

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

Clonagem e Seqüenciamento do Gene *pheA* de *Mycobacterium tuberculosis* e  
Superexpressão do Seu Produto – a Proteína Prefenato Desidratase

**ANA LUIZA VIVAN**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador:  
Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Porto Alegre, maio de 2004.

Este trabalho foi realizado no Grupo de Microbiologia Molecular e Funcional, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com financiamento do Projeto Millennium-MCT-CNPq e bolsa concedida pela CAPES.

Dedico este trabalho aos meus pais, **Luiz e Delvina**, que sempre incentivaram,  
apoiaram e acreditaram na realização do mesmo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao **Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos**, pela acolhida em seu laboratório, orientação, apoio e laços de amizade construídos durante a realização deste trabalho.

Agradeço igualmente ao **Prof. Dr. Luiz Augusto Basso**, pela importante contribuição na construção deste trabalho.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivonir Troggio**, da FFFCMPA, por disponibilizar a utilização de seu laboratório durante o crescimento e extração de DNA genômico de *M. tuberculosis*.

À **Clotilde**, pela acolhida no laboratório e participação na realização deste trabalho.

Aos colegas **Cristopher Schneider** e **Rodrigo Ducati**, pela amizade e participação constante na realização dos experimentos.

Aos colegas **Alessandro, Carol, Clarissa, Diego, Fernanda, Gaby, Rafael, Isabel, Isabelinha, Jaim, Juliano, Lurdinha, Patrícia**, pela amizade e pelo carinho com o qual me receberam e me apoiaram.

Ao **Elmo** e **Ellen**, pelo carinho e atenção com que sempre me atenderam.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, pela amizade e carinho.

Aos amigos **Ana Paula, Maurício, Luiza, Rosel, Cláudia** e **Marcinha** que estiveram sempre ao meu lado, me incentivando e me fazendo acreditar que era possível chegar mais alto.

Ao meu namorado **Rodrigo e à Família Arruda**, pelo apoio, carinho e compreensão durante os momentos mais difíceis.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular pela oportunidade de realização desta etapa.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Projeto Millennium MCT-CNPq pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....</b>	<b>10</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>11</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	15
1.2 TRANSMISSÃO E PATOLOGIA .....	16
1.3 TB E AIDS .....	17
1.4 <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> .....	18
1.5 MDR-TB.....	19
1.6 DESENVOLVIMENTO DE NOVAS DROGAS .....	20
1.5 BIOSÍNTESE DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS.....	23
1.6 A ENZIMA PREFENATO DESIDRATASE (E.C 4.2.1.51) .....	27
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.2 - AMPLIFICAÇÃO POR PCR.....	31
3.3 - CLONAGEM DO FRAGMENTO <i>PHEA</i> EM VETOR PCR®-BLUNT .....	32
3.4 – CLONAGEM DO FRAGMENTO <i>PHEA</i> EM VETOR PET23A(+) .....	34
3.5 - IDENTIFICAÇÃO DO CLONE PET23A(+): <i>PHEA</i> .....	35
3.6 - EXPRESSÃO DA ENZIMA PREFENATO DESIDRATASE .....	36
3.7 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA.....	37
3.8 - ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA COM PREFENATO DESIDRATASE.....	37
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>PHEA</i> .....	38
4.2 CLONAGEM DO FRAGMENTO <i>PHEA</i> EM VETOR DE CLONAGEM PCR®-BLUNT .....	39
4.3 CLONAGEM DO FRAGMENTO <i>PHEA</i> EM VETOR DE EXPRESSÃO PET23A(+) .....	40
4.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PREFENATO DESIDRATASE .....	41
4.5 ENSAIO ENZIMÁTICO COM A PROTEÍNA PREFENATO DESIDRATASE .....	42
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BCG:** Bacilo de Calmette-Guerín

**BSA:** *Bovine Serum Albumin* ou Albumina de Soro Bovina

**CM:** Corismato mutase

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DOTS:** *Directly Observed Treatment Strategy* (Estratégia de Tratamento Diretamente Observado)

**EDTA:** Ácido Etilenodiaminotetracético

**HIV:** *Human Immunodeficiency Virus* ou Vírus da Imunodeficiência humana.

**INH:** Isoniazida

**IPTG:** isopropil  $\beta$ -*D*-tiogalactopiranosídeo

**IUATLD:** *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* ou União Internacional contra Tuberculose e Doenças Pulmonares

**LB:** Luria-Bertani

**MDR-TB:** *Multi-Drug Resistance Tuberculosis* ou Tuberculose resistente a múltiplas drogas

**MTB:** *Mycobacterium tuberculosis*

**OD:** densidade ótica

**ORFs:** *Open Reading Frames* ou Regiões de Leitura Aberta

**PAGE:** *polyacrylamide gel electrophoresis* ou eletroforese em gel de poliacrilamida

**PAS:** ácido para-aminosalicílico

**pb:** pares de bases

**PCR:** *Polimerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase

**PYR:** Pirazinamida

**PDT:** Prefenato desidratase

**PHE:** Fenilalanina

**RIF:** Rifampicina

**SDS:** dodecilsulfato de sódio

**STR:** estreptomina

**TAE:** Tris-Acetato EDTA

**TB:** Tuberculose

**TYR:** Tirosina

**UV:** ultravioleta

**WHO:** *World Health Organization* ou Organização Mundial da Saúde

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.1:</b> Mapa circular do cromossomo de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	22
<b>Figura 1.2:</b> Representação esquemática da via do ácido chiquímico.....	24
<b>Figura 1.3:</b> Formação de importantes compostos em <i>M. tuberculosis</i> . ....	25
<b>Figura 1.4:</b> Reação de descarboxilação e desidratação de prefenato a fenilpiruvato catalisada pela enzima prefenato desidratase em <i>M. tuberculosis</i> . .....	28
<b>Figura 1.5:</b> Biossíntese de fenilalanina.....	29
<b>Tabela 1:</b> Condições utilizadas para amplificação do gene <i>pheA</i> de <i>M.</i> <i>tuberculosis</i> .....	32
<b>Figura 3.1:</b> Representação esquemática do plasmídeo pCR®-Blunt (INVITROGEN).....	33
<b>Figura 3.2:</b> Representação esquemática do plasmídeo pET-23a(+) (NOVAGEN).. .....	35
<b>Tabela 2:</b> Mistura de reação para o seqüenciamento do clone pET23a(+):: <i>pheA</i> . .....	36
<b>Figura 4.2:</b> Triagem dos clones recombinantes em vetor pCR®-Blunt:: <i>pheA</i> . ....	39
<b>Figura 4.4:</b> Análise em SDS-PAGE 12% da fração solúvel de crescimento de <i>E.</i> <i>coli</i> BL21(DE3)/pET-23a(+):: <i>pheA</i> , mostrando a expressão da proteína prefenato desidratase de <i>M. tuberculosis</i> .....	41

## RESUMO

A Tuberculose (TB) é a principal causa de óbitos entre as doenças infecciosas causadas por um único agente. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o agente etiológico da TB no homem, o complexo *Mycobacterium* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*) é responsável por cerca de 8 milhões de novas infecções e 3 milhões de mortes a cada ano no mundo. No começo da década de 80, a reemergência da TB em países em desenvolvimento deve-se à crescente incidência do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), à falta de recursos para o tratamento desta doença e à proliferação de cepas resistentes a múltiplas drogas (MDR-TB). Esta situação criou a necessidade da busca por novos agentes antimicobacterianos capazes de reduzir o tempo de tratamento, melhorar a adesão dos pacientes ao mesmo e ser efetiva contra cepas MDR-TB. A via do chiquimato leva à biossíntese do corismato, o precursor de aminoácidos aromáticos, tirosina, triptofano e fenilalanina. A primeira reação na biossíntese de fenilalanina envolve a conversão de corismato a prefenato, catalisada pela corismato mutase. A segunda reação na biossíntese de fenilalanina é a descarboxilação e desidratação de prefenato a fenilpiruvato, catalisada pela prefenato desidratase. Embora ausente em mamíferos, esta via está presente em bactérias, algas, fungos, plantas e parasitos do Phylum Apicomplexa. Esta rota é essencial em *M. tuberculosis* e, portanto, suas enzimas representam alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas antimicobacterianas. O objetivo deste trabalho foi estudar o gene *pheA* da linhagem de *M. tuberculosis* H37Rv e seu produto, a enzima prefenato desidratase.

Para isso, DNA genômico de *M. tuberculosis* H37RV foi extraído e o gene *pheA* foi amplificado pela técnica de PCR, clonado no vetor de expressão pET-23a(+), seqüenciado e superexpresso em células de *Escherichia coli* BL21(DE3). Os resultados obtidos confirmaram a região predita para o gene *pheA*, que foi amplificado com sucesso, mostrando 963 pb, sendo que a presença de 10% dimetil sulfoxido (DMSO) mostrou ser essencial para permitir a desnaturação do DNA rico em bases G-C. Análise da seqüência nucleotídica pelo método de Sanger confirmou a identidade do gene clonado e demonstrou que nenhuma mutação foi introduzida pelos passos de PCR e clonagem. A enzima prefenato desidratase foi superexpressa em células de *E. coli* BL21(DE3) eletroporadas com pET-23a(+):*pheA*. Análise por SDS-PAGE mostrou expressão significativa de uma proteína com aproximadamente 33kDa, estando de acordo com a massa molecular esperada para a prefenato desidratase. A proteína recombinante foi superexpressa sem a adição de IPTG, e a presença da proteína pôde ser detectada em todos os intervalos de tempo testados (6, 9 e 24 horas depois da OD<sub>600nm</sub> alcançar o valor de 0,5). Foi realizado ensaio enzimático com a prefenato desidratase de acordo com Gething *et al.* (1976) utilizando prefenato de bário como substrato e coeficiente de extinção molar de 17.500 a 320 nm para calcular a concentração de fenilpiruvato. Houve um aumento de 1766 vezes na atividade específica da prefenato desidratase no extrato bruto da proteína recombinante em relação ao controle, no qual o vetor pET23a(+) sem o gene *pheA* foi introduzido em células de *E. coli* BL21(DE3).

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is one of the most common infectious diseases known to man. According to the World Health Organization (WHO) the causative agent of TB, *Mycobacterium* complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*), is responsible for approximately 8 million new cases and 3 million deaths every year in the world. Since the late 1980s, the reemergence of tuberculosis in developing countries is due to the increasing incidence of human immunodeficiency virus (HIV), the absence of resources for treatment of this disease, and the proliferation of multidrug-resistant (MDR) strains. This situation has created a need for new antimycobacterial agents to shorten the treatment course, improve patient compliance and also be effective against MDR strains. The shikimate pathway leads to the biosynthesis of chorismate, a precursor of aromatic amino acids, tyrosine, tryptophane and phenylalanine. The first reaction in phenylalanine biosynthesis involves the conversion of chorismate to prephenate, catalysed by chorismate mutase. The second reaction in phenylalanine biosynthesis is the decarboxylation and dehydration of prephenate to phenylpyruvate, catalysed by prephenate dehydratase. Although absent from mammals, this pathway is present in bacteria, algae, fungi, plants, and parasites belonging to the phylum Apicomplexa. The enzymes of this pathway seem to be essential to *M. tuberculosis*, and so they can be explored as good targets for the development of new antimycobacterial drugs.

