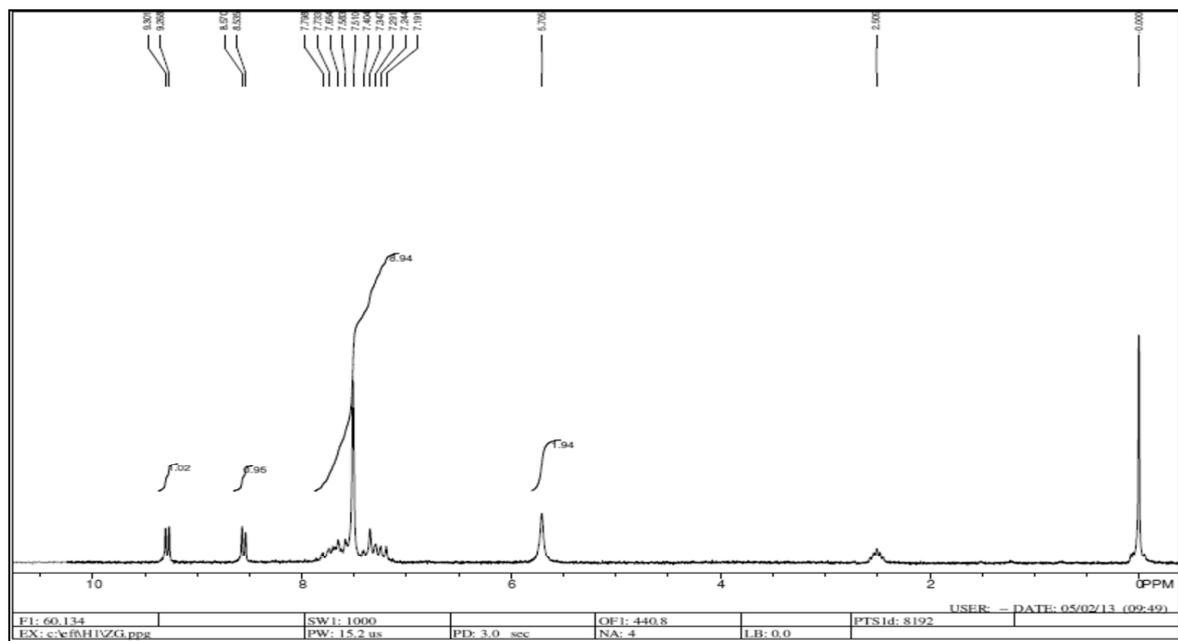
Espectro 2. Espectro de ^1H RMN 60 MHz da *N*-(4-fluorfenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetamida (**5b**) em $\text{DMSO-}d_6$ (60 MHz).



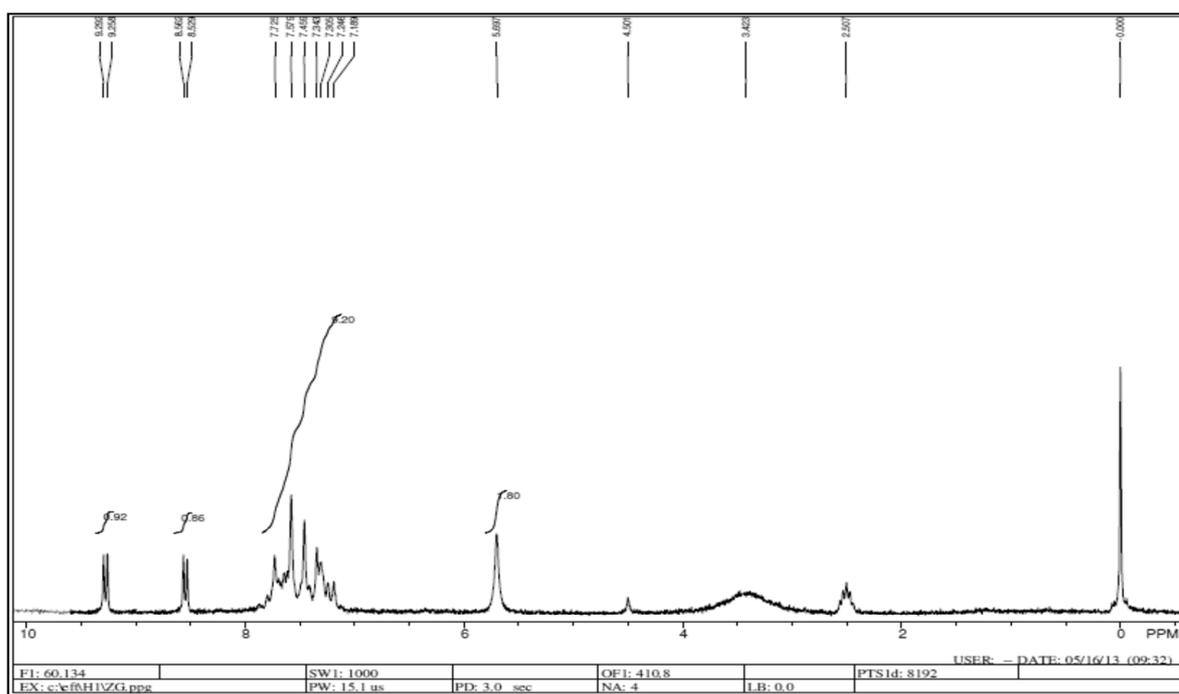
Espectro 3. Espectro de ^1H RMN 60 MHz da *N*-(4-clorofenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetamida (**5c**) em $\text{DMSO-}d_6$ (60 MHz).



