

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA**

**A enzima  $\beta$ -cetoacil-PCA redutase de  
*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: mecanismos  
cinético, químico e cooperativo**

**Rafael Guimarães da Silva**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas: Bioquímica, da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
como pré-requisito para obtenção do grau de  
Doutor em Bioquímica

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso**

**Porto Alegre, 2008**

*Este trabalho é dedicado à Clarissa.*

Este trabalho foi realizado no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob orientação do Professor Luiz Augusto Basso.

## **Agradecimentos**

Ao Professor **Luiz A. Basso**, pela orientação.

Ao Professor **Diógenes S. Santos**, pelo apoio ao projeto.

A **Luiz Pedro S. de Carvalho**, pela colaboração e incentivo.

Ao Professor **John S. Blanchard**, pela colaboração.

Aos colegas **Isabel O. Fonseca, Eraldo L. Batista Jr, Bruna P. Selbach, Isabel C. R. Werlang, Rodrigo G. Ducati, Christopher Z. Schneider, Fernanda Ely, Leonardo A. Rosado e Ardala Breda**, pelo convívio e ensinamentos.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFRGS**, pela oportunidade de desenvolver o doutorado.

Ao **CNPq/MCT**, pela bolsa de doutorado.

# Índice

<b>Parte I</b> .....	1
Resumo .....	2
Abstract .....	3
Lista de Abreviaturas .....	4
Introdução .....	5
Objetivos .....	16
<b>Parte II</b> .....	17
Capítulo I .....	18
Capítulo II .....	19
<b>Parte III</b> .....	20
Discussão .....	21
Referências .....	36

# **PARTE I**

## Resumo

A enzima  $\beta$ -cetoacil-PCA redutase catalisa a redução, dependente de NADPH, de  $\beta$ -cetoacil-PCA, a segunda etapa do sistema tipo II de alongação de ácidos graxos em bactérias, plantas e organismos apicomplexos. No presente trabalho, utilizou-se acetoacetyl-CoA como substrato para caracterizar cineticamente a reação catalisada pela enzima de *Mycobacterium tuberculosis*, o agente etiológico da tuberculose. O mecanismo cinético da reação foi investigado pela análise de padrões de velocidade inicial, inibição por produtos e efeitos isotópicos primários cinéticos, e os resultados apontam para um mecanismo aleatório em estado estacionário. Efeitos isotópicos cinéticos primários,  $\alpha$ -secundários, de solvente e múltiplos, bem como estudos de pH e temperatura, ressonância magnética nuclear e variação dos efeitos isotópicos primários com o pH foram utilizados para determinar o mecanismo químico da reação, e a análise dos resultados sugere que as transferências de hidreto e próton e a re-hibridização dos substratos ocorrem de modo concertado. A interação entre NADPH e enzima foi estudada tanto em condições de equilíbrio quanto em estado pré-estacionário, monitorando-se o aumento na fluorescência do nucleotídeo ao ligar na proteína. Os dados coletados em equilíbrio sugerem a presença de cooperatividade homotrópica positiva entre as subunidades do dímero, e a análise dos dados cinéticos sugere duas formas de enzima livre em solução como base para a cooperatividade. Diálise em equilíbrio foi empregada para caracterizar a ligação de acetoacetyl-CoA à enzima, e os resultados indicam que não há cooperatividade na ligação deste substrato. Mecanismos cinético, químico e cooperativo para a reação catalisada pela  $\beta$ -cetoacil-PCA redutase de *M. tuberculosis* são propostos com base nos dados aqui apresentados.

## Abstract

The  $\beta$ -ketoacyl-ACP reductase enzyme catalyzes the NADPH-dependent reduction of  $\beta$ -ketoacyl-ACP, the second step of type II fatty acid elongation system of bacteria, plants, and apicomplexan organisms. In the present work, acetoacetyl-CoA was utilized as substrate to kinetically characterize the reaction catalyzed by the enzyme of *Mycobacterium tuberculosis*, the etiologic agent of tuberculosis. The reaction kinetic mechanism was investigated by analyzing initial velocity and product inhibition patterns, and primary kinetic isotope effects, and the results point to a random steady-state mechanism. Primary,  $\alpha$ -secondary, solvent, and multiple kinetic isotope effects, as well as pH and temperature studies, nuclear magnetic resonance, and pH variation of primary isotope effects were utilized to determine the reaction chemical mechanism, and analysis of the results suggests that hydride and proton transfer and substrate re-hybridization occur in a concerted fashion. Interaction between NADPH and enzyme was studied both in equilibrium and pre-steady-state conditions, by monitoring the enhancement in nucleotide fluorescence upon its binding to the enzyme. Data collected at equilibrium suggest the presence of positive homotropic cooperativity between subunits of the dimer, and analysis of kinetic data suggests two forms of free enzyme in solution as the basis for cooperativity. Equilibrium dialysis was employed to characterize the binding of acetoacetyl-CoA to the enzyme, and the results indicate there is no cooperativity in the binding of this substrate. Kinetic, chemical, and cooperative mechanisms for the *M. tuberculosis*  $\beta$ -ketoacyl-ACP reductase-catalyzed reaction are proposed on the basis of the data presented here.



## Lista de Abreviaturas

WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
MDR-TB	<i>M. tuberculosis</i> resistente a múltiplas drogas
XDR-TB	<i>M. tuberculosis</i> extensivamente resistentes a drogas
FAS I	Sistema tipo I de biossíntese de ácidos graxos
FAS II	Sistema tipo II de biossíntese de ácidos graxos
PCA	Proteína carreadora de acila
KasA/KasB	$\beta$ -Cetoacil-PCA sintase
MabA	$\beta$ -Cetoacil-PCA redutase
HadAB	$\beta$ -Hidroxiacil-PCA desidratase
InhA	2- <i>Trans</i> -enoil-PCA redutase
SDR	desidrogenases e redutases de cadeia curta
AcAcCoA	Acetoacetyl-CoA
$V$	Velocidade máxima
$K$	Constante de Michaelis
$k_{cat}$	Constante catalítica
$D, D_2O, \alpha-D V$	Efeito isotópico primário, de solvente ou $\alpha$ -secundário em $V$
$D, D_2O, \alpha-D V/K$	Efeito isotópico primário, de solvente ou $\alpha$ -secundário em $V/K$
$\alpha-D K_{eq}$	Efeito isotópico $\alpha$ -secundário na constante de equilíbrio
$K'$	Constante de dissociação média
$h$	Coeficiente de Hill
$k_{obs}$	Constante aparente de velocidade de associação

## Introdução

Febre, hemoptise, dispnéia e suores noturnos.

A vida inteira que podia ter sido e que não foi.

Tosse, tosse, tosse.

Mandou chamar o médico:

- Diga trinta e três.

- Trinta e três... trinta e três... trinta e três...

- Respire.

- O senhor tem uma escavação no pulmão esquerdo e o pulmão direito infiltrado.

- Então, doutor, não é possível tentar o pneumotórax?

- Não. A única coisa a fazer é tocar um tango argentino.

*Pneumotórax*, **Manuel Bandeira** (1886 – 1968).

O poema acima exemplifica a interpretação do poeta pernambucano Manuel Bandeira a respeito do que o diagnóstico da tuberculose representava: uma sentença de morte. Esta interpretação pode ser considerada um consenso até, aproximadamente, a metade do século XX, uma vez que as primeiras drogas efetivas no tratamento da tuberculose, como estreptomicina e isoniazida, surgiram, respectivamente, apenas no final da década de 1940 e no início da década de 1950 (Bernstein *et al.*, 1952; Bloom e Murray, 1992).

## Transmissão e patologia

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa causada, principalmente, pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis*. A progressão da infecção é fundamentalmente

regulada pelo sistema imunológico do hospedeiro, o qual pode mediar a eliminação do bacilo ou seu condicionamento à latência, ou falhar nessa tarefa e permitir o desenvolvimento da doença ativa (Ducati *et al.*, 2006). A doença é transmitida de um indivíduo para outro por gotículas de aerossol respiratório contendo o bacilo e, uma vez inaladas, estas gotículas atingem os pulmões do novo hospedeiro, onde o *M. tuberculosis* é fagocitado por macrófagos alveolares (Dunlap *et al.*, 2000).

