

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Clonagem e Purificação da Enzima Bifuncional Corismato Sintase de
Mycobacterium tuberculosis e Caracterização Cinética de sua Atividade
NADH:FMN-Oxidoreductase.**

FERNANDA ELY

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

Orientação: Jeverson Frazzon e Diógenes Santiago Santos.

Porto Alegre, setembro de 2006.

Este trabalho foi desenvolvido no **Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF)** da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Agências Financiadoras:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Programa Millennium, Ministério da Ciência e Tecnologia-CNPq;

Ministério da Saúde – Departamento de Ciência e Tecnologia – UNESCO;

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Jeverson Frazzon pela amizade, atenção sempre prestada e pelo incentivo, confiança e apoio as minhas decisões;

Ao meu orientador Diógenes Santiago Santos pela confiança depositada em mim durante todos os anos de convívio;

À minha comissão de acompanhamento Professor Giancarlo Pasquali e, em especial, ao Professor Luiz Augusto Basso, pelo apoio intelectual e pela cuidadosa correção do manuscrito apresentado nesta dissertação;

Aos colegas Evelyn Schroeder, Jaim de Oliveira, Isabel da Fonseca, Patrícia Weber e Rafael da Silva pela orientação, sugestões durante o desenho dos experimentos e discussão dos resultados obtidos neste trabalho;

Aos alunos Jordana Dutra de Mendonça e Marcelo Monteiro Pedroso por toda ajuda prestada e por me darem a oportunidade de aprender ensinando. E em especial ao Marcelo por me trazer sempre novas e interessantes informações que aumentam ainda mais meu interesse pela ciência;

À Clotilde de Amorim Pinto pelo auxílio técnico sempre impecável e por tudo que me ensinou nesses anos de convívio, especialmente durante o início da minha formação;

À Ana Paula Moreira por proporcionar a todos os estudantes do CPBMF um ambiente de trabalho mais confortável e produtivo e, além disso, pela sua amizade.

À Renilda e Gleci por garantirem um ambiente de trabalho limpo e organizado nos laboratórios do CPBMF.

Aos funcionários Luciano Saucedo e Silvia Centeno pela gentileza e disposição sempre demonstradas;

Ao revisor desta dissertação, Professor Guido Lenz, pela atenção e sugestões;

Á todos os demais colegas do CPBMF pela amizade e por tornar as horas de trabalho mais prazerosas e descontraídas. Em especial aos amigos queridos que fiz e que guardarei sempre no coração: Ana Luíza, Ana Paula, Bruna, Clarissa, Diego, Doca, Eraldo, Igor, Isabelinha, Isabelona, Jaim, Jordana, Jotinha, Júnior, Marcelo, Marta, Pati, Paula, Rafael, Raquel e Zé.

Por fim, e mais importante, a minha família. Fabi, Régis e Paulo, pela amizade, companheirismo e por suportarem a convivência mesmo nos momentos de maior tensão. Meus pais, Flávio e Izolde, por serem pessoas maravilhosamente únicas, por me trazerem tantas alegrias no convívio e pelo exemplo de caráter e conduta.

Muito Obrigada!

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Tuberculose.....	13
1.2. Via do chiquimato	19
1.3. Corismato Sintase	22
2. OBJETIVOS	28
3. MÉTODOS E RESULTADOS	30
3.1. Manuscrito	31
4. DISCUSSÃO	61
4.1. Amplificação e Clonagem do gene <i>aroF</i> de <i>M. tuberculosis</i>	61
4.2. Purificação da <i>MtCS</i> recombinante e análise da proteína purificada	63
4.3. Verificação da atividade de corismato sintase da <i>MtCS</i>	65
4.4. Determinação das constantes cinéticas aparentes da atividade flavina redutase em <i>MtCS</i>	68
4.5. Efeitos isotópicos primários de deutério	70
4.6. Efeitos isotópicos de solvente e <i>proton inventory</i>	71
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
6. APÊNDICE	81
6.1. Carta de submissão do artigo “Bifunctional <i>Mycobacterium tuberculosis</i> chorismate synthase: isotope effect studies on the FMN reductase activity” à revista <i>Archives of Biochemistry and Biophysics</i>	81
6.2. Seqüência de nucleotídeos do gene <i>aroF</i> de <i>M. tuberculosis</i>	82
6.3. Seqüência dos resíduos de aminoácidos da <i>MtCS</i>	83
6.4. Composição de aminoácidos da <i>MtCS</i>	84
6.5. Mapa do vetor de expressão pET23a(+).	85
6.6. Análise da expressão protéica da <i>MtCS</i> em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)	86
6.7. Análise das etapas de purificação da <i>MtCS</i> por FPLC.	87

7. CURRICULUM VITÆ RESUMIDO 88

LISTA DE ABREVIATURAS

ORF – *Open reading frame*;

TB - Tuberculose;

BCG - *Bacillus Calmette-Guérin*;

HIV – *Human immune deficiency virus*;

OMS – Organização Mundial de Saúde;

AIDS – *Acquired immune deficiency syndrome*;

FDA - *Food and Drug Administration*;

MDR-TB – *Multidrug resistant Mycobacterium tuberculosis*;

XDR-TB - *Extensively drug-resistant tuberculosis*;

PEP – *Phosphoenolpyruvate*;

DAHP - 3-deoxi-*D*-arabinoheptulosonato 7-fosfato;

EPSP – *Enolpyruvylshikimate-3-phosphate*;

CS – Corismato sintase;

FMN_{red} – Flavina mononucleotídeo reduzida;

FMN_{ox} – Flavina mononucleotídeo oxidada;

NAD(P) - *Nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)*;

kDa – kilo Daltons;

His – Histidina;

MtCS – Corismato sintase de *M. tuberculosis*;

ESI-MS - *Electrospray ionization-mass spectrometry*;

DMSO – Dimetil sulfóxido;

PCR – *Polymerase chain reaction*;

IPTG – Isopropil-beta-*D*-tiogalactopiranosida;

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*;

LB – *Luria bertani*;

Sk – *M. tuberculosis shiquimate kinase*;

EPSPs – EPSP sintase de *M. tuberculosis*;

PNP – *Purine nucleotide phosphorylase*;

ATP – *Adenosine triphosphate*;

ADP – *Adenosine diphosphate*;

Pi – *Inorganic phosphate*;

MESG – *2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside*;

ϵ – Coeficiente de absorvidade molar;

Kd – Constante de dissociação;

Km – Constante de Michaelis-Menten;

K_{cat} – Constante catalítica;

K_{cat}/K_m – Eficiência catalítica;

^DV – Efeito isotópico sobre V_{max};

^DV/K – Efeito isotópico sobre V_{max}/K_m.

RESUMO

O aumento da incidência de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a múltiplas drogas tornou urgente a necessidade de novos agentes terapêuticos para o tratamento da tuberculose. A via do ácido chiquímico é essencial para a sobrevivência deste organismo, o que torna suas enzimas interessantes alvos para o desenvolvimento de novos medicamentos. A enzima corismato sintase (*MtCS*) foi identificada no genoma de *M. tuberculosis* por homologia de seqüência. Esta enzima catalisa a síntese NADH- e FMN-dependente de ácido corísmico, precursor de aminoácidos aromáticos, naftoquinonas, menaquinonas e micobactinas. Este trabalho descreve a clonagem, super-expressão e purificação até a homogeneidade da *MtCS* recombinante. As medidas das atividades das reações de corismato sintase e de NADH:FMN oxidoreductase comprovaram a bifuncionalidade da *MtCS*. A atividade de flavina redutase foi caracterizada, mostrando a existência de um complexo estável entre FMN_{ox} e *MtCS*. Efeitos isotópicos primários de deutério e de solvente foram realizados, e sugerem etapas distintas para a transferência do próton e para a transferência do hidreto, com o último contribuindo mais fortemente para a etapa limitante da reação. Os resultados descritos aqui auxiliarão no desenho racional de novos agentes contra tuberculose.

ABSTRACT

The emergence of multi-drug resistance *Mycobacterium tuberculosis* has created an urgent need for new agents to treat tuberculosis. The enzymes of shikimate pathway are attractive targets to the development of these agents, since experimental evidence that this pathway is essential for *M. tuberculosis* has been reported. Chorismate synthase (*MtCS*) has been identified by sequence homology in the genome of *M. tuberculosis*. This enzyme catalyzes the NADH- and FMN-dependent synthesis of chorismate, a precursor of aromatic amino acids, naphthoquinones, menaquinones, and mycobactins. In the present work, we describe *MtCS* cloning, overexpression and purification of recombinant protein to homogeneity. The bifunctionality of *MtCS* was determined by measurements both chorismate synthase and NADH:FMN oxidoreductase activities. The flavin reductase activity was characterized, showing the existence of a stable complex between FMN_{ox} and *MtCS*. Primary deuterium and solvent kinetic isotope effects are described and suggest distinct steps for hydride and proton transfers, with the former being more rate-limiting. These results should pave the way for the rational design of antitubercular agents.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o desenvolvimento de técnicas de seqüenciamento cada vez mais eficientes e de menor custo tornou disponíveis informações sobre genomas de milhares de organismos diferentes. Todos os dias, uma série de novas seqüências é depositada em bancos de dados de domínio público, observando-se um aumento exponencial no número de nucleotídeos seqüenciados nos últimos 10 anos. Considerando apenas as seqüências depositadas no GenBank[®], observamos um aumento de aproximadamente 37 milhões de seqüências em janeiro de 2005 (BENSON *et al.*, 2005) para 54 milhões em fevereiro de 2006 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). A geração desta imensidão de dados abriu um extenso campo de pesquisa que visa, além de outras coisas, entender as verdadeiras funções destas seqüências no organismo em que estão inseridas, estejam elas codificando proteínas, atuando como sinais regulatórios ou exercendo funções ainda desconhecidas. Nos genomas dos diferentes organismos já seqüenciados, milhares de ORFs já foram identificadas, o que aumentou o interesse em estudar as proteínas codificadas por elas, tanto em relação a suas características funcionais quanto as suas características estruturais. As proteínas podem exercer diferentes funções que abrangem desde atividades de transporte, funções estruturais e até hormonais. Entretanto, algumas destas classes protéicas têm recebido atenção especial pelo fato de serem os principais alvos da grande maioria de fármacos existentes no mercado,

entre elas se destacam as proteínas com atividade catalítica, i.e. enzimas, e os receptores.

Os antibióticos fazem parte de uma importante classe de medicamentos que desde a sua introdução, na década de 40 (SAXON, 1999), têm propiciado a melhoria nas condições de saúde e expectativa de vida dos pacientes. Apesar disto, durante 38 anos, entre a introdução do ácido nalidíxico em 1962 e a linezolida em 2000 (ZURENKO *et al.*, 1996), nenhuma nova classe de antibiótico foi introduzida, sendo que as moléculas lançadas no mercado farmacêutico até então não passavam de variações de fármacos já existentes, a grande maioria delas pertencendo a classes de antibióticos há muito tempo conhecidas, como os beta-lactâmicos, quinolonas e macrolídeos (BAX *et al.*, 1998). Nos últimos anos, a emergência de resistência a agentes antibacterianos se tornou motivo de intensa preocupação entre as agências de saúde, principalmente pelo fato de existir uma grande demanda no mercado por novos fármacos que combatam esse problema. Os dados acumulados pelo avanço da genômica são uma recente ferramenta que pode ser utilizada no desenvolvimento de novos antimicrobianos através da identificação de prováveis alvos moleculares. A escolha desses alvos é baseada principalmente no princípio da toxicidade seletiva, teorizado por Paul Ehrlich, que estabelece que a presença do alvo no patógeno e a ausência no hospedeiro tornariam menores as chances de a molécula que atua neste alvo ser tóxica para o hospedeiro. Além disso, é ideal que o alvo escolhido seja validado, i.e., são necessárias evidências de que a molécula alvo é vital para a sobrevivência do patógeno.

A seqüência completa do genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (COLE *et al.*, 1998) possibilitou a identificação de genes cujos produtos são enzimas que representam possíveis alvos para o desenvolvimento de novos medicamentos para a tuberculose (TB). Entre esses genes estão aqueles que codificam as enzimas da via do ácido chiquímico, responsável pela biossíntese de aminoácidos aromáticos em bactérias, fungos, plantas e protozoários do *phylum* apicomplexa (BENTLEY, 1990 & HERRMANN, 1995). O entendimento do mecanismo de ação dessas moléculas catalisadoras através da associação de dados cinéticos e estruturais representa um importante passo para o desenho racional de inibidores que possivelmente possam ser utilizados como agentes anti-micobacterianos (COATES *et al.*, 2002). O estudo relatado aqui trata da sétima e última enzima da via do ácido chiquímico, a corismato sintase. Essa enzima catalisa uma reação única na natureza (MACHEROUX *et al.*, 1999), o que faz com que o entendimento do seu mecanismo de ação tenha fundamental importância tanto em nível acadêmico, quanto em pesquisa aplicada, uma vez que ela representa um importante alvo molecular para o desenho de novos inibidores com capacidade anti-micobacteriana.

1.1. Tuberculose

A TB em humanos é causada pela infecção de micobactérias, principalmente *M. tuberculosis*. O caso mais comum da doença, a TB pulmonar, afeta o sistema respiratório, principalmente pulmões e laringe. Os pacientes com

TB pulmonar ativa são capazes de liberar gotículas de saliva contendo o bacilo da TB através de tosse, espirro ou fala. Essas gotículas, quando inaladas por outro indivíduo, atravessam a árvore brônquica, permitindo a chegada do *M. tuberculosis* até os alvéolos pulmonares onde são fagocitados pelos macrófagos alveolares, contaminando o indivíduo que o inalou (FREIDEN *et al.*, 2003). Devido ao seu pequeno diâmetro (1 a 5 µm), essas gotículas são capazes de permanecer no ar durante minutos ou até horas depois da sua liberação pelo paciente contaminado, o que torna esse patógeno altamente infeccioso. O estabelecimento da infecção nos pulmões está relacionada a dois principais fatores: a virulência da bactéria e a capacidade bactericida dos macrófagos alveolares. Se o bacilo é capaz de sobreviver às defesas iniciais do organismo, ele passa a se multiplicar lentamente dentro do macrófago (DUNLAP *et al.*, 2000). Uma vez que o bacilo é fagocitado se inicia uma cascata de eventos que resulta na contenção da infecção pelo sistema imune ou na sua progressão até o desenvolvimento da doença ativa.

O *M. tuberculosis* não produz endo ou exotoxinas, e, portanto não existe resposta imune imediata contra a infecção. Além disso, o tempo de geração do *M. tuberculosis* de aproximadamente 24 horas (HIRIYANNA & RAMAKRISHNAN, 1986) é considerado longo se comparado com outras bactérias, como *Escherichia coli*, por exemplo, cujo tempo de geração é de aproximadamente 30 min. Essas são algumas das características que dificultam o diagnóstico da TB. O bacilo se replica durante 2 a 12 semanas até atingir número suficiente para desencadear a resposta imune celular, podendo então ser detectado pelo teste tuberculínico (DUNLAP *et al.*, 2000). Antes do

desenvolvimento da imunidade celular o bacilo se espalha para outros tecidos via corrente linfática e sanguínea. A grande maioria dos órgãos é resistente à multiplicação da micobactéria, mas em certos casos a infecção pode se alojar em diferentes tecidos como medula óssea, fígado, ossos, etc., caracterizando a TB extra-pulmolar. O risco de desenvolvimento da doença varia de acordo com uma série de fatores (Tabela 1; FÄTKENHEUER *et al.*, 1999). Existem estimativas que sugerem que apenas 10% das pessoas que são infectadas pelo *M. tuberculosis* desenvolvem a doença durante alguma etapa da sua vida (VYNNYCKY & FINE, 2000). O bacilo, dentro dos macrófagos, continua a se replicar lenta, porém continuamente. Linfócitos T ativados migram para o local da infecção e junto com os macrófagos formam granulomas, o sintoma mais característico da tuberculose pulmonar (DYE & FLOYD, 2006), e que muitas vezes podem ser observados em radiografia de tórax.

Tabela 1: Fatores responsáveis pelo risco variado de desenvolvimento da doença

Fatores relacionados ao hospedeiro	Fatores relacionados ao patógeno
Idade	Virulência da cepa
Sexo	Tropismo por determinados tecidos/órgãos.
Imunização com BCG	
Tempo desde a infecção	
Estado imunológico	
Estado nutricional	
Fatores genéticos	
Estados imunodeficientes específicos (transplante, uso de depressores do sistema imune, HIV).	
Doenças associadas	

Um dos sintomas mais evidentes da TB pulmonar é a tosse. Muitas vezes essa tosse vem acompanhada de escarro, que pode ser utilizado para o diagnóstico da TB através da verificação da presença de micobactérias. Quando a TB afeta outras regiões do organismo, diferente dos pulmões, o diagnóstico passa a ser muito mais complicado. Os pacientes infectados com TB extrapulmonar apresentam sintomas sistêmicos que são facilmente confundidos com os de outras doenças menos graves como a gripe, por exemplo, e muitas vezes o diagnóstico tardio, ou mesmo incorreto, acaba prejudicando a eficácia do tratamento (DUNLAP *et al.*, 2000).

O tratamento recomendado para pacientes com TB é dividido em duas fases. Durante os dois primeiros meses de tratamento são administrados isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. Após a primeira fase, isoniazida e rifampicina continuam a ser administradas por mais 4 meses. O tratamento da TB pode variar dependendo das características do paciente e presença de doenças associadas. Os medicamentos atualmente usados para o tratamento da TB se dividem em medicamentos de primeira e segunda linha (Tabela 2).