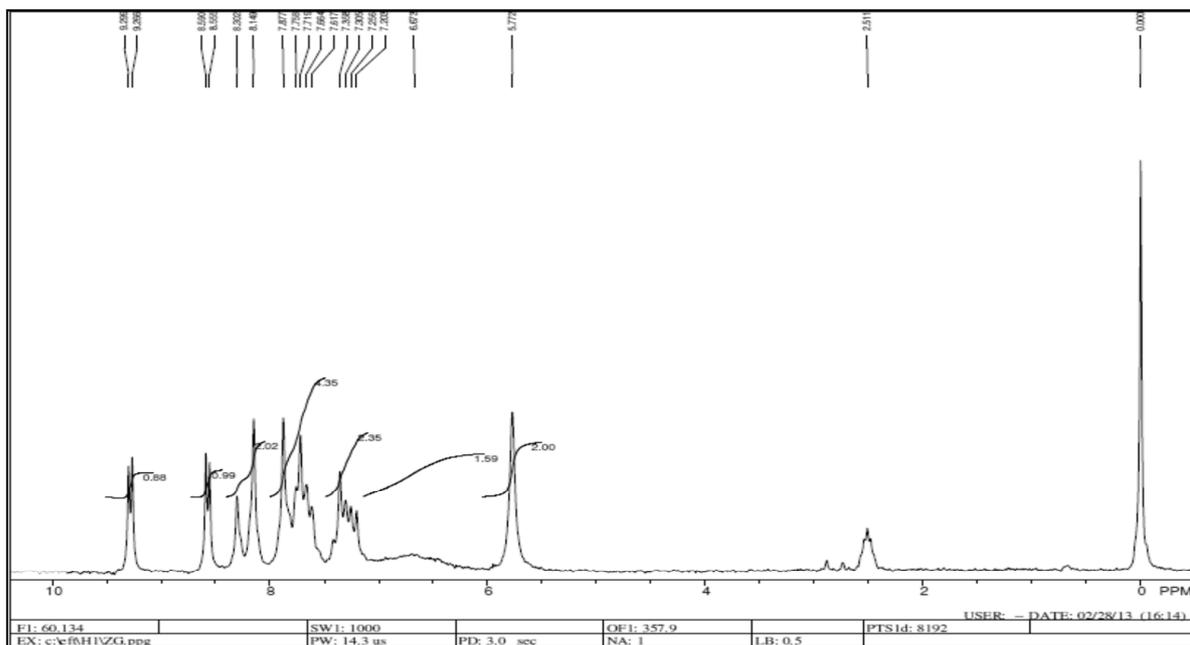
Espectro 4. Espectro de ^1H RMN 60 MHz da *N*-(3-clorofenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetamida (**5d**) em $\text{DMSO-}d_6$ (60 MHz).