A erosão bacteriana no interstício pulmonar gera um processo inflamatório local caracterizado por infiltração celular. Lesões teciduais acarretam a produção e secreção de aminas vasoativas e prostaglandinas, aumentando a permeabilidade capilar e promovendo o influxo de células de defesa, como monócitos e granulócitos. Formam-se, então, granulomas, e a agregação destes constitui o tubérculo característico da doença. Embora os pulmões sejam o sítio da infecção primária, alguns bacilos podem entrar na corrente sanguínea, alcançando diversos órgãos e tecidos onde a infecção pode-se estabelecer (Milburn, 2001).

### **Epidemiologia e tratamento**

A tuberculose permanece como o principal fator de mortalidade humana por um único agente infeccioso bacteriano. A interrupção de décadas de declínio nas taxas de casos da doença, a qual ocorreu em países desenvolvidos na década de 1980, deve-se, entre outras razões, à pandemia da síndrome da imunodeficiência adquirida, ao empobrecimento da população em grandes centros urbanos, à disseminação de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiplas drogas, à imigração nesses países a partir de áreas de alta prevalência de tuberculose e à degradação dos sistemas de saúde (Fätkenheuer *et al.*, 1999). Este

ressurgimento da doença levou a Organização Mundial da Saúde (WHO) a declarar a tuberculose como uma emergência de saúde global. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, não houve ressurgimento da tuberculose, visto que ela jamais deixou de ser um grave problema de saúde (Ruffino-Neto, 2002).

Atualmente, há taxas anuais de cerca 8,8 milhões de novos casos de tuberculose, levando a 1,7 milhões de mortes, 95% das quais ocorrendo em países em desenvolvimento (Ducati *et al.*, 2006). Estima-se, ainda, que aproximadamente 2 bilhões de pessoas estejam infectadas com a forma latente do bacilo, podendo desenvolver a doença ativa caso seu sistema imunológico seja comprometido (Dye *et al.*, 1999).

O tratamento contra tuberculose requer a administração, por 2 meses, de isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol ou estreptomicina, conhecidas como drogas de primeira linha, seguida de 4 meses adicionais de administração de isoniazida e rifampicina (Mitchison, 1985). O tratamento, além de longo, acarreta severos efeitos colaterais, levando, freqüentemente, à desistência do tratamento por parte do paciente (Sharma, 2004) e contribuindo, assim, para a seleção e proliferação de cepas resistentes a múltiplas drogas (MDR-TB), definidas como resistentes a, pelo menos, isoniazida e rifampicina (Stockstad, 2000). Além disso, têm sido reportados, recentemente, casos de tuberculose causada por cepas extensivamente resistentes a drogas (XDR-TB), definidas como resistentes a isoniazida, rifampicina, qualquer droga da classe das fluoroquinolonas e a, pelo menos, uma de três drogas injetáveis de segunda linha, capreomicina, canamicina e amicacina (CDC, 2006). Estas cepas apresentam uma ampla distribuição geográfica e uma taxa de fatalidade sem precedentes (Dorman e Chaisson, 2007; Singh, Upshur e Padayatchi, 2007).

Frente a esse quadro extremamente preocupante sobre a incidência de tuberculose, especialmente em países em desenvolvimento, agravado ainda pela proliferação de cepas

resistentes a múltiplas drogas, fazem-se necessárias, e urgentes, abordagens as quais visem ao desenvolvimento de novas drogas, potentes e mais específicas, contra o principal agente etiológico da doença, o *M. tuberculosis*. Conseqüentemente, a identificação e caracterização de alvos moleculares do bacilo, cujas funções tais drogas devam inibir, é de primordial importância para o estabelecimento de novas terapias para a tuberculose.

### ***Mycobacterium tuberculosis***

O *M. tuberculosis* é uma bactéria em forma de bastão, fracamente Gram-positiva e obrigatoriamente aeróbica, cujas condições ótimas de sobrevivência compreendem um ambiente com pressão de O<sub>2</sub> de 100 a 140 mm Hg, 5% de CO<sub>2</sub> e pH próximo do neutro (Grosset, 1980). As dimensões do bacilo variam de 0,3 a 0,6 µm e de 1,0 a 4,0 µm, respectivamente, em seus eixos mais curto e mais longo. Esta espécie de bactéria é um parasita intracelular de macrófagos, possui um envelope celular bastante complexo e apresenta um tempo de geração relativamente elevado, dividindo-se, aproximadamente, a cada 24 horas, tanto em meios de cultura sintéticos quanto em animais (Cole *et al.*, 1998).

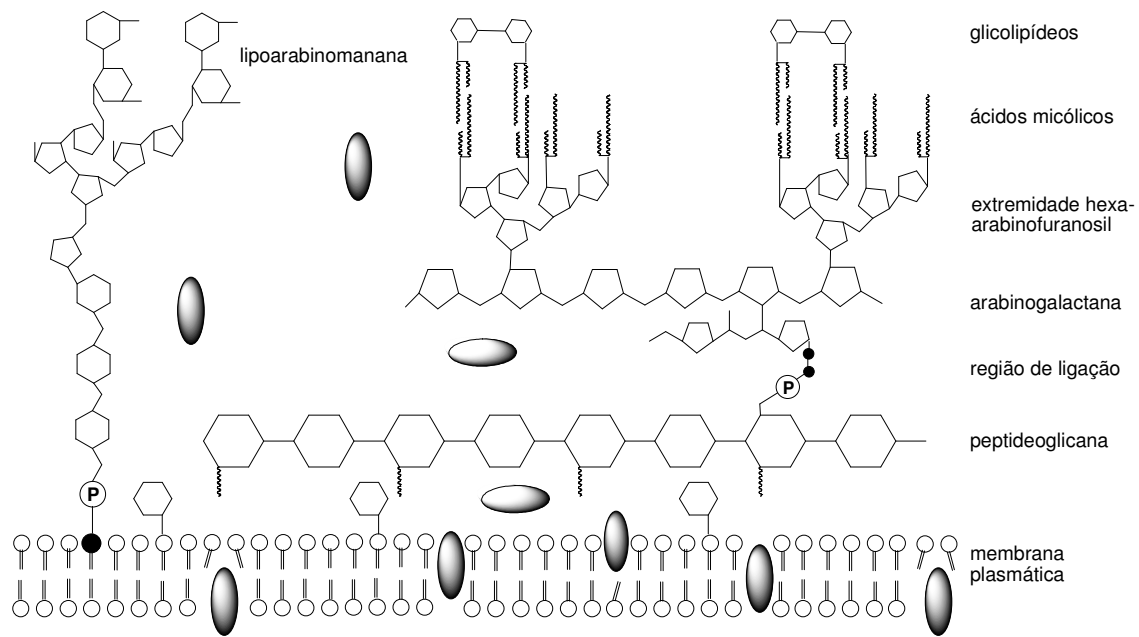
Em 1998, foi publicado o seqüenciamento completo do cromossomo de *M. tuberculosis* H37Rv, sendo esta cepa escolhida por apresentar suscetibilidade a drogas e à manipulação genética, bem como por reter sua total virulência em modelos animais (Cole *et al.*, 1998). O DNA cromossômico do bacilo é composto por 4.411.529 pares de nucleotídeos e apresenta um alto conteúdo de nucleotídeos de guanina e citosina de cerca de 65%. Um dos aspectos mais peculiares do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv é o fato de que mais de 50% dos genes identificados codificam enzimas relacionadas à lipólise, provavelmente para a sobrevivência do bacilo dentro do macrófago, e à lipogênese,

principalmente de lipídeos constituintes da parede celular (Cole *et al.*, 1998). O seqüenciamento do cromossomo de *M. tuberculosis* H37Rv não apenas propiciou uma ferramenta importante para a investigação da biologia do bacilo, como inaugurou uma nova e importante fase na luta contra a tuberculose (Young, 1998).

### **Envelope celular e ácidos micólicos**

O envelope celular das micobactérias é bastante incomum se comparado com o envelope de outras bactérias, e seu conteúdo total de lipídeos (por massa) ultrapassa 60 %. Há, por exemplo, uma estrutura de glicolipídeos, a lipoarabinomanana, ancorada à membrana plasmática por um domínio fosfatidilinositol-diacilglicerol. Esta estrutura desempenha funções biológicas relevantes para a patogenicidade, como a inibição da ativação de linfócitos-T e macrófagos por interferon- $\gamma$  (Schroeder *et al.*, 2002). O esqueleto principal do envelope, contudo, consiste do revestimento da membrana plasmática por uma rígida camada de peptideoglicana, composta por uma cadeia de unidades repetitivas de ácido *N*-acetil- $\beta$ -D-glicosaminil-(1-4)-*N*-glicolilmurâmico, interligadas por cadeias peptídicas de L-alanil-D-isoglutaminil-*meso*-diaminopimelil-D-alanina. É importante notar que o ácido murâmico é *N*-glicolilado em micobactérias, enquanto em outras bactérias ele é *N*-acetilado, e esta *N*-glicolilação pode prover maior número de ligações de hidrogênio, aumentando a rigidez da estrutura de peptideoglicana. A camada de peptideoglicana é unida à de arabinogalactana por uma ligação fosfodiéster entre o ácido murâmico e um dissacarídeo ancorado à galactana. A extremidade da camada de arabinogalactana consiste de uma estrutura ramificada de hexa-arabinofuranosil, da qual grande parte está esterificada

a ácidos micólicos (Brennan e Nikaido, 1995), como representado esquematicamente na Figura 1.