The goal of this work was to study the *pheA* gene from *M. tuberculosis* H37Rv and its product, the prephenate dehydratase enzyme. Accordingly, genomic DNA from *M. tuberculosis* H37Rv was extracted and the *pheA* gene was amplified by PCR, cloned into pET-23a(+) expression vector system, sequenced and overexpressed in *Escherichia coli* BL21(DE3).

Our results showed that a DNA fragment of 963 bp as predicted for the *pheA* gene was successfully amplified. The presence of 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) was shown to be essential to improve the denaturation of GC-rich DNA. Nucleotide sequence analysis by the dideoxy chain termination technique confirmed the identity of the cloned gene and demonstrated that no mutation was introduced by the PCR amplification step. Prephenate dehydratase was overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells electroporated with the pET-23a(+):*pheA* recombinant plasmid. Analysis by SDS-PAGE showed a significant amount of a 33 kDa protein, in agreement with the predicted molecular weight for this protein. The recombinant protein was overexpressed without the addition of IPTG, and the presence of the protein could be detected at all time intervals tested (6, 9 and 24 hours after an OD<sub>600nm</sub> value of 0.5 was reached). Enzyme assay was performed as described by Gething *et al.* (1976) using barium prephenate as substrate and a molar extinction coefficient of 17,500 at 320 nm to determine phenylpyruvate concentration. The specific activity of recombinant protein extracts was 1,766 fold higher than the control.

## 1 INTRODUÇÃO

**“The captain of all these men of death that came against him to take him away, was the consumption, for it was that brought him down to the grave”.**  
**John Bunyan**

O título de capitã de todas as mortes foi dado à tuberculose (TB) no século XVI, mas ainda hoje representa muito bem o dano causado por esta enfermidade, que acompanha o homem ao longo de toda a sua história. Estima-se que atualmente a doença esteja presente na sua forma latente em um terço da população mundial (WHO, 2003).

O avanço da Revolução Industrial, no século XIX, ocasionou uma intensa aglomeração humana acarretando condições de higiene precárias o que provocou um aumento nas taxas de mortalidade e morbidade por tuberculose (DORMANDY, 2000).

A doença também apresentou sua fase romântica na Inglaterra vitoriana, onde a palidez e a esqualidez eram padrões de beleza, atingindo inclusive status intelectual. Ao longo de toda a história de relação entre a tuberculose e o homem, muitos personagens conhecidos foram vítimas desta doença. Entre eles, Frédéric Chopin, Castro Alves, Cruz e Souza, Augusto dos Anjos, Noel Rosa, Vivian Leigh, Eleanor Roosevelt, George Orwell, São Francisco de Assis e muitos outros. (DUCATI *et al.*, 2003).

Foi apenas no século XIX que o médico e bacteriologista alemão Robert Koch isolou o agente etiológico da TB, que ficou conhecido como bacilo de Koch. Ele definiu que o *Mycobacterium tuberculosis* era um agente infeccioso a partir dos seus postulados que diziam que o patógeno deveria ser isolado do indivíduo infectado e cultivado em cultura pura e ser capaz então de reproduzir a doença (BLOOM & MURRAY, 1992).

Desde a introdução de agentes antimicobacterianos, entre as décadas de 40-70, a TB deixou de ser preocupação nos programas de saúde dos países desenvolvidos. Com a utilização dos antimicobacterianos a doença pode ser controlada, porém o tratamento é longo e apresenta muitos efeitos colaterais o que leva a maioria dos pacientes a abandoná-lo após o desaparecimento dos sintomas. A estratégia DOTS (*Directly Observed Treatment Strategy*) da Organização Mundial da Saúde inclui também o acompanhamento dos pacientes na utilização dos antibióticos por agentes de saúde treinados, o que evita o abandono do tratamento, prevenindo o surgimento de cepas resistentes. Além disso, exames laboratoriais são realizados periodicamente para verificação do curso da infecção.

Apesar da doença ser considerada reemergente em países desenvolvidos como Estados Unidos e países europeus, no Brasil a TB é um problema que sempre existiu, contudo a preocupação tornou-se crescente nos últimos anos, devido ao aumento no número de casos. A doença encontra-se presente no Brasil desde a colonização pelos portugueses. Houve uma queda na mortalidade por TB desde a introdução de antimicobacterianos, a partir da década de 40, com a utilização de estreptomicina, ácido paraminosalicílico e isoniazida. A utilização de um programa contra a TB foi implantada no Brasil na década de 60, sendo que em 1973 foi implantada a vacinação com BCG em crianças menores de um ano. No final da década de 70 foi introduzido no Brasil o tratamento de curta duração incluindo a utilização de pirazinamida (RUFFINO-NETO, 2002).

## 1.1 Epidemiologia

A cada ano, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, entre 8-10 milhões de pessoas são infectadas pelo bacilo da tuberculose em todo o mundo, sendo que destes, aproximadamente três milhões morrem de tuberculose (WHO, 2003). A maioria dos casos de tuberculose ocorre em pessoas com idade produtiva entre 15-49 anos e cerca de 80% dos casos de TB são encontrados em países em desenvolvimento como Índia, China, Indonésia e países da África subsahariana. Entretanto, os casos de tuberculose não se encontram apenas nos países pobres. Desde o final da década de 80, a doença ressurgiu em países desenvolvidos como os Estados Unidos, onde se acreditava que a mesma já se encontrava controlada e restrita à população pobre e de baixa renda. Este fato deve-se ao advento da pandemia da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), declínio dos programas de saúde pública, aumento no número de casos de transmissão em prisões e hospitais e o surgimento de cepas resistentes (ESPINAL, 2003).

A Organização Mundial da Saúde declarou a TB estado de emergência de saúde global em 1993, prevendo cerca de 200 milhões de novos casos e 35 milhões de mortes até o ano de 2020. A tuberculose é uma doença que implica problemas médicos e sociais, pois infecta desproporcionalmente pessoas carentes, sem teto, mal-nutridas e imunodeprimidas. Condições precárias de sobrevivência, como as encontradas em prisões, hospitais e casas de abrigo ilustram locais onde a disseminação da doença é espantosa. Noventa e cinco por cento dos casos de TB ocorrem em países em desenvolvimento, onde poucos recursos são empregados no tratamento da doença e onde a infecção pelo HIV é comum (DUNLAP, 2000).

## 1.2 Transmissão e Patologia

A transmissão da TB geralmente ocorre entre indivíduos pelo ar por pequenas partículas com diâmetro entre 1-5  $\mu\text{m}$  contendo de 2-3 bacilos, capazes de permanecerem no ar por minutos ou horas. Essas partículas são pequenas o suficiente para alcançarem os alvéolos pulmonares, onde o microrganismo se replica (FRIEDEN, *et al.* 2003), sendo liberadas por pacientes infectados com TB durante a tosse, espirro e fala. A infecção se inicia quando esses aerossóis são inalados e instalam-se nos alvéolos pulmonares. Partículas maiores também são produzidas contendo inúmeros bacilos, mas estas não são efetivas na transmissão de TB porque se inaladas não alcançam os alvéolos pulmonares (DUNLAP, 2000).

A transmissão de *M. tuberculosis* pode ser determinada por quatro fatores: o número de microrganismos expelidos no ar, a concentração destes no ar determinada pelo espaço e ventilação, o tempo de exposição das pessoas ao ar contaminado e o status do sistema imune do indivíduo exposto (DUNLAP, 2000). Após a inalação do bacilo, este é fagocitado por macrófagos alveolares e pulmonares, e ali poderá multiplicar-se lentamente dividindo-se a cada 25-32 horas, sendo que o estabelecimento da infecção é dependente da virulência da cepa bacteriana e do efeito bactericida dos macrófagos (DUNLAP, 2000). Os bacilos podem ser transportados pelos macrófagos até os linfonodos, causando sua inflamação e se disseminando pelas vias linfáticas por todo o organismo do hospedeiro, alojando-se em diferentes órgãos, podendo vir a causar a doença posteriormente.

A TB pode permanecer latente no indivíduo infectado, podendo ser reativada anos após o primeiro contato com o microrganismo, levando então ao desenvolvimento progressivo da doença e a transmissão ativa da mesma. Enquanto a TB permanecer latente nenhum sintoma da doença será encontrado no indivíduo. Muitas pessoas apresentam uma resposta imune à infecção pelo *M. tuberculosis* o que impede a multiplicação do bacilo nos pulmões. Contudo, uma vez infectados, a eliminação do bacilo é lenta e difícil e sem um tratamento

adequado, pode levar ao desenvolvimento da doença (GOMEZ & MCKINNEY, 2004).

A capacidade do bacilo de permanecer latente no hospedeiro gera ainda muitas dúvidas, e a falta de conhecimento sobre o seu metabolismo dificulta a identificação de novos compostos (O'BRIEN & NUNN, 2001).

### **1.3 TB e AIDS**

O ressurgimento dos casos de TB coincide com o aparecimento de uma outra doença, a AIDS, principalmente no continente Africano. As taxas de pessoas infectadas com ambas doenças chega a exceder 60% dos casos de TB em países africanos. O HIV (Vírus da Imunodeficiência Adquirida), agente etiológico da AIDS, é capaz de deteriorar o sistema imune, o que facilita a infecção ou a reativação da TB, sendo esta responsável pela maior mortalidade entre os pacientes soropositivos (FATKENHEUER *et al.*, 1999). Estes autores também estimam que haja 20 milhões de pessoas infectadas pelo HIV, sendo que pelo menos a metade está coinfectedada com o *M. tuberculosis* na África subsahariana.

A infecção simultânea com o HIV e o *M. tuberculosis* reflete um aumento no número de indivíduos infectados e capazes de disseminar a doença. Em 2000, cerca de 2 milhões de pessoas morreram de TB e 13% destas estavam coinfectedadas com o HIV (FRIEDEN *et al.*, 2003).

A coinfecção entre TB e HIV afeta a população ativa, com idade entre 15-49 anos, é responsável por aproximadamente metade da mortalidade adulta nos países mais afetados, principalmente na Ásia e na África (O'BRIEN, 2001). A infecção com o HIV altera a susceptibilidade para infecções e facilita a progressão da infecção recente, sendo que a TB influencia o curso da infecção pelo HIV pela produção de citocinas e decréscimo das células CD4. A AIDS sem dúvida colaborou no aumento da epidemia de TB e na história natural da sua infecção,

aumentando a dinâmica da transmissão de tuberculose assim como as taxas de mortalidade e morbidade da TB.

#### **1.4 *Mycobacterium tuberculosis***

O agente etiológico da tuberculose no homem é, principalmente, o *Mycobacterium tuberculosis*. Crescimento lento, dormência, envelope celular complexo, parasitismo intracelular e homogeneidade genética são características deste bacilo. O *M. tuberculosis* é uma bactéria aeróbia, fracamente Gram-positiva, possuindo entre 0,3 e 0,6  $\mu\text{m}$  de largura e 1 a 4  $\mu\text{m}$  de altura que infecta e se prolifera no interior de macrófagos, sendo, portanto, um microrganismo intracelular obrigatório (COLE *et al.*, 1998). O gênero é considerado bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) devido à capacidade de reter fucsina básica na parede celular mesmo na presença de álcool e ácido, quando para sua coloração é utilizado o método de Ziehl-Nielsen. Este método consiste em corar um esfregaço com fucsina básica, descorar com álcool absoluto e ácido clorídrico e corar com azul de metileno, onde bactérias BAAR positivas apresentam coloração vermelha enquanto que BAAR negativas apresentam coloração azul.