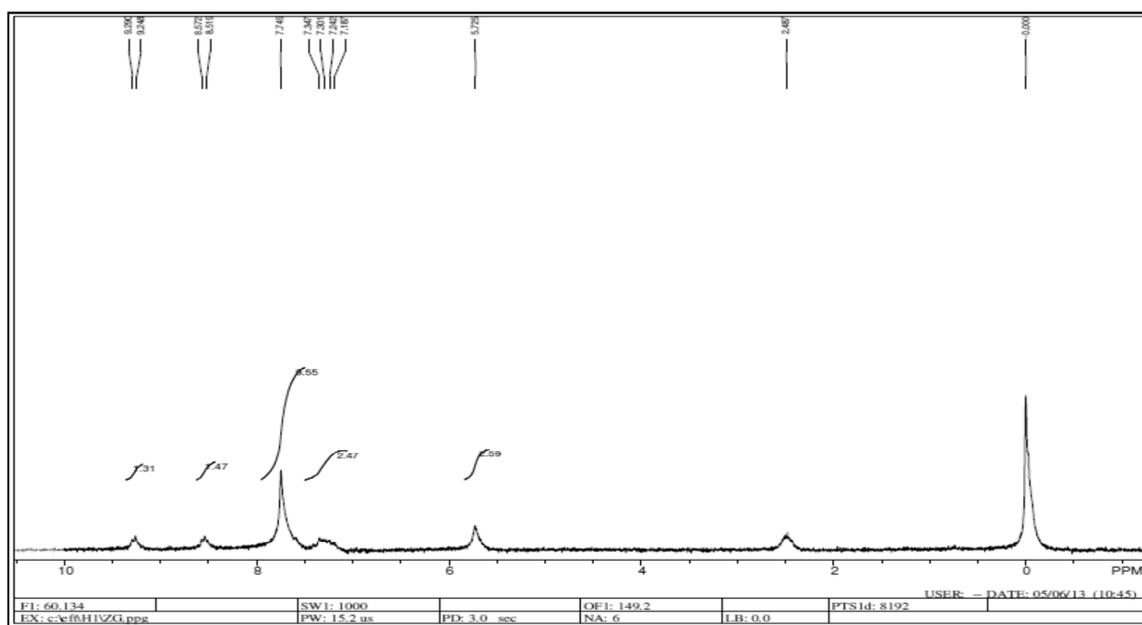
Espectro 5. Espectro de ¹H RMN 60 MHz da *N*-(4-bromofenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetamida (**5e**) em DMSO-*d*₆ (60 MHz).



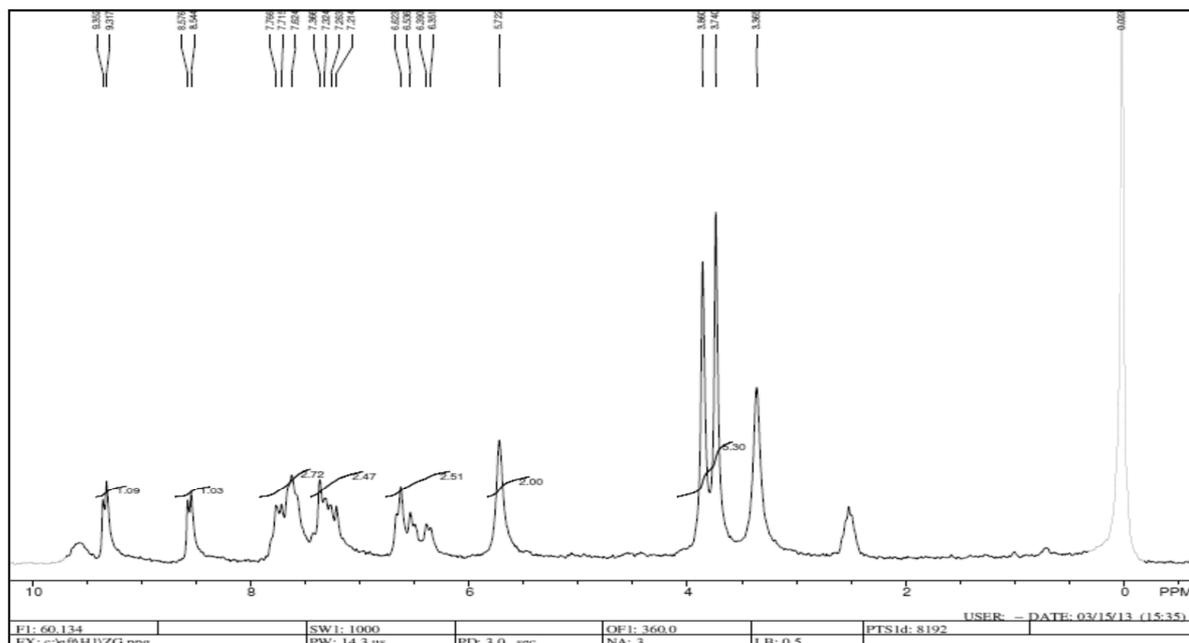
Espectro 6. Espectro de ¹H RMN 60 MHz da *N*-(4-iodofenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetamida (**5f**) em DMSO-*d*₆ (60 MHz).