Apesar de os medicamentos para TB estarem disponíveis no mercado desde 1940, a TB continua sendo a causa de milhares de morte ao ano. Atualmente, segundo estimativas da OMS, a TB é a principal causa de morte entre doenças infecciosas que possuem cura, estando atrás somente da AIDS (WHO, 2004). A TB tem alcançado números assustadores, o último relatório divulgado pela OMS sobre a situação da TB no mundo estima que só em 2004

existiram aproximadamente 9 milhões de novos casos e 2 milhões de mortes (WHO, 2006). Noventa por cento dos pacientes que desenvolvem a doença estão em países em desenvolvimento (BASSO E BLANCHARD, 1998), o que reflete as principais causas do ressurgimento da TB nas últimas décadas. Fatores como o aumento da população imunodeficiente, principalmente HIV positivos, insuficiência de testes diagnóstico que forneçam dados corretos sobre todos os casos existentes, a falta de políticas e práticas de saúde que visem o controle da infecção e tornem o tratamento de qualidade acessível a todos, entre outros, são os principais problemas que tornam a TB hoje um problema de saúde pública em grande parte dos países em desenvolvimento, mas presente também nos países desenvolvidos.

Tabela 2: Medicamentos usados no tratamento da TB.

Medicamentos de Primeira Linha	Medicamentos de Segunda Linha
Isoniazida	Cicloserina
Rifampicina	Etionamida
Rifapentina	Levofloxacino*
Rifambutina*	Moxifloxacino*
Etambutol	Gatifloxacino*
Pirazinamida	Ácido ρ -amino salicílico
	Estreptomicina
	Canamicina*
	Capreomicina

* Medicamentos não aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o uso no tratamento da TB (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2003).

A correlação entre HIV e TB tem sido excepcionalmente preocupante. Na África a TB é a doença de maior importância associada à AIDS e tem sido a principal causa de óbito entre os soro-positivos. Outro problema está no aumento do número de casos de TB extrapulmonar, cujo diagnóstico se torna ainda mais difícil (FÄTKENHEUER *et al.*, 1999). Além disso, o tratamento prolongado acaba levando a altas taxas de abandono (STOKSTAD, 2000) que contribuem significativamente para a proliferação de linhagens de *M. tuberculosis* multi-resistentes (MDR-TB), caracterizadas pela resistência, a pelo menos, isoniazida e rifampicina, os dois medicamentos de primeira linha mais utilizados e mais eficazes no tratamento da TB (BASSO & BLANCHARD, 1998). Pacientes infectados com MDR-TB são tratados com os medicamentos de segunda linha que são menos efetivos e muito mais caros. Nos Estados Unidos, por exemplo, o tratamento custa em torno de \$ 250.000 por pessoa e dura em média 2 anos (STOKSTAD, 2000). No caso da coinfeção HIV e MDR-TB a taxa de mortalidade é próxima a 100% e é definida como a infecção oportunista mais maligna associada a AIDS (FÄTKENHEUER *et al.*, 1999). Cerca de 300,000 novos casos de MDR-TB são diagnosticados por ano, sendo que de 4 a 20 % destes casos são classificados com *extensively drug-resistant TB* (XDR-TB), definido com a cepa de MDR-TB que também é resistente a pelo menos 3 dos 6 medicamentos de segunda linha mais utilizados (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2006). Essa situação demonstra a necessidade urgente de desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da TB que sejam mais efetivos, principalmente contra linhagens MDR-TB, e que diminuam o tempo de tratamento, levando a maior adesão por parte dos pacientes.

1.2. Via do chiquimato

Os estudos clássicos de Bernhard Davis (DAVIS, 1951) identificaram a via do chiquimato como a rota responsável pela biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. A partir destes dados muitos trabalhos foram realizados visando a caracterização desta via e de suas enzimas. Atualmente se sabe que ela é composta por sete etapas enzimáticas que levam a formação do ácido corísmico (Figura 1), o último precursor comum na biossíntese de aminoácidos aromáticos e uma série de outros compostos de metabolismo secundário.

A via do ácido chiquímico se inicia com a condensação do composto fosfoenolpiruvato (PEP), proveniente da via glicolítica, e eritrose 4-fosfato, intermediária da via das pentoses, dando origem a um composto de seis membros, o 3-deoxi-*D*-arabinoheptulose 7-fosfato (DAHP). Esta reação é catalisada pela enzima DAHP sintase, e a partir daí as enzimas deidroquinato sintase, deidroquinato desidratase, chiquimato desidrogenase, chiquimato quinase, EPSP sintase e corismato sintase catalisam reações seqüenciais que originam o ácido corísmico. Este composto, além de ser precursor de aminoácidos aromáticos, é responsável pela biossíntese de naftoquinonas, menaquinonas e micobactinas em micobactérias (RATLEDGE, 1982). O corismato também está envolvido na biossíntese de uma série de outros importantes compostos como vitamina K, ubiquinona, enteroquelinas e ácido *p*-amino benzóico (COGGINS *et al.*, 2003). Em plantas superiores os compostos de metabolismo secundário

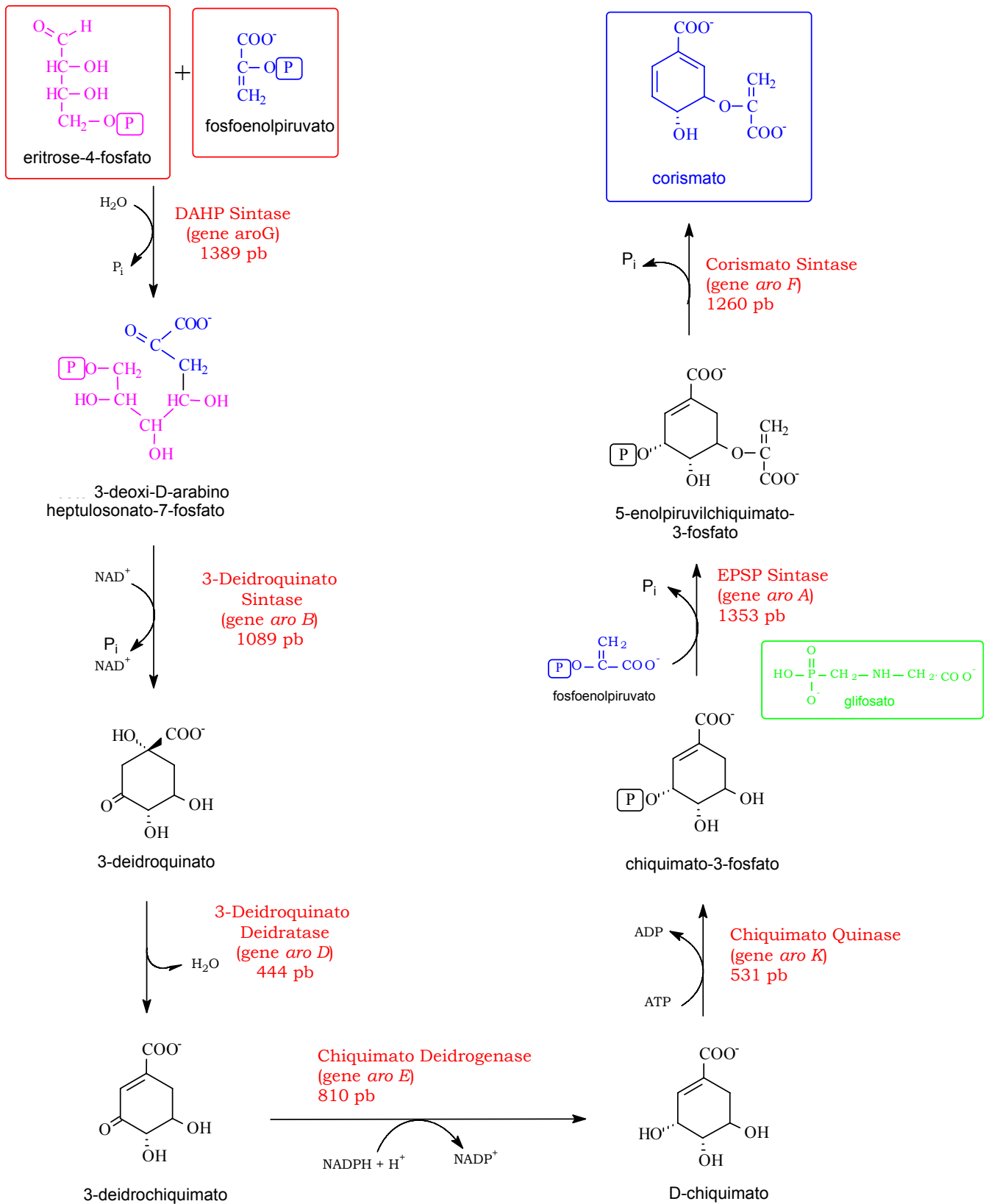


Figura 1: Via do Ácido Chiquímico

provenientes do corismato também são inúmeros, e exercem diferentes funções, entre elas, funções de pigmentação, defesa contra insetos e outros herbívoros, proteção contra luz UV, e formação de lignina (BENTLEY, 1990).

A via do ácido chiquímico está presente em fungos, algas, bactérias, plantas e parasitas do *phylum* apicomplexa (BENTLEY, 1990 e HERRMANN, 1995). A ausência desta via em mamíferos faz com que os aminoácidos aromáticos nestes organismos tenham que ser obtidos através da dieta alimentar.

As enzimas da via do ácido chiquímico são alvos viáveis e bem caracterizados para o desenvolvimento de herbicidas de amplo espectro. Um exemplo é o composto glifosato, comercializado com o nome de Roundup pela empresa Monsanto. Este composto é um dos herbicidas mais utilizados no mundo e age inibindo a enzima EPSP sintase (KISHORE & SHAH, 1988). Além disso, uma série de inibidores de enzimas da via já foi descrita, alguns deles também são capazes de inibir o crescimento bacteriano (DAVIES *et al.*, 1994).

A essencialidade da via do ácido chiquímico já foi observada em alguns organismos de grande interesse médico, como o *Plasmodium falciparum*, causador da malária, e o *M. tuberculosis*. As espécies *Toxoplasma gondii*, *P. falciparum* e *Cryptosporidium parvum* tiveram seu crescimento inibido pelo glifosato (ROBERTS, *et al.*, 1998). Em *M. tuberculosis* a interrupção do gene *aroK*, que codifica a enzima chiquimato quinase, tornou o organismo inviável,

comprovando a essencialidade da via nessa espécie (PARISH & STOKER, 2002). Esses trabalhos suportam fortemente a essencialidade da via do ácido chiquímico para a sobrevivência destes patógenos. A ausência desta rota em mamíferos e a necessidade de sua funcionalidade para a sobrevivência do *M. tuberculosis* tornam suas enzimas interessantes alvos para a procura de inibidores que possam ser testados como agentes anti-micobacterianos.

1.3. Corismato Sintase

A enzima corismato sintase (CS) foi inicialmente descrita em três diferentes organismos: *E. coli* (MORELL *et al.*, 1967), *Bacillus subtilis* (HASAN & NESTER, 1978) e *Neurospora crassa* (GAERTNER & COLE, 1973). Nesta época, as diferenças bioquímicas entre essas três macromoléculas levaram os cientistas a acreditar que se tratavam de enzimas diferentes; contudo, logo se evidenciou que as três enzimas catalisavam a mesma reação, a conversão de EPSP em ácido corísmico (Figura 1 do manuscrito). Esta reação necessita a presença de uma flavina reduzida (FMN_{red}) como cofator, mas apesar disto, não se trata de uma reação de oxi-redução, como acontece com a maioria das flavoenzimas. O FMN_{red} apresenta o mesmo estado de oxidação no início e no final da reação, o que gerou especulações quanto ao fato de esta molécula possuir uma função meramente estrutural durante a catálise. Hoje, já é descrito que a molécula de FMN_{red} participa ativamente da reação, possuindo uma função química (RAMJEE *et al.*, 1991).

Uma interessante característica desta enzima é a capacidade que a CS de alguns organismos têm de reduzir o cofator FMN_{ox} através de uma segunda atividade enzimática, NAD(P)H:FMN oxidoreductase (muitas vezes referida como atividade diaforase). A presença dessa segunda atividade fez com que as CSs caracterizadas até o momento fossem divididas em três grupos. No primeiro grupo as CSs são chamadas monofuncionais, e estão presente na maioria das bactérias, incluindo *E. coli* (MORELL *et al.*, 1967). Neste grupo a CS só é ativa em condições anaeróbicas e na presença de FMN reduzido química ou enzimaticamente, isso porque o potencial redox de FMN_{red}/FMN_{ox} é muito baixo e não permite que a FMN permaneça reduzida em atmosfera com oxigênio. As CSs do segundo grupo foram encontradas em fungos e em *M. tuberculosis* (manuscrito submetido), e são chamadas bifuncionais. Neste grupo, as CSs possuem a segunda atividade de flavina redutase dependente de NAD(P)H, cuja seqüência codificadora está incluída na mesma cadeia polipeptídica da sua atividade característica (HENSTRAND, *et al.*, 1996; GAERTNER, 1987). Neste caso é possível observar atividade enzimática mesmo na presença de oxigênio provavelmente devido a características estruturais da enzima que permitem a manutenção da FMN na forma reduzida. No terceiro grupo, caracterizado em *B. subtilis* (HASAN & NESTER, 1978a; HASAN & NESTER, 1978b; HASAN & NESTER, 1978c), a CS aparece associada com as enzimas deidroquinato sintase, segunda da via chiquimato, e flavina redutase, formando um heterotrímero trifuncional.

Inicialmente se acreditava que as diferenças no peso molecular entre a CS monofuncional de *E. coli* (39,1 kDa) e a CS bifuncional de *N. crassa* (46,4 kDa) eram responsáveis pela atividade complementar de flavina redutase presente nas bifuncionais. Baseado na comparação das seqüências destas CSs, duas regiões do gene que codifica CS em *N. crassa* foram deletados, uma região de 18 resíduos de aminoácidos internos e outra de 29 resíduos de aminoácidos do C-terminal. Ao contrário do que era esperado, a ausência destas regiões não provocou grandes alterações na atividade de flavina redutase (HENSTRAND *et al.*, 1995). Mais tarde, a caracterização de uma CS bifuncional de menor peso molecular (40,8 kDa), de *Saccharomyces cerevisiae* (HENSTRAND *et al.*, 1996), comprovou a hipótese de que a bifuncionalidade não poderia ser predita através da simples análise do peso molecular da proteína. Até o momento, não se sabe exatamente quais os resíduos ou a região do sítio ativo que é responsável pela atividade flavina redutase nas CSs bifuncionais. A determinação da estrutura tridimensional da CS bifuncional de *S. cerevisiae* não apresenta o *Rossmann fold*, característico de proteínas que ligam NAD(P)(H), o que sugere que o sítio de ligação deste substrato não possui uma conformação usual (QUEVILLON-CHERUEL *et al.*, 2004). Por outro lado, a forte dependência da velocidade de oxidação do NAD(P)H em relação à concentração de EPSP, sugere que NAD(P)H e EPSP competem pelo mesmo sítio de ligação nas CSs bifuncionais (KITZING *et al.*, 2001). Em *M. tuberculosis* a estrutura cristalográfica da CSs é relativamente similar as outras estruturas depositadas, apresentando a topologia característica de CSs, o sanduíche β - α - β (DIAS *et al.*, 2006). Também nesta estrutura não foi determinada qual a região de ligação do NADH ou do EPSP.

A síntese de corismato a partir de EPSP é feita através de uma reação de eliminação 1,4 *trans* do grupamento 3-fosfato e do hidrogênio C(6*proR*), em um mecanismo não-concertado (FLOSS *et al.*, 1972). A eliminação 1,4 *anti* e a necessidade de uma FMN_{red} são duas características não usuais, sendo que a reação catalisada pela CS é única entre as enzimas flavina-dependentes (MACHEROUX *et al.*, 1999). Apesar de existirem diferentes classes de CS, classificadas de acordo com sua habilidade de reduzir FMN, parece não existir diferença entre o mecanismo de eliminação catalisado por elas (KITZING *et al.*, 2004).

Estudos espectrocópicos e físicos da CS de *E. coli* descreveram uma significativa mudança estrutural na enzima durante a formação do complexo ternário (CS:FMN:EPSP). Quando EPSP e FMN_{red} são ligados ao sítio ativo da CS, a enzima adquire uma conformação mais compacta, chamada *closed form*, enquanto que a apoenzima exibe uma conformação mais relaxada, chamada de *opened form* (MACHEROUX *et al.*, 1998). A estrutura cristalográfica da CS de *Streptococcus pneumoniae* evidenciou essa mudança conformacional durante a ligação do EPSP (MACLEAN & ALI *et al.*, 2003). Quando as estruturas nas formas *opened* e *closed* são comparadas se observa uma significativa mudança na posição dos resíduos His 110 e His 10 (MACLEAN & ALI *et al.*, 2003). A função destas duas histidinas no sítio ativo da CS foi estudada através de mutação sítio dirigida na enzima de *N. crassa*. Estes resíduos, His 106 e His 17 (em *N. crassa*), foram substituídos por alaninas, reduzindo a atividade enzimática 10 e 20 vezes, respectivamente (KITZING *et al.*, 2004). A liberação do

grupamento fosfato durante a reação de eliminação ocorre antes da quebra da ligação C-(6*proS*) hidrogênio (BORNEMANN et al., 1996), e é provável que estas duas histidinas estejam envolvidas na etapa química inicial de clivagem da ligação C-O para a liberação deste grupamento fosfato. Foi proposto por Kitzing *et al.* (2004) que a His 106 estaria envolvida na protonação da forma reduzida monoaniônica da FMN, e, portanto, atuaria como um ácido que doa prótons para N(1). Por outro lado, a função da His 17 seria protonar o grupamento fosfato que está sendo retirado do EPSP. Um mecanismo detalhado para essa reação foi descrito baseado em dados estruturais e de mutagênese sítio dirigida (Figura 2).