A parede micobacteriana possui uma estrutura incomum, pois o peptidoglicano contém ácido N-glicolilmurâmico ao invés de ácido N-acetilmurâmico. Aproximadamente 60% do envelope micobacteriano é composto por lipídeos que consistem de ácidos graxos incomuns, conhecidos como ácidos micólicos (ácidos graxos de cadeia longa) (JARLIER & NIKAIDO, 1994).

As espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium* e bactérias assemelhadas compartilham, em geral, muitas características como a produção de ácidos micólicos e grande porção do genoma composta por G+C. O genoma da linhagem melhor caracterizada, o *M. tuberculosis* H37Rv, possui 4.411.529 pares de base dispostos em um cromossomo circular, sendo que 65,6% é composto por bases G+C (COLE *et al.*, 1998). Esta linhagem tem sido utilizada mundialmente para pesquisa biomédica devido à manutenção de sua virulência e sensibilidade aos tuberculostáticos. Grande parte do genoma de *M. tuberculosis* é

responsável pela codificação e produção de enzimas envolvidas em lipogênese e lipólise.

## **1.5 MDR-TB**

O surgimento de bacilos resistentes a múltiplas drogas é a preocupação que predomina em países pobres e em desenvolvimento, onde os programas de controle da tuberculose ainda são deficientes. Um programa de tratamento e administração inadequada de medicamentos pode resultar em MDR-TB, sendo que sua prevalência é maior em pacientes que foram previamente tratados do que em novos casos (PABLOS-MÉNDEZ *et al.*, 2002). Assim, desde que os primeiros antimicobacterianos foram introduzidos no tratamento da tuberculose no século passado, cepas resistentes foram identificadas. Contudo, bacilos resistentes a múltiplas drogas (MDR-TB) eram limitados aos países desenvolvidos, onde a quimioterapia era utilizada. Dessa maneira, o monitoramento por MDR-TB e o interesse geral dos países desenvolvidos pela doença tornou-se ainda menor e a TB passou a ser negligenciada, restringindo-se aos países menos desenvolvidos. (PETRINI & HOFFNER, 1999).

MDR-TB pode ser caracterizada como a forma específica de bacilo resistente a, pelo menos, duas das drogas mais efetivas utilizadas no tratamento da tuberculose: a isoniazida e a rifampicina. A utilização de antimicobacterianos como a isoniazida e a rifampicina por mais de 40 anos não está diretamente envolvida na epidemia de MDR-TB (ESPINAL, 2003). O surgimento de cepas resistentes deve-se à utilização inadequada da quimioterapia em pacientes com TB susceptível ao tratamento e onde o programa de controle contra tuberculose é muito fraco, recebendo pouco apoio governamental, e aplicação inadequada da estratégia DOTS. Para os casos de MDR-TB, a Organização Mundial da Saúde recomenda a utilização da estratégia DOT-PLUS, que compreende a administração de drogas de segunda linha, de forma a prevenir a disseminação da doença por cepas resistentes.

No início da década de 80, o declínio dos programas de saúde contra TB, o avanço da pandemia da AIDS e a transmissão da doença em presídios, hospitais e casas de abrigo foram alguns dos fatores que levaram ao aumento na incidência de casos de TB em países desenvolvidos, junto com o surgimento de casos de MDR-TB. Isto levou os países desenvolvidos e a Organização Mundial da Saúde a voltarem a se preocupar com a TB, concentrando a atenção ao controle, pesquisa e sobrevivência dos afetados por esta enfermidade.

Os casos de TB causados por cepas resistentes são um importante fator econômico, pois apesar de representarem apenas 3% de todos os casos o tratamento desses é mais caro do que todos os casos causados por cepas não resistentes (VIEDMA, 2003). Além disso, o tratamento é mais tóxico devido à utilização de drogas de segunda linha, como por exemplo, cicloserina, ciprofloxacina, capreomicina, etionamida, canamicina e rifabutina que são drogas menos efetivas do que as utilizadas na terapia padrão, apresentando efeitos colaterais ainda mais acentuados.

## **1.6 Desenvolvimento de Novas Drogas**

O regime utilizado atualmente para o tratamento da tuberculose consiste da administração regular de pelo menos três agentes quimioterápicos ao qual o bacilo é susceptível e a manutenção do tratamento por um período de 6 a 9 meses. O regime de tratamento consiste de duas fases: a fase intensiva ou bactericida, com a administração de rifampicina, pirazinamida, isoniazida e estreptomicina durante os dois primeiros meses, e a fase de esterilização, com administração de isoniazida e rifampicina durante mais quatro meses. Na primeira fase, o número de bacilos é diminuído grandemente e a fase de esterilização é necessária para eliminar bacilos persistentes, minimizando o risco de ressurgimento da doença. A Organização Mundial da Saúde propôs a estratégia DOTS (*Directly Observed Therapy, Short Course*), que compreende cinco fatores: serviços de microscopia, monitoramento, medicação, comprometimento político e observação direta do tratamento por agentes de saúde. Contudo, em países em

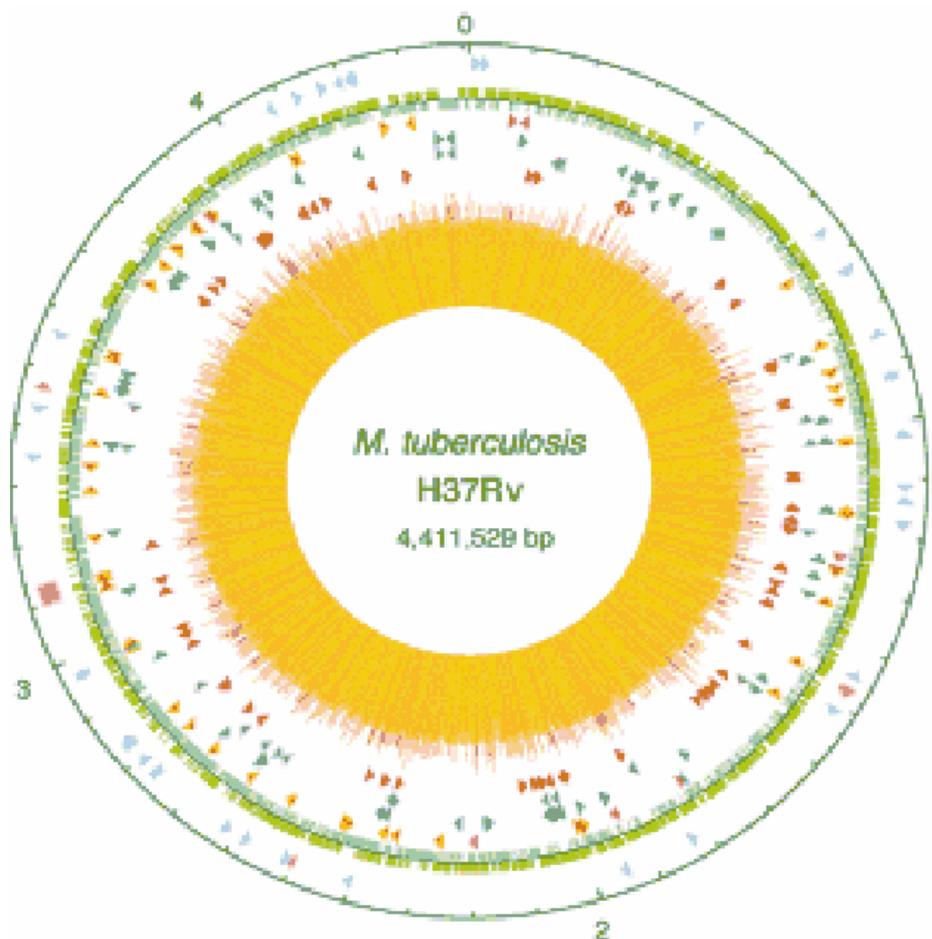
desenvolvimento a adoção deste tratamento tem sido lenta, pois o programa não é capaz de atingir todos os casos de TB. Assim, o desenvolvimento de drogas que diminuam o tempo de tratamento e que sejam mais efetivas facilitará o programa DOTS (DUNCAN, 2003).

A administração de drogas para o tratamento da tuberculose começou no final dos anos 40 com a utilização da estreptomicina (STR), seguida pelo ácido para-aminosalicílico (PAS) – pouco utilizado nos dias atuais – e isoniazida (INH), enquanto que a rifampicina (RIF) foi introduzida no final dos anos 60. Pirazinamida (PYR), conhecida no final dos anos 50, foi introduzida no tratamento contra tuberculose no final dos anos 70 e administrada em baixas doses, devido a sua toxicidade. Pode-se perceber que a última droga introduzida no tratamento da TB foi há mais de 30 anos (O'BRIEN & NUNN, 2001). O desenvolvimento de um novo composto antimicobacteriano pode custar milhões de dólares, mas o interesse da indústria farmacêutica neste setor é baixo, devido ao baixo retorno financeiro esperado, pois a maioria dos pacientes se encontra em países em desenvolvimento (DUNCAN, 2003).

Algumas razões para a introdução de novas drogas são a melhoria do tratamento atual, com menor duração, melhora no tratamento de infecções com cepas resistentes e um tratamento mais efetivo contra a infecção latente (O'BRIEN & NUNN, 2001). Estes também são requisitos determinados pela *Global Alliance for TB Drug Development* (GATB) para o desenvolvimento de novas drogas, que devem apresentar maiores vantagens em relação às drogas utilizadas atualmente. Com isso, haverá uma melhora na redução do período de tratamento com redução de efeitos colaterais, levando a maior adesão pelos pacientes (DUNCAN, 2003).

A determinação da seqüência completa do genoma de *M. tuberculosis* por COLE *et al.* em 1998 (Fig. 1.1) tornou possível a identificação por homologia de genes envolvidos em rotas metabólicas do patógeno. A identificação e validação de rotas essenciais ao microrganismo que sejam ausentes no hospedeiro são de

grande importância para o desenvolvimento de inibidores específicos de baixa toxicidade (DUNCAN, 2003). Entretanto, a introdução de novas drogas em um programa ineficiente irá acelerar o surgimento de cepas com resistência aos novos compostos (O'BRIEN & NUNN, 2001). Dessa maneira, é importante que novas drogas sejam introduzidas em um programa de saúde eficaz, a fim de evitar o desenvolvimento de cepas resistentes.