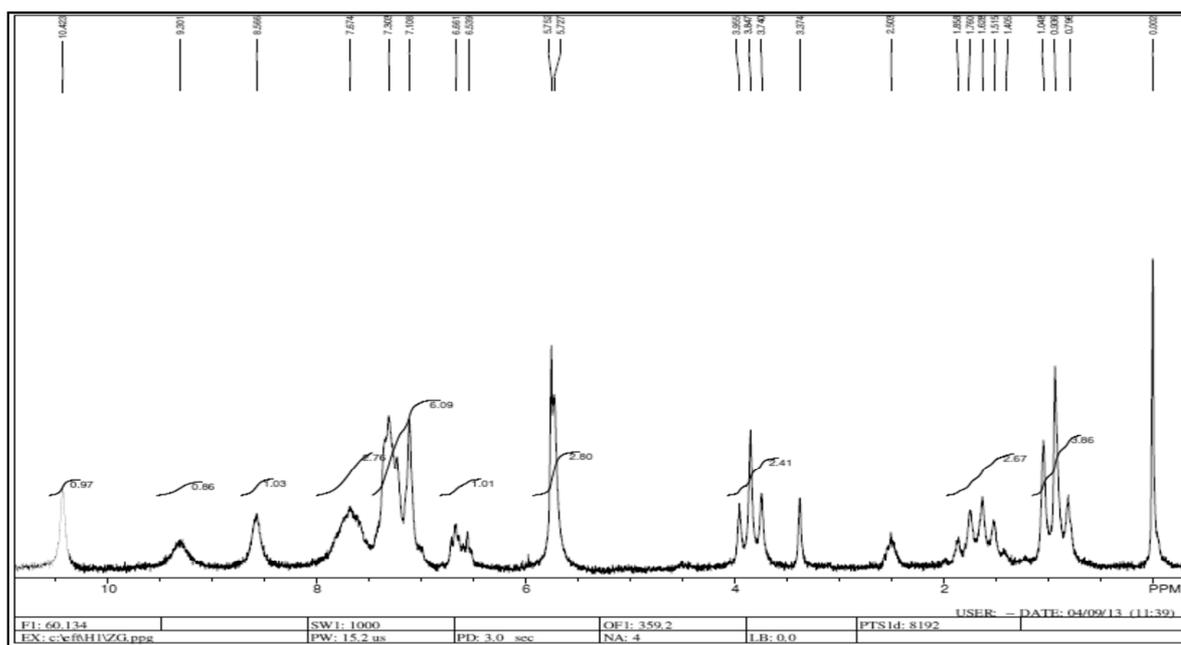
Espectro 7. Espectro de ^1H RMN 60 MHz da *N*-(4-nitrofenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetamida (**5g**) em $\text{DMSO-}d_6$ (60 MHz).