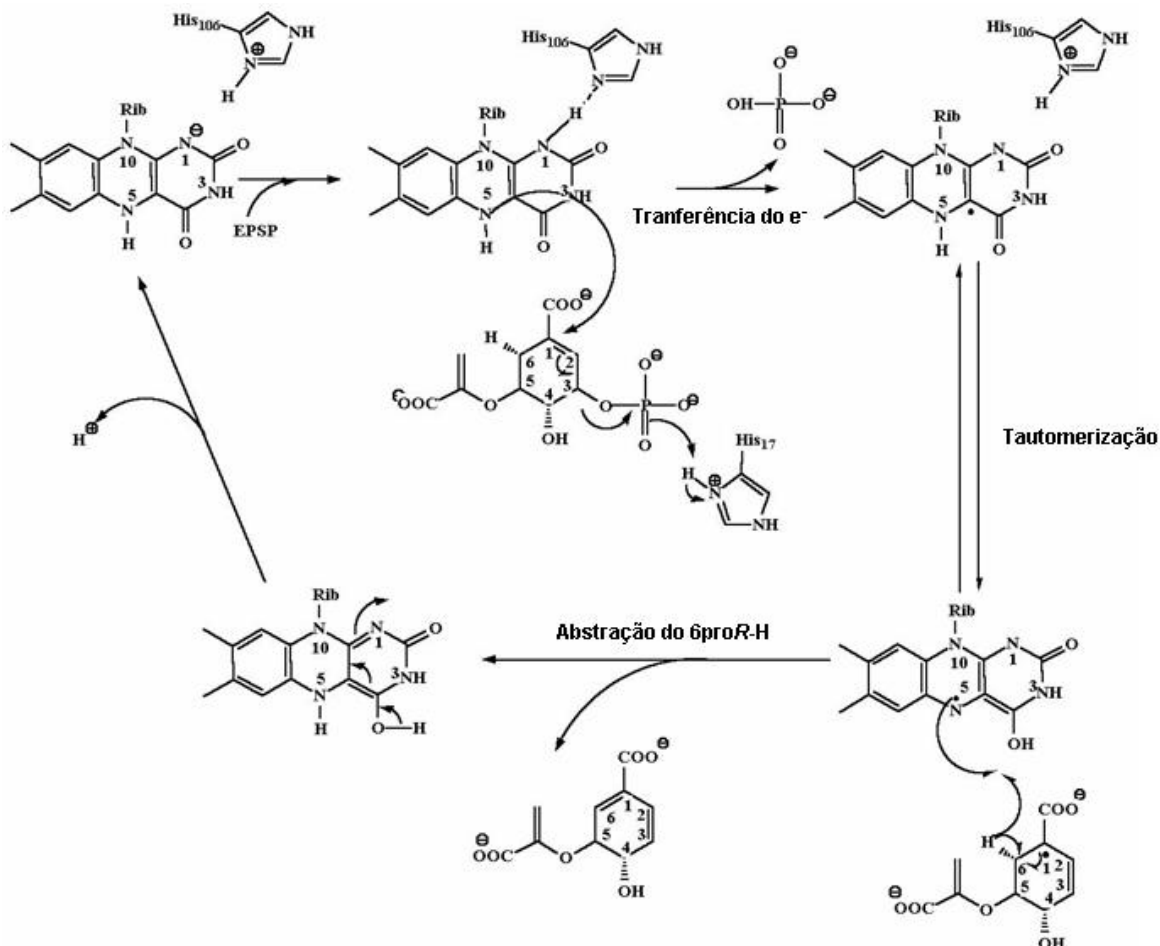


Figura 2: Mecanismo de reação catalisado pela CS (KITZING *et al.*, 2004).

Apesar de a reação de eliminação catalisada pela CS ter seu mecanismo bem caracterizado, pouco ainda se conhece sobre o mecanismo de reação da atividade flavina redutase das CSs bifuncionais.

2. OBJETIVOS

Este trabalho visa a caracterização funcional de um alvo molecular para o desenvolvimento de medicamentos contra TB, a enzima corismato sintase de *M. tuberculosis* (*MtCS*). Os dados aqui descritos poderão auxiliar no desenho racional de inibidores enzimáticos análogos dos substratos, estados de transição ou produtos desta enzima. Além disso, a enzima purificada poderá ser usada para a procura de inibidores através de *high throughput screening*, usando tanto bancos de compostos sintetizados quimicamente quanto extratos de diversas fontes.

Uma série de objetivos específicos foram traçados buscando caracterizar a reação enzimática catalisada pela *MtCS*:

- Amplificação, clonagem e super-expressão do gene *aroF* de *M. tuberculosis* H37Rv;
- Purificação da enzima recombinante *MtCS* até a homogeneidade;
- Análise da proteína purificada - ESI-MS, seqüenciamento do N-terminal e determinação do estado oligomérico;
- Caracterização a enzima de acordo com a(s) reação(s) que ela catalisa (mono, bi ou trifuncional);

- Determinação das constantes cinéticas da enzima;
- Investigação da etapa limitante da velocidade da reação através de efeitos isotópicos primários e de solvente.

3. MÉTODOS E RESULTADOS

A seção de materiais e métodos e a seção de resultados são apresentadas a seguir na forma do manuscrito intitulado “**Bifunctional *Mycobacterium tuberculosis* chorismate synthase: isotope effect studies on the FMN reductase activity**” submetido à publicação na revista *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Seção 6.1).

3.1. Manuscrito

Bifunctional *Mycobacterium tuberculosis* chorismate synthase: isotope effect studies on the FMN reductase activity

Fernanda Ely^{1,2}, Evelyn K. Schroeder¹, Jeverson Frazzon³, Mário S. Palma⁴, Diógenes S. Santos^{1*}, and Luiz A. Basso^{1*}.

¹Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90619-900, ²Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, ³Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91501-970, ⁴Departamento de Biologia/CEIS, Universidade do Estado de São Paulo, Rio Claro, SP 13506-900, Brazil.

Running title: Isotope effect on FMN reductase activity of chorismate synthase.

Corresponding authors: luiz.basso@puers.br; diogenes@puers.br.

Phone (Fax) number: +55-51-3320-3629.

Subject area: Protein Biochemistry and Biophysics.

ABSTRACT

The emergence of multi-drug resistance *Mycobacterium tuberculosis* has created an urgent need for new agents to treat tuberculosis (TB). The enzymes of shikimate pathway are attractive targets to the development of these agents, since experimental evidence that this pathway is essential for *M. tuberculosis* has been reported. Chorismate synthase (*MtCS*) has been identified by sequence homology in the genome of *M. tuberculosis*. This enzyme catalyzes the NADH- and FMN-dependent synthesis of chorismate, a precursor of aromatic amino acids, naphthoquinones, menaquinones, and mycobactins. In the present work, we describe *MtCS* cloning, overexpression and purification of recombinant protein to homogeneity. The bifunctionality of *MtCS* was determined by measurements of both chorismate synthase and NADH:FMN oxidoreductase activities. The flavin reductase activity was characterized, showing the existence of a stable complex between FMN_{ox} and *MtCS*. Primary deuterium and solvent kinetic isotope effects are described and suggest distinct steps for hydride and proton transfers, with the former being more rate-limiting. These results should pave the way for the rational design of antitubercular agents.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, shikimate pathway, chorismate synthase, NADH:FMN-oxidoreductase, bifunctional enzymes, primary deuterium isotope effects, solvent isotope effects, proton inventory.

ABBREVIATIONS USED

TB, tuberculosis; MRD-TB, multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*; XDR-TB, extensively drug-resistant tuberculosis; CS, chorismate synthase; EPSP, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate; FMN_{red}, reduced flavin mononucleotide; FMN, flavin mononucleotide; *MtCS*, chorismate synthase from *M. tuberculosis*; FPLC, fast protein liquid chromatography; ESI-MS, electrospray ionization-mass spectrometry; PNP, purine nucleotide phosphorylase; MESG, 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside; FMN_{ox}, oxidized flavin mononucleotide; PEP, phosphoenolpyruvate; IPTG, isopropyl β-D-thiogalactoside; Sk, shikimate kinase from *M. tuberculosis*; EPSPs, EPSP synthase from *M. tuberculosis*; *NcCS*, chorismate synthase from *Neurospora crassa*;

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) remains a major global health concern. Its causative agent, *Mycobacterium tuberculosis*, has been estimated to infect approximately one-third of the world's population [1], and approximately 30 million people have died from the disease in the past decade [2]. The World Health Organization estimated a total of 9 million new cases of TB and approximately 2 million deaths from this disease in 2004, second only to AIDS among infectious diseases [3]. Several factors including poverty, overcrowding, decline in health care structures, and the synergy between HIV and TB are thought to be driving the resurgence of TB [4]. The emergence of drug resistant isolates of *M. tuberculosis*, particularly of multidrug-resistant TB (MDR-TB), defined as resistant to at least isoniazid and rifampicin [5], imposes a great challenge to public health [6]. Treatment of MDR-TB requires the administration of second-line drugs that are more toxic and less effective, and are given for at least three times as long as, and 100 times as expensive as basic short-course chemotherapy regimens [7]. More recently, the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and the World Health Organization surveyed the WHO/International Union Against Tuberculosis and Lung Disease Global Supranational TB Reference Laboratory Network to assess the frequency and distribution of extensively drug-resistant (XDR) TB cases, which are defined as cases in persons with TB whose isolates were resistant to isoniazid and rifampicin and at least three of the six main classes of second-line drugs (aminoglycosides, polypeptides, fluoroquinolones, thioamides, cycloserine, and *para*-aminosalicylic acid). This survey determined that, during 2000-2004, of 17,690 TB isolates, 20% were MDR and 2% were XDR [8]. XDR-TB has a wide geographic distribution, including the USA where TB control has been effective for many

years, and is associated with worse treatment outcomes than MDR-TB. The emergence of XDR-TB worldwide raises the bleak prospect of a future epidemic of virtually untreatable TB. New antimycobacterial agents are thus needed to improve the treatment of MDR- and XDR-TB, to shorten the treatment course and increase patient compliance, and to provide more effective treatment of latent TB infection.

A plausible approach to selective antimicrobial chemotherapy is to exploit the inhibition of targets unique and vital to the pathogen [9]. The shikimate pathway is an attractive example of this kind of target, since this route is essential in higher plants, fungi, bacteria and algae and is absent in mammals [10, 11]. In *M. tuberculosis*, this route leads to the biosynthesis of a wide range of primary and secondary metabolites, including aromatic amino acids, folate, naphthoquinones, menaquinones and mycobactins [12]. Recently, the disruption of *aroK* gene, encoding for shikimate kinase enzyme, has demonstrated that shikimate pathway is essential for *M. tuberculosis* viability [13], which establishes the enzymes of this pathway as potential targets for the development of new antimycobacterial agents.

Homologues to the shikimate pathway enzymes were identified in the complete genome sequence of *M. tuberculosis* H37Rv [14]. Among them, the chorismate synthase (CS; EC 4.2.3.5; 5-*O*-(1-carboxyvinyl)-3-phosphoshikimate phosphate lyase) encoding gene (*aroF*, Rv2540c) was proposed to be present by sequence homology. CS catalyzes an unusual 1,4-*anti*-elimination of the 3-phosphate group and the C-(6*proR*) hydrogen from 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP) forming chorismate and phosphate [15]. Although there is no overall change in its redox state, there is an absolute requirement for a reduced flavin mononucleotide (FMN_{red}) [16, 17]. The CS-catalyzed chemical reaction introduces the second of the three double bonds which are necessary for formation of the

benzene ring. Another interesting feature of CSs from different organisms is the way that reduced FMN_{red} is obtained divides these enzymes into two classes, monofunctional and bifunctional. The CSs from fungi are bifunctional as they display a second enzymatic activity, an NAD(P)H-dependent flavin reductase (described as “diaphorase” activity in several papers), which confers them an intrinsic ability to reduce flavin using NAD(P)H. The CSs from plants and *Escherichia coli* are monofunctional as they do not possess this activity and are active only in anaerobic conditions in the presence of either chemically or enzymatically reduced flavin. We have recently reported a molecular model [18] and three-dimensional structure determination by X-ray crystallography [19] for CS from *M. tuberculosis* (*MtCS*). However, there has been no report on whether *MtCS* is bifunctional or monofunctional.

Here we report cloning of *M. tuberculosis* CS-encoding *aroF* gene, overexpression and purification to homogeneity of active recombinant *MtCS*, N-terminal sequencing, electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), and oligomeric state determination by gel filtration. We also show that *MtCS* is bifunctional based on activity measurements of both chorismate synthase and NADH-dependent flavin reductase activities. FMN appears to be stably bound to *MtCS* and the apparent kinetic constants for the holoenzyme *MtCS*-FMN_{ox} for NADH were determined. Measurements of primary deuterium and solvent kinetic isotope effects were carried out to prove the nature of the rate-limiting step of the redox reaction. Proton inventory on the maximal velocity allowed us to address the number of kinetically important transferred protons. The results presented here will pave the way for the rational design of *MtCS* inhibitors with potential antitubercular activity and low toxicity.

MATERIALS AND METHODS

Materials. *Pfu* DNA polymerase was from Stratagene. The pET23a(+) expression vector and *E. coli* Rosetta(DE3) host cell were from Novagen. All chromatographic supports, including the molecular weight calibration kits, were purchased from GE Healthcare. The protease inhibitor cocktail was from Roche. Purine nucleotide phosphorylase (PNP, EC 2.4.2.1) and 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside (MESG) were purchased from Molecular Probes -Invitrogen. NADH, NAD⁺, oxidized FMN (FMN_{ox}), ATP, phosphoenolpyruvate (PEP), *Leuconostoc mesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase (type XXIII) and yeast hexokinase (type C-300) were from Sigma Chemical Co. D-glucose-1-d (97 atom % D) was from Aldrich and deuterium oxide (99.9 atom % D) was from Cambridge Isotope Laboratories. The genomic DNA from *M. tuberculosis* was a generous gift from Prof. William Jacobs Jr., Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, USA.

Cloning, Overexpression and Purification of MtCS. The complete genomic sequence of *M. tuberculosis* H37Rv [14] allowed the design of oligonucleotide primers complementary to the amino-terminal coding and carboxy-terminal noncoding strands of *aroF* gene (5' **ggtcatatgttgcgctggatcaccgcg** 3' and 5' **cggatcctcaaccggagaccgcgcg** 3', respectively). These primers, containing 5'*Nde*I and 3'*Bam*HI restriction sites, in bold, were used to amplify *aroF* gene (1,206 bp) from genomic DNA, using *Pfu* DNA polymerase and standard PCR conditions. The amplified fragment was digested with *Nde*I and *Bam*HI, and cloned into pET23a(+) expression vector previously digested with the same restriction enzymes. The *aroF* gene identity and the absence of PCR-introduced mutations were

confirmed by DNA sequencing. The pET23a(+):*aroF* was transformed by electroporation into *E. coli* Rosetta(DE3) host cells and selected on LB agar plates containing 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ carbenicillin and 34 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chloramphenicol. Single colonies were inoculated in 6 L of Luria-Bertani medium containing the same antibiotics and grown for 24 h at 37 °C at 180 rpm with no isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) induction. The cells (25 g) were harvested by centrifugation at 3,000 g for 30 min at 4 °C, collected and resuspended in 75 mL of 50 mM Tris-HCl, pH 7.8 (buffer A) containing proteinase inhibitor cocktail and 0.2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ lysozyme; and the mixture was stirred for 30 min. The cells were disrupted by sonication and centrifuged at 48,000 g for 30 min to remove cell debris. Streptomycin sulfate was added to a final concentration of 1% (w/v) and the mixture was stirred for 30 min. The soluble fraction was collected by centrifugation at 48,000 g for 30 min and dialyzed against buffer A. The sample was loaded on a Q-Sepharose Fast Flow (2.6 cm x 8.2 cm) anion exchange column previously equilibrated with buffer A and the proteins were eluted using a linear gradient from 0.0 to 0.5 M NaCl. The fractions containing *MtCS* were pooled and ammonium sulfate was added to a final concentration of 0.8 M. The sample was loaded on a High Load Phenyl-Sepharose (1.6 cm x 10 cm) hydrophobic interaction column pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (buffer B). The proteins were fractionated using a linear gradient from 0.8 to 0.0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. The active fractions were pooled and dialyzed against buffer A. The sample was loaded on a MonoQ (1.6 cm x 10 cm) anion exchange column previously equilibrated with buffer A. The proteins were eluted using a linear gradient of NaCl (0.0 - 0.5 M). The fractions with homogeneous *MtCS* were pooled, quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Samples of each purification step were analyzed by SDS-PAGE [20].

Protein concentration was determined by Bradford method [21], using Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad) and bovine serum albumin as standard.