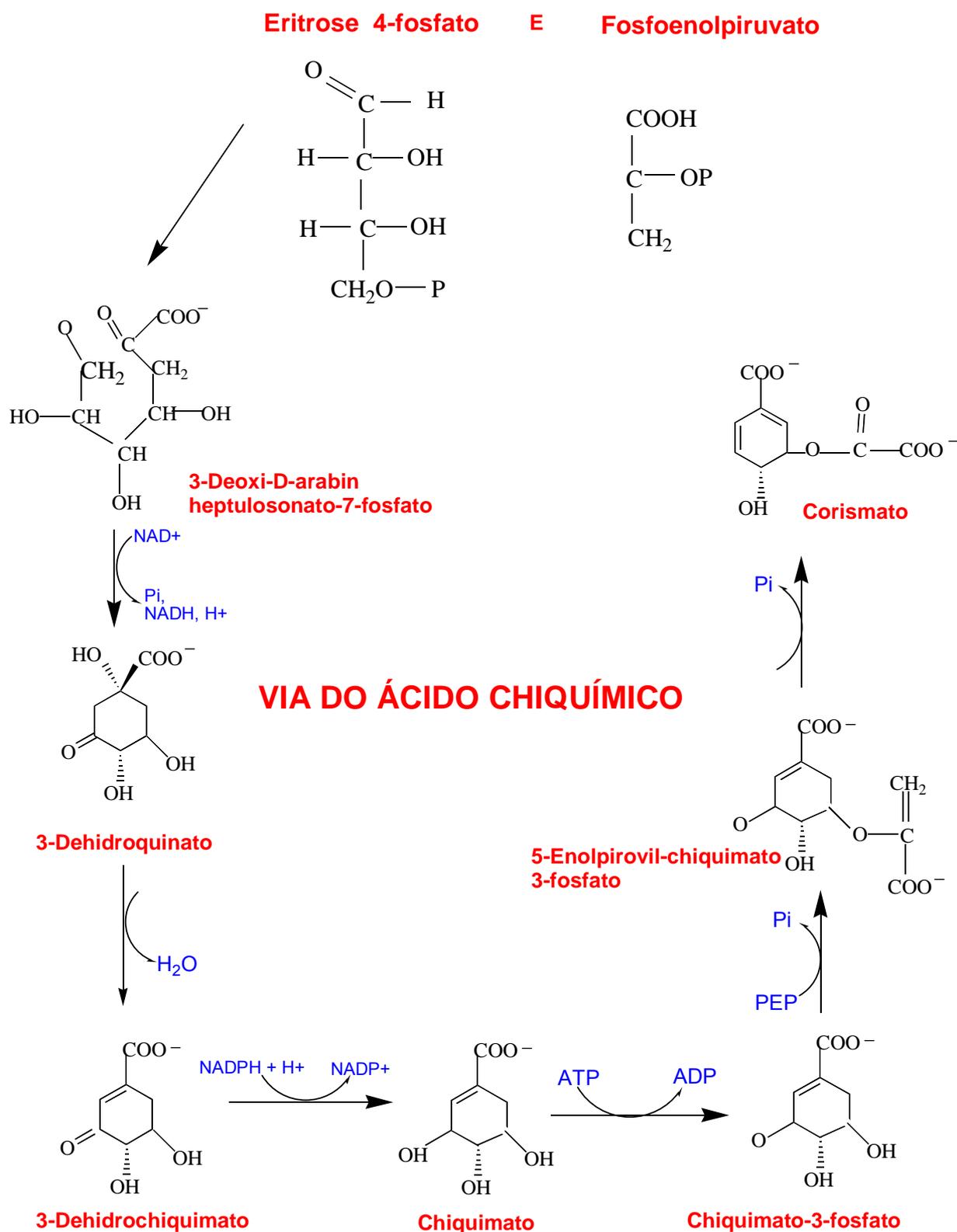


**Figura 1.1: Mapa circular do cromossomo de *M. tuberculosis* H37Rv. O genoma de *M. tuberculosis* foi seqüenciado por Cole et al em 1998, com 4.411.529 pares de bases, sendo que mais de 65% é composto de guaninas e citosinas.**

## 1.5 Biossíntese de Aminoácidos Aromáticos

A via do chiquimato ou ácido chiquímico é encontrada em bactérias, algas, fungos, plantas e parasitos do Filo Apicomplexa (ROBERTS *et al.*, 1998), estando ausente em vertebrados. Devido à ausência desta via no ser humano, a compreensão das estruturas enzimáticas que a compõem gera grande interesse como potenciais alvos para desenho racional de drogas, pois a inibição da função destas enzimas pode matar o organismo infectante sem afetar o metabolismo do hospedeiro. A via do chiquimato é necessária para a síntese de todos os aminoácidos aromáticos, bem como de outros importantes metabólitos nas bactérias (PARISH & STOKER, 2002). A interrupção de genes desta via, como o gene *aroK* em *M. tuberculosis* pelos mesmos autores demonstrou a essencialidade da via neste microrganismo.

Os organismos que possuem a via do chiquimato são capazes de converter os precursores de carboidratos eritrose-4-fosfato e fosfoenolpiruvato em chiquimato e, a partir deste, em corismato, produto final da via do chiquimato (Fig. 1.2), e um dos principais precursores metabólicos na biossíntese de importantes biomoléculas como ubiquinona, ácido fólico, menaquinonas, micobactinas e dos aminoácidos aromáticos - fenilalanina, tirosina e triptofano (NEIDHARDT *et al.*, 1996) (Fig.1.3).



**FIGURA 1.2:** Representação esquemática da via do ácido chiquímico.

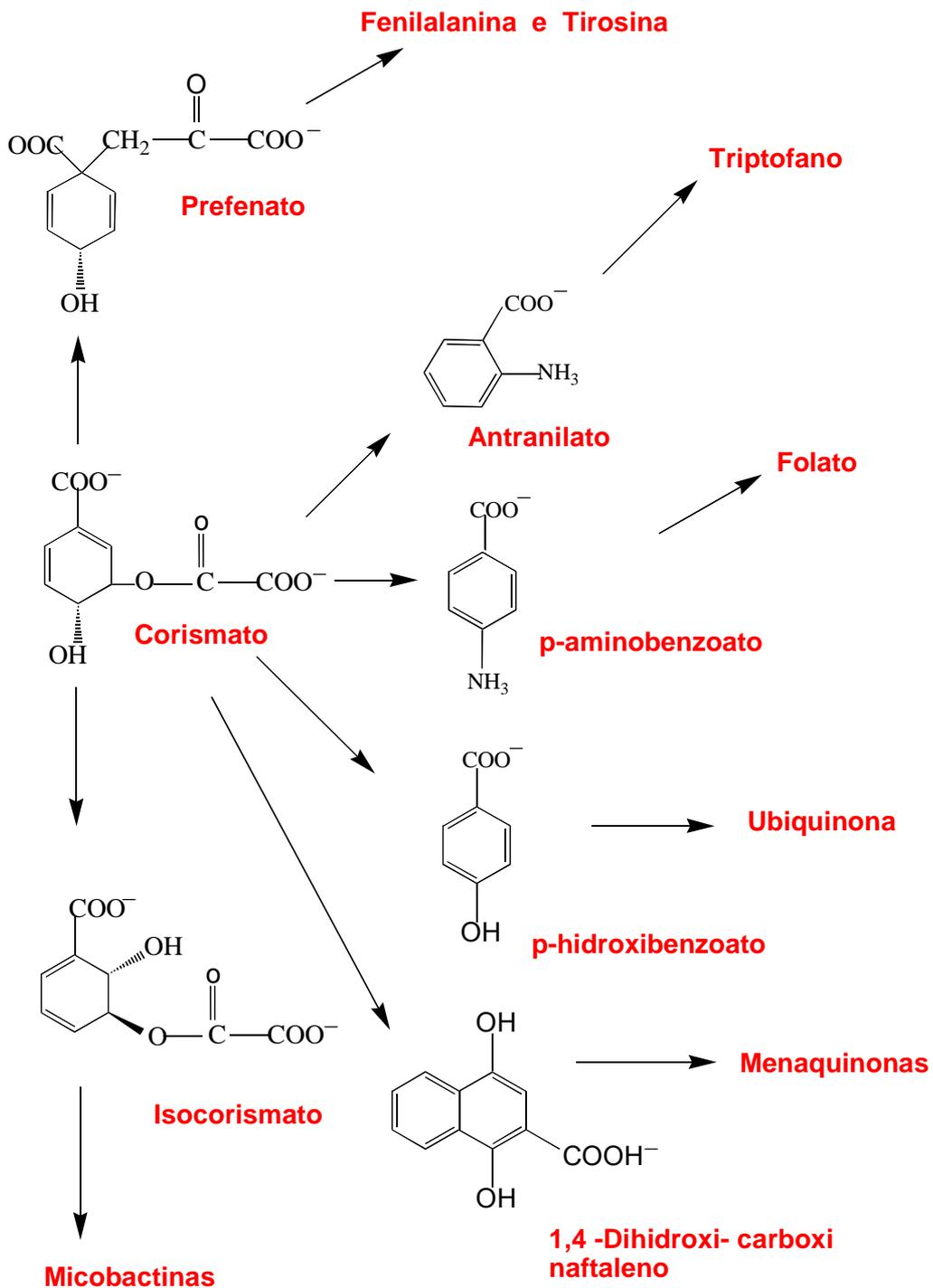


Figura 1.3: Formação de importantes compostos em *M. tuberculosis*. O corismato é precursor essencial na formação de aminoácidos aromáticos, ubiquinona, folato, menaquinonas e micobactinas.

O corismato é convertido por cinco enzimas distintas a prefenato, antranilato, *p*-aminobenzoato, *p*-hidroxibenzoato e isocorismato, sendo que o

prefenato é o precursor comum na biossíntese de fenilalanina e tirosina. O precursor para fenilalanina é o fenilpiruvato e o substrato acumulado é o prefenato. Enzimas que sintetizam este último composto a partir de corismato são chamadas de corismato mutases. A segunda reação na via de biossíntese da fenilalanina é realizada pela enzima prefenato desidratase, que pode, em muitas espécies, formar uma enzima bifuncional, a corismato mutase-prefenato desidratase. As estruturas das corismato mutases podem ser divididas em duas grandes classes: AroH e AroQ. A classe AroH contém proteínas de estrutura quaternária trimérica pseudo  $\alpha\beta$  e a classe AroQ contém corismato mutases diméricas. Diferentes isoenzimas para corismato mutase englobam proteínas relacionadas funcionalmente, mas com pequenas similaridades em suas seqüências. Dessa maneira, uma nova nomenclatura foi sugerida para a classe AroQ: AroQp (prefenato desidratase), AroQt (prefenato desidrogenase), AroQd (3-deoxy-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintase –DAHP), AroQf (regulação monofuncional) e AroQr (regulação alostérica) (DOSSELAERE & VANDERLEYDEN, 2001).

A combinação entre a crescente lista de genomas seqüenciados e a utilização da bioinformática, possibilita trilhar novos caminhos no descobrimento de novos alvos e no desenho racional de drogas. Sabendo que a via do chiquimato é essencial em *M. tuberculosis* (PARISH & STOKER, 2002), embora ainda não se saiba se o é em outras micobactérias, a inibição de enzimas desta via torna-se uma estratégia interessante para o desenvolvimento de drogas. Sendo a via ausente em humanos, as drogas desenhadas para inibição de enzimas micobacterianas provavelmente não causarão efeitos colaterais no hospedeiro humano, atingindo apenas o agente da tuberculose.

## 1.6 A Enzima Prefenato Desidratase (E.C 4.2.1.51)

A enzima prefenato desidratase de *M. tuberculosis* é codificada pelo gene *pheA* (Rv3838) de 963 pb e 386 aminoácidos, e realiza a descarboxilação e desidratação de prefenato a fenilpiruvato (Fig. 1.4).