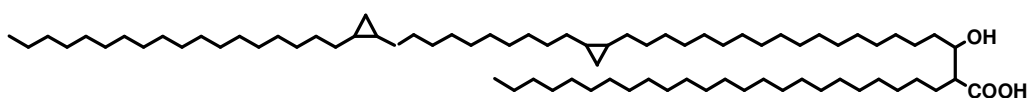


**Figura 1:** Representação esquemática da parede celular micobacteriana, evidenciando o esqueleto principal de peptidoglicana-arabinogalactana-ácidos micólicos, bem como a estrutura de lipoarabinomanana. Modificada a partir de Schroeder *et al.*, 2002.

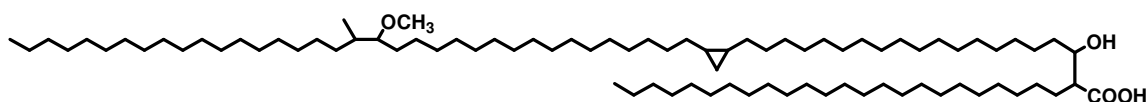
Ácidos micólicos são ácidos graxos  $\alpha$ -alquil e  $\beta$ -hidroxi, de alta massa molecular (de 70 a 90 carbonos), característicos do envelope celular de micobactérias. São lipídeos  $\alpha$ -ramificados, com uma cadeia curta de 20 a 26 carbonos, e outra longa, de 50 a 60 carbonos, classificados em três grupos, de acordo com as funções orgânicas presentes na cadeia

longa:  $\alpha$ -micolatos (ciclopropanações), metoximicolatos ( $\alpha$ -metil éteres) e cetomicolatos ( $\alpha$ -metilcetonas) (Figura 2). A identificação e a caracterização estrutural destes ácidos graxos têm sido realizadas, principalmente, por cromatografia de camada delgada, espectroscopia por infravermelho e ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e cromatografia gasosa pirolítica (Barry III *et al.*, 1998).

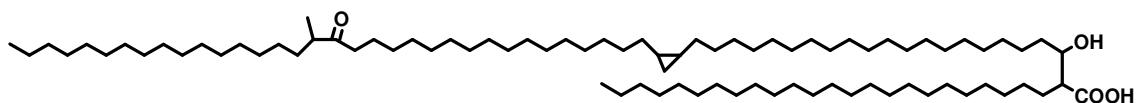
$\alpha$ -Micolatos



Metoximicolatos



Cetomicolatos



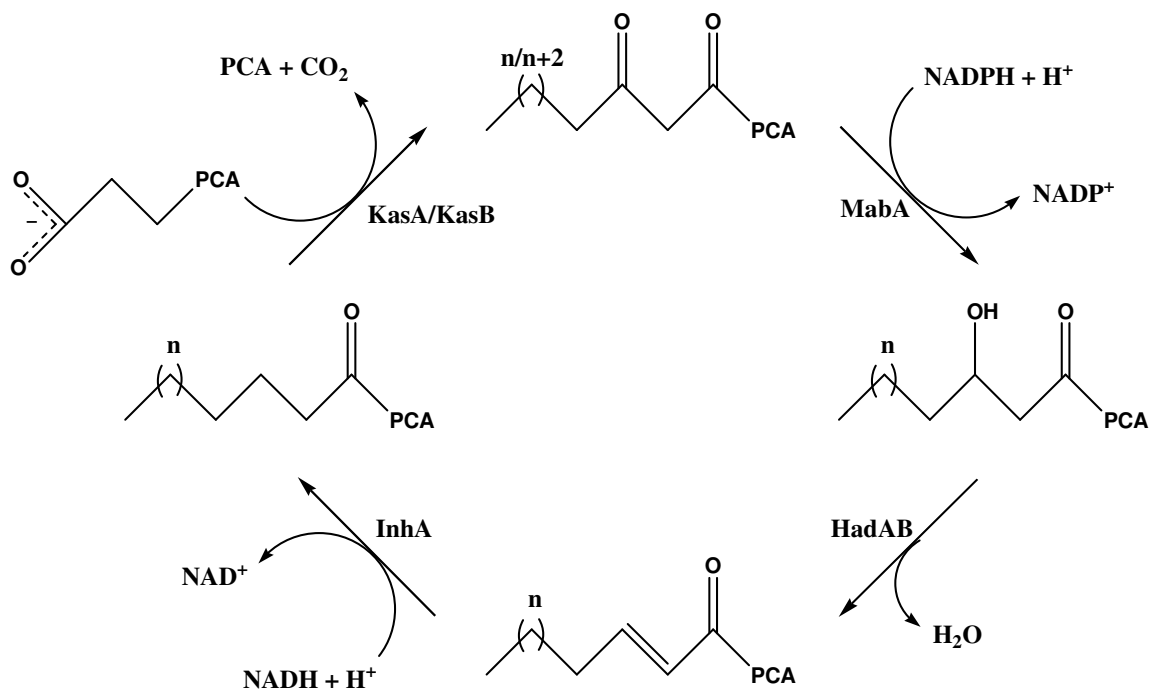
**Figura 2:** Estruturas de alguns ácidos micólicos identificados em *M. tuberculosis*. Os  $\alpha$ -micolatos são os mais abundantes (cerca de 57 %), seguidos por metoximicolatos (cerca de 32 %) e cetomicolatos (cerca de 11 %). Modificada a partir de Schroeder *et al.*, 2002.



Resistência a drogas, patogenicidade e capacidade de persistência do bacilo em macrófagos, estão entre as prováveis funções biológicas dos ácidos micólicos, e são dependentes tanto do comprimento da cadeia carbônica quanto do grupo funcional a ela incorporado (Schroeder *et al.*, 2002). Os ácidos micólicos e outros componentes da parede celular micobacteriana têm sido propostos como alvo no mecanismo de ação de drogas antigas utilizadas no tratamento da tuberculose (Brennan e Nikaido, 1995), e o estudo de vias metabólicas envolvidas na biossíntese dos ácidos micólicos tem sido proposto como passo importante para a identificação de potenciais alvos para o desenvolvimento de novas drogas contra a doença (Young, 1998).

### **Sistema tipo II de biossíntese de ácidos graxos**

O sistema tipo II de biossíntese de ácidos graxos (FAS II), presente em bactérias e plantas, no qual cada reação é catalisada por uma enzima distinta, constitui-se num alvo atraente para o desenvolvimento de drogas, uma vez que ele contrasta com o sistema tipo I (FAS I), presente em mamíferos, em que todas as reações são codificadas por uma única proteína com múltiplos domínios (Heath, White e Rock, 2001). Interessantemente, o *M. tuberculosis* possui os dois sistemas, e ambos geram precursores para a síntese de ácidos micólicos: enquanto o FAS I produz ácidos graxos de 24 a 26 carbonos, além dos produtos usuais de 16 e 18 carbonos, com a cadeia acílica ancorada à coenzima A, o FAS II promove a elongação dos produtos do FAS I, gerando lipídeos de 24 a 56 carbonos, os quais encontram-se ancorados à proteína carreadora de acila (PCA) (Brindley, Matsumura e Bloch, 1969; Bloch, 1975). As reações do FAS II estão esquematizadas na Figura 3.



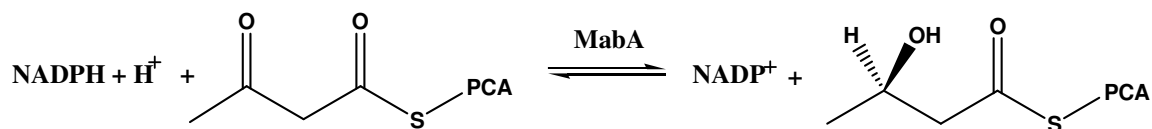
**Figura 3:** O sistema tipo II de biossíntese de ácidos graxos em *M. tuberculosis*, em que cada reação é catalisada por uma enzima distinta. A cada ciclo de quatro reações, dois carbonos são adicionados à cadeia crescente.