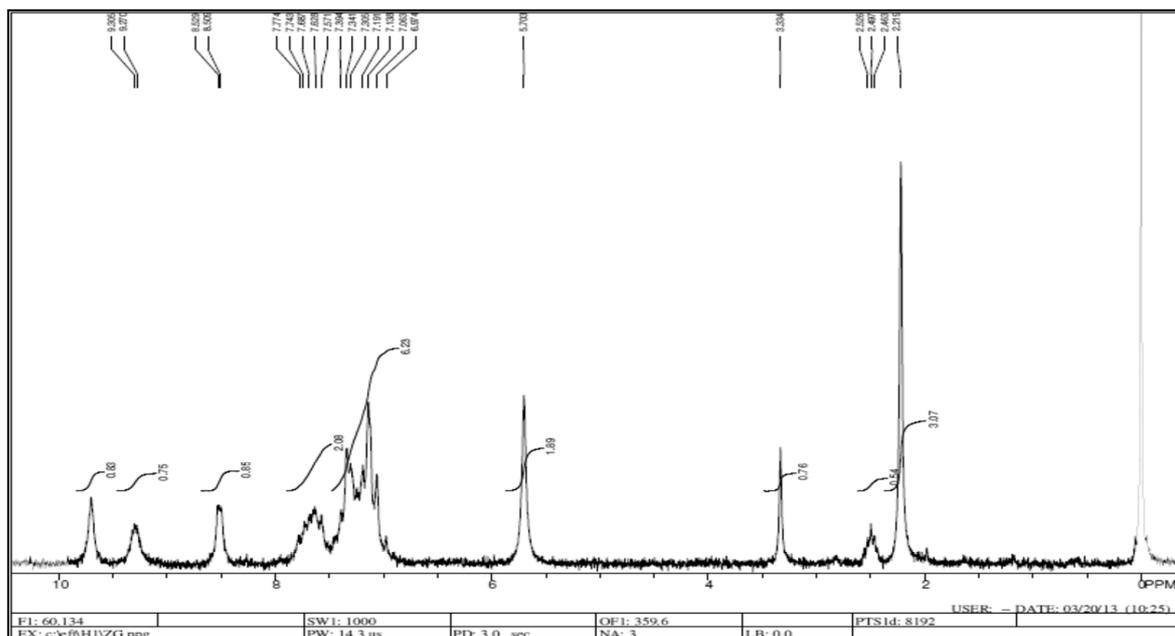
Espectro 8. Espectro de ^1H RMN 60 MHz da *N*-(4-cianofenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetamida (**5h**) em $\text{DMSO-}d_6$ (60 MHz).



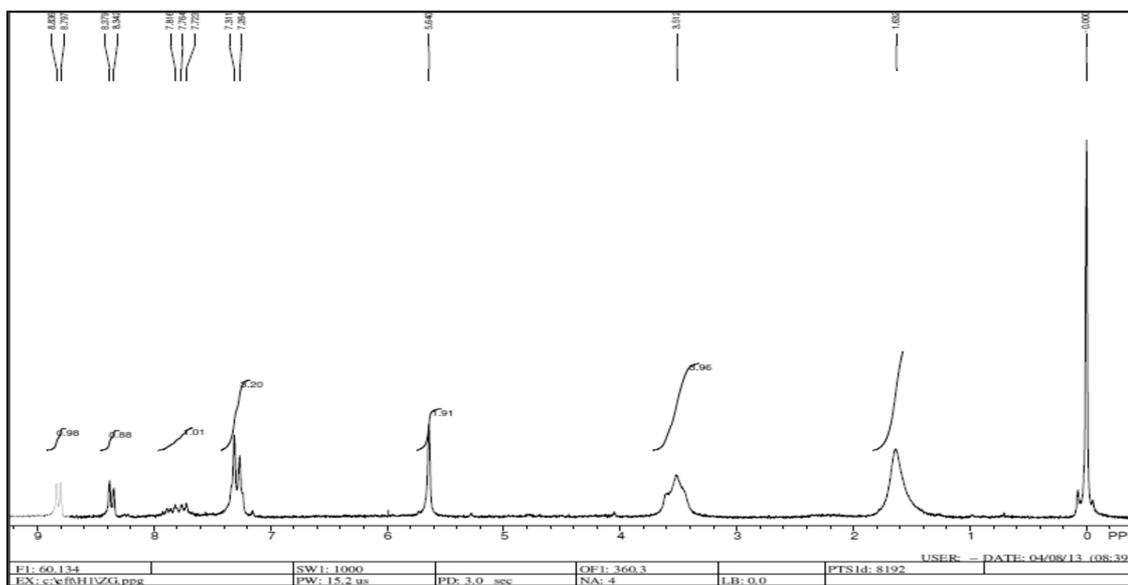
Espectro 9. Espectro de ^1H RMN 60 MHz da *N*-(2,4-dimetoxifenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetamida (**5i**) em $\text{DMSO-}d_6$ (60 MHz).



Espectro 10. Espectro de ^1H RMN 60 MHz da *N*-(3-propoxifenil)-2-(2-(tiazol-4-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetamida (**5j**) em $\text{DMSO-}d_6$ (60 MHz).