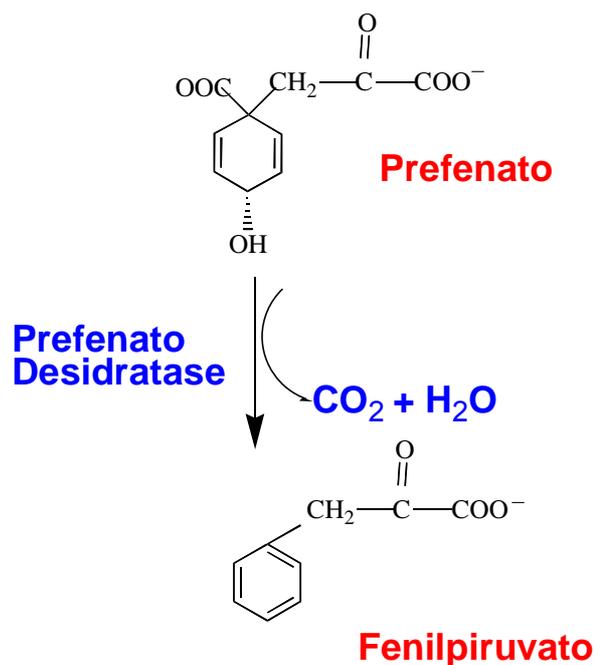
Em *Escherichia coli* a conversão de corismato a fenilpiruvato ocorre pela atuação de uma enzima bifuncional conhecida como Proteína P. A Proteína P é uma proteína bifuncional com dois sítios catalíticos acoplados independentemente que catalisa dois passos consecutivos na síntese de fenilalanina, sendo codificada pelo gene *AroQ<sub>p</sub>.pheA*, com cerca de 386 aminoácidos, sendo um homodímero, e massa molecular da subunidade de 43 kDa (NEIDHART, 1996). O primeiro passo requer a conversão de corismato a prefenato pela atuação da corismato mutase enquanto que o segundo passo, de prefenato a fenilpiruvato, ocorre através da ação da prefenato desidratase (POHNERT, 1999). A regulação do gene *AroQ<sub>p</sub>.pheA* ocorre por atenuação mediada por fenilalanina. Podem ser encontrados na região *upstream* deste gene, três estruturas em alça e uma seqüência líder, codificando um peptídeo de 15 resíduos de aminoácidos (ZHANG *et al.* 1998; POHNERT *et al.* 1999). As atividades catalíticas da proteína P encontram-se em domínios distintos (resíduos 1-109 para CM e resíduos 101-285 para PDT) possuindo ainda um domínio regulatório independente (resíduos 286-386) (POHNERT, 1999).

Estudos cromatográficos realizados por COTTON & GIBSON (1965) usando extratos celulares e material parcialmente purificado de *Aerobacter aerogenes* sugerem que um único complexo enzimático é capaz de realizar as duas primeiras reações na via biossintética de formação de fenilalanina. metabolizando corismato em prefenato, através da atividade corismato mutase e corismato em fenilpiruvato, através da atividade prefenato desidratase.

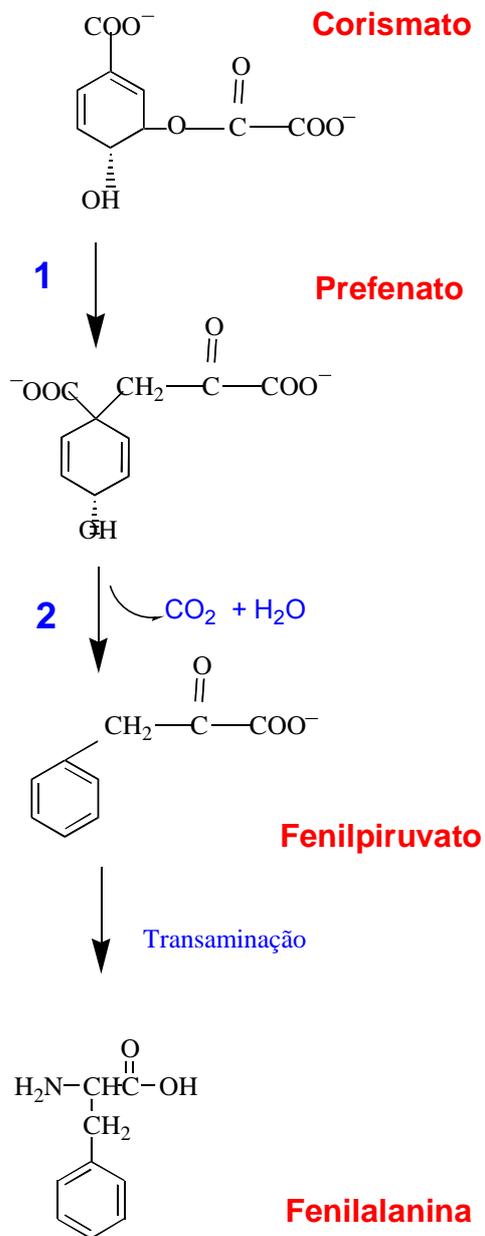
A enzima prefenato desidratase é uma importante enzima regulatória na biossíntese de fenilalanina em *Amiycolatopsis methanolica*, uma bactéria gram-positiva pertencente ao mesmo gênero de bactérias responsáveis pela síntese de

importantes antibióticos como *Amycolatopsis orientalis* produtora de vancomicina. Em *A. methanolica* a pefenato desidratase foi purificada e caracterizada como uma proteína homotetramérica com massa de 150 kDa e subunidade com peso de 34 kDa, sendo alostericamente inibida por fenilalanina e ativada por tirosina (EUVERINK *et al.*, 1995).

Apesar da Proteína P ter sido caracterizada em outros organismos, até o momento nenhum estudo com essa proteína foi conduzido em *M. tuberculosis*. Dessa forma, este trabalho vem por sua vez confirmar a região de homologia do gene *pheA* como sendo responsável pela codificação da proteína pefenato desidratase em *M. tuberculosis* (Fig. 1.5).



**Figura 1.4: Reação de descarboxilação e desidratação de pefenato a fenilpiruvato catalisada pela enzima pefenato desidratase em *M. tuberculosis*.**



**Figura 1.5: Biossíntese de fenilalanina.** Em *E. coli*, uma única proteína bifuncional, a proteína P, converte o corismato a prefenato (1), e realiza a descarboxilação e desidratação deste a fenilpiruvato (2), que é então transaminado formando fenilalanina.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

O objetivo geral do projeto é a busca de inibidores específicos para a enzima pefenato desidratase de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv com possível atividade antimicobacteriana, que futuramente possam ser utilizados como agentes terapêuticos no tratamento da tuberculose.

### **2.2 Objetivos Específicos**

O presente trabalho teve como objetivos específicos a amplificação do gene *pheA* de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv através da técnica de PCR, a clonagem do gene em vetor de expressão pET-23a(+), o seqüenciamento do gene para verificação de que nenhuma mutação foi inserida durante os passos de PCR e clonagem, a expressão da enzima pefenato desidratase em *Escherichia coli* BL21(DE3) na sua forma solúvel e realização da medida da atividade enzimática para verificação da forma ativa da enzima.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Extração de DNA genômico de *Mycobacterium tuberculosis*

O DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv foi obtido a partir do crescimento do bacilo em meio de cultura Löwenstein-Jensen durante 3-4 semanas. Para lise das células bacterianas foi utilizado lisozima e RNase e o DNA foi purificado por extrações com fenol/clorofórmio. A precipitação ocorreu através da utilização de etanol absoluto e temperatura de -20°C segundo Parish & Stoker (2001).

#### 3.2 - Amplificação por PCR

O gene *pheA* (~963pb) foi amplificado a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv pela técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) utilizando a enzima *Pfu* Turbo DNA Polymerase de *Pyrococcus furiosus* (STRATAGENE). Oligonucleotídeos iniciadores sintéticos (5'-**tgcatatgg**tcgtatcgcttacctcggtcc-3' e 5'-**acaagc**tttcatgcttgcgccccctggtcg-3'), denominados de *pheAN* e *pheAC* respectivamente, foram desenhados baseados na seqüência completa do genoma de *M. tuberculosis* (COLE *et al.* 1998). Os *primers pheAN* e *pheAC* são complementares, respectivamente, à extremidade amino-terminal e carbóxi-terminal do gene *pheA* com sítios de restrição para 5' *NdeI* e 3' *HindIII*, que estão em negrito. A reação de amplificação continha 1,25U/ de enzima, 20µM dNTP, 5µL tampão de reação 10x (Stratagene), 1µL DNA genômico, 1µL de cada primer e 10% DMSO (dimetilsulfóxido) em um volume final de 50µL. As condições para amplificação do gene encontram-se na Tabela 1.

Etapa	Temperatura	Tempo
1	98°C	5 minutos
2	98°C	45 segundos
3	60°C	45 segundos
4	72°C	2 minutos
5	Retornar à etapa 2, 35 vezes	
6	72°C	10 minutos

**Tabela 1: Condições utilizadas para amplificação do gene *pheA* de *M. tuberculosis*.** As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC-200 (mj research).

O produto obtido foi separado por eletroforese horizontal em gel 1,5% TAE-agarose contendo 5 mg/mL de Brometo de Etídio e visualizado sob iluminação ultravioleta (UV). A solução tampão de eletroforese TAE contém 0,4 M de Tris-acetato e 0,001 M de EDTA (pH 8,0).

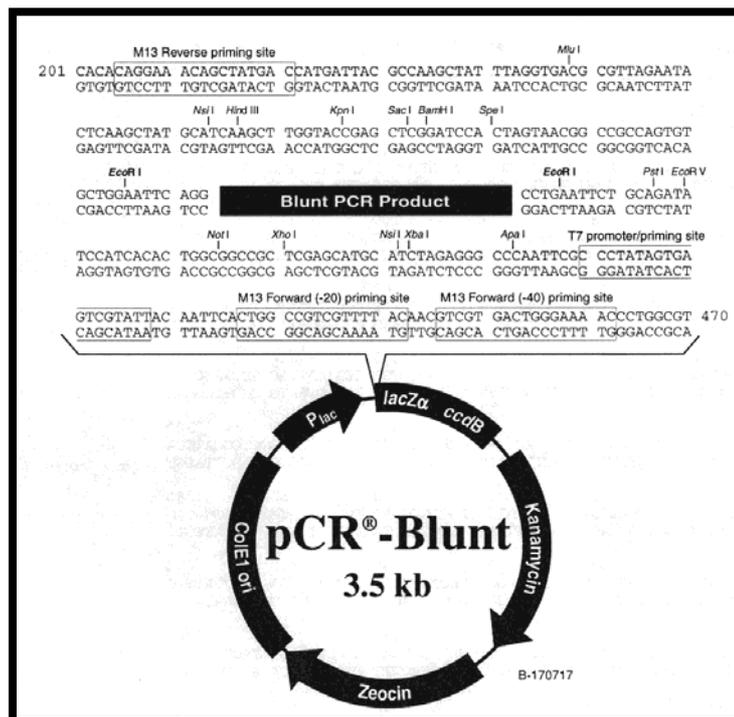
### 3.3 - Clonagem do fragmento *pheA* em vetor pCR®-Blunt

O fragmento *pheA* (963 pb) foi visualizado em gel de agarose e purificado utilizando o kit comercial Concert (GIBCO), conforme instruções do fabricante. O fragmento purificado foi ligado em vetor de clonagem pCR®-Blunt (INVITROGEN) (Fig. 3.1), utilizando a enzima T4 DNA ligase, e incubação de 16 horas a 16°C. Este kit tem como objetivo a clonagem de fragmentos de PCR de extremidades cegas, selecionando os recombinantes, pois a ligação do fragmento ao vetor interrompe a expressão de um gene letal para a célula, o *ccdb*.