Como ilustrado acima, o FAS II catalisa a elongação de ácidos graxos provenientes do FAS I por meio de um ciclo de quatro reações, o qual se inicia com a adição de unidades de dois carbonos, providas pelo malonil-PCA, à cadeia acílica crescente, catalisada pelo complexo enzimático  $\beta$ -cetoacil-PCA sintase (KasA/KasB), gerando  $\beta$ -cetoacil-PCA, que, por sua vez, é reduzido a  $\beta$ -hidroxiacil-PCA pela enzima  $\beta$ -cetoacil-PCA redutase (MabA). O  $\beta$ -hidroxiacil-PCA é então convertido a 2-*trans*-enoil-PCA pela ação da  $\beta$ -hidroxiacil-PCA desidratase (HadAB). O último passo do ciclo é a redução de 2-*trans*-enoil-PCA, catalisada pela 2-*trans*-enoil-PCA redutase (InhA), a um ácido graxo com dois carbonos a

mais. O ciclo repete-se até que um ácido graxo saturado de tamanho adequado seja produzido (Oliveira *et al.*, 2007; Sacco *et al.*, 2007). É oportuno destacar que interações proteína-proteína entre enzimas do sistema FAS II e entre estas e as enzimas responsáveis pelas modificações introduzidas nos ácidos graxos são fundamentais para a biossíntese de ácidos micólicos em *M. tuberculosis* (Veyron-Churlet *et al.*, 2005).

### **$\beta$ -Cetoacil-PCA redutase**

A enzima de *M. tuberculosis*  $\beta$ -cetoacil-PCA redutase (MabA, EC 1.1.1.100), codificada pelo gene *mabA*, com 744 nucleotídeos, catalisa a segunda etapa do FAS II, a redução de  $\beta$ -cetoacil-PCA dependente de NADPH e H<sup>+</sup>, gerando  $\beta$ -hidroxiacil-PCA e NADP<sup>+</sup> (Banerjee *et al.*, 1998), como mostrado na Figura 4. Esta enzima demonstra uma grande preferência por NADPH em detrimento de NADH, bem como maior especificidade por cadeias longas de  $\beta$ -cetoacil, em concordância com sua função na biossíntese de precursores de ácidos micólicos. Observou-se ainda um equilíbrio entre formas dimérica e tetramérica da enzima em solução, com uma constante de dissociação de 22  $\mu$ M (Marrakchi *et al.*, 2002). Com 247 aminoácidos preditos em sua estrutura primária, a MabA é classificada como membro da família de desidrogenases e redutases de cadeia curta (SDR) (Oppermann *et al.*, 2003), e a determinação de sua estrutura cristalográfica, tanto na presença quanto na ausência de NADPH, revelou o dobramento de Rossmann para ligação de nucleotídeos e a possível tríade catalítica de serina, tirosina e lisina, característicos da família SDR (Cohen-Gonsaud *et al.*, 2002).



**Figura 4:** Reação catalisada pela  $\beta$ -cetoacil-PCA redutase. NADPH é a fonte de hidreto para a redução de  $\beta$ -cetoacil-PCA.

Recentemente, foi demonstrado que o gene *mabA* é essencial em *M. tuberculosis*, visto que sua inativação inviabiliza a sobrevivência do bacilo (Parish *et al.*, 2007). Esta observação, somada às diferenças estruturais entre o FAS II micobacteriano e o FAS I humano, torna a MabA um potencial alvo para o desenvolvimento de drogas contra a tuberculose, e a caracterização do mecanismo de ação desta enzima é um passo importante para alcançar este objetivo. Assim, o presente trabalho trata da investigação dos mecanismos cinético, químico e cooperativo da reação catalisada pela MabA, empregando acetoacetyl-CoA (AcAcCoA) como substrato.

## Objetivos

Os principais objetivos da linha de pesquisa na qual está inserido o presente trabalho são identificar e caracterizar potenciais alvos moleculares do bacilo causador da tuberculose e desenvolver drogas capazes de atuar nesses alvos. Como passo inicial nessa direção, o gene *mabA* de *M. tuberculosis* H37Rv foi clonado e expresso em *Escherichia coli*, como parte do trabalho de mestrado de Luiz Pedro Sório de Carvalho, realizado entre 2000 e 2001, sob orientação dos Professores Luiz A. Basso e Diógenes S. Santos.

Este trabalho é a continuação daquele iniciado em 2000 e tem como objetivos específicos elucidar os mecanismos cinético e químico da reação catalisada pela enzima  $\beta$ -cetoacil-PCA redutase de *M. tuberculosis* H37Rv, e caracterizar tanto a ligação em equilíbrio de NADPH e acetoacil-CoA à enzima, quanto a cinética de ligação em estado pré-estacionário de NADPH à mesma.

## **PARTE II**

## Capítulo I

“*Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) reductase: kinetic and chemical mechanisms”

Artigo publicado no periódico *Biochemistry* em 2006.

## Capítulo II

“*Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -ketoacyl-ACP reductase:  $\alpha$ -secondary kinetic isotope effects and kinetic and equilibrium mechanisms of substrate binding”

Artigo publicado no periódico *Archives of Biochemistry and Biophysics* em 2008.

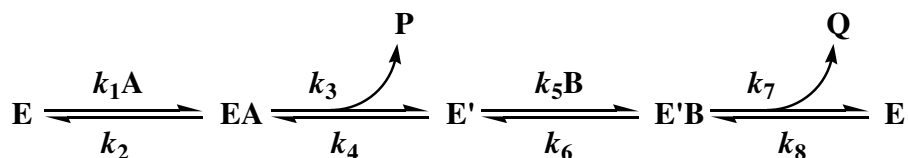


## **PARTE III**

## Discussão

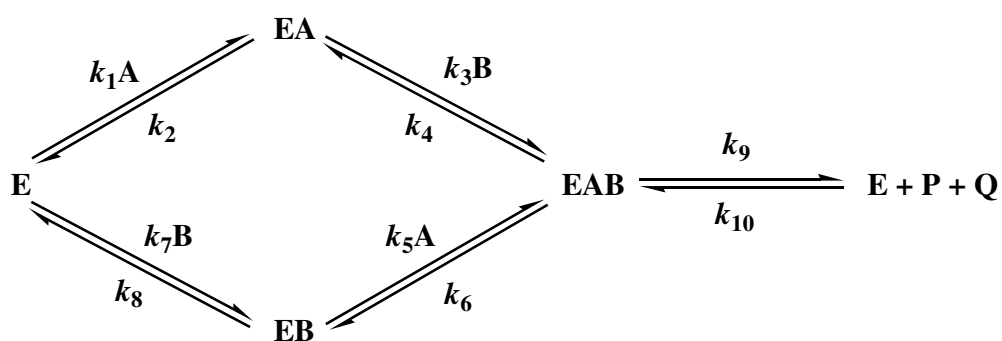
Os resultados que serão discutidos a seguir referem-se ao artigo do Capítulo I, intitulado “*Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) reductase: kinetic and chemical mechanisms”, o qual trata, em grande parte, da ordem de adição dos substratos à enzima. Torna-se apropriada, portanto, uma brevíssima recapitulação dos principais mecanismos cinéticos em catálise enzimática com dois ou mais substratos.

Os mecanismos são classificados em dois grupos principais, a substituição enzimática, ou *ping-pong*, e o seqüencial. No primeiro, um dos substratos liga-se a enzima e há formação e liberação de um dos produtos antes que o outro substrato seja adicionado. O segundo substrato liga-se então à enzima e o segundo produto é formado (Figura 5). Uma característica deste mecanismo é a modificação covalente da enzima, a qual ocorre após a adição do primeiro substrato. O mecanismo de ping-pong é freqüentemente observado em reações de transferência de grupamentos tais como fosfato e amina (Cleland, 1963a, Segel, 1975).



**Figura 5:** Mecanismo enzimático de ping-pong, onde E representa a enzima, A e B são substratos, P e Q são produtos, E' representa a forma covalentemente modificada da enzima e  $k_n$  ( $n = 1, 2, \dots, 8$ ) são constantes macroscópicas de velocidade.