Mass Spectrometry Analysis and N-terminal Amino Acid Sequencing. The recombinant *MtCS* was analyzed using mass spectrometry in an adaptation of Chassigne and Lobinski systems [22]. Intact horse heart myoglobin and its typical cone-voltage induced fragments were used to equipment calibration. The *MtCS* subunit molecular mass was determined by ESI-MS and approximately 50 pmol of sample was injected into electrospray transport solvent. The N-terminal amino acid residues of purified recombinant *MtCS* were identified by automated Edman degradation sequencing using a PPSQ 21A gas-phase sequencer (Shimadzu).

Determination of Native MtCS Molecular Mass. The molecular mass of native *MtCS* was determined by gel filtration using Superdex S-200 (10 mm x 30 cm) column eluted with buffer A containing 200 μ M NaCl at 0.4 mL.min⁻¹. The protein elution was monitored at 280 nm. The of protein molecular weight standards were from Low Molecular Weight and High Molecular Weight Calibration kits (GE Healthcare).

EPSP Synthesis. The shikimate kinase (Sk) and EPSP synthase (EPSPs) from *M. tuberculosis* [23, 24], and PNP [25, 26] were used to synthesize the substrate EPSP. The synthesis was carried out using 9.6 mM shikimate, 2.4 mM ATP, 3 mM PEP, 0.4 mM MESG. The reaction mixture (S1) was pre-incubated in 50 mM Tris-HCl, 2.5 mM MgCl₂, 2.5 mM KCl pH 7.6 (buffer C) for 3 min at 25 °C. To S1 was added 2.2 U Sk, 0.7 U EPSPs, 2 U PNP and incubated for 30 min at 25 °C. The enzymes were removed by

ultrafiltration using a Centricon 3000 Da cut-off (Amicon), resulting in a mixture of compounds (S2), which included the substrate EPSP. One unit (U) of enzyme activity for all enzymes cited in this work is defined as the amount of enzyme catalyzing the conversion of 1 μmol of substrate per minute at 25 °C in an optical path of 1 cm.

MtCS Enzymatic Assay for CS activity. The *MtCS* assay was performed in the forward direction using 15 μL S2, 0.04 mM FMN_{ox} , 0.3 mM NADH, 0.2 mM MESG, 1 U PNP in buffer A (S3). S3 was incubated for 4 min at 25 °C for total consumption of Pi by PNP, to which *MtCS* was added. The CS reaction was monitored by detecting release of Pi at 360 nm ($\epsilon = 11.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) using PNP present in S3. The assay was performed at 25 °C and monitored using a Shimadzu UV-2550 spectrophotometer.

MtCS and FMN_{ox} Interaction. The stability of the interaction between FMN_{ox} and *MtCS* was tested by incubation of *MtCS* with excess FMN_{ox} in buffer A for 12 hours at 4 °C in the dark. The mixture was injected into a HiTrapQ HP anion exchange column previously equilibrated with buffer A. The sample was eluted with a linear gradient from 0.0 to 1 M NaCl. Absorption spectrum of the pool of fractions containing FMN_{ox} and *MtCS* was measured at wavelengths values ranging from 210 to 600 nm by a Shimadzu UV-2550 spectrophotometer.

MtCS Enzymatic Assay for NADH:FMN-oxidoreductase Activity. All assays were performed at 25 °C in buffer A and the FMN-reductase activity of *MtCS* was monitored for the forward reaction. The activity measurements were based on the decrease of NADH concentration upon FMN reduction at 380 nm ($\epsilon = 0.893 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). The apparent

steady state kinetic parameters K_m and V_{max} of FMN reductase activity were determined for holoenzyme $MtCS-FMN_{ox}$ in the presence of varying concentration of NADH (10, 25, 50, 75, 100, 200, 300 μM). The reaction was started with the addition of 60 nmol of homogeneous $MtCS$ previously incubated with 40 μM FMN_{ox} .

Kinetic Isotope Effects and Proton Inventory. $[4S-^2H]NADH$ was synthesized according to the method described by Ottolina *et al.* (1989) [27]. The substrates, $[4S-4-^1H]$ - or $[4S-4-^2H]$ -NADH, were purified on a MonoQ column as previously described [28], and the fractions with absorbance ratios $A_{260nm}/A_{340nm} \leq 2.3$ were pooled. Both kinetic isotope effects and proton inventory were determined in buffer A with 60 nmol of homogeneous $MtCS$ previously incubated with 40 μM FMN_{ox} . The determination of primary deuterium kinetic isotope effects was carried out by measuring initial rates in the presence of varying concentrations of either $[4S-4-^1H]$ - or $[4S-4-^2H]$ -NADH. The solvent kinetic isotope effects were determined by measuring initial velocities in the presence of varying concentrations of NADH in either H_2O or 91 atom % D_2O . Proton inventory was carried out with saturating concentrations of NADH at various mole fractions of D_2O (from 0 to 80 atom % D_2O). All measurements were performed in triplicate. The nomenclature proposed by Northrop [29] and Cook and Cleland [30] was used to express isotope effects.

Data Analysis. The initial velocity kinetic data were fitted to the appropriate equations by using the non-linear regression function of SigmaPlot 2000 (SPSS, Inc.), yielding values for the kinetic parameters and standard errors. The initial rate measured at seven different NADH concentrations were fitted to eq. 1.

$$v = VA/(K + A) \quad (\text{eq. 1})$$

Isotope effect data were fitted to eq 2, which assumes isotope effects on both V/K and V . In equations 1 and 2, V is the maximal velocity, K is the Michaelis constant, A is substrate concentrations, $E_{V/K}$ and E_V are the isotope effects minus 1 on V/K and V , respectively, and F_i is the fraction of deuterium label.

$$v = VA/[K(1 + F_i E_{V/K}) + A(1 + F_i E_V)] \quad (\text{eq. 2})$$

RESULTS AND DISCUSSION

Cloning, Expression, and Purification of MtCS. The PCR amplification of *aroF* gene from genomic *M. tuberculosis* DNA yielded a fragment with the expected length (1206 bp). The fragment was cloned into pET23a(+) expression vector, and the *aroF* gene was sequenced, which confirmed its identity and the absence of PCR-introduced mutations. A number of rare codons were identified in *aroF* sequence, and the *MtCS* overexpression could only be achieved in *E. coli* Rosetta(DE3) host cells, which provide the required tRNAs for codons. SDS-PAGE analysis revealed a cell extract containing a significant amount of a soluble protein with an apparent molecular weight in agreement with the predicted value based on amino acid sequence for *MtCS* (41.8 kDa). Recombinant protein expression was achieved in cells grown for 24 h at 37 °C in the absence of IPTG induction. It has been previously shown that the *lac*-controlled systems, including the pET system, could have a high-level protein expression, in the absence of inducer. This phenomenon occurs in the cell stationary phase, when there is the presence of a complex medium, cyclic AMP, acetate and low pH [31]. The three-step purification yielded approximately 55 mg of *MtCS* from 6 liters of cell culture. The ammonium sulfate precipitation of purified *MtCS* resulted in total inactivation of the enzyme (data not shown). Homogeneous recombinant protein was thus instantaneously frozen in liquid nitrogen in the absence of ammonium sulfate, which proved to be a convenient protocol for active *MtCS* storage.

Analysis of purified MtCS. The ESI-MS of homogeneous *MtCS* revealed a subunit molecular mass of 41,804 Da, consistent with the theoretical molecular mass (41,792 Da). The first 16 N-terminal amino acid residues were identified as MLRWITAGESHGRALV,

which confirmed the identity of homogeneous *MtCS* and presence of N-terminal methionine residue. Analytical gel filtration chromatography revealed a single peak of approximately 104 kDa, suggesting that *MtCS* is a dimer in solution, which is consistent with the hydrodynamic properties of the recombinant protein assessed by sedimentation velocity and sedimentation equilibrium [19].

The CS activity of MtCS. The synthesis of EPSP was carried out in a vial containing the enzymes Sk and EPSPs, which convert shikimate, ATP and PEP to EPSP, ADP and Pi. The equilibrium of the forward reaction was displaced using PNP, which consumes Pi, increasing the final concentration of EPSP in the reaction mixture. The enzymes were removed by ultrafiltration to avoid the continuous release of Pi by EPSPs enzyme activity after the addition of *MtCS*, which would interfere with specific measurements of *MtCS* enzyme activity. Conversion of EPSP to chorismate and Pi catalyzed by *MtCS* enzyme activity (Figure 1) was determined by measuring the release of Pi using PNP, which converts MESG and Pi to ribose-1-phosphate and 7-methyl-6-thio-guanine base monitoring absorbance at 360 nm of the latter. The enzymatic activity of homogenous *MtCS* was linearly dependent on enzyme volume added to the reaction mixture (Figure 2), showing that the initial velocity is proportional to total enzyme concentration and that true initial velocities are being measured. The conversion of EPSP to chorismate in aerobic conditions by the addition of FMN_{ox} and NADH is the first strong evidence that *MtCS* is bifunctional, since the monofunctional CSs can only be assayed under strictly anaerobic conditions in the presence of chemically or enzymatically reduced flavin [16]. The specific activity of bifunctional *MtCS* (0.004 U.mg⁻¹) is approximately 175-fold lower than the specific activity of bifunctional *Neurospora crassa* CS (*NcCS*; 0.7 U.mg⁻¹) [32]. In the

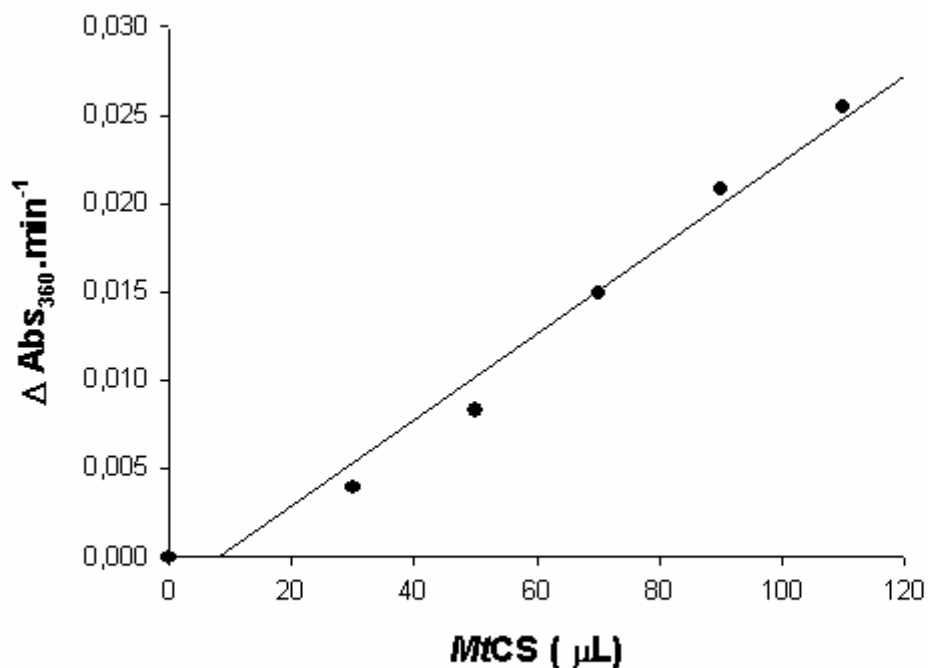


Figure 2: Linear dependence of homogenous *MtCS* activity. The rates of enzyme activity were carried out in the forward direction by continuously monitoring the increase of 2-amine-6-mercapto-7-methylpurine absorbance at 360 nm.

The NADH:FMN-oxidoreductase activity of MtCS. The NADH-dependent reduction of FMN_{ox} was measured in the forward reaction by monitoring the decrease of NADH concentration. The NADH:FMN-oxidoreductase activity of homogenous *MtCS* is linearly dependent on the enzyme volume added to the reaction mixture; therefore the initial velocity is proportional to total enzyme concentration, and true initial velocities are being measured. To verify the stability of the *MtCS*-FMN_{ox} complex, *MtCS* was incubated with excess FMN_{ox} and loaded in an anion exchange column. Two peaks were observed and

collected into separated fractions measuring absorbance at 280 nm and 445 nm (Figure 3A). To roughly estimate the presence of protein in the two pools, coomassie-blue was added to them and only the second peak was shown to contain protein (indicating the

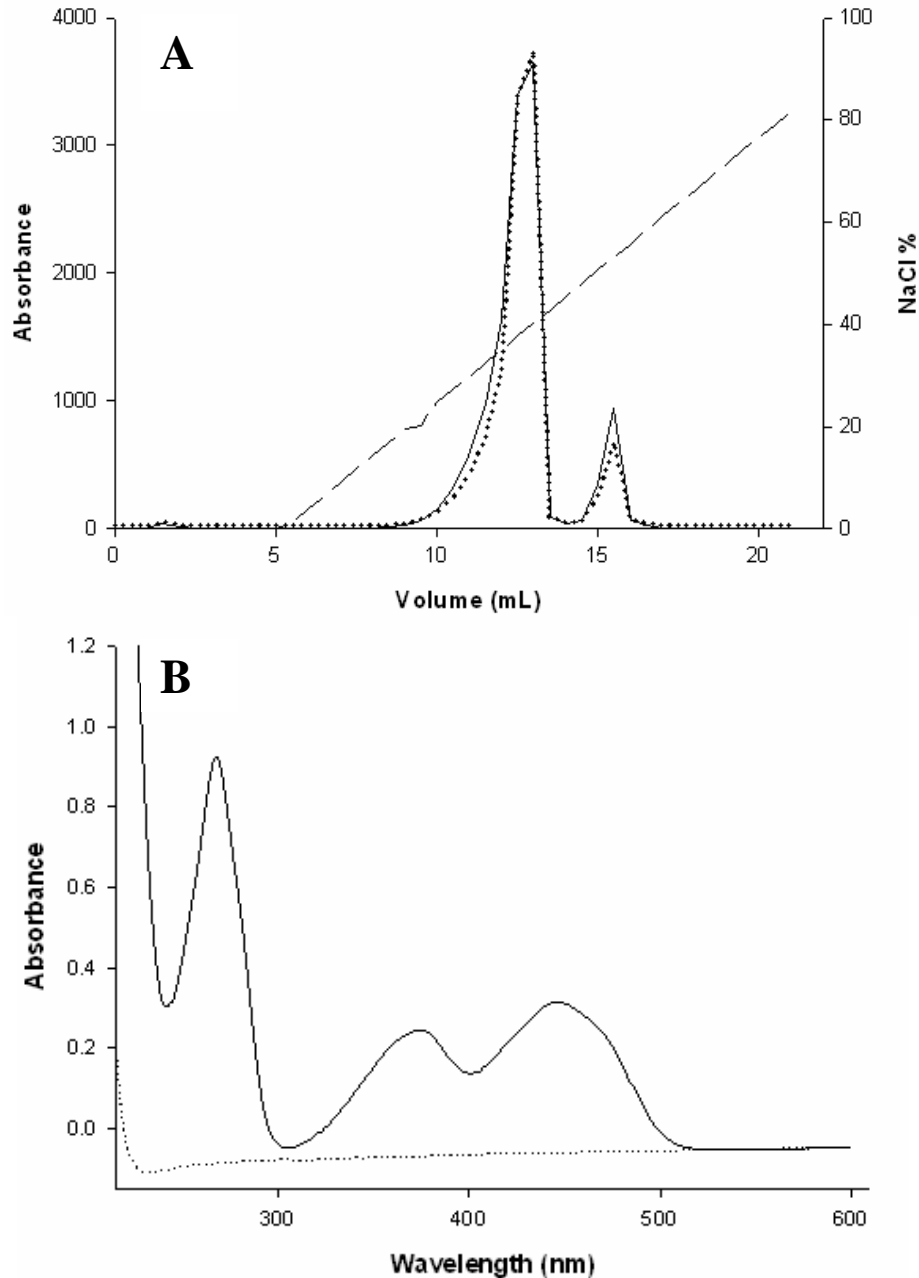


Figure 3: (A) Elution of *MtCS* and FMN_{ox} incubation in a HiTrapQ HP column upon a linear gradient from 0 to 1 M NaCl (dashed line). The absorbance was monitored at 445 nm (dotted line) and 280 nm (solid line). The first peak corresponds to free FMN_{ox} , and the

second peak corresponds to *MtCS*-FMN_{ox} complex. **(B)** UV-Vis spectrum ranging from 210 nm to 600 nm of the second pool (solid line) and Tris-HCl (dotted line). All characteristic peaks of FMN_{ox} can be observed (267 nm, 373 nm, and 445 nm).

presence of recombinant *MtCS*), while the first was not stained. The UV-Vis spectrum for the second pool containing recombinant *MtCS* protein showed that all the characteristic absorbance peaks of FMN_{ox} (267, 373, and 445 nm) could be observed (Figure 3B). These results suggest that *MtCS* and FMN_{ox} form a relatively stable binary complex.

Although the FMN_{ox} usually appears as a prosthetic group in NAD(P)H:FMN oxidoreductases from other organisms [36], it is not clear whether in *MtCS* the FMN is covalently bound. CSs from other organisms, such as that from *E. coli*, showed low affinity for FMN_{ox}; but the value of K_d for FMN_{ox} depends strongly on EPSP binding, decreasing ca. 1000-fold in the presence of this substrate (from 30 μM to 20 nM) [37]. On the other hand, EPSP has a much smaller effect on the affinity of bifunctional *NcCS* to FMN_{ox} [32]. Interestingly, the purified *MtCS* is FMN-free, which could be an effect of the insufficient intracellular concentration of FMN, probably due to *MtCS* overexpression into the host cell. Owing to the stable binary complex formed between FMN_{ox} and *MtCS*, the kinetic data were collected considering the holoenzyme as the *MtCS*-FMN_{ox} complex brought about by incubating *MtCS* and FMN_{ox}.

The oxidoreductase activity is functionally independent of CS activity, since the consumption of NADH occurs in the absence of EPSP. Accordingly, the apparent kinetic parameters for the oxidoreductase activity were determined in the absence of EPSP in steady-state kinetic experiments. No activity was observed when NADPH was used at concentrations ranging from 100 to 500 μM (data not shown). Kinetics of reduction of the

MtCS-bound FMN_{ox} by NADH was determined using fixed amount of holoenzyme and varying levels of NADH. The data were fitted to equation 1, and yielded the following values: $K_{\text{NADH}} = 36 \pm 4 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 8.3 (\pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ and $k_{\text{cat}}/K_{\text{NADH}} = 231 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The K_{NADH} observed for *MtCS* is similar to the K_{NADPH} determined for *NcCS* [35] and *ScCS* [38] (43 μM and 70 μM , respectively). In other NAD(P)H:FMN oxidoreductases (EC 1.5.1.30), which are present in a large variety of organisms, the apparent kinetic constants have a significant variation. For instance, the $K_{\text{NAD(P)H}}$ can vary from 208 μM in *Rhodococcus erythropolis* [39] to 0.85 μM in *Bacillus subtilis* [40].

Primary Deuterium Kinetic Isotope Effects. The rate-limiting nature and the stereospecificity of hydride transfer were probed by primary deuterium kinetic isotope effects. Initial velocity data were collected using either [4S-¹H]NADH or [4S-²H]NADH (Figure 4), and the values obtained for ^DV and ^DV/K were 3.5 ± 0.2 and 3.0 ± 0.4 , respectively. The magnitude of the primary isotope effects when the [4S-²H]NADH substrate is used indicates that C₄-*proS* hydrogen is being transferred during the reduction of FMN_{ox} catalyzed by *MtCS*. Isotope effects on *V* are related to events following the formation of the complex capable of undergoing catalysis (*MtCS*-FMN_{ox}-NADH in the case studied here), including chemical steps, possible enzyme conformational changes, and product release. On the other hand, the isotope effects on *V/K* report on steps in the reaction mechanism from the binding of the labeled substrate to the first irreversible step, usually the release of the product [29]. The values for primary deuterium isotope effects of biochemical interest usually range from 3 to 7 [41], and steps such as conformational changes accompanying hydride transfer and product release may account for the lower values. In particular, primary deuterium kinetic isotope effects typically range from 1 to 3

for enzyme reactions involving NAD(P)H oxidation [42]. The $^D V$ value obtained for *MtCS*-FMN_{ox} (3.5) suggests that the hydride transfer contributes significantly to the rate-limiting step of the FMN reduction reaction. The value of 3.0 for the $^D V/K$ indicates that NADH is not sticky¹, since $^D V/K$ values for sticky substrates are around unity [30].

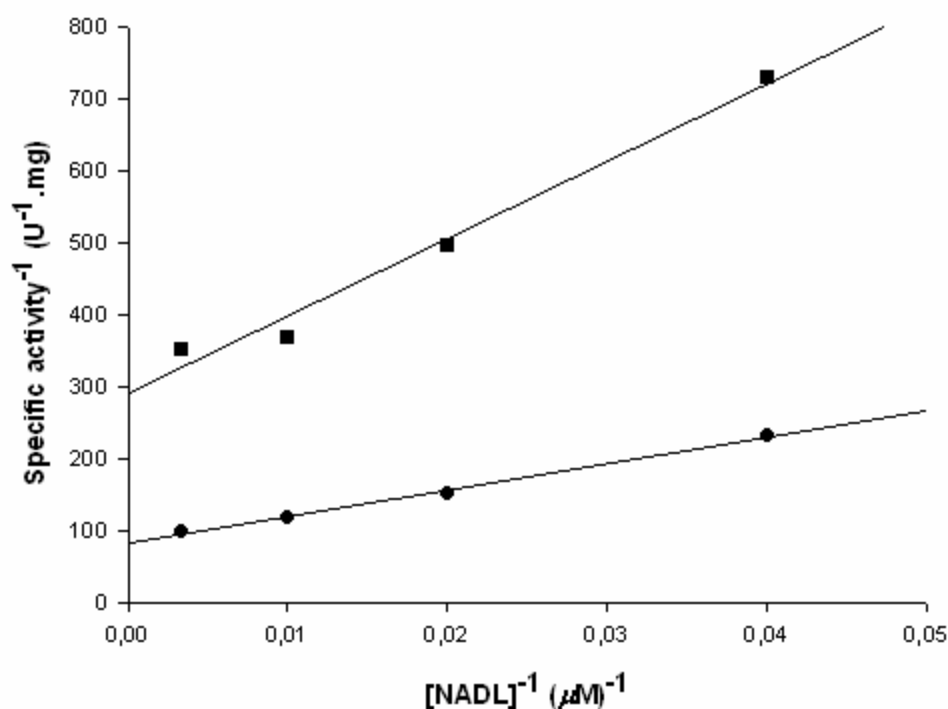


Figure 4: Primary deuterium isotope effects for *MtCS*. Concentration of [4S-¹H]NADH (●) or [4S-²H]NADH (■) is varied in the reaction mixture.

Solvent Isotope Effects and Proton Inventory. Solvent isotope effects were employed to analyze the proton transfer contribution to the rate of flavin reduction. Initial velocity data were collected in either H₂O or 91 atom % D₂O (Figure 5), and values of 1.7 ± 0.3 and 1.3 ± 0.1 were obtained for $^D V$ and $^D V/K$, respectively. The magnitude of the solvent isotope effects indicate that proton transfer partially limit the rate of FMN reduction reaction, and that the proton transfer probably has high commitment factor². In order to determine the

number of kinetically important protons transferred during the reaction, a proton inventory on V was carried out. The mole fraction of D_2O was varied from 0 to 80%, and a linear relationship between V and the mole fraction of D_2O was observed (Figure 5, inset). This result indicates that a single proton transfer gives rise to the observed solvent isotope effect [43], and the proton transfer has high commitment factor².

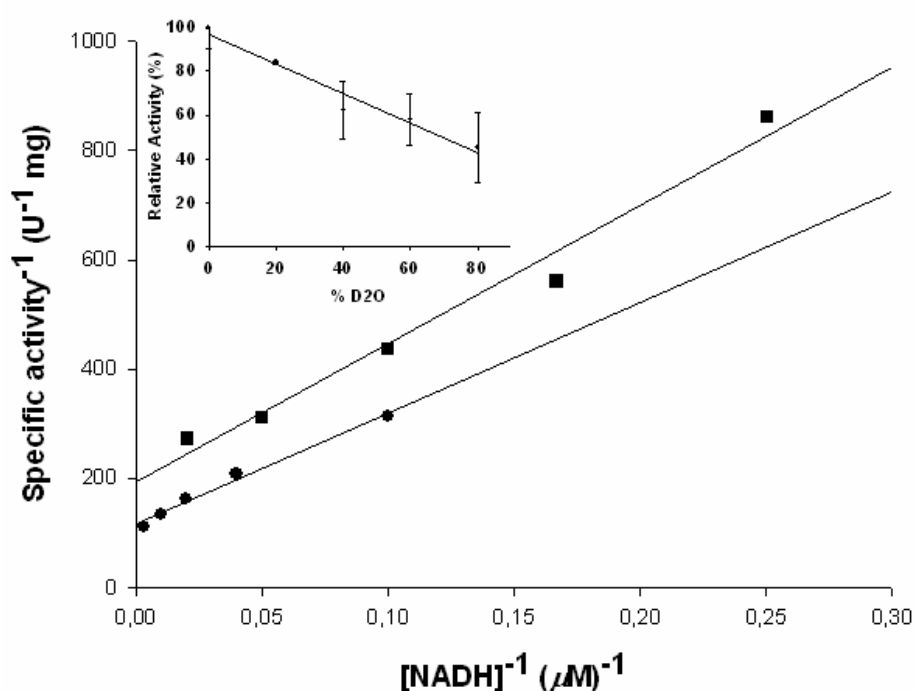


Figure 5: Solvent isotope effects for *MtCS*. NADH is varied in the reaction mixture containing either 0 (●) or 91 (■) atom % D_2O . Inset: Proton inventory measured in saturating concentration of NADH.

Significantly different magnitudes between primary and solvent kinetic isotope effects may indicate that they are reporting on distinct steps of a reaction. Patel *et al.* have reported, for the NADPH-dependent ketoacyl-ACP reductase from *S. pneumoniae*, primary and solvent isotope effects quite distinct in their magnitudes, and concluded that hydride

transfer and protonation were occurring in separate steps [44]. Here, the primary isotope effect values are larger than those for solvent isotope effects, which may indicate that proton and hydride transfer take place in two distinct transition-states, with the latter being more rate-determining. A mechanism for the bifunctional CS from *Neurospora crassa* has been proposed and involves an electron transfer from FMN_{red} to C1 EPSP and C-O bond cleavage, protonation of the leaving phosphate group by His17, tautomerization of the resulting C4(a)-neutral flavin semiquinone to a radical species on N(5) with concomitant abstraction of the C-(6*proR*) hydrogen of the dephosphorylated substrate intermediate, and deprotonation the reduced flavin restores the initial state of the cofactor [35]. However, the mode of action of bifunctional *MtCS* is not known. To the best of our knowledge, this is the first report on enzyme kinetics of recombinant *MtCS* showing that a bacterial enzyme is bifunctional. Site-directed mutagenesis, steady state and pre-steady state kinetics studies are currently underway in our lab to try to elucidate the mechanism of action of *MtCS*. The results reported here should thus pave the way for further studies of this reaction and characterization of the chorismate synthase activity of the enzyme to guide the rational design of antitubercular agents.

FOOTNOTES

¹ A substrate is sticky if it reacts to give products as fast as, or faster than, it dissociates from the enzyme. The stickiness of a substrate depends on the external part of its commitment: the larger the external commitment, the stickier the substrate [30].

² The commitment factor for a substrate is defined as the ratio of the rate constant for the isotope-sensitive step to the net rate constant of dissociation of this substrate from the complex capable of proceeding forward in the reaction path through a step that contains the isotope-sensitive one. A commitment factor is composed of both internal and external portions. The internal portion is kept unchanged when the dissociation rate constant for the varied substrate is brought to infinite. The external portion includes the partition ratio with the dissociation rate constant for the varied substrate in the denominator. For a more extended definition, see [30].

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Rafael G. Silva for his contribution to the analysis of isotope effects. Financial support for this work was provided by Millennium Initiative Program MCT-CNPq, Ministry of Health-Department of Science and Technology and PRONEX/CNPq/FAPERGS (Brazil) to D.S.S. and L.A.B. D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06), L.A.B. (CNPq, 520182/99-5), M.S.P. (CNPq, 500079/90-0), and J.F. (CNPq, 301131/2003-1) are researchers awardees from the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil.

REFERENCES

- [1] E.L. Corbett., C.J. Watt, N. Walker, D. Maher, B.G. Williams, M.C. Raviglione, C. Dye, *Arch. Intern. Med.* 163 (9) (2003) 1009-1021.
- [2] C. Dye, S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania, M. C. Raviglione, *JAMA* 282 (1999) 677-686.
- [3] World Health Organization, *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing*, Geneva, 2006.
- [4] B. R. Bloom, C. J. L. Murray, *Science* 257 (1992) 1055-1064.
- [5] L. A. Basso, J. S. Blanchard, *Adv. Exp. Med. Biol.* 456 (1998) 115-144.
- [6] S. W. Dooley Jr, K. G. Castro, M. D. Hutton, R. J. Mullan, J. A. Polder, D. E. Snider Jr. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 39 (1994) 1-29.
- [7] A. Plabos-Méndez, D. K. Gowda, T. R. Frieden. *World Health Organization* 80 (2002) 489-2006-08-24
- [8] CDC (Centers for Disease Control and Prevention) *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 55 (2006) 301-305.

- [9] A. Coates, Y. Hu, R. Bax, C. Page, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 895-910.
- [10] R. Bentley, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25 (1990) 307-384.
- [11] K. M. Herrmann, *Plant Cell* 7 (1995) 907-919.
- [12] C. Ratledge in: C. Ratledge, J. L. Stanford (Eds.), *Nutrition, growth and metabolism. The biology of the Mycobacteria*, Academic Press, London, 1982, pp. 185-271.
- [13] T. Parish, N.G. Stoker, *Microbiology* 148 (2002) 3069-3077.
- [14] S. T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E., Barry III, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, B. G. Barrell, *Nature* 393 (1998) 537-544.
- [15] T. R. Hawkes, T. Lewis, J. R. Coggins, D. M. Mousdale, D. J. Lowe, R. N. F. Thorneley, *Biochem. J.* 265 (1990) 899-902.
- [16] P. J. White, G. Millar, J. R. Coggins, *Biochem. J.* 251 (1988) 313-322.
- [17] S. Balasubramanian, C. Abell, J. R. Coggins, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 8581-8583.

- [18] C. L. Fernandes, A. Breda, D. S. Santos, L. A. Basso, O. N. Souza, *Comp. Biol. Méd.* Mar 31 [Epub ahead of print] PMID: 16584721.
- [19] M. V. B. Dias, J. C. Borges, F. Ely, J. H. Pereira, F. Canduri, C. H. Ramos, J. Frazzon, M. S. Palma, L. A. Basso, D. S. Santos, W. F. de Azevedo Jr., *J. Struct. Biol.* 154 (2006) 130-143.
- [20] U. K. Laemmli. *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [21] M. M. Bradford, R. A. McRorie, W. L. Williams, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [22] H. Chassaigne, R. Lobinski, *Analyst.* 123 (1998) 2125–2130.
- [23] J. S. Oliveira, C. A. Pinto, L. A. Basso, D. S. Santos, *Protein Expr. Purif.* 22 (2001) 430-435.
- [24] J. S. Oliveira, M. A. Mendes, M. S. Palma, L. A. Basso, D. S. Santos, *Protein Expr. Purif.* 28 (2003) 287-292.
- [25] M. R. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4884-4887.
- [26] R. H. Upson, R. P. Haugland, M. N. Malekzadeh, R. P. Haugland, *Anal. Biochem.* 243 (1996) 41-45.

- [27] G. Ottolina, S. Riva, G. Carrea, B. Danieli, A. F. Buckmann, *Biochem. Biophys. Acta* 998 (1989) 173-178.
- [28] G. A. Orr, J. S. Blanchard, *Anal. Biochem.* 142 (1984) 232-234.
- [29] Northrop, D. B. (1975) Steady-state analysis of kinetic isotope effects in enzymic reactions, *Biochemistry* 14, 2644-2651.
- [30] Cook, P. F., and Cleland, W. W. (1981) Mechanistic deductions from isotope effects in multireactant enzyme mechanisms, *Biochemistry* 20, 1790-1796.
- [31] T.H. Grossman, E.S. Kawaski, S.R. Punreddy, M.S. Osburne, *Gene* 209 (1998) 95-103.
- [32] K. Kitzing, P. Macheroux, N. Amrhein, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 42658-42666.
- [33] H. J. Ahn, H. J. Yoon, B. II Lee, S. W. Suh, *J. Mol. Biol.* 336 (2004) 903-915.
- [34] J. Maclean, S. Ali, *Structure* 11 (2003) 1499-1511.
- [35] K. Kitzing, S. Auweter, N. Amerhein, P. Macheroux, *J. Mol. Biol.* 279 (2004) 9451-9461.

- [36] S. Inouye, FEBS Lett. 347 (1994) 163-168.
- [37] P. Macheroux, J. Petersen, S. Bornemann, D. J. Lowe, R. N. F. Thorneley, Biochemistry 35 (1996) 1643-1652.
- [38] J. M. Henstrand, A. Schaller, M. Braun, N. Amrhein, J. Schmid, Mol. Microbiol. 22 (1996) 859-866.
- [39] T. Matsubara, T. Ohshiro, Y. Nishina, Y. Izumi, Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001) 1179-1184.
- [40] S. Zenno, T. Kobori, M. Tanokura, K. Saigo, Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 (1998) 1978-1987.
- [41] K. B. Schowen, R. L. Schowen, BioScience 31 (1981) 826-831.
- [42] P. F. Cook, in: P. F. Cook, (Ed.), Kinetic and Regulatory Mechanisms of Enzymes from Isotope Effects, in Enzyme Mechanism from Isotope Effects, CRC Press, Florida, 1991, pp. 203-228.
- [43] D. M. Quinn, L. D. Sutton, in: P. F. Cook (Ed.), Theoretical Basis and Mechanistic Utility of Solvent Isotope Effects, in Enzyme Mechanism from Isotope Effects, CRC Press, Florida, 1991, pp. 73-126.

[44] M. P. Patel, W. S. Liu, J. West, D. Tew, D. T. Meek, S. H. Thrall, *Biochemistry* 44 (2004) 16753-16765.

4. DISCUSSÃO

4.1. Amplificação e Clonagem do gene *aroF* de *M. tuberculosis*

O gene *aroF* foi amplificado na presença de 10% de DMSO a partir de DNA genômico. O genoma de *M. tuberculosis* é composto por cerca de 65,6 % de citosinas e guaninas (COLE *et al.*, 1998), o que faz com que a separação da dupla fita de seu DNA necessite temperaturas mais elevadas de desnaturação. A adição de DMSO na etapa de PCR altera a estrutura secundária do DNA (POMP & MEDRANO, 1991), auxiliando a extensão da DNA-polimerase através da molécula e permitindo a amplificação do fragmento.

A digestão do plasmídeo recombinante pET23a(+):*aroF* com as enzimas *NdeI* e *BamHI* confirmou a inserção do fragmento *aroF* no vetor de expressão. A identidade do gene *aroF* e a ausência de mutações que poderiam ter sido inseridas na etapa de PCR foram confirmadas pela análise da seqüência nucleotídica realizada por seqüenciamento automático (seção 6.2). O plasmídeo recombinante permitiu a transformação de células hospedeiras capazes de super-expressar o produto do gene, a enzima *MtCS*. O sistema pET permite a expressão do gene de interesse por meio da enzima T7 RNA polimerase, que atua sob o controle do promotor *lacUV5*. As células hospedeiras utilizadas neste sistema possuem uma cópia do gene da T7 RNA polimerase, permitindo, desta forma, a transcrição do fragmento heterólogo pela indução do promotor *lacUV5* com IPTG (DUBENDORFF & STUDIER, 1991). Ao contrário do que seria

esperado na utilização do sistema de expressão pET, o gene *aroF* foi melhor expresso sem a indução por IPTG. Esse sistema prevê uma pequena expressão do fragmento clonado antes da indução. Esta expressão é característica dos sistemas controlados pelo promotor *lacUV5*, que permite a transcrição do gene da T7 RNA polimerase em níveis basais em células não induzidas. Ao se aproximarem da fase estacionária, as células hospedeiras que possuem altas concentrações de AMP cíclico, além de acetato e baixo pH do meio, são capazes de promover altos níveis de expressão da proteína heteróloga na ausência de IPTG. A liberação do operon *lac* na ausência do indutor pode ser parte da resposta celular à limitação nutricional (GROSSMAN *et al.*, 1998). A expressão da enzima *MtCS* na ausência de IPTG diminui o custo da produção da proteína e simplifica o protocolo, facilitando a obtenção de grandes quantidades necessárias para a purificação da enzima.

O gene *aroF* foi melhor expresso através da utilização do hospedeiro *E. coli* Rosetta(DE3) (Seção 6.6). Esta cepa é capaz de sintetizar RNAt para códons raros em *E. coli*, muitos deles identificados no gene *aroF*. A proteína foi super-expressa em maior concentração na fração celular solúvel e com o peso molecular esperado (41,8 kDa), confirmado por SDS-PAGE. É provável que genes que são expressos continuamente e em altas concentrações durante a fase de crescimento celular exponencial, como é o caso do gene *aroF*, utilizem as moléculas de RNAt mais abundantes para a expressão de proteínas heterólogas e evitem RNAt de códons cuja frequência seja menor que 6%. Quantidades insuficientes de determinados RNAt podem levar a erros durante a tradução,

produzindo proteínas alteradas (KURLAND & GALLANT, 1996). Na seqüência nucleotídica do gene *aroF* (seção 6.2) foram identificados 10 códons raros (7 x CCC, AUA, CUA, GGA). A cepa de *E. coli* Rosetta(DE3) é capaz de produzir RNAt para códons raros em *E.coli* (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) devido à presença do plasmídio que possui marca de resistência para cloranfenicol. A utilização desta cepa permitiu o aumento da concentração da *MtCS* na fração celular solúvel, provavelmente devido à presença de RNAts que antes eram pouco freqüentes.

4.2. Purificação da *MtCS* recombinante e análise da proteína purificada

A super-expressão da *MtCS* na fração solúvel tornou possível a purificação da enzima até a homogeneidade. A partir de uma cultura de 6 L de LB foram purificados aproximadamente 55 mg de *MtCS*. O extrato celular foi solubilizado no tampão Tris-HCl contendo lisozima e coquetel inibidor de proteases. A lisozima auxilia a etapa de rompimento celular através da quebra da ligação entre N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico presentes na porção peptidoglicano da parede celular bacteriana. Os ácidos nucléicos foram precipitados com a adição de sulfato de estreptomicina, posteriormente retirado através de diálise.

A purificação até a homogeneidade da *MtCS* foi obtida através de três etapas cromatográficas, foram usadas duas colunas de troca aniônica e uma coluna de interação hidrofóbica (Seção 6.7). As colunas QSepharose e MonoQ de

troca aniônica foram escolhidas baseado no ponto isoelétrico teórico da enzima (pI: 6,0; seção 6.3) e no pH do tampão utilizado durante a purificação (pH 7,8). Apesar de os pontos isoelétricos teórico e experimental nem sempre coincidirem, e a carga dos resíduos de aminoácidos que interagem com a coluna serem, muitas vezes, mais relevantes do que o ponto isoelétrico da proteína, a *MtCS*, como esperado, se ligou em ambas as colunas.

A análise da proteína purificada revelou a necessidade da presença do coquetel inibidor de proteases, uma vez que na sua ausência foi observada a perda seqüencial de resíduos de aminoácidos do N-terminal. O seqüenciamento dos resíduos do N-terminal e o valor de peso molecular obtido por espectroscopia de massas confirmaram a identidade da proteína. Também foi observado que não houve a perda do resíduo metionina nesta extremidade, que é uma modificação pós-traducional que pode ser encontrada em proteínas procarióticas.

A determinação do estado oligomérico da *MtCS* purificada revelou um dímero em solução, concordando com os experimentos de velocidade de sedimentação (DIAS *et al.*, 2006) . As CSs de diversos organismos já tiveram seu estado oligomérico determinado e variam de dímeros à oligômeros (Tabela 3).

Tabela 3: Estados oligoméricos da CS em diferentes organismos

Organismo	Estado oligomérico	Referência
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Tetrâmero	MACLEAN & ALI, 2003.
<i>Neurospora crassa</i>	Dímero/tetrâmero	WHITE <i>et al.</i> , 1988.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Dímero/tetrâmero	HENSTRAND <i>et al.</i> , 1996.
<i>Helicobacter pylori</i>	Tetrâmero	AHN <i>et al.</i> , 2004.
<i>Escherichia coli</i>	Tetrâmero	WHITE <i>et al.</i> , 1988.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tetrâmero	HORSBURGH <i>et al.</i> , 1996.
<i>Lycopersicum esculentum</i>	Dímero/tetrâmero	BRAUN <i>et al.</i> , 1996.
<i>Bacillus subtilis</i>	Heterotrímero	HASAN & NESTER, 1978.
<i>Euglena gracilis</i>	Oligômero	SCHALLER <i>et al.</i> , 1991.
<i>Corydalis sempervirens</i>	Dímero	SCHALLER <i>et al.</i> , 1990.

4.3. Verificação da atividade de corismato sintase da *MtCS*

A CS converte o substrato EPSP em corismato através de uma reação de eliminação 1,4-anti do grupamento 3-fosfato e do hidrogênio C-(6proR) (KITZING *et al.*, 2004). Apesar desta reação não ser uma reação de oxi-redução ela requer uma flavina mononucleotídeo reduzida (FMN_{red}) como cofator (Figura 1 - manuscrito).

O substrato EPSP não é comercializado, tornando necessário a realização de um ensaio acoplado com a utilização de 3 outras enzimas: a chiquimato sintase (Sk), a EPSP sintase (EPSPs) e a PNP (Figura 3). A Sk converte chiquimato e ATP em chiquimato-3-fosfato e ADP, então o chiquimato-3-fosfato se condensa com PEP, reação catalisada pela EPSPs, formando EPSP e

fosfato inorgânico (Pi). Para aumentar a concentração final de EPSP o equilíbrio da reação catalisada pela enzima EPSPs foi deslocado no sentido do aumento da formação do seu produto através do consumo de Pi, catalisado pela enzima PNP. A PNP condensa Pi e MESG dando origem a amino-mercapto-metilpurina. As reações catalisadas por essas três enzimas levam a produção de altas concentrações de EPSP, necessário para a determinação da atividade enzimática da *MtCS*. Uma vez sintetizado, o EPSP é separado das três enzimas através de ultrafiltração, restando apenas uma mistura de compostos (S1) que inclui todos substratos e produtos provenientes das três reações catalisadas, além da alta concentração de EPSP.

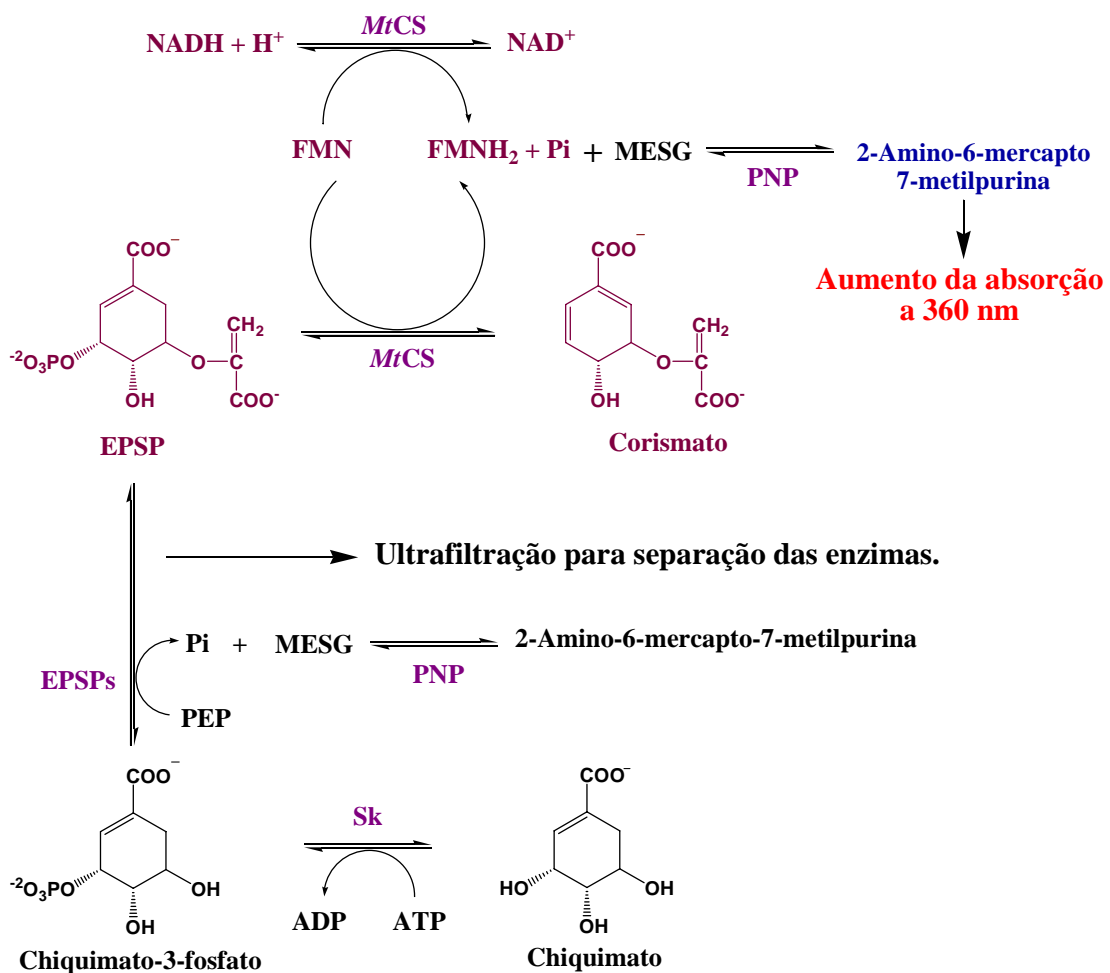


Figura 3: Ensaio para a determinação da atividade de corismato sintase da *MtCS*.

Esta mistura de compostos, chamada S1, foi utilizada para o ensaio de atividade da *MtCS*. Tanto ESPS quanto ácido corísmico possuem comprimentos onda de absorção máxima muito baixos (~275 nm) e o monitoramento da reação nesta região seria inviável, uma vez que o FMN utilizado no ensaio possui valor coeficiente de extinção molar (ϵ) muito alto neste comprimento de onda e extrapolaria os limites de confiabilidade do equipamento. Portanto, se optou por monitorar a reação da *MtCS* através da liberação de Pi utilizando novamente a enzima PNP e o substrato MESG, desta forma monitoramos a formação de amino-mercapto-metilpurina a 360 nm ($\epsilon = 11000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). No entanto, em S1 havia a presença do Pi que não foi totalmente consumido pela PNP durante a reação de síntese de EPSP. Por isso a mistura reacional contendo S1, FMN, NADH, MESG e PNP foi previamente incubada a 25 °C por 4 min para que a enzima PNP entrasse em equilíbrio. Depois desse tempo de incubação foi adicionada a *MtCS* e se observou o deslocamento do equilíbrio da reação da PNP ocasionado pela liberação de Pi da reação catalisada pela *MtCS*.

A atividade enzimática da *MtCS* foi linearmente dependente do volume de enzima adicionado, indicando que a velocidade inicial medida é diretamente proporcional a concentração de *MtCS* e que valores de velocidades iniciais reais estavam sendo medidos (Figura 2 – manuscrito). A atividade enzimática da *MtCS* em atmosfera aeróbica foi a primeira evidência de que esta enzima pertencia a classe das CSs bifuncionais. A formação de corismato catalisada pelas CSs só é possível na presença de FMN_{red} , porém na *MtCS* a

adição de FMN_{ox} e NADH foi suficiente para que a reação ocorresse, indicando a existência da segunda atividade de flavina redutase. A ausência de FMN_{red} na mistura reacional é confirmada pelo fato de esta molécula possuir um potencial de redução muito baixo (-207 mV) e não ser capaz de se manter reduzida na presença de oxigênio (KITZING *et al.*, 2004). Apesar disto, nas estruturas de CS complexadas com FMN, *H. pylori* (AHN *et al.*, 2004) e *S. pneumoniae* (MACLEAN & ALI, 2003), o sítio de ligação do FMN apresenta uma série de aminoácidos de carga positiva, o que poderia aumentar o potencial de redução de FMN_{red}/FMN_{ox} provocando a diminuição da velocidade de reoxidação do FMN_{red}.

A atividade específica calculada para *MtCS* foi de 0,004 U.mg⁻¹, bastante abaixo do valor obtido para CS bifuncional de *N. crassa* (0,7 U.mg⁻¹) (KITZING *et al.*, 2001).

4.4. Determinação das constantes cinéticas aparentes da atividade flavina redutase em *MtCS*

A atividade NADH:FMN oxidorredutase foi monitorada no sentido direto da reação através da diminuição da concentração de NADH. O comprimento de absorção máxima do NADH é 340 nm, porém, a FMN possui alto ϵ nesta região e o comprimento de onda medido teve que ser deslocado para 380 nm ($\epsilon = 893 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). A atividade de flavina redutase da *MtCS* foi linearmente dependente do volume de enzima adicionado, indicando que a velocidade inicial medida é diretamente proporcional a concentração de *MtCS* e que valores de

velocidades iniciais reais estavam sendo medidos. Foi observada uma brusca diminuição da atividade enzimática quando o tampão fosfato foi utilizado no ensaio, o que também é observado para uma série de desidrogenases NAD(P)⁺ dependentes (CHAMBERS, 1993).

Em várias flavinas redutases o FMN aparece ligado covalentemente à enzima, ou seja, se trata de um grupo prostético (INOUE, 1994). Na *MtCS* apesar de não se saber se o FMN se trata de um grupo prostético, se observou que *MtCS:FMN_{ox}* formam um complexo estável, incapaz de ser separado por uma coluna de troca aniônica. A eluição de uma mistura incubada com FMN_{ox} e *MtCS* foi separada em dois picos, monitorados a 280 e 446 nm (comprimentos de absorção máximo da FMN) (Figura 3A – manuscrito). O primeiro pico correspondia ao excesso de FMN_{ox} adicionado e o segundo correspondia ao complexo *MtCS:FMN*. A existência do complexo foi confirmada utilizando dois métodos distintos. A espectroscopia no UV-Vis (210 a 600 nm) confirmou a presença do FMN, uma vez que os picos de absorção máxima do FMN estavam todos bem caracterizados (Figura 3B – manuscrito). A presença da *MtCS* foi confirmada através da coloração com *comassie-blue*, já que seria impossível determinar a presença da proteína por absorção UV pois no comprimento de absorção usado para esta medida (280 m, referente ao aminoácidos aromáticos) a FMN absorve com alto ϵ . Apesar da formação deste complexo estável, se observa que após a purificação, a *MtCS* não apresenta FMN ligado, o que pode ser resultado da concentração celular insuficiente de FMN uma vez que a proteína heteróloga está sendo super-expressa dentro do hospedeiro utilizado.

Na maioria CSs caracterizadas até então, o FMN_{ox} geralmente possui baixa afinidade, sendo que seu K_d varia na presença de EPSP, diminuindo até 1000 vezes na presença deste substrato em *E. coli* (30 μM para 20 nm) (MACHEROUX *et al.*, 1996). Em bifuncionais o EPSP possui influência bem menor sobre o K_d (KITZING *et al.*, 2001). Apesar disto, foi observado a formação do complexo estável MtCS:FMN e esta holoenzima foi utilizada na determinação dos parâmetros cinéticos aparentes referentes ao NADH em experimentos em estado estacionário. Se observou que a atividade flavina redutase de MtCS segue a cinética de Michaelis-Menten e as constantes cinéticas foram determinadas utilizando as curvas lineares de Lineweaver-Burk. Os valores obtidos foram $K_{\text{NADH}} = 36 \pm 4 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 8,3 (\pm 0,3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ e $k_{\text{cat}}/K_{\text{NADH}} = 231 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Estes valores estão próximos daqueles observados para as CSs bifuncionais de *N. crassa* e *S. cerevisiae* (KITZING *et al.*, 2004 & HENSTRAND, *et al.*, 1996).

4.5. Efeitos isotópicos primários de deutério

Os estudos de efeitos isotópicos estão baseados no fato de que a substituição em uma ligação, de um átomo por seu isótopo mais pesado faz com que a força e estabilidade desta ligação sejam maiores, ou seja, a quebra ou a formação desta ligação necessitará de mais energia e conseqüentemente terá menor velocidade. Se a formação ou quebra da ligação na qual o isótopo for inserido for limitante da velocidade da reação total ou parcialmente, se observa uma diminuição da velocidade inicial da reação enzimática.

Os efeitos isotópicos primários de deutério foram feitos através da substituição do hidrogênio C(4*proS*) do NADH por deutério. As medidas de velocidade inicial foram coletadas para ambos substratos, marcado e não-marcado, e os valores obtidos foram: $^D V = 3,5 \pm 0,2$ e $^D V/K = 3,0 \pm 0,4$ (Figura 4 – manuscrito). O valor de $^D V$ descreve os eventos a partir da formação do complexo capaz de catalisar a reação (MtCS-FMN_{ox}-NADH), incluindo etapas químicas, mudanças conformacionais da enzima e liberação do produto. Já o valor de $^D V/K$ descreve as etapas do mecanismo de reação a partir da ligação do substrato marcado até a primeira etapa irreversível da reação, geralmente a liberação do produto (NORTHROP, 1975).

A magnitude do efeito isotópico primário de deutério indica que o hidrogênio que é transferido do NADH durante a reação é o *proS*. Por outro lado, o valor de $^D V$ é maior (3,5) que o limite de 2,0 estabelecido para etapas limitantes da reação (NORTHROP, 1975). Com isso, fica claro que a transferência do hidreto do NADH contribui para a limitação da velocidade durante a redução de FMN.

4.6. Efeitos isotópicos de solvente e *proton inventory*

Os efeitos isotópicos de solvente foram utilizados para a determinação da contribuição da transferência do próton da água na limitação da velocidade de redução da FMN_{ox}. As medidas de velocidade inicial foram realizadas em H₂O e

em D₂O e os seguintes valores foram obtidos: $^D V = 1,7 \pm 0,3$ e $^D V/K = 1,3 \pm 0,1$ (Figura 5 – manuscrito). Estes valores são relativamente baixos se comparados com o limite 2,0, indicando que a transferência do próton não contribui significativamente para a limitação da velocidade da reação. Além disso, foi realizado o experimento de *próton inventory*, onde a concentração de D₂O é variada de 0 a 80 %. Este experimento permite determinar o número de próton cineticamente importantes transferidos durante a reação. Os resultados obtidos indicam que apenas um único próton transferido é responsável pelo efeito isotópico de solvente (QUINN & SUTTON, 1991).

Os efeitos isotópicos primários e de solvente apresentaram magnitudes bem distintas, indicando que a transferência do hidreto e do próton ocorrem em etapas distintas da reação dando origem a dois diferentes estados de transição (PATEL *et al.*, 2004). É provável, pelos dados mostrados aqui, que a reação de redução de FMN_{ox} se trate de uma reação não concertada com a formação de mais de um intermediário de reação.

Os resultados obtidos neste trabalho servirão como base para os estudos posteriores de caracterização das reações catalisadas pela MtCS. Além disso, aliados a dados estruturais, os resultados descritos aqui auxiliarão no desenho racional de inibidores que possam ser usados no tratamento da TB.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, H. J.; YOON, H. J.; LEE, B. 2nd & SUH, S. W. Crystal structure of chorismate synthase: a novel FMN-binding protein fold and functional insights. *J. Mol. Biol.* 27: 903-915, 2004.

BASSO, L. A. & BLANCHARD, J. S. Resistance to antitubercular drugs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 456: 115-144, 1998.

BAX, R. P.; ANDERSON, R.; CREW, J.; FLETCHER, E.; JOHNSON, T.; KAPLAN, E.; KNAUS, B.; KRISTINSSON, K.; MALEK, M. & STRANDBERG, L. Antibiotic resistance – what can we do? *Nature Med.* 4: 545-546, 1998.

BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J. & WHEELER, D. L. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 33: D34-D38, 2005.

BENTLEY, R. The shikimate pathway – a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25: 307-384, 1990.

BORNEMANN, S.; LOWE, D. J. AND THORNELEY, R. N. The transient kinetics of *Escherichia coli* chorismate synthase: substrate consumption, product formation, phosphate dissociation, and characterization of a flavin intermediate. *Biochemistry* 35: 9907-9916, 1996.

BRAUN, M.; HENSTRAND, J. M.; GORLACH, J. AMRHEIN, N. & SCHMID, J. Enzymatic properties of chorismate synthase isoenzymes of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta* 200: 64-70, 1996.

Centers for Disease Control and Prevention. *Emergence of Mycobacterium tuberculosis with extensive resistance to second-line drugs – Worldwide, 2000-2004.* MMWR 55: p. 1-305, 2006.

Centers for Disease Control and Prevention. Recommended Treatment Regimens. In: *Treatment of Tuberculosis*. American Thoracic Society, CDC, and Infectious Diseases Society of America. MMWR 52 (No. RR-11): p. 36-42, 2003.

CHAMBERS, J. A. A. Buffers, chelating agents and desnaturants. In Chambers, J. A. A. & Rickwood, D. *Biochemistry Labfax*. Oxford: Information Press Ltda, p. 1-35, 1993.

COATES, A.; HU, Y.; BAX, R. & PAGE, C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1: 895-910, 2002.

COGGINS, J. R.; ABELL, C.; EVANS, L. B.; FREDERICKSON, M.; ROBINSON, D. A.; ROSZAK, A. W. & LAPTHORN, A. P. Experiences with the shikimate-pathway enzymes as targets for rational drug design. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 548-552, 2003.

COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY III, 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. & BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544, 1998.

DAVIES, G. M.; BARRETT-BEE, K. J.; JUDE, D. A.; LEHAN, M.; NICHOLS, W. W.; PINDER, P. E.; THAIN, J. L.; WATKINS, W. J. & WILSON, R. G. (6S)-6-fluoroshikimic acid, an antibacterial agent acting on the aromatic biosynthesis pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 403-406, 1994.

DAVIS B. D. Aromatic biosynthesis. I. The role of shikimic acid. *J. Biol. Chem.* 191: 315-326, 1951.

- DIAS, M. V. B.; BORGES, J. C.; ELY, F.; PEREIRA, J. H.; CANDURI, F.; RAMOS, C. H.; FRAZZON, J.; PALMA, M. S.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. & AZEVEDO JR., W. F. Structure of chorismate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Struct. Biol.* 154: 130-143, 2006.
- DUBENDORFF, J. W. & STUDIER, F. W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. *J. Mol. Biol.* 219: 45-49, 1991.
- DUNLAP, N. E.; BASS, J.; FUJIWARA, P.; HOPEWELL, P.; HORSBURGH, C. R.; SALFINGER, M. & SIMONE, P. M. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161: 1376–1395, 2000.
- DYE, C. & FLOYD, K. Tuberculosis. In: Jamison, D. T.; Breman, J. G.; Measham, A. R.; Alleyne, G.; Claeson, M.; Evans, D. B.; Jha, P.; Mills, A. & Musgrove, P. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. Washington (DC): IBRD/The World Bank and Oxford University Press, Cap. 16, p. 289-309, 2006.
- FARER, L. S.; LOWELL, L. M. & MEADOR, M. P. Extrapulmonary tuberculosis in the United States. *Am. J. Epidemiol.* 109: 205–217, 1979.
- FÄTKENHEUER, G.; TAELEMAN, H.; LEPAGE, P.; SCHWENK, A. & WERZEL, R. The return of tuberculosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34: 139-146, 1999.
- FRIEDEN, T.; STERLING, T. R.; MUNSIFF, S. S.; WATT, C. J. & DYE, C. Tuberculosis. *Lancet* 362: 887-899, 2003.
- GAERTNER, F. H. & COLE, K. W. Properties of chorismate synthase in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 248: 4604-4609, 1973.

- GAERTNER, F. H. Chorismate synthase: a bifunctional enzyme in *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol.* 142: 362-366, 1987.
- GROSSMAN, T. H., KAWASKI, E. S., PUNREDDY, S. R. & OSBURNE, M. S. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene* 209: 95-103, 1998.
- HASAN, N. & NESTER, E. W. Dehydroquinate synthase in *Bacillus subtilis*. An enzyme associated with chorismate synthase and flavin reductase. *J. Biol. Chem.* 253: 4999-5004, 1978a.
- HASAN, N. & NESTER, E. W. Purification and characterization of NADPH-dependent flavin reductase. An enzyme required for the activation of chorismate synthase in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 253: 4987-4982, 1978b.
- HASAN, N. & NESTER, E. W. Purification and properties of chorismate synthase from *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 253: 4993-4998, 1978c.
- HENSTRAND, J. M.; AMRHEIN, N. & SCHMID, J. Cloning and characterization of a heterologously expressed bifunctional chorismate synthase/flavin reductase from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 270: 20447-20452, 1995.
- HENSTRAND, J. M.; SCHALLER, A.; BRAUN, M.; AMRHEIN, N. & SCHMID, J. *Saccharomyces cerevisiae* chorismate synthase has a flavin reductase activity. *Mol. Microbiol.* 22: 859-866, 1996.
- HERRMANN, K. M. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919, 1995.
- HIRIYANNA, K. T. & RAMAKRISHNAN, T. Deoxyribonucleic acid replication time in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Arch Microbiol.* 144: 105-109, 1986.

- HORSBURGH, M. J., FOSTER, T. J.; BARTH, P. T. & COGGINS, J. R. Chorismate synthase from *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* 142: 2943-2950, 1996.
- INOUE, S. NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein. *FEBS Lett.* 347: 163-168, 1994.
- KISHORE, G. M. & SHAH, D. M. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 627-663, 1988.
- KITZING, K.; AUWETER, S.; AMRHEIN, N. & MACHEROUX, P. Mechanism of chorismate synthase. Role of the two invariant histidine residues in the active site. *J. Biol. Chem.*, 279: 9451-9461, 2004.
- KITZING, K.; MACHEROUX, P.; & AMRHEIN, N. Spectroscopic and kinetic characterization of the bifunctional chorismate synthase from *Neurospora crassa*: evidence for a common binding site for 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate and NADPH. *J. Biol. Chem.*, 276: 42658-42666, 2001.
- KURLAND, C. & GALLANT, J. Error of heterologous protein expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 489-493, 1996.
- MACHEROUX P.; SCHONBRUNN, E.; SVERGUN, D. I.; VOLKOV, V. V.; KOCH, M. H.; BORNEMANN, S. AND THORNELEY, R. N. Evidence for a major structural change in *Escherichia coli* chorismate synthase induced by flavin and substrate binding. *Biochem. J.* 335: 319-327, 1998.
- MACHEROUX, P., PERTERSEN, J., BORNEMANN, S., LOWE, D. J. & THORNELEY, R. N. F. Binding of the oxidized, reduced, and radical flavin species to chorismate synthase. An investigation by spectrophotometry,

fluorimetry, and electron paramagnetic resonance and electron nuclear double resonance spectroscopy. *Biochemistry* 35: 1643-1652, 1996.

MACHEROUX, P.; SCHMID, J.; AMRHEIN, N. & SCHALLER, A. A unique reaction in a common pathway: mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. *Planta* 207: 325-334, 1999.

MACLEAN, J. & ALI, S. The structure of chorismate synthase reveals a novel flavin binding site fundamental to a unique reaction. *Structure* 11: 1499-1511, 2003.

MORELL, H.; CLARK, M. J.; KNOWLES, P. F. & SPRINSON, D. B. The enzymic synthesis of chorismic and prephenic acids from 3-enolpyruvylshikimic acid 5-phosphate. *J. Biol. Chem.* 242: 82-90, 1967.

National Center for Biotechnology Information. GenBank Overview. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank> (revised: march 28, 2006).

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

PARISH, T. & STOKER, N. G. The common aromatic amino acid biosynthesis pathway is essential in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* 148: 3069-3077, 2002.

PATEL, M. P.; LIU, W. S.; WEST, J.; TEW, D.; MEEK, D. T. & THRALL, S. H. Kinetic and chemical mechanisms of the fabG-encoded *Streptococcus pneumoniae* beta-ketoacyl-ACP reductase. *Biochemistry* 44: 16753-16765, 2004.

POMP, D. & MEDRANO, J. F. Organic solvents as facilitators of a polymerase chain reaction. *Biotechniques* 10: 58-59, 1991.

QUEVILLON-CHERUEL, S.; LEULLIOT, N.; MEYER, P.; GRAILLE, M.; BREMANG, M.; BLONDEAU, K.; SOREL, I.; POUPON, A.; JANIN, J. & VAN TILBEURGH, H. Crystal structure of the bifunctional chorismate synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279: 619-625, 2004.

QUINN, D. M. & SUTTON, L. D. Theoretical Basis and Mechanistic Utility of Solvent Isotope Effects. In: Cook, P. F.. *Enzyme Mechanism from Isotope Effects*: Florida, CRC Press, p. 73-126, 1991.

RAMJEE, M. K.; COGGINS, J. R.; HAWKES, T. R.; LOWE, D. J. AND THORNELEY, R. N. F. Spectrophotometric detection of a modified flavin mononucleotide (FMN) intermediate formed during the catalytic cycle of chorismate synthase *J. Am. Chem. Soc.* 113: 8566-8567, 1991.

RATLEDGE, C. Nutrition, growth and metabolism. In: Ratledge, C. & Stanford, J. L. (Eds.), *The biology of the Mycobacteria*, vol. 1. London: Academic Press, pp. 185-271, 1982.

ROBERTS, C. W.; ROBERTS, F.; LYONS, R. E.; KIRISITS, M. J.; MUI, E. J.; FINNERTY, J.; JOHNSON, J. J.; FERGUSON, D. J. P.; COGGINS, J. R.; KRELL, T.; COOMBS, G. H.; MILHOUS, W. K.; KYLE, D. E.; TZIPORI, S.; BARNWELL, J.; DAME, J. B.; CARLTON, J. & MCLEOD, R. The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites. *Nature* 393: 801-805, 1998.

SAXON, W. Anne Miller, 90, first patient who was saved by penicillin. *The New York Times*. 1999, Jun 9.

SCHALLER, A.; VAN AFFERDEN, M.; WINDHOFER, V.; BULOW, S.; ABEL, G.; SCHMID, J. & AMRHEIN, N. Purification and characterization of chorismate synthase from *Euglena gracilis*: comparison with chorismate synthases of plant and microbial origin. *Plant Physiol.* 97: 1271-1279, 1991.

SCHALLER, A.; WINDHOFER, V. & AMRHEIN, N. Purification of chorismate synthase from a cell culture of the higher plant *Corydalis sempervirens* Pers. *Arch. Biochem. Biophys.* 282: 437-442, 1990.

STOKSTAD, E. Drug-resistant TB on the rise. *Science* 287: 2391, 2000.

VYNNYCKY, E. & FINE, P. E. M. Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. *Am. J. Epidemiol.* 152: 247-263, 2000.

WHITE, P. J.; MILLAR, G. & COGGINS, J. R. The overexpression, purification and complete amino acid sequence of chorismate synthase from *Escherichia coli* K12 and its comparison with the enzyme from *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* 251: 313-322, 1988.

World Health Organization. *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing*, Geneva, 2006.

World Health Organization. *The world health report 2004: changing the history*. Geneva: World Health Organization, 2004.

ZURENKO, G. E.; YAGI, B. H.; SCHAADT, R. D.; ALLISON, J. W.; KILBURN, J. O.; GLICKMAN, S. E.; HUTCHINSON, D. K.; BARBACHYN, M. R. & BRICKNER, S. J. *In Vitro* Activities of U-100592 and U-100766, Novel Oxazolidinone Antibacterial Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40(4): 839-845, 1996.

6. APÊNDICE

6.1. Carta de submissão do artigo “Bifunctional *Mycobacterium tuberculosis* chorismate synthase: isotope effect studies on the FMN reductase activity” à revista *Archives of Biochemistry and Biophysics*.

De: ABB [mailto:abb@elsevier.com]
Enviada: sex 25/8/2006 14:08
Para: Luiz Augusto Basso
Assunto: Submission Confirmation

Dear Dr Basso,

Your submission entitled "Bifunctional *Mycobacterium tuberculosis* chorismate synthase: isotope effect studies on the FMN reductase activity" has been received for consideration in *Archives of Biochemistry and Biophysics*.

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

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

This manuscript will be processed with the understanding that it:

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

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

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

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

Kind regards,

Charlotte Dudley
Editorial Office
Archives of Biochemistry and Biophysics
Elsevier
525 B Street, Suite 1900
San Diego, CA 92101-4495
USA
Phone: 619-699-6857
FAX: 619-699-6211

6.2. Sequência de nucleotídeos do gene *aroF* de *M. tuberculosis*.

1 atgttgctgct ggatcaccgc gggggagtca cacggccgcg ccttggtggc cgtggtcgaa
61 ggcatggtcg ccggcgtgca cgtcacctcg gccgacatcg ccgaccagct ggccccgacgc
121 cggctgggct acggccgcg cgcacggatg acgttcgagc gcgacgcggt gaccgtgctg
181 tccgggatac gccacggcag caccctgggc gggcccatcg ccatcgagat cggcaacacc
241 gaatggccca aatgggagac cgtgatggcc gccgaccgcg tcgaccccgc cgagctggcc
301 gacgtcgcac gcaacgcccc gtcacccgcg ccgcgccgcg gccacgcccga ctacgcgggc
361 atgctcaaat acggcttcga cgacgcgcg ccggtgctgg agcgggcccag cgcccgcgag
421 accgcccggc ggtcgcggc gggcacggtc gcacgggcat tctgaggca ggcgctgggt
481 gtcgaggtgc tctcccacgt catctcgatc ggcgctcgg caccctacga ggtccgccc
541 ccgcgggccg aggacctacc cgccatcgac gccagcccgg tacgcgcta cgacaaggcc
601 gccgaggcgg acatgatcgc ccaaatcgag gcggccaaga aagacggcga caccctcggc
661 ggcgtggtgg aggcggtcgc gctgggcctg ccggtggggc tggggtcgtt caccagcggc
721 gaccatcggc tcgacagcca gctggccgcc gccgtcatgg gcatccaggc gatcaagggc
781 gtggagatcg gcgacggatt ccagaccgcg cgccgccgcg gcagccgcbc ccacgacgag
841 atgtaccccg ggccccgacg cgtcgtccgc tccaccaacc gggccggggg gctggaaggc
901 gggatgacca acgggcagcc gctgcgggtg cgtgcggcga tgaagccgat ctccacggtg
961 ccgcgcgcbc tggccaccgt cgacctggcg accggcgatg aggccgtcgc catccatcag
1021 cgctcggatg tgtcgcgggt gccggcggcc ggggtcgtgg tggagacat ggtggcgtg
1081 gtgctggccc gggcggcgct ggaaaaattc ggcggggatt cgctggccga aaccacgcbc
1141 aacatcgccg cctaccagcg cagcgtcggc gaccgccaag caccggcccgc gcgggtctcc
1201 ggttga

6.3. Seqüência dos resíduos de aminoácidos da *MtCS*.

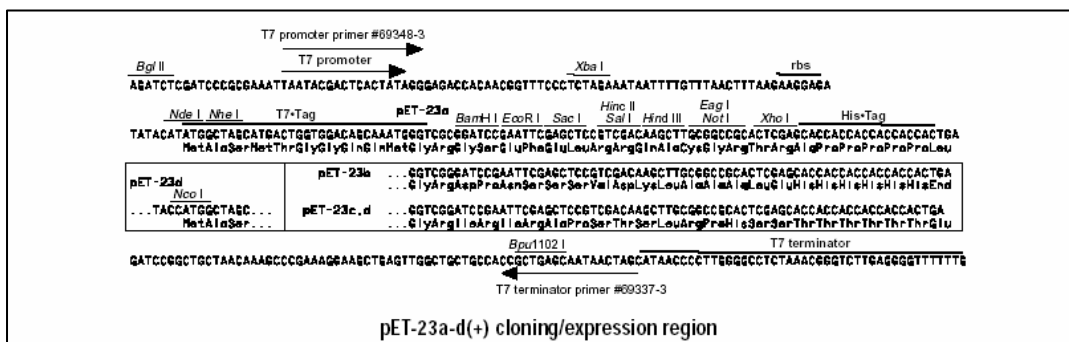
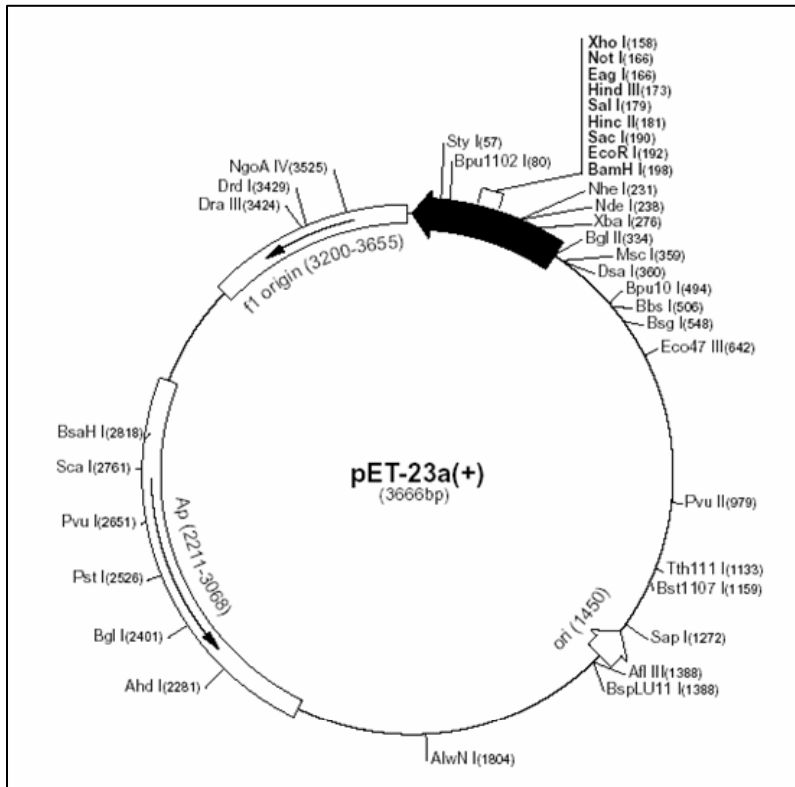
MLRWITAGES HGRALVAVVE GMVAGVHVTS ADIADQLARR RLG YGRGARM
TFERDAVTVL SGIRHGSTLG GPIAIEIGNT EWPKWETVMA ADPVDPAELA
DVARNA PLTR PRPGHADYAG MLKYGFDDAR PVLERASARE TAARVAAGTV
ARAF LRQALG VEVLSHVISI GASAPYEGPP PRAEDLPAID ASPVRAYDKA
AEADMIAQIE AAKKDGDTLG GVVEAVALGL PVGLGSFTSG DHRLDSQLAA
AVMGIQAIKG VEIGDGFQTA RRRGSRAHDE MYPGPDGVVR STNRAGGLEG
GMTNGQPLRV RAAMKPISTV PRALATVDLA TGDEAVAIHQ RSDVCAVPAA
GVVETMVAL VLARA ALEKF GGDSL AETQR NIAAYQRSVA DREAPAARVS
G

Ponto Isoelétrico teórico: 6,00

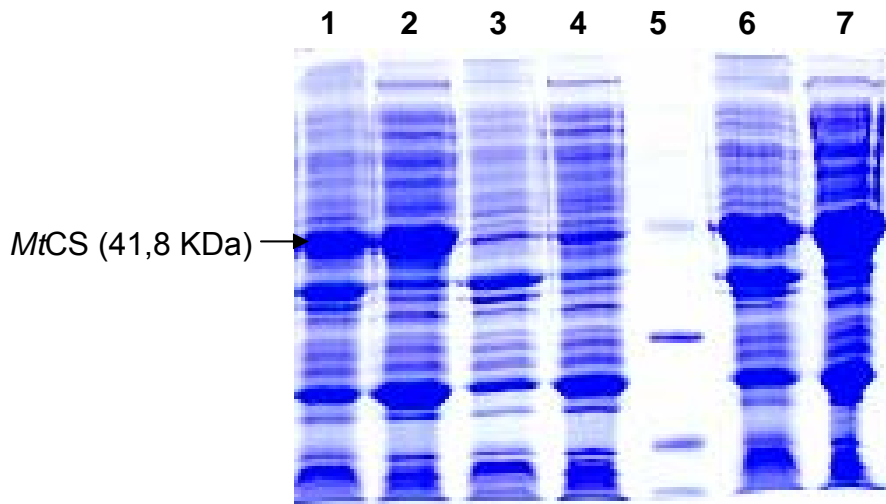
6.4. Composição de aminoácidos da *MtCS*.

Aminoácido	Nº de resíduos na <i>MtCS</i>	Percentagem na <i>MtCS</i>
Ala (A)	70	17,46 %
Arg (R)	36	8,98 %
Asn (N)	5	1,25 %
Asp (D)	25	6,23 %
Cys (C)	1	0,25 %
Gln (Q)	10	2,49 %
Glu (E)	23	5,74 %
Gly (G)	43	10,72 %
His (H)	8	2,00 %
Ile (I)	17	4,24 %
Leu (L)	28	6,98 %
Lys (K)	8	2,00 %
Met (M)	11	2,74 %
Phe (F)	6	1,50 %
Pro (P)	22	5,49 %
Ser (S)	19	4,74 %
Thr (T)	20	4,99 %
Trp (W)	3	0,75 %
Tyr (Y)	7	1,75 %
Val (V)	39	9,73 %
Asx (B)	0	0,00 %
Glx (Z)	0	0,00 %

6.5. Mapa do vetor de expressão pET23a(+).

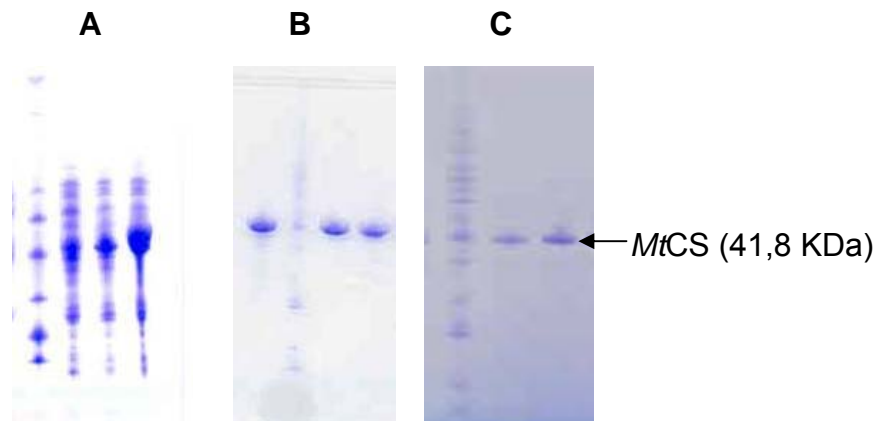


6.6. Análise da expressão protéica da *MtCS* em *E. coli* Rosetta(DE3)



Gel de Poliacrilamida-SDS 12%. Legenda: 1 e 6 – fração insolúvel Rosetta(DE3)+ pET23a(+)::*aroF*; 2 e 7 – fração solúvel Rosetta(DE3)+ pET23a(+)::*aroF*; 3 – fração insolúvel Rosetta(DE3)+pET23a(+) (controle negativo); 4 – fração solúvel Rosetta(DE3)+pET23a(+) (controle negativo); 5 – padrão de peso molecular de proteína, high range (Gibco) (43, 29, 18,4 e 14,3 kDa) .

6.7. Análise das etapas de purificação da *MtCS* por FPLC.



Gel de Poliacrilamida SDS 12%. Legenda: A – *MtCS* após o fracionamento na coluna *Q-Sepharose*; B - *MtCS* após fracionamento na coluna *Phenyl-Sepharose*; C – *MtCS* após o fracionamento na coluna *MonoQ*.

7. CURRICULUM VITÆ RESUMIDO

ELY, F.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Fernanda Ely

Local e data de nascimento: Capanema, Paraná, Brasil, 12 de agosto de 1982.

Endereço profissional: Av. Ipiranga 6681, TecnoPUC prédio 92A

Telefone profissional: (51) 3320.3629 **E-mail:** fernanda_ely@yahoo.com.br_

2. FORMAÇÃO: Farmácia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000-2004); Mestrado em Biologia Celular e Molecular (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005-2006).

3. ESTÁGIOS: *Laboratório de Microbiologia Molecular e Funcional (Centro de Biotecnologia – UFRGS)/ Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (TecnoPUC – PUCRS).*

Orientação: Prof. Dr. Jeverson Frazzon

Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Período: Jun 2000 – Dez 2001 Iniciação Científica – Voluntária

Jan 2001 – Dez 2004 Bolsista de Iniciação Científica – CNPq

Projeto de Pesquisa: “Estudo das Enzimas da Via do Ácido Chiquimico para o Desenvolvimento de Drogas Anti-Tuberculose”

Farmácia Dermatológica e Cosmética B&S

Supervisão: Farm^a Inara Bagestiro

Período: Mar 2004 – Jul 2004 Estágio Curricular

Atuação: Manipulação de formas farmacêuticas sólidas e semi-sólidas. Controle de qualidade de matéria-prima, gerenciamento comercial e dispensação de medicamentos.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Trabalho Destaque - XV Salão de Iniciação Científica da UFRGS

ELY, F.; SCHROEDER, E. K.; FRAZZON, J.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. “Clonagem, Super-expressão e Purificação das Enzimas Corismato Sintase e Deidroquinato Sintase de *Mycobacterium tuberculosis*”

24 a 28 de novembro de 2003 Porto Alegre – RS

5. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

M. V. B. DIAS, J. C. BORGES, **F. ELY**, J. H. PEREIRA, F. CANDURI, J. FRAZZON, M. S. PALMA, L. A. BASSO, D. S. SANTOS, W. F. AZEVEDO JR. Structure of chorismate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Struct. Biol.* 154: 130-143, 2006.

C. RIZZI, **F. ELY**, P. G. WEBER, M. GALLAS, I. O. FONSECA, J. O. SIMÕES, M. S. PALMA, J. FRAZZON, D. S. SANTOS, L. A. BASSO. DAHP synthase of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Cloning, Overexpression, and Purification of the Functional Enzyme. *Protein Exp. Purif.* 40: 23-30, 2005.

M. V. B. DIAS, **F. ELY**, F. CANDURI, J. H. PEREIRA, J. FRAZZON, L. A. BASSO, M. S. PALMA, W. F. AZEVEDO JR., D. S. SANTOS. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of chorismate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 60: 2003-2005, 2004.

M. V. B. DIAS, **F. ELY**, M. S. PALMA, L. A. BASSO, D. S. SANTOS. Chorismate Synthase: an attractive target for drug development against neglected disease. *Accepted for publication in Current Drug Targets*.

6. RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

M. M. PEDROSO, **F. ELY**, L. A. BASSO, D. S. SANTOS. The Enzymatic Synthesis and Purification of Shikimate-3-phosphate, the Substrate of EPSP Synthase. In: XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2006, Águas de Lindóia, Brasil.

F. ELY, J. D. MENDONCA, J. FRAZZON, L. A. BASSO, D. S. SANTOS. Chorismate Synthase from *Mycobacterium tuberculosis*: a Bifunctional Enzyme as a Target to Anti-tuberculosis Drug Development, In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2005, Águas de Lindóia, Brasil.

J. D. MENDONCA, **F. ELY**, J. FRAZZON, L. A. BASSO, D. S. SANTOS. Purification of *AroB* Encoded Dehydroquinase Synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and Genetic Complementation in *Escherichia coli* Mutants In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2005, Águas de Lindóia, Brasil.

J. D. MENDONCA, **F. ELY**, J. FRAZZON, L. A. BASSO, D. S. SANTOS. Purificação da Enzima Deidroquinato Sintase de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e a Complementação Gênica de Mutantes *AroB Escherichia coli*. In: XVII Salão de Iniciação Científica – Ciências Biológicas (SIC-UFRGS), 2005, Porto Alegre, Brasil.

F. ELY, E. K. SCHROEDER, J. FRAZZON, L. A. BASSO, D. S. SANTOS. The Enzymes of Shikimate Pathway: Dehydroquinase Synthase and Chorismate Synthase as a Target to Chemotherapeutic Agents Development Against *Mycobacterium tuberculosis*. In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2004, Caxambu, Brasil.

F. ELY, E. K. SCHROEDER, L. A. BASSO, D. S. SANTOS. Amplification, Cloning and Overexpression Studies of *Mycobacterium tuberculosis* Chorismate Synthase, the Seventh Enzyme of Shikimate Pathway. In: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2003, Caxambu, Brasil.

F. ELY, E. K. SCHROEDER, J. FRAZZON, L. A. BASSO, D. S. SANTOS. Clonagem, Super-Expressão e Purificação das Enzimas Corismato Sintase e Deidroquinato Sintase de *Mycobacterium tuberculosis* In: XV Salão de Iniciação Científica – Ciências Biológicas (SIC-UFRGS), 2003, Porto Alegre, Brasil.

F. ELY, E. K. SCHROEDER, J. FRAZZON, L. A. BASSO, D. S. SANTOS. Estudo das Enzimas da Via do Chiquimato: Corismato Sintase e Deidroquinato Sintase como Alvo para a Quimioterapia Anti-*Mycobacterium tuberculosis*. In: XXVI Encontro Nacional dos Estudantes de Farmácia X Conferência Científica Brasileira dos Estudantes de Farmácia (ENEF), 2003, Cuiabá, Brasil.

F. ELY, E. K. SCHROEDER, J. FRAZZON, L. A. BASSO, D. S. SANTOS. Amplification, Cloning and Overexpression Studies of *Mycobacterium tuberculosis* Chorismate Synthase, the Seventh Enzyme of Shikimate Pathway. In: I Workshop da Rede Brasileira de Pesquisa em Tuberculose (REDE-TB), 2002, Rio de Janeiro, Brasil.

F. ELY, E. K. SCHROEDER, L. A. BASSO, D. S. SANTOS. Amplificação e Clonagem do Gene *AroF* de *Mycobacterium tuberculosis* e Super-Expressão do seu Produto, a Corismato Sintase In: XIII Salão de Iniciação Científica – Ciências Biológicas (SIC-UFRGS), 2001, Porto Alegre, Brasil.