Espectro 11. Espectro de ¹H RMN 60 MHz da 2-(2-(tiazol-4-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)-*N*-o-tolilacetamida (**5k**) em DMSO-*d*₆ (60 MHz).



Espectro 12. Espectro de ¹H RMN 60 MHz da 1-(piperidin-1-il)-2-(2-(tiazol-4-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)acetamida (**5l**) em DMSO-*d*₆ (60 MHz).

Anexo B

Biochemical characterization of
Mycobacterium tuberculosis IMP
dehydrogenase: kinetic mechanism, metal
activation and evidence of allosteric
regulation

Diana C. Rostirolla, Thiago M. de Assunção,
Cristiano V. Bizarro, Luiz A. Basso e Diógenes S.
Santos

Carta de submissão à revista *Molecular BioSystems*

Dear Dr Basso:

Thank you for submitting your manuscript entitled "Biochemical characterization of Mycobacterium tuberculosis IMP dehydrogenase: kinetic mechanism, metal activation and evidence of allosteric regulation" to Molecular BioSystems. This is an automatic acknowledgement that your files have been successfully uploaded. You will receive a formal acknowledgement message from the Editorial Office once your submission has been verified.

Your manuscript ID is MB-ART-09-2013-070390.

Please mention the above manuscript ID in all correspondence relating to this manuscript. If there are any changes to your contact details, please log in to your Author Centre at <http://mc.manuscriptcentral.com/mb> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by logging into your Author Centre at <http://mc.manuscriptcentral.com/mb>.

Thank you for submitting your manuscript to Molecular BioSystems.

Yours sincerely,
Molecular BioSystems Editorial Office
molbiosyst@rsc.org

Anexo C

UMP kinase from *Mycobacterium tuberculosis*: mode of action and allosteric regulations, and their likely role in pyrimidine metabolism regulation

Diana C. Rostirolla, Ardala Breda, Leonardo A. Rosado, Mário S. Palma, Luiz A. Basso, Diógenes S. Santos

Artigo publicado
Archives of Biochemistry and Biophysics, 2011,
505:202-212



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabbi

UMP kinase from *Mycobacterium tuberculosis*: Mode of action and allosteric interactions, and their likely role in pyrimidine metabolism regulation[☆]

Diana C. Rostirolla^{a,b}, Ardala Breda^{a,b}, Leonardo A. Rosado^{a,c}, Mario S. Palma^d, Luiz A. Basso^{a,b,*}, Diógenes S. Santos^{a,b,*}

^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), Av. Ipiranga 6681 – Tecnopuc – Prédio 92-A, Porto Alegre 90619-900, RS, Brazil

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

^cPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre 90619-900, RS, Brazil

^dLaboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, Centro de Estudos de Insetos Sociais, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 July 2010

and in revised form 21 October 2010

Available online 28 October 2010

Keywords:

UMPK

Cooperative kinetics

Allosteric regulation

Pyrimidine metabolism

Thermodynamic binding parameters

Antitubercular drug target

ABSTRACT

The *pyrH*-encoded uridine 5'-monophosphate kinase (UMPK) is involved in both *de novo* and salvage synthesis of DNA and RNA precursors. Here we describe *Mycobacterium tuberculosis* UMPK (*MtUMPK*) cloning and expression in *Escherichia coli*. N-terminal amino acid sequencing and electrospray ionization mass spectrometry analyses confirmed the identity of homogeneous *MtUMPK*. *MtUMPK* catalyzed the phosphorylation of UMP to UDP, using ATP-Mg²⁺ as phosphate donor. Size exclusion chromatography showed that the protein is a homotetramer. Kinetic studies revealed that *MtUMPK* exhibits cooperative kinetics towards ATP and undergoes allosteric regulation. GTP and UTP are, respectively, positive and negative effectors, maintaining the balance of purine versus pyrimidine synthesis. Initial velocity studies and substrate(s) binding measured by isothermal titration calorimetry suggested that catalysis proceeds by a sequential ordered mechanism, in which ATP binds first followed by UMP binding, and release of products is random. As *MtUMPK* does not resemble its eukaryotic counterparts, specific inhibitors could be designed to be tested as antitubercular agents.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Anexo D

Biochemical characterization of recombinant *guaA*-encoded guanosine monophosphate synthetase (EC 6.3.5.2) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain

Tathyana Mar A. Franco, Diana C. Rostirolla, Rodrigo G. Ducati, Daniel M. Lorenzini, Luiz A. Basso, Diógenes S. Santos

Artigo publicado
Archives of Biochemistry and Biophysics, 2012,
517:1-11



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabbi

Biochemical characterization of recombinant *guaA*-encoded guanosine monophosphate synthetase (EC 6.3.5.2) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain

Tathyana Mar A. Franco^{a,b}, Diana C. Rostirolla^{a,b}, Rodrigo G. Ducati^a, Daniel M. Lorenzini^a, Luiz A. Basso^{a,b,*}, Diógenes S. Santos^{a,b,*}

^aInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681/Prédio 92-A, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2011

and in revised form 8 November 2011

Available online 18 November 2011

Keywords:

Guanosine monophosphate synthetase
Recombinant protein
Steady-state kinetics
Cooperative kinetics
Protein function
Tuberculosis

ABSTRACT

Administration of the current tuberculosis (TB) vaccine to newborns is not a reliable route for preventing TB in adults. The conversion of XMP to GMP is catalyzed by *guaA*-encoded GMP synthetase (GMPS), and deletions in the *Shigella flexneri* *guaBA* operon led to an attenuated auxotrophic strain. Here we present the cloning, expression, and purification of recombinant *guaA*-encoded GMPS from *Mycobacterium tuberculosis* (MtGMPS). Mass spectrometry data, oligomeric state determination, steady-state kinetics, isothermal titration calorimetry (ITC), and multiple sequence alignment are also presented. The homodimeric MtGMPS catalyzes the conversion of XMP, MgATP, and glutamine into GMP, ADP, PP_i, and glutamate. XMP, NH₄⁺, and Mg²⁺ displayed positive homotropic cooperativity, whereas ATP and glutamine displayed hyperbolic saturation curves. The activity of ATP pyrophosphatase domain is independent of glutamine amidotransferase domain, whereas the latter cannot catalyze hydrolysis of glutamine to NH₃ and glutamate in the absence of substrates. ITC data suggest random order of binding of substrates, and PP_i is the last product released. Sequence comparison analysis showed conservation of both Cys-His-Glu catalytic triad of N-terminal Class I amidotransferase and of amino acid residues of the P-loop of the N-type ATP pyrophosphatase family.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Anexo E

Kinetic mechanism and energetics of
binding of phosphoryl group acceptors to
Mycobacterium tuberculosis Cytidine
Monophosphate Kinase

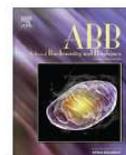
Léia Jaskulski, Leonardo A. Rosado, Luís Fernando
Timmers, Diana C. Rostirolla, Osmar N. de Souza,
Diógenes S. Santos, Luiz A. Basso

Artigo publicado
Archives of Biochemistry and Biophysics, 2013,
536:53-63



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabbi

Kinetic mechanism and energetics of binding of phosphoryl group acceptors to *Mycobacterium tuberculosis* cytidine monophosphate kinase



Léia Jaskulski^{a,b,1}, Leonardo A. Rosado^{a,c,1}, Diana C. Rostirolla^{a,b}, Luis F.S.M. Timmers^{c,d},
Osmar N. de Souza^{c,d}, Diogenes S. Santos^{a,b,*}, Luiz A. Basso^{a,b,*}

^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), Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

^cPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2013

and in revised form 16 May 2013

Available online 10 June 2013

Keywords:

Cytidine monophosphate kinase

Mycobacterium tuberculosis

Enzyme mechanism

Isothermal titration calorimetry

Proton linkage

Intrinsic binding enthalpy

ABSTRACT

Cytidine monophosphate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* (*MtCMK*) likely plays a role in supplying precursors for nucleic acid synthesis. *MtCMK* catalyzes the ATP-dependent phosphoryl group transfer preferentially to CMP and dCMP. Initial velocity studies and isothermal titration calorimetry (ITC) measurements showed that *MtCMK* follows a random-order mechanism of substrate (CMP and ATP) binding, and an ordered mechanism for product release, in which ADP is released first followed by CDP. The thermodynamic signatures of CMP and CDP binding to *MtCMK* showed favorable enthalpy and unfavorable entropy, and ATP binding was characterized by favorable changes in enthalpy and entropy. The contribution of linked protonation events to the energetics of *MtCMK*:phosphoryl group acceptor binary complex formation suggested a net gain of protons. Values for the pK_a of a likely chemical group involved in proton exchange and for the intrinsic binding enthalpy were calculated. The Asp187 side chain of *MtCMK* is suggested as the likely candidate for the protonation event. Data on thermodynamics of binary complex formation were collected to evaluate the contribution of 2'-OH group to intermolecular interactions. The data are discussed in light of functional and structural comparisons between CMP/dCMP kinases and UMP/CMP ones.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Anexo F