No mecanismo seqüencial, há formação de um complexo ternário composto pela enzima e pelos dois substratos. Este mecanismo é subdividido em pelo menos quatro categorias, dependendo da ordem de adição dos substratos e das magnitudes relativas das constantes de velocidade (Figura 6). Nos mecanismos em equilíbrio rápido, a etapa contendo a transformação química é significativamente mais lenta que as etapas de ligação de substratos, enquanto que nos mecanismos em estado estacionário, o passo contendo a etapa química é, no mínimo, equivalente em magnitude aos passos de ligação de substratos. Estes mecanismos podem ser classificados em ordenados, quando há uma ordem compulsória de adição de substratos à enzima, ou em aleatórios, quando qualquer dos substratos pode ligar-se à enzima livre (Cleland, 1963a, Segel, 1975). A elucidação do mecanismo cinético é, geralmente, a primeira abordagem na investigação do mecanismo de ação de uma enzima (Cook e Cleland, 1981a).



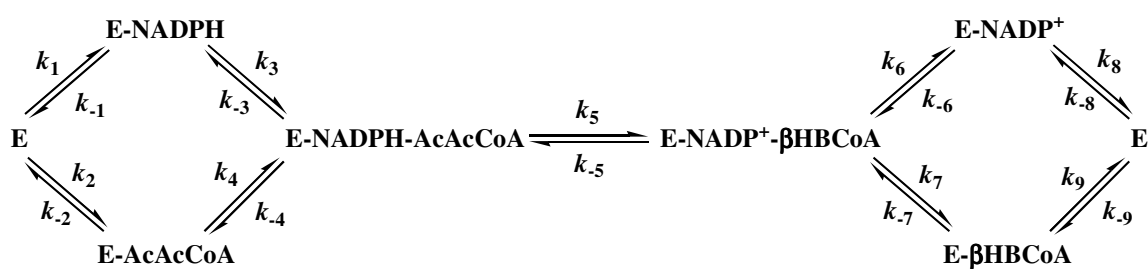
**Figura 6:** Mecanismos enzimáticos seqüenciais, onde E representa a enzima, A e B são substratos, P e Q são produtos e  $k_n$  são constantes macroscópicas de velocidade.

## Padrões de velocidade inicial e inibição por produtos

Para obter informações sobre a ordem de adição dos substratos à MabA, os padrões de velocidade inicial foram avaliados tanto para NADPH quanto para AcAcCoA como substratos de concentração variável (Figura 1, artigo). O conjunto de retas intersectáveis em ambos os gráficos de duplos recíprocos é consistente com um mecanismo seqüencial para a reação catalisada pela MabA, havendo formação de um complexo ternário MabA-NADPH-AcAcCoA. Caso o mecanismo fosse *ping-pong*, um dos gráficos deveria apresentar um conjunto de retas paralelas (Segel, 1975). Como as retas intersectam-se à esquerda do eixo das ordenadas nos dois gráficos, um mecanismo ordenado em equilíbrio rápido também pode ser descartado, uma vez que este mecanismo prediz que as retas deveriam intersectar-se sobre o eixo das ordenadas quando o segundo substrato a ligar-se à enzima fosse variado e o primeiro mantido a concentrações fixas e crescentes (Cleland, 1963a).

Os estudos de velocidade inicial com a MabA foram compatíveis com três mecanismos seqüenciais: aleatório em equilíbrio rápido, aleatório em estado estacionário e ordenado em estado estacionário. A análise dos padrões de inibição por produtos é capaz de diferenciar mecanismos cujas equações de velocidade sejam distintas (Cleland, 1963b), e, portanto, um estudo de inibição por produtos foi realizado com a MabA, utilizando NADP<sup>+</sup> e  $\beta$ -hidroxibutiril-CoA como inibidores (Tabela 1, artigo). Os dois produtos apresentaram inibição do tipo não-competitiva contra ambos os substratos, sugerindo um mecanismo aleatório em estado estacionário para a MabA, onde há formação de complexos binários do tipo MabA-NADPH e do tipo MabA-AcAcCoA, e a etapa que contém a etapa química não

é necessariamente determinante da velocidade da reação. A Figura 7 mostra a seqüência cinética proposta para esta reação.



**Figura 7:** Mecanismo cinético proposto para a enzima MabA.

### Efeitos isotópicos cinéticos primários de deutério

Para investigar os passos limitantes da velocidade, bem como a estereoquímica da transferência de hidreto, efeitos isotópicos cinéticos primários de deutério foram medidos utilizando-se NADPH deuterado na posição *pro-S* (Tabela 2, artigo). Pela magnitude dos efeitos isotópicos observados pode-se concluir que o hidrogênio *pro-S* da nicotinamida é transferido para a AcAcCoA, uma vez que efeitos isotópicos secundários, os quais ocorreriam se o hidrogênio *pro-R* fosse transferido, deveriam ser muito menores do que os observados com a MabA. Também é possível concluir que a transferência de hidreto é modestamente limitante da velocidade da reação, visto que os efeitos isotópicos, para ambos os substratos, na velocidade máxima ( $^D V$ ) são menores do que 2, o limite mínimo no

valor de efeitos isotópicos para que a etapa na qual eles reportam seja consideravelmente determinante da velocidade (Northrop, 1975).

Outra aplicação da análise de efeitos isotópicos cinéticos em enzimologia é a elucidação de mecanismos cinéticos pela avaliação da dependência dos efeitos isotópicos aparentes no parâmetro  $V/K$ , onde  $K$  é a constante de Michaelis, para um substrato com a variação do co-substrato. Sejam A e B, respectivamente, o primeiro e o segundo substratos adicionados à enzima,  $^D V/K_A$  decrescerá a 1 quando a concentração de B for saturante e  $^D V/K_B$  será independente da concentração de A, caso o mecanismo seja ordenado em estado estacionário. Se o mecanismo for aleatório em estado estacionário e A, ao ligar-se à enzima, reagir mais rapidamente do que, ou tão rapidamente quanto, ele se dissocia da mesma,  $^D V/K_A$  decrescerá a um valor maior do que 1 quando a concentração de B atingir níveis saturantes, enquanto que  $^D V/K_B$  não variará com a concentração de A se B, ao ligar-se à enzima, reagir mais rapidamente do que, ou tão rapidamente quanto, ele se dissocia da mesma (Cook e Cleland, 1981a). Os resultados obtidos com a MabA (Figura 2, artigo) indicam um mecanismo aleatório em estado estacionário, confirmando os resultados de inibição por produtos e o modelo mostrado na Figura 7. Além disso, pode-se sugerir que a AcAcCoA, uma vez ligada à MabA, reage para formar produtos com uma velocidade mínima igual a sua velocidade de dissociação da enzima.

### **Efeitos isotópicos cinéticos de solvente e inventário de prótons**

Na tentativa de examinar a contribuição da transferência de prótons na composição da etapa limitante da velocidade, efeitos isotópicos cinéticos de solvente foram medidos empregando-se  $D_2O$  como meio reacional (Figura 3, artigo). Os resultados (Tabela 2,

artigo) indicam que pelo menos uma protonação é parcialmente limitante da velocidade, e, considerando-se adições nucleofílicas a carbonos carbonílicos, valores de  $^{D_2O}V$  maiores do que 2, como obtidos para a MabA, geralmente sugerem mecanismos concertados (Klinman, 1978).

Com o intuito de inferir o número de prótons transferidos durante a etapa sensível ao efeito isotópico de solvente, um inventário de prótons foi realizado em  $V$ , medindo-se a velocidade da reação em frações molares distintas de  $D_2O$ . A relação linear observada (inserção na Figura 3A, artigo) indica que a transferência de apenas um próton origina o efeito isotópico de solvente (Quinn e Sutton, 1991).

### **Perfis de pH e temperatura**

A presença de catálise acido-base na reação foi investigada pela análise dos perfis de variação de parâmetros cinéticos em função de pH medindo-se a constante catalítica ( $k_{cat}$ ) e as constantes de especificidade ( $k_{cat}/K$ ). Os resultados (Figura 4, artigo) são compatíveis com a condição de que um único resíduo de aminoácido esteja protonado para que tanto a atividade quanto a ligação de AcAcCoA sejam mantidas. Além disso, o perfil de  $k_{cat}/K_{NADPH}$  sugere que um resíduo deva estar protonado e o fosfato-2' do nucleotídeo, desprotonado, para que a ligação de NADPH seja eficaz. Os valores de  $pK$  aparentes calculados não permitem identificar sem ambigüidade quais resíduos de aminoácidos estão desempenhando as funções supracitadas.

