



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

TATHYANA MAR AMORIM FRANCO

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS DA ENZIMA GMP
SINTASE (EC 6.3.5.2) DE *MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS* H37RV COMO PRIMEIRO PASSO
PARA A OBTENÇÃO DE AMOSTRAS
ATENUADAS**

Porto Alegre

2011

TATHYANA MAR AMORIM FRANCO

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS DA ENZIMA GMP
SINTASE (EC 6.3.5.2) DE *MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS* H37RV COMO PRIMEIRO PASSO
PARA A OBTENÇÃO DE AMOSTRAS
ATENUADAS**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

Orientador: Diógenes Santiago Santos

Co-orientador: Luiz Augusto Basso

Porto Alegre
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F825e Franco, Tathiana Mar Amorim

Estudos bioquímicos da enzima GMP sintase (EC 6.3.5.2) de *Mycobacterium Tuberculosis* H37Rv como primeiro passo para a obtenção de amostras atenuadas / Tathiana Mar Amorim Franco. Porto Alegre, 2011.
140 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, 2011.

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

1. Medicina. 2. Bioquímica. 3. Guanosina monofosfato sintase. 4. Cinética cooperativa. 5. Comportamento aostérico. 6. Formação de adenil-XMP. 7. Mecanismo cinético. 8. Agentes antimicrobianos. I. Santos, Diógenes Santiago. II. Título.

CDD 574.88

Bibliotecária Responsável

Isabel Merlo Crespo
CRB 10/1201

TATHYANA MAR AMORIM FRANCO

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS DA ENZIMA GMP
SINTASE (EC 6.3.5.2) DE *MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS* H37RV COMO PRIMEIRO PASSO
PARA A OBTENÇÃO DE AMOSTRAS
ATENUADAS**

Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Mestre pelo Programa de
Pós-Graduação em Medicina e Ciências da
Saúde.

Aprovada em 24 de Agosto de 2011.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Denise Cantarelli Machado - PUCRS

Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr. - PUCRS

Dr. Arthur Germano Fett-Neto - UFRGS

Porto Alegre
2011

Dedico esta dissertação à
minha família, que me apoiou
e incentivou nesta conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Diógenes Santiago Santos e Luiz Augusto Basso, pela oportunidade de crescimento profissional dentro do seu esplendido grupo de pesquisas, e principalmente por toda a ajuda e suporte.

Aos meus colegas de laboratório por toda a ajuda, ensinamentos, paciência e companheirismo, principalmente aos colegas Rodrigo Ducati, Diana Rostirolla, Zilpa Adriana, Gregório, Christiano Neves, Anne Villela, Cândida Deves, Léia Jaskulski, Laura Marder, Priscila Vitola, Valnês Junior, Caroline Brancher, Thiago Milech, Priscila Wink, Daniel Lorenzini, Renilda, Gleci e Melissa.

Às minhas amigas, Jacki, Adri, Ju, Jô, Nine, Nani e Marcinha, por fazerem parte da minha vida, por sempre terem uma palavra de conforto e otimismo, pela confiança, paciência e por todo o amor por nós compartilhado.

Ao meu colega, amigo, companheiro e, sobretudo, meu amor, Rodrigo Ducati, que foi peça fundamental para que este mestrado fosse emocionante e confuso ao mesmo tempo, por toda a ajuda, paciência (esta ainda está sendo aprimorada) e amor, por fazer os meus dias mais alegres, e por todo ensinamento, tanto profissional quanto pessoal. Sem mais palavras, te amo.

Aos meus irmãos, Will e Allan, simplesmente por existirem. Vocês são 2/3 de tudo que eu sou.

Finalmente, gostaria de agradecer os responsáveis pela formação do meu caráter e de tudo que eu sou, meus pais, que são o meu alicerce, meus melhores amigos e meus maiores amores. Obrigada por me ensinarem a ser, sobretudo, uma pessoa de bem, que acredita e luta pelos seus sonhos. Amo vocês.

Muito obrigada a todos vocês!

“Você ganha forças, coragem e confiança a cada experiência em que você enfrenta o medo. Você tem que fazer exatamente aquilo que você acha que não consegue.”

(Eleanor Roosevelt)

RESUMO

Aproximadamente 1/3 da população mundial está infectada com o *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose humana (TB). A incidência global e o constante aumento da resistência às drogas tornam evidente a urgente necessidade do desenvolvimento de novas drogas, para o tratamento, e vacinas, para a prevenção desta doença. As enzimas das vias metabólicas fundamentais são vistas como atrativos alvos moleculares definidos. A enzima guanosina monofosfato sintase (GMPS), uma amidotransferase do tipo G, catalisa a aminação da xantosina monofosfato (XMP) à guanosina monofosfato (GMP), em uma reação que ocorre em dois domínios, o glutamina amidotrasferase e o adenosina trifosfato (ATP) pirofosfatase, onde ocorre o ataque do intermediário altamente reativo adenil-XMP, levando a formação de GMP. O gene *guaA* (Rv3396c), o qual codifica a enzima GMPS, foi identificado por homologia de sequência no genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Nós evidenciamos que a formação do adenil-XMP causa uma inibição da enzima pelo aumento dos níveis de ATP e XMP. Além disso, a GMPS de *M. tuberculosis* (MtGMPS), apresentou um comportamento alostérico na variação dos níveis de XMP, demonstrando cooperatividade positiva e diferentes aspectos cinéticos dos já reportados para as enzimas de humanos e *Escherichia coli*. O mecanismo ping-pong foi proposto com base nos resultados evidenciados pela liberação de pirofosfato (PP_i) depois da ligação da amônia, corroborando com os dados previamente publicados para outras GMPSs. Nossos resultados podem ser úteis por revelar o papel desta enzima no metabolismo de purinas do *M. tuberculosis*, fornecendo conhecimento para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas para o tratamento e prevenção, respectivamente.

Palavras-chaves: Guanosina monofosfato sintase, cinética cooperativa, comportamento alostérico, formação de adenil-XMP, mecanismo cinético, agentes antimicobacteriais.

ABSTRACT

Approximately one-third of the world's population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*, the aetiological agent of human tuberculosis (TB). As global incidence of drug-resistance constantly increases, the