A reação de ligação contendo o vetor de clonagem e o fragmento amplificado foi inserida em células eletrocompetentes de *Escherichia coli* TOP10, por eletroporação, em equipamento GENE PULSER II (BIORAD). As condições para a eletroporação foram as seguintes: resistência 200Ω, capacitância 25μF e voltagem de 2,45 kV. Após o choque elétrico, as células foram transferidas para meio de cultura SOC, onde permaneceram durante 1 hora a 200 rpm. Para a

multiplicação e a seleção de células recombinantes, foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura LB e canamicina (50 µg/mL). As células recombinantes selecionadas foram inoculadas em meio LB líquido contendo a mesma concentração de canamicina sob agitação por 16 horas a 37°C. A extração de DNA plasmidial foi realizada com o Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN).

A confirmação da inserção do fragmento de 963 pb no vetor pCR®-Blunt foi realizada pela clivagem do vetor recombinante selecionado com a enzima de restrição *EcoRI* (Cenbiot Enzimas), pois o sítio de reconhecimento para esta enzima se encontra nas extremidades de clonagem. Para a reação de clivagem, foram utilizados 10 unidades de enzima *EcoRI* a 37°C por 2 horas e analisados em eletroforese horizontal em gel de agarose corado com brometo de etídeo e visualizado com iluminação UV.



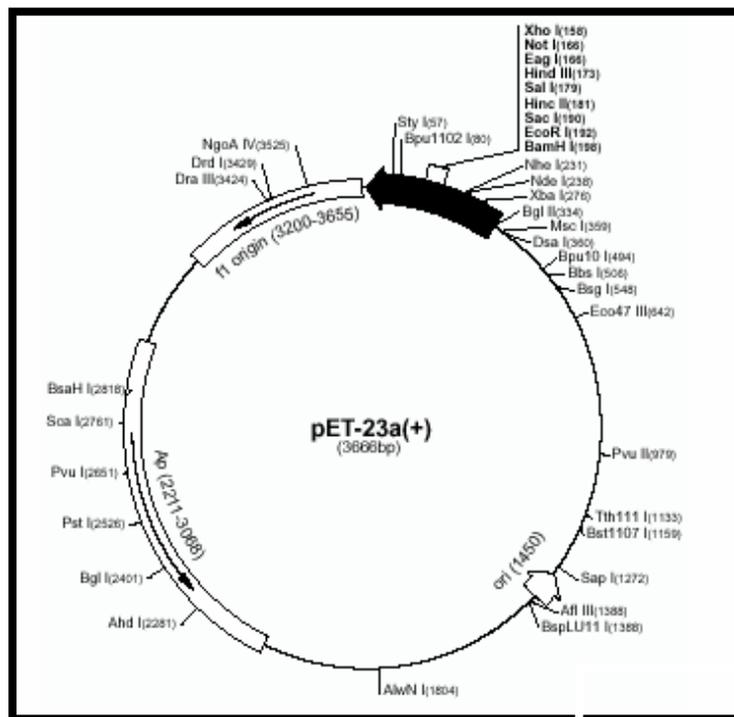
**Figura 3.1: Representação esquemática do plasmídeo pCR®-Blunt (INVITROGEN).** Na figura encontram-se representadas os sítios para enzimas de restrição e região de ligação do gene de interesse; os genes de resistência a canamicina e zeocina; a origem de replicação ColE1; o promotor Lac, que controla o gene fusionado LacZα ccdB, levando a morte celular caso seja inserido na célula hospedeira sem o gene de interesse.

### 3.4 – Clonagem do fragmento *pheA* em vetor pET23a(+)

Para a transferência do gene de interesse para um plasmídeo de expressão, o vetor pCR®-Blunt contendo o inserto obtido anteriormente foi clivado com enzimas de restrição (*NdeI* e *HindIII*) e a clivagem com as mesmas enzimas foi realizada no vetor de expressão pET-23a(+) (NOVAGEN, Fig. 3.2), a fim de proporcionar extremidades coesivas entre o vetor e o fragmento. Os produtos da reação de clivagem do vetor pCR®-Blunt::*pheA* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para verificação da linearização do vetor e liberação do fragmento de interesse, que foi então purificado do gel com o kit comercial Concert (GIBCO). O fragmento purificado (963 pb) foi ligado em vetor de expressão pET23a(+), na presença de 4 unidades de T4 DNA ligase (BOEHRINGER) em um volume de 10 µl, a 16°C durante 16 horas.

O vetor de expressão recombinante foi introduzido por eletroporação em células *E. coli* DH10B, nas mesmas condições utilizadas anteriormente. Estas células foram inoculadas em placas contendo o antibiótico carbenicilina (50 µg/mL), já que o vetor pET confere resistência a este antibiótico. As células recombinantes foram então inoculadas em meio LB líquido contendo a mesma concentração de carbenicilina e mantidas por 1 hora a 37°C sob agitação. O DNA plasmidial foi novamente extraído utilizando-se o Kit MiniPrep (Qiagen), sendo que o produto obtido nesta etapa é designado como o plasmídeo pET-23a(+>::*pheA*.

A confirmação da presença do inserto em vetor de expressão pET23a(+) foi realizada pela clivagem do plasmídeo recombinante com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* a 37° durante a noite. A reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose e visualizada sob iluminação UV.



**Figura 3.2: Representação esquemática do plasmídeo pET-23a(+)** (NOVAGEN). Este vetor foi desenvolvido para clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*. Os genes de interesse ligados neste vetor encontram-se sob regulação do promotor T7 do galo Lambda.

### 3.5 - Identificação do clone pET23a(+)::*pheA*

A confirmação da seqüência nucleotídica do fragmento de interesse, o gene *pheA*, foi realizada por meio de seqüenciamento de DNA pelo método de terminação de cadeia de Sanger utilizando didesoxirribonucleotídeos radiomarcados, utilizando o kit *Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle* (AMERSHAM BIOSCIENCES). Foram utilizados os primers T7 promoter e T7 terminator complementares ao vetor de expressão pET23a(+). Entretanto, para o seqüenciamento completo do gene, foram desenhados dois oligonucleotídeos internos, denominados *pheA240* (5'tgtgcgcctgcaggtgttcg3') e *pheA723* (5'aag

ttcggtagcgggtggcc3'). A reação de seqüenciamento foi realizada como o recomendado pelo fabricante, utilizando tampão *Glycerol Tolerant Buffer* (USB™). As condições utilizadas no seqüenciamento do gene estão representadas na Tabela 2.

	Volume (µL)
H <sub>2</sub> O Milli-Q	10
<i>Thermo Sequenase Reaction Buffer 10 X</i>	2
pET23a(+):: <i>pheA</i>	5
Primer	1
<i>Thermo Sequenase 4 U/µL</i>	2
Total	20

**Tabela 2: Mistura de reação para o seqüenciamento do clone pET23a(+)::*pheA*.**

Dessa maneira, procurou-se aferir a integridade do gene de interesse assegurando que não tenham sido inseridas mutações no mesmo durante os passos de amplificação e clonagem.

### 3.6 - Expressão da enzima Prefenato Desidratase

Células eletrocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas por eletroporação com o plasmídeo recombinante pET-23a(+)::*pheA*, sendo que as células transformadas foram selecionados em placas contendo meio LB e 50 µg/ml de carbenicilina, e incubadas por 24 horas. As colônias isoladas foram utilizadas para inocular em 1,5 L de meio LB contendo 50 µg/mL de carbenicilina e multiplicadas a 37°C até atingirem densidade ótica entre 0,4 e 0,6 (OD<sub>600</sub>) e induzidas ou não com IPTG (isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo) com concentração final de 1mM. As células foram submetidas à centrifugação e armazenadas a -80°C.

Para análise da superexpressão da proteína, o estoque de células foi ressuspensão em 600  $\mu$ L de tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,8 e lisados por sonicação, nas seguintes condições: 2 pulsos de 10 segundos cada com intervalo de 1 minuto e amplitude de 21%. Os extratos protéicos foram analisados em SDS-PAGE.

### **3.7 - Determinação da concentração protéica**

A determinação da concentração da proteína foi realizada pelo método de Bradford *et al.* (1976) usando o kit para ensaio protéico Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) e albumina de soro bovina (BSA) como padrão.

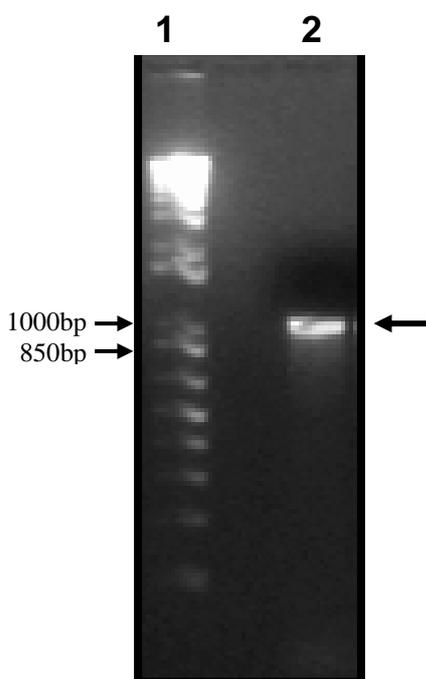
### **3.8 - Ensaio de atividade enzimática com prefenato desidratase**

A enzima prefenato desidratase foi ensaiada pela conversão de prefenato a fenilpiruvato, segundo o método descrito por GETHING *et al.* (1976). A atividade foi medida em uma mistura de 0,4 mL contendo 0,5mM prefenato de bário, 20mM Tris-HCl pH 8,2, 1,0 mM EDTA, 0,01% BSA e 20mM 2-mercaptoethanol. Depois de pré-incubado por 5 minutos, a 37°C, a enzima foi adicionada permanecendo incubada a 37°C por diferentes períodos (1, 5, 10, 15 e 20 minutos). Após esta incubação, a reação foi interrompida pela adição de 0,8 mL de 1,5M NaOH e a absorbância obtida a 320nm. A concentração de fenilpiruvato foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de 17.500 (COTTON & GIBSON, 1965).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Amplificação do gene *pheA*

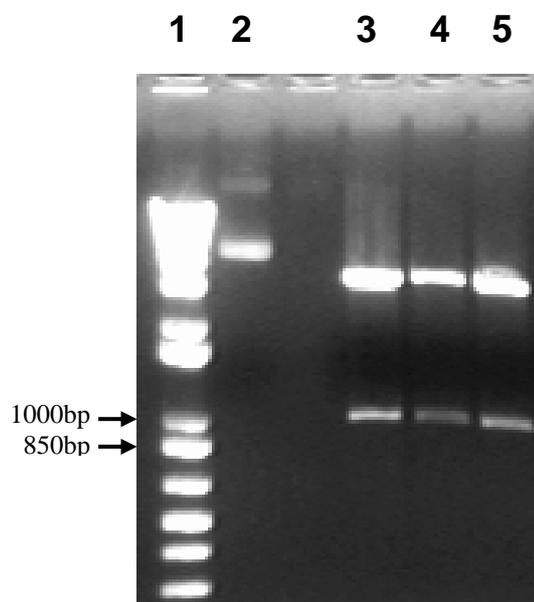
A região codificante do gene *pheA* foi amplificada com sucesso a partir de DNA genômico de *M. tuberculosis*, fazendo-se uso da técnica de PCR e utilizando para isso oligonucleotídeos iniciadores específicos *pheAN* e *pheAC* contendo sítios de reconhecimento para as enzimas *NdeI* e *HindIII* respectivamente, desenhados a partir da seqüência completa deste microrganismo. A enzima *Pfu* turbo DNA polimerase foi escolhida por apresentar baixa taxa de erros durante a amplificação do fragmento de interesse, ser altamente termoestável gerando fragmentos de PCR de extremidades abruptas. A mistura de reação sem a presença de DMSO não gerou amplificação de nenhum fragmento, enquanto que na presença de 10% DMSO pode ser verificado uma forte banda em torno de 963 pb (Fig. 4.1).