Discovery of New Inhibitors of
Mycobacterium tuberculosis InhA Enzyme
using Virtual Screening and a 3D-
Pharmacophore-Based Approach

Ivani Pauli, Ricardo Santos, Diana C. Rostirolla,
Leonardo K. Martinelli, Rodrigo G. Ducati, Luís
Fernando Timmers, Luís A. Basso, Diógenes S.
Santos, Rafael Guido, Adriano Andricopulo, Osmar
N. de Souza

Artigo aceito para publicação no *Journal of
Chemical Information and Modeling*, 2013

Discovery of New Inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* InhA Enzyme using Virtual Screening and a 3D-Pharmacophore-Based Approach

Ivani Pauli, Ricardo N. Santos, Diana Carolina Rostirolla, Leonardo K. Martinelli, Rodrigo Gay Ducati, Luis Fernando Saraiva Macedo Timmers, Luiz Augusto Basso, Diogenes S. Santos, Rafael V. C. Guido, Adriano D. Andricopulo, and Osmar Norberto de Souza

J. Chem. Inf. Model., **Just Accepted Manuscript** • DOI: 10.1021/ci400202t • Publication Date (Web): 27 Jul 2013

Downloaded from <http://pubs.acs.org> on August 2, 2013

Just Accepted

"Just Accepted" manuscripts have been peer-reviewed and accepted for publication. They are posted online prior to technical editing, formatting for publication and author proofing. The American Chemical Society provides "Just Accepted" as a free service to the research community to expedite the dissemination of scientific material as soon as possible after acceptance. "Just Accepted" manuscripts appear in full in PDF format accompanied by an HTML abstract. "Just Accepted" manuscripts have been fully peer reviewed, but should not be considered the official version of record. They are accessible to all readers and citable by the Digital Object Identifier (DOI®). "Just Accepted" is an optional service offered to authors. Therefore, the "Just Accepted" Web site may not include all articles that will be published in the journal. After a manuscript is technically edited and formatted, it will be removed from the "Just Accepted" Web site and published as an ASAP article. Note that technical editing may introduce minor changes to the manuscript text and/or graphics which could affect content, and all legal disclaimers and ethical guidelines that apply to the journal pertain. ACS cannot be held responsible for errors or consequences arising from the use of information contained in these "Just Accepted" manuscripts.

Anexo G

Production of recombinant human annexin
V by fed-batch cultivation

Laura S. Marder, Diana C. Rostirolla, Guilherme O.
Petersen, José E. S. Nunes, Ana Paula de Souza,
Cristiano V. Bizarro, Jocelei M. Chies, Luiz A.
Basso, Diógenes S. Santos

Carta de submissão à revista *BMC Biotechnology*

Article title: Production of recombinant human annexin V by fed-batch cultivation
MS ID : 8824716761048909
Authors : Laura S Marder, Diana C. Rostirolla, Guilherme O Petersen, José E S Nunes, Ana Paula D de Souza, Cristiano V Bizarro, Jocelei M Chies, Luiz A Basso and Diógenes S Santos
Journal : BMC Biotechnology

Dear Prof Bizarro

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://www.biomedcentral.com/imedia/8824716761048909_article.pdf (1199K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1675702723104963_comment.pdf

If the PDF does not contain the comments which you uploaded, please upload the cover letter again, click "Continue" at the bottom of the page, and then proceed with the manuscript submission again. If the letter will not upload, please send a copy to toeditorial@biomedcentral.com.

The submitting author can check on the status of the manuscript at any time by logging into 'My BioMed Central' (<http://www.biomedcentral.com/my>).

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on editorial@biomedcentral.com. We would also welcome feedback about the online submission process.

Best wishes,

The BMC Biotechnology Editorial Team

Tel: +44 (0) 20 3192 2013
e-mail: editorial@biomedcentral.com
Web: <http://www.biomedcentral.com/>