Para determinar a energia de ativação da reação catalisada pela MabA, averiguou-se a dependência de  $k_{cat}$  com a temperatura, construindo-se um gráfico de Arrhenius (Figura 5,

artigo). Uma energia de ativação de  $9,0 \text{ kcal mol}^{-1}$  foi obtida, a qual, provavelmente, está associada, em grande parte, a etapas que não a etapa química. A linearidade do gráfico também indica que a etapa determinante da velocidade não muda dentro da faixa de temperatura testada.

### **Regioquímica da transferência de hidreto**

Para testar a possibilidade de que o hidreto fosse adicionado ao carbono 2 da AcAcCoA, havendo uma redução indireta do carbono 3, o que poderia ocorrer caso o substrato passível de redução estivesse em sua forma enólica, uma análise por ressonância magnética nuclear foi realizada com o produto reacional  $\beta$ -hidroxibutiril-CoA, gerado ou na presença de NADPH ou na presença de  $[4S\text{-}^2\text{H}]\text{-NADPH}$ . Os resultados obtidos (Figura 6, artigo) apontam para a adição de hidreto diretamente ao carbono 3 da AcAcCoA. É importante salientar que este experimento foi idealizado, desenvolvido e analisado pelo Dr. Luiz Pedro S. de Carvalho e pelo Dr. John S. Blanchard, do Departamento de Bioquímica do Albert Einstein College of Medicine, em Nova Iorque, os quais foram colaboradores neste trabalho.

### **Efeitos isotópicos cinéticos múltiplos**

Com o intuito de distinguir o mecanismo químico da reação entre concertado e por etapas (com intermediário), efeitos isotópicos cinéticos de solvente foram determinados utilizando-se NADPH deuterado na posição pro-S. Considerando-se que o efeito isotópico



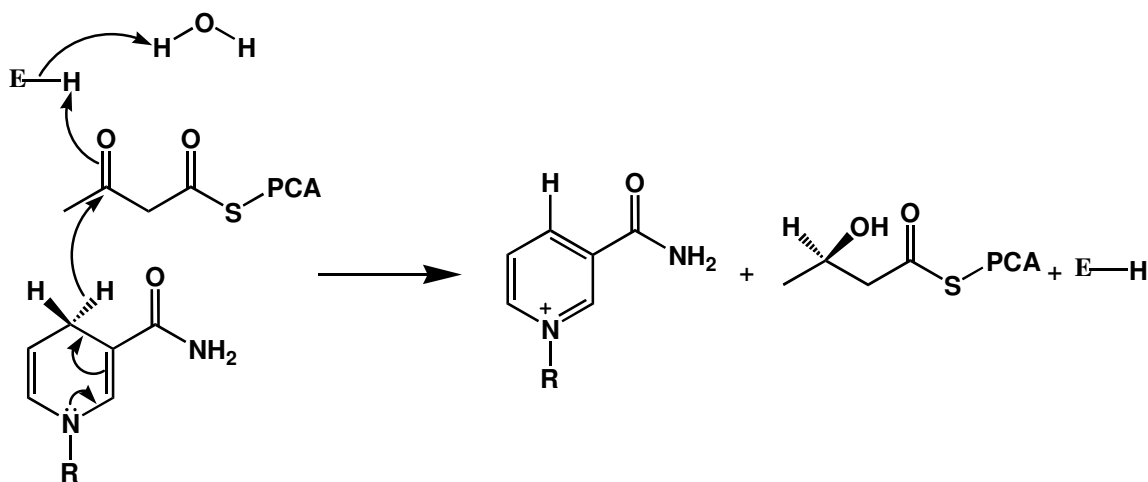
cinético primário é expresso apenas na transferência de hidreto e assumindo-se empiricamente que o efeito isotópico cinético de solvente reporta apenas na protonação do possível alcóxido, o uso de  $[4S\text{-}^2\text{H}]\text{-NADPH}$  deveria diminuir a velocidade apenas da transferência de hidreto. Se tanto transferência de hidreto quanto de próton ocorrem na mesma etapa, a velocidade de protonação será indiretamente diminuída com o uso de NADPH deuterado, e o efeito isotópico de solvente será maior. Por outro lado, se hidreto e próton são transferidos em passos distintos, a etapa de protonação será agora menos limitante da velocidade, e o efeito isotópico de solvente será menor (Hermes *et al.*, 1982).

Os resultados com a MabA (inserção na Figura 3B, artigo) não foram esclarecedores com relação à presença de intermediários de reação, uma vez que o efeito isotópico em  $V/K$  diminuiu, tornando-se inverso, o que apontaria para um mecanismo por etapas, e o efeito em  $V$  permaneceu inalterado, dentro do erro experimental, sugerindo um mecanismo concertado (Tabela 2, artigo). A origem do efeito isotópico de solvente inverso observado para a MabA com  $[4S\text{-}^2\text{H}]\text{-NADPH}$  não é clara. Entre as principais possibilidades está a existência de um efeito isotópico inverso de equilíbrio, possivelmente reportando em alguma mudança de conformação da enzima antes da etapa catalítica.

### **Variação dos efeitos isotópicos cinéticos primários com o pH**

Como a investigação do mecanismo químico da reação catalisada pela MabA pela análise de efeitos isotópicos múltiplos gerou conclusões contraditórias, efeitos isotópicos primários foram determinados em um pH onde a transferência de prótons é mais limitante da velocidade (pH 10.0). Novamente, a teoria prediz que os efeitos isotópicos primários deveriam aumentar neste pH caso as transferências de próton e hidreto façam parte da

mesma etapa, uma vez que a protonação tornar-se-ia mais limitante em pH básico, e ambos os efeitos, em  $V/K$  e  $V$ , seriam iguais. Se a reação ocorrer por etapas, os efeitos isotópicos primários iriam diminuir, visto que a transferência de hidreto seria menos limitante da velocidade (Cook e Cleland, 1981b; Cook e Cleland, 1981c). Os resultados com a MabA (Figura 7, artigo) estão de acordo com a primeira hipótese (Tabela 2, artigo) indicando que o passo dependente de pH e o passo sensível à substituição isotópica são o mesmo, o que pode ser interpretado como um mecanismo concertado se for assumido que a etapa dependente de pH corresponde à protonação do substrato acílico. Esta proposição é ilustrada na Figura 8, respeitando os perfis de pH e a regioquímica de transferência de hidreto.



**Figura 8:** Mecanismo químico proposto para a reação catalisada pela MabA.

Os resultados discutidos a seguir referem-se ao artigo do Capítulo 2, intitulado “*Mycobacterium tuberculosis*  $\beta$ -ketoacyl-ACP reductase:  $\alpha$ -secondary kinetic isotope effects and kinetic and equilibrium mechanisms of substrate binding”. Este trabalho aprofunda a análise do mecanismo químico da reação pela determinação de efeitos isotópicos  $\alpha$ -secundários e investiga o modo de ligação dos substratos à enzima.

### **Purificação da enzima**

Com o objetivo de melhorar o rendimento obtido na purificação da enzima, um novo protocolo foi estabelecido, empregando-se três passos cromatográficos: afinidade, exclusão por tamanho e troca catiônica. Este protocolo permitiu um aumento de 25 % na quantidade de proteína purificada por grama de célula em comparação com o protocolo anterior, descrito no primeiro artigo, e sua atividade específica manteve-se a mesma.

### **Efeitos isotópicos cinéticos $\alpha$ -secundários de deutério**

Almejando a investigar a contribuição da mudança de hibridização de  $sp^3$  para  $sp^2$  no carbono 4 da porção nicotinamida do NADPH para a determinação da velocidade da reação, efeitos isotópicos  $\alpha$ -secundários foram medidos utilizando-se  $[4R\text{-}^2\text{H}]\text{-NADPH}$  (Figura 2A, artigo), e os resultados (Tabela 1, artigo) sugerem que a re-hibridização contribui pouquíssimo para limitar a velocidade reacional. Os valores para efeitos isotópicos cinéticos  $\alpha$ -secundários de deutério normais geralmente variam de 1,0 ao efeito isotópico de equilíbrio ( $^{\alpha\text{-D}}K_{\text{eq}}$ ), o qual é 1,13 para redução de NADPH. Os valores normais

encontrados para a MabA também sugerem que a ligação entre o carbono 4 e o hidrogênio pro-*R* encontra-se menos restrita no estado de transição do que no reagente (Cleland, 1995).

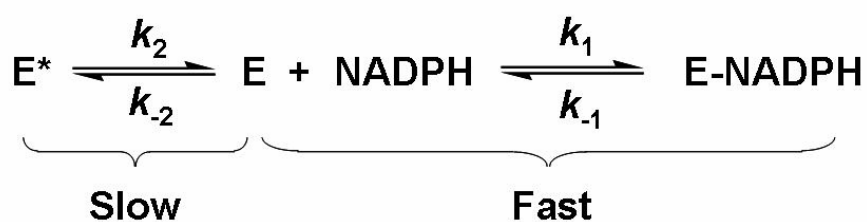
Com o intuito de observar uma expressão mais pronunciada dos efeitos isotópicos cinéticos  $\alpha$ -secundários, os dados foram coletados em pH 10,0 (Figura 2B), e o aumento dos efeitos isotópicos para ambos os substratos (Tabela 1, artigo) para um valor igual, dentro do erro experimental, sugere que a etapa sensível ao pH é a mesma sensível à substituição isotópica (Cook e Cleland, 1981b). Estes resultados estão de acordo com a variação dos efeitos isotópicos primários com o pH, discutida acima.

#### **Associação em equilíbrio entre NADPH e MabA dimérica**

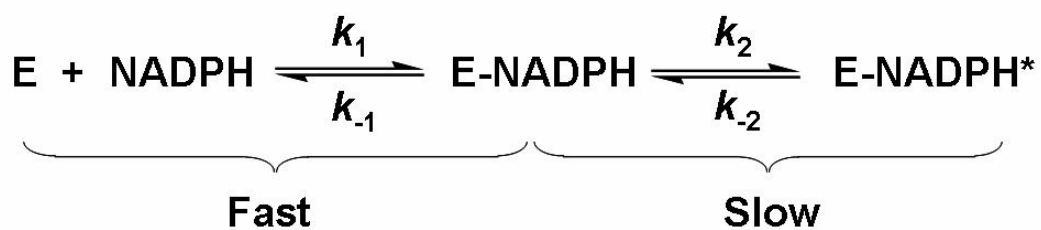
O aumento da fluorescência do nucleotídeo, resultante de sua ligação à forma dimérica da enzima, foi monitorado para estudar a formação do complexo binário MabA-NADPH em equilíbrio. Os resultados (Figura 3, artigo) apontam claramente para a existência de acentuada cooperatividade homotrópica positiva na formação do complexo binário MabA-NADPH, uma vez que o valor do coeficiente de Hill (*h*) (Tabela 2, artigo) é o maior possível para um dímero.

Dados em equilíbrio sugerindo cooperatividade positiva são consistentes tanto com o mecanismo concertado, ou modelo de simetria, onde há dois isômeros da enzima livre em solução, E e E\*, e o substrato liga-se efetivamente apenas a E (Monod, Wyman e Changeaux, 1965), quanto com o mecanismo seqüencial, ou ajuste induzido, no qual há somente uma forma de enzima livre em solução, o substrato liga-se a uma das subunidades e desencadeia uma isomerização que aumenta a afinidade da segunda subunidade pela

próxima molécula de substrato (Koshland, Némethy e Filmer, 1966). Estes dois mecanismos estão representados na Figura 9 e na Figura 10, respectivamente, e sua diferenciação experimental será tratada adiante.



**Figura 9:** Mecanismo concertado ou modelo de simetria, onde a isomerização entre as duas formas de enzima livre, E e E\*, é a etapa lenta, e  $k_n$  são constantes microscópicas de velocidade.



**Figura 10:** Mecanismo seqüencial, ou ajuste induzido, onde a isomerização do complexo binário é a etapa lenta. E representa a enzima, e  $k_n$  são constantes microscópicas de velocidade.

### **Associação em equilíbrio entre AcAcCoA e MabA dimérica**

Não foi possível empregar espectroscopia de fluorescência para monitorar a associação em equilíbrio entre AcAcCoA e a forma dimérica da enzima, pois o substrato gerou um efeito de filtro interno bastante elevado nos comprimentos de onda utilizados para a excitação. Assim, diálise em equilíbrio foi utilizada com tal objetivo, e os resultados (Figura 5, artigo) sugerem que não há cooperatividade, positiva ou negativa, na formação do complexo binário MabA-AcAcCoA.

### **Interação entre substratos e MabA monomérica**

Ressonância plasmônica de superfície foi utilizada para monitorar a ligação dos substratos à forma monomérica da MabA (Figura 6, artigo). A enzima foi covalentemente imobilizada em uma superfície sólida, e a subunidade não covalentemente ligada foi removida sob fluxo constante de tampão. Como esperado, houve abolição da cooperatividade na ligação de NADPH, uma vez que há somente um sítio de ligação por subunidade (Cohen-Gonsaud *et al.*, 2005). O efeito nas constantes de dissociação em equilíbrio para os dois substratos foi significativo, porém pequeno, sugerindo que a afinidade das formas dimérica e monomérica de MabA pelos substratos é semelhante. Como um todo, os estudos de ligação corroboram o mecanismo aleatório proposto para a MabA, visto que os dois substratos são capazes de ligar-se independentemente à enzima, uma premissa deste mecanismo.

## **Cinética em estado pré-estacionário da formação do complexo MabA-NADPH**

Para distinguir entre os mecanismos concertado e sequencial propostos para cooperatividade positiva, a velocidade de ligação de NADPH à MabA foi medida durante sua aproximação ao estado estacionário, monitorando-se a taxa de aumento da fluorescência do nucleotídeo resultante de sua associação com a enzima na forma dimérica (Figura 7, artigo). A teoria prediz que a constante aparente de velocidade de associação ( $k_{obs}$ ) deve diminuir com o aumento da concentração de substrato caso haja duas formas de enzima livre em solução, pois quando E satura-se com substrato, a conversão de  $E^*$  para E passa a limitar o valor de  $k_{obs}$ . Por outro lado,  $k_{obs}$  aumenta hiperbolicamente com a concentração de substrato se houver uma forma de enzima livre em solução e uma isomerização do complexo binário limitando o valor de  $k_{obs}$  (Nakatami e Hiromi, 1980). Os resultados com a MabA (Figura 8, artigo) estão de acordo com a primeira hipótese, sugerindo que a interação entre NADPH e MabA segue o mecanismo concertado, ou modelo de simetria, proposto na Figura 9.

A análise das amplitudes do sinal de fluorescência (inserção na Figura 8, artigo) permitiu a obtenção de um valor para a constante de dissociação média ( $K'$ ) do complexo MabA-NADPH em estreito acordo com o valor obtido em equilíbrio e com o valor calculado para a constante global de dissociação (Tabela 2, artigo), cuja dedução é descrita no artigo, indicando que não há passos adicionais no mecanismo representado na Figura 9.

Os resultados aqui interpretados permitiram a proposição de mecanismos cinético e químico para a reação catalisada pela MabA, bem como um modelo para a ligação de NADPH à enzima. Além de contribuir para a expansão do conhecimento sobre a bioquímica de *M. tuberculosis*, estes resultados serão úteis para o desenho de inibidores da

atividade desta enzima, a qual é proposta como um importante alvo para o desenvolvimento de drogas contra a tuberculose.

Este trabalho representa um passo importante para a elucidação do modo de ação da MabA, porém deixa para ser ainda investigados aspectos fundamentais da reação e do comportamento químico da enzima. Por exemplo, o mecanismo catalítico da MabA pode ser estudado pela análise de formas mutantes da mesma, as quais podem ser obtidas por mutagênese direcionada ao sítio, permitindo assim a atribuição de funções específicas a resíduos de aminoácidos do sítio ativo. Além disso, a clonagem, expressão e purificação da proteína carreadora de acila de *M. tuberculosis* H37Rv seria uma etapa essencial para a caracterização da interação desta com a MabA, o que representaria uma oportunidade de inferir sobre o comportamento da enzima em um ambiente mais próximo daquele encontrado na célula.



## Referências

- BANERJEE A., SUGANTINO M., SACCHETTINI J. C., JACOBS JR. W. R. (1998) The *mabA* gene from the *inhA* operon of *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3-ketoacyl reductase that fails to confer isoniazid resistance, *Microbiology* 144, 2697-2707
- BARRY III C. E., LEE R. R., MDLULI K., SAMPSON A. E., SCHROEDER B. G., SLAYDEN R. A., YUAN Y. (1998) Mycolic acids: structure, biosynthesis, and physiological functions, *Prog. Lipid Res.* 37, 143-179
- BERNSTEIN J., LOTT W. A., STEINBERG B. S., YALE H. L. (1952) Chemotherapy of experimental tuberculosis. V. Isonicotinic acid hydrazide (nydrazide) and related compounds, *Am. Rev. Tuberc.* 65, 357-364
- BLOCH K. (1975) Fatty acid synthases from *Mycobacterium phlei*, *Methods Enzymol.* 35, 84-90
- BLOOM B. R., MURRAY C. J. L. (1992) Tuberculosis: commentary on a reemergent killer, *Science* 257, 1055-1064
- BRENNAN P. J., NIKAIDO H. (1995) The envelope of mycobacteria, *Annu. Rev. Biochem.* 64, 29-63

BRINDLEY D. N., MATSUMURA S., BLOCH K. (1969) *Mycobacterium phlei* fatty acid synthetase: a bacterial multienzyme complex, *Nature* 224, 666-669

CENTER FOR DISEASE CONTROL (2006) Notice to readers: revised definition of extensively Drug-resistant tuberculosis, *MMWR* 55, 1176-1177

CLELAND W. W. (1963a) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations, *Biochim. Biophys. Acta* 167, 104-137

CLELAND W. W. (1963b) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection, *Biochim. Biophys. Acta* 67, 188-196

CLELAND W. W. (1995) Isotope effects: determination of enzyme transition state structure, *Methods Enzymol.* 249, 341-373

COHEN-GONSAUD M., DUCASSE-CABANOT S., HOH F., ZERBIB D., LABESSE G., QUÉMARD A. (2002) Crystal structure of MabA from *Mycobacterium tuberculosis*, a reductase involved in long-chain fatty acid biosynthesis, *J. Mol. Biol.* 320, 249-261

COHEN-GONSAUD M., DUCASSE-CABANOT S., QUÉMARD A., LABESSE G.

(2005) Ligand-induced fit in mycobacterial MabA: the sequence-specific C-terminus locks the conformational change, *Protein* 60, 392-400

COLE S. T., BROSCHE R., PARKHILL J., GARNIER T., CHURCHER C., HARRIS D., GORDON S. V., EIGLMEIER K., GAS S., BARRY C. E., TEKAIA F., BADCOCK K., BASHAM D., BROWN D., CHILLINGWORTH T., CONNOR R., DAVIES R., DEVLIN K., FELTWELL T., GENTLES S., HAMLIN N., HOLROYD S., HORNSBY T., JAGELS K., KROGH A., MCLEAN J., MOULE S., MURPHY L., OLIVER K., OSBORNE J., QUAIL M. A., RAJANDREAM M. A., ROGERS J., RUTTER S., SEEGER K., SKELTON J., SQUARES R., SQUARES S., SULSTON J. E., TAYLOR K., WHITEHEAD S., BARREL B. G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature* 393, 537-544

COOK P. F., CLELAND W. W. (1981a) Mechanistic deductions from isotope effects in multireactant enzyme mechanisms, *Biochemistry* 20, 1790-1796

COOK P. F., CLELAND W. W. (1981b) pH variation of isotope effects in enzyme-catalyzed reactions. 1. Isotope- and pH-dependent steps the same, *Biochemistry* 20, 1797-1805

- COOK P. F., CLELAND W. W. (1981c) pH variation of isotope effects in enzyme-catalyzed reactions. 2. Isotope-dependent step not pH-dependent. Kinetic mechanism of alcohol dehydrogenase, *Biochemistry* 20, 1805-1816
- DORMAN S. E., CHAISSON R. E. (2007) From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis, *Nature Med.* 13, 295-298
- DUCATI R. G., RUFFINO-NETTO A., BASSO L. A., SANTOS D. S. (2006) The resumption of consumption, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 697-714
- DUNLAP N. E., BASS J., FUJIWARA P., HOPEWELL P., HORSBURGH JR. C. R., SLAFINGER M., SIMONE P. M. (2000) Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and Children, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 161, 1376-1395
- DYE C., SCHEELE S., DOLIN P., PATHANIA V., RAVIGLIONE M. C. (1999) Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project, *JAMA* 282, 677-686
- FÄTKENHEUER G., TAELEMAN H., LEPAGE P., SCHWENK A., WENZEL R. (1999) The return of tuberculosis, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 139-146

GROSSET J. (1980) Bacteriologic basis of short-course chemotherapy for tuberculosis, *Clin. Chest Med.* 1, 231-241

HEATH R. J., WHITE S. W., ROCK C. O. (2001) Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents, *Prog. Lipid Res.* 40, 467-497

HERMES J. D., ROESKE C. A., O'LEARY M. H., CLELAND W. W. (1982) Use of multiple isotope effects to determine enzyme mechanisms and intrinsic isotope effects. Malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Biochemistry* 21, 5106-5114

KLINMAN J. P. (1978) Kinetic isotope effects in enzymology, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 46, 415-494

KOSHLAND D. E., NÉMETHY G., FILMER D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits, *Biochemistry* 5, 365-385

MARRAKCHI H., DUCASSE-CABANOT S., LABESSE G., MONTROZIER H., MARGEAT E., EMORINE L., CHARPENTIER X., MAMADOU D., QUÉMARD A. (2002) MabA (FabG1), a *Mycobacterium tuberculosis* protein involved in the long-chain fatty acid elongation system FAS-II, *Microbiology* 148, 951-960

MILBURN H. J. (2001) Primary tuberculosis, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 7, 133-141

MITCHISON D. A. (1985) The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy, *Tubercle* 66, 219-225

MONOD J., WYMAN J., CHANGEUX J. P. (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model, *J. Mol. Biol.* 12, 88-118

NAKATANI H., HIROMI K. (1980) Analysis of signal amplitude in stopped-flow method for enzyme-ligand systems, *J. Biochem.* 87, 1805-1810

NORTHROP D. B. (1975) Steady-state analysis of kinetic isotope effects in enzymic reactions, *Biochemistry* 14, 2644-2651

OLIVEIRA J. S., VASCONCELOS I. B., MOREIRA I. S., SANTOS D. S., BASSO L. A. (2007) Enoyl reductases as targets for the development of anti-tubercular and anti-malarial agents, *Curr. Drug Targets* 8, 399-411

OPPERMANN U., FILLING C., HULT M., SHAFQAT N., WU X., LINDH M., SHAFQAT J., NORDLING E., KALLBERG Y., PERSSON B., JÖRNVAL H. (2003) Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update, *Chem. Biol. Interact.* 143-147, 247-253

PARISH T., ROBERTS G., LAVAL F., SCHAEFFER M., DAFTE M., DUNKAN K. (2007) Functional complementation of the essential gene *fabG1* of *Mycobacterium*

tuberculosis by *Mycobacterium smegmatis* fabG but not *Escherichia coli* fabG, *J. Bacteriol.* 189, 3721-3728

QUINN D. M., SUTTON L. D. (1991) Theoretical Basis and Mechanistic Utility of Solvent Isotope Effects, em: *Enzyme Mechanism from Isotope Effects* (Cook P. F., editor) CRC Press, Florida

RUFFINO-NETTO A. (2002) Tuberculosis: the neglected calamity, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 35, 51-58

SACCO E., COVARRUBIAS A. S., O'HARE H. M., CARROLL P., EYNARD N., JONES T. A., PARISH T., DAFFÉ M., BÄCKBRO K., QUÉMARD A. (2007) The missing piece of the type II fatty acid synthase system from *Mycobacterium tuberculosis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 14628-14633

SCHROEDER E. K., DE SOUZA O. N., SANTOS D. S., BLANCHARD J. S., BASSO L. A. (2002) Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*, *Curr. Pharm. Biotech.* 3, 197-225

SEGEL I. H. (1975) Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme System, John Wiley and Sons Inc., New York

SHARMA S. K. (2004) Antituberculosis drugs and hepatotoxicity, *Infect. Genet. Evol.* 4, 167-170

SINGH J. A., UPSHUR R., PADAYATCHI N. (2007) XDR-TB in South Africa: no time for denial or complacency, *PLoS Med.* 4, 19-25

STOCKSTAD E. (2000) Drug-resistant TB on the rise, *Nature* 287, 2391

VEYRON-CHURLET R., BIGOT S., GUERRINI O., VERDOUX S., MALAGA W., DAFFÉ M., ZERBIB D. (2005) The biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis* relies on multiple specialized elongation complexes interconnected by specific protein-protein interactions, *J. Mol. Biol.* 353, 847-858

YOUNG D. B. (1998) Blueprint for the white plague, *Nature* 393, 515-516