**Figura 4.1: Amplificação do fragmento de interesse correspondente ao gene *pheA* de *M. tuberculosis* através da técnica de PCR.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% e 0,5 $\mu$ g/ml de Brometo de etídeo. Canaleta 1: Marcador de tamanho de cadeia para DNA 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaleta 2: Amplificação da região de interesse de ~963pb na presença de 10% DMSO.

## 4.2 Clonagem do fragmento *pheA* em vetor de clonagem pCR®-Blunt

O fragmento de PCR correspondente ao gene *pheA* foi ligado em vetor pCR®-Blunt (INVITROGEN), com a utilização da enzima T4 DNA ligase. A triagem dos clones recombinantes foi realizada pela clivagem com a enzima *EcoRI* capaz de liberar o fragmento caso o mesmo tenha sido inserido corretamente no vetor, pois este apresenta sítios de restrição para esta enzima nas suas extremidades. A liberação do inserto pode ser confirmada através de eletroforese em gel de agarose visualizado na figura 4.2.

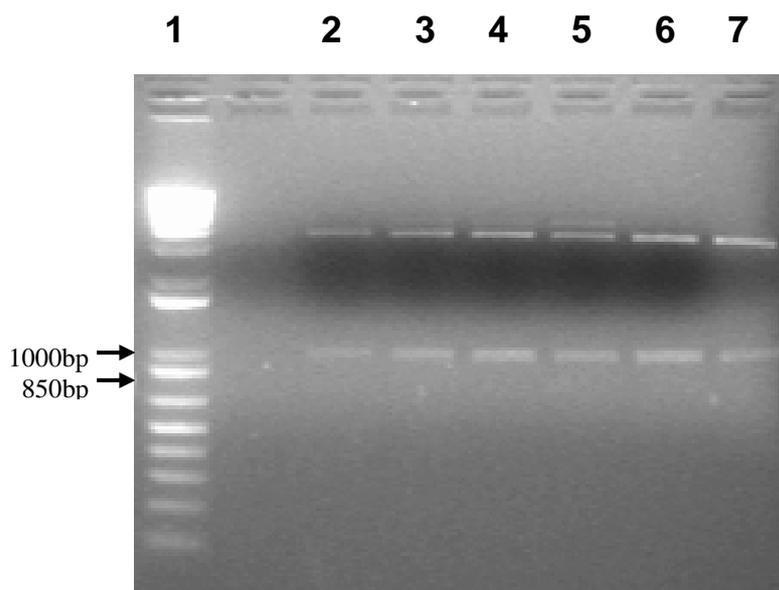


**Figura 4.2: Triagem dos clones recombinantes em vetor pCR®-Blunt::*pheA*.**

O DNA de diferentes clones foi digerido com a enzima *E. coli* e analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% e corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídeo. Canaleta 1: marcador de tamanho de cadeia para DNA1kb plus DNA ladder (Invitrogen). Canaleta 2: vetor de clonagem pCR®-Blunt linear. Canaleta 3, 4 e 5: clivagem completa do plasmídeo com liberação do fragmento de ~963pb.

### 4.3 Clonagem do fragmento *pheA* em vetor de expressão pET23a(+)

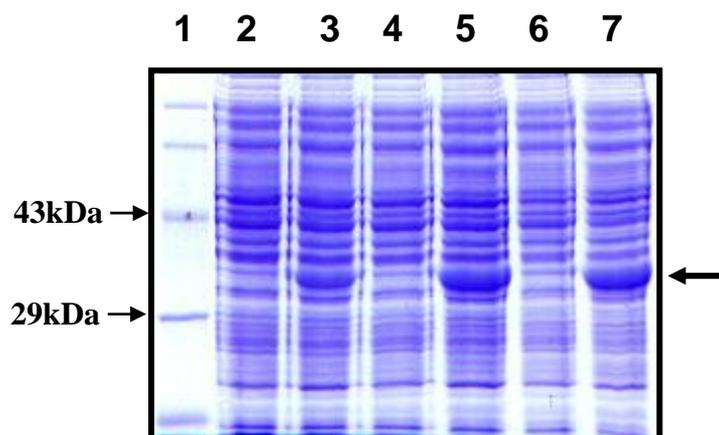
O clone recombinante pCR<sup>®</sup>-Blunt::*pheA* escolhido foi digerido com as enzimas *NdeI* e *HindIII*, cujos sítios de reconhecimento encontram-se nos primers *pheAN* e *pheAC*, respectivamente. O vetor de expressão pET-23a(+) foi também digerido com as mesmas enzimas de restrição levando assim à presença de extremidades coesivas entre o fragmento e o vetor de expressão. O fragmento *pheA* foi clonado em vetor de expressão pET-23a(+), pela realização de reação de ligação entre o vetor pET-23a(+) e o fragmento liberado com a utilização da enzima T4 DNA ligase, e a triagem dos clones foi realizada por meio de clivagem com as mesmas enzimas de restrição. Todos os clones recombinantes liberaram o fragmento de 963 pb, que pode ser verificado na eletroforese em gel de agarose, representado na Figura 4.3.



**Figura 4.3: Triagem dos clones recombinantes em vetor pET-23a(+).** Os plasmídeos foram clivados com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* e visualizados em eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com 0,5µg/ml de brometo de etídeo. Canaleta 1: Marcador de tamanho de cadeia para DNA 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas 2-7: vetor pET-23a(+>::*pheA* clivado com *NdeI* e *HindIII* liberando o fragmento de interesse de ~963pb.

#### 4.4 Expressão da proteína Prefenato Desidratase

As frações solúvel e insolúvel do extrato celular de *E. coli* BL21(DE3)/pETt23a(+>::*pheA* foram analisadas em SDS-PAGE 12%, em função do tempo após a OD<sub>600nm</sub> ter atingido 0,5 e ter sido induzido ou não com IPTG. A enzima prefenato desidratase foi expressa na fração solúvel do extrato celular tanto na presença (dados não mostrados), quanto na ausência de IPTG (Fig 4.4). Os diferentes intervalos de tempo testados (6, 9, 24 horas) demonstraram a presença de uma forte banda no tamanho de aproximadamente 33 kDa. A expressão da enzima sem adição de IPTG resultou em uma maior expressão do que na presença deste indutor. Assim, as condições escolhidas para expressão da enzima prefenato desidratase foram o crescimento após atingir densidade ótica de 0,5, na temperatura de 37°C e sem adição de IPTG.



**Figura 4.4:** Análise em SDS-PAGE 12% da fração solúvel de crescimento de *E. coli* BL21(DE3)/pET-23a(+>::*pheA*, mostrando a expressão da proteína prefenato desidratase de *M. tuberculosis*. Canaletas 2, 4 e 6: extrato celular de *E. coli* BL21(de3)::[pet-23a(+)]; Canaletas 3, 5 e 7: *E. coli* BL21(de3)::[pet-23a(+>::*phea*] em 6, 9 e 24 horas após a od<sub>600nm</sub> alcançar 0,5; Canaleta 1: marcador de peso molecular “High range” (gibco brl).

#### 4.5 Ensaio enzimático com a proteína Prefenato Desidratase

O ensaio de atividade enzimática da proteína prefenato desidratase foi realizado segundo método descrito por GETHING *et al.* (1976), utilizando prefenato de bário como substrato e coeficiente de extinção molar de 17.500 (COTTON & GIBSON, 1965). O ensaio foi realizado com a fração solúvel de células de *E. coli* BL21(DE3)/pET-23a(+):*pheA*. Quantidades crescentes de extrato puro foram adicionadas às misturas de reação e a taxa de atividade enzimática foi medida pela variação da absorbância a 320 nm por minuto. A enzima mostrou-se ativa em todos os tempos testados, sendo que a dependência de substrato foi constante. A atividade enzimática da proteína recombinante é 1766 vezes maior do que o controle.

## 5 DISCUSSÃO

A partir da análise dos resultados apresentados, pode-se afirmar que os objetivos propostos foram alcançados. O gene *pheA* foi amplificado pela técnica de PCR na presença de 10% DMSO, que mostrou-se essencial para a amplificação do gene em estudo, pois supera os problemas de extensão da DNA polimerase que ocorrem devido a formação de estruturas secundárias na molécula de DNA e é capaz de melhorar a desnaturação de moléculas de DNA com alto conteúdo de bases G e C, o que está em concordância com o genoma de *M. tuberculosis*, que contém 65,6% de G e C (COLE *et al.*, 1998) Trabalhos anteriores também demonstraram que a presença deste co-solvente é essencial para a amplificação de outros genes de *M. tuberculosis* (MAGALHÃES, *et al.*, 2002).

A clonagem do fragmento de interesse *pheA* foi realizada em vetor de expressão pET-23a(+), pois este vetor tem sido extensivamente utilizado na produção de altos níveis de proteínas heterólogas (KELLEY *et al.*, 1995; OLIVEIRA, *et al.*, 2001; MAGALHÃES, *et al.*, 2002). O sistema pET faz uso da alta processividade da enzima T7 RNA Polimerase que se encontra sob controle do promotor *LacUV5* sendo ativada pela adição de IPTG, mas permitindo um nível basal de transcrição em células não induzidas (GROSSMAN *et al.*, 1998). O IPTG liga-se à proteína repressora LacI, impedindo a atividade desta, levando então, à ativação da transcrição do gene da T7 RNA polimerase. A alta processividade da T7 RNA polimerase leva à síntese de mRNA em altas concentrações e produção da proteína de interesse em taxas que chegam a até 50% do extrato protéico total (BANEYX, 1999). Apesar do argumento de que o IPTG limitaria a utilização do vetor pET, vários trabalhos vem demonstrando a sua utilização para expressão protéica sem a presença deste indutor (OLIVEIRA, *et al.*, 2001; MAGALHÃES, *et al.*, 2002). Estes trabalhos obtiveram altos níveis de produção protéica pela não indução com IPTG, muitas vezes sendo superior do que com a indução com IPTG. Segundo GROSSMAN *et al.* (1998) a expressão não induzida de genes controlados pelo promotor *Lac* ocorre em células que estão em fase estacionária em meio complexo, sendo a dependência de cAMP necessária para altos níveis

de expressão sem a presença de IPTG, requerendo também acetato e baixo pH. Apesar de este efeito ser baixo qualquer estímulo é amplificado, pois o gene de interesse encontra-se em um plasmídeo multicópia sendo transcrito de forma eficiente pela T7 RNA Polimerase. O seqüenciamento demonstrou que nenhuma mutação havia sido inserida durante os passos anteriores, confirmando a identidade do gene.

A utilização da bactéria gram negativa *E. coli* K12 para expressão de proteínas heterólogas permanece muito atraente pela sua habilidade em crescer rapidamente e em alta densidade em substratos de baixo custo, possuindo características genéticas bem caracterizadas e com um grande número de vetores de clonagem e cepas mutantes (BANEYX, 1999). Dessa maneira, para a expressão da proteína pefenato desidratase utilizou-se a construção do gene *pheA* no vetor de expressão pET23a(+) na cepa de *E. coli* BL21(DE3). Este sistema apresentou expressão significativa da enzima na fração solúvel do extrato celular quando rompida por sonicação. Este método de lise celular mostrou-se eficiente, liberando uma quantidade significativa da proteína de interesse na fração solúvel do extrato celular. A enzima foi expressa na fração solúvel de células, tanto induzidas quanto não induzidas por IPTG, a partir de 6 horas após a OD<sub>600nm</sub> ter alcançado 0,5. Entretanto, células não induzidas apresentaram maior expressão da enzima do que naquelas que cresceram na presença do indutor. Resultados semelhantes já foram demonstrados, onde altos níveis de produção protéica são obtidos a partir de vetores pET na fase estacionária de crescimento (OLIVEIRA, *et al*, 2001; MAGALHÃES, *et al.*, 2002). Apesar de GROSSMAN *et al.* (1998) descreverem este efeito em células em crescimento em meio complexo como o 4xYT, neste e em outro trabalho (MAGALHÃES, *et al.*, 2002), a expressão não induzida em fase estacionária foi obtida com a utilização de meio de cultivo LB.

O ensaio enzimático realizado com a proteína preferato desidratase mostrou que esta se encontrava funcionalmente ativa, mostrando uma atividade específica 1766 vezes superior quando comparada com o experimento controle.

Assim, os objetivos propostos neste trabalho foram alcançados com sucesso, sendo este trabalho o primeiro realizado com a enzima preferato desidratase de *M. tuberculosis* H37Rv. Estudos em andamento, como purificação desta enzima através da técnica de FPLC (Cromatografia Líquida de Rápida Performance), estudos de cinética enzimática em estado estacionário e no futuro, a determinação da sua estrutura tridimensional por cristalografia de raios-X serão agora possíveis, o que serão passos importantes na busca de novos inibidores e no desenho racional de drogas contra o *M. tuberculosis*.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANEYX, F. (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, n10: 411-421.
- BARNES, P.F.; DONALD, C.M. (2003) Current Concepts: Molecular Epidemiology of Tuberculosis. **The New England Journal of Medicine**, Volume 349 (12). September 18. 1149-1156.
- BLOOM, B.R; MURRAY, C.J.L.; (1992) Tuberculosis: Comentary on a Reemergent Killer. In: **Science**, vol.257, 21 august.
- BONNER, C.A.; FISCHER, R.S.; AHMAD, S.; JENSEN, R.A. (1990) Remnants of na Ancient Pathway to L-Phenylalanine and L-Tyrosine in Enteric Bacteria: Evolutionary Implications and Biotechnological Impact. **Applied and Environmental Microbiology**. Dec, p. 3741-3747.
- BRADFORD, M.M., McROIRE, R.A., WILLIAMS, W.L. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72, 248-254.
- BRENNAN, P.J. & NIKAIIDO, H. (1995) The envelope of Mycobacteria. **Annual Review of Biochemistry** 64, 29-63.
- BRENNAN, P.J. (1997) Tuberculosis in the context of femerging and reemerging diseases. In: **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 18 263-269.
- COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J. et al. (1998) Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature** 393, 537-544.
- COTTON R.G.H., GIBSON, F. (1965) The biosynthesis of phenylalanine and tyrosine: enzymes converting chorismic acid into prephenic acid and their relationship to prephenate dehydratase and prephenate dehydrogenase. **Biochimica et Biophysica Acta**, 100:75-88.
- DOSELAERE, F.; VANDERLEYDEN, J.; (2001) A metabolic node in action: Chorismate-utilizing enzymes in microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, 27 (2): 75-131.
- DORMANDY, T. (2002) *The white death: a history of tuberculosis*, New York University Press.
- DUCATI, R.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. (2003) O Ressurgimento da tuberculose-Revisão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. (Submetido).

- DUNCAN, K. (2003) Progress in TB drug development and what is still needed. **Tuberculosis** 83, 201-207.
- DUNLAP, N.E.; BASS, J.; FUJIWARA, P.; HOPEWELL, P.; HORSBURG, C.R.; SALFINGER, M.; SIMONE, P.M. (2000) Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. Vol 161, pp. 1376-1395.
- ESPINAL, M.A. (2003) The global situation of MDR-TB. **Tuberculosis** 83, 44-51.
- EUVERINK, G.J.W.; WOLTERS, D.J.; DIJKHUIZEN, L. (1995) Prephenate Dehydratase of the Actinomycete *Amycolatopsis methanolica*: Purification and Characterization of wild-type and deregulated mutant proteins. **Biochemical Journal**, 308: 313-320.
- FÄTKENHEUER, G.; Taelman, H.; LEPAGE, P.; SCHWENK, A.; WENZEL, R. (1999). The Return of Tuberculosis. In: **Diagnostic Microbiology Infection Disease**, 34:139-146.
- FRIEDEN, T.R.; STERLING, T.; MUNSIFF, S.S.; WATT, C.J.; DYE, C. (2003) Tuberculosis. **Lancet** 362, 887-99.
- GETHING, M.J.H.; DAVIDSON, B.E.; DOPHEIDE, T.A.A.. (1976) Chorismate Mutase/Prephenate Dehydratase from *Escherichia coli* K12: The Effect of NaCl and its use in a New Purification involving Affinity Chromatography on Sepharosyl-phenylalanine. **European Journal of Biochemistry**. 71, 317-325.
- GLICKMAN, M.S.; JACOBS, W.R.JR. (2001) Microbial Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a Discipline. **Cell**, Vol. 104- 477-485.
- GLYNN, J.R.; WHITELEY, J.; BIFANI, P.J.; KREMER, K.; SOOLINGEN, D.V. (2002). Worldwide Occurrence of Beijing/W Strains of *Mycobacterium tuberculosis*: A Systematic Review. **Emerging Infectious Diseases**. Vol. 8, N° 8, August.
- GOMEZ, J.; MCKINNEY, J.D. (2004) *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. **Tuberculosis** 84, 29-44.
- GROSSMAN, T.H.; KAWASAKI, E.S.; PUNREDDY, S.R.; OSBURNE, M.S. (1998) Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. **Gene**, 209, pp. 95-103.
- HUDSON, G.C., WONG, V., DAVIDSON, B.E., (1985) Chorismate mutase-prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli* K-12. Purification, characterization and identification of a reactive cysteine. **Biochemistry** 23:6240-6249.

- HUANG, H.; JIN, Q.; MA, Y.; CHEN, X.; ZHUANG, Y. (2002) Characterization of *rpoB* mutations in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in China. **Tuberculosis**, 82 (2/3), 79-83.
- JARLIER, V.; NIKAIDO, H. (1994) Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. **FEMS Microbiology Letters** 123, pp. 11-18.
- KELLEY, K.C.; HUESTIS, K.J.; AUSTEN, D.A.; SANDERSON, C.T.; DONOGHUE, M.A.; STICKEL, S.K.; KAWASAKI, E.; OSBURNE, M. (1995). Regulation of sCD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in *Escherichia coli*. **Gene**, 156, pp. 33-36.
- MAGALHÃES, M.L.B.; PEREIRA, C.P.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S (2002) Cloning and expression of functional shikimate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.25) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Protein Expression and Purification** 26, 59-64.
- NEIDHARDT, F.C. *et. al.*(1996) Biosyntheses of the Aromatic Amino Acids. (PITTARD, A.J.) In: **Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology**.. Second edition. Vol.1.ASM Press. Washington.
- O'BRIEN, R.J. (2001) **Tuberculosis: Scientific Blueprint for Tuberculosis Drug Development**. Global Alliance for TB Drug Development. New York. Churchill Livingstone. Disponível em: <http://www.tballiance.org>.
- O'BRIEN, R.J.; NUNN P.P. (2001) The Need for New Drugs against Tuberculosis: Obstacles, Opportunities, and Next Steps. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** Vol 162. Pp 1055-1058.
- OLIVEIRA, J.S; PINTO, C.A.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S (2001) Cloning and Overexpression in Soluble Form of Functional Shikimate Kinase and 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase Enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. **Protein Expression and Purification** 22, 430-435.
- PABLOS-MÉNDEZ, A.; GOWDA, D.K. & FRIEDEN, T. (2002) Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drugs: a rational framework. **Bulletin of the World Health Organization** 80(6) 489-500.
- PARISH, T.; STOKER, N.G. (2001) **Mycobacterium tuberculosis Protocols**. Humana Press. Totara, New Jersey.
- PARISH, T. STOKER, N. (2002) The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology** 148, 3069-3077.
- PETRINI, B.; HOFFNER, S.; (1999) Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. **International Journal of Antimicrobial Agents** 13, 93-97,.

- POHNERT, G.; ZHANG, S.; HUSAIN, A.; WILSON, D.B.; GANEM, B. (1999) Regulation of Phenylalanine Biosynthesis. Studies on the Mechanism of Phenylalanine Binding and Feedback Inhibition in the *Escherichia coli* P-Protein. **Biochemistry**, 38, 12212-12217.
- ROBERTS, F.; ROBERTS, C.W.; JOHNSON, J.J.; KYLELL, D.E.; KRELL, T.; COGGINS, J.R.; COOMBS, G.H.; MILHOUS, W.K.; TRIPHURI, S.; FERGUSON, D.J.P.; CHAKRABARTI, D.; McLEOD, R. (1998) Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. **Nature**, Vol. 393, 25 June.
- RUFFINO-NETO, A. (2002) Tuberculose: a calamidade negligenciada. In: **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 35(1): 51-58, jan-fev.
- STEWART, J.; WILSON, D.B.; GANEM, B. (1991) Chorismate Mutase/Prephenate Dehydratase from *Escherichia coli*: Subcloning, Overproduction and Purification. **Tetrahedron**. Vol. 47, nº 14/15, pp. 2573-2577.
- TELENTI, A.; ISEMAN, M.; (2000) Drug-Resistant Tuberculosis: What do we do now?. **Drugs**, Feb, 59 (2) 171-179.
- VIEDMA, D.G. (2003) Rapid Detection of resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review discussing molecular approaches. **Clinical Microbiology and Infection**, Vol. 9 Number 5, May. 349-359.
- WHO Report 2003 Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. disponível em [www.who.int/gtb](http://www.who.int/gtb).
- ZHANG, S.; WILSON, D.B.; GANEM, B. (2000) Probing the Catalytic mechanism of Prephenate Dehydratase by Site-Directed Mutagenesis of the *Escherichia coli* P-Protein Dehydratase Domain. **Biochemistry**, 39, 4722-4728.
- ZHANG, S.; POHNERT, G.; KONGSAEREE, P.; WILSON, D.B.; CLARDY, J.; GANEM, B. (1998) Chorismate Mutase-Prephenate Dehydratase from *Escherichia coli*: Study of catalytic and regulatory domains using genetically engineered proteins. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol 273, nº 11, Issue of March 13, pp. 6248-6253.
- ZHANG, Y.; YOUNG, D. (1993) Molecular Mechanisms of Isoniazid: a drug at the front line of tuberculosis control. **Trends in Microbiology**. Vol. 1 Nº3, June, 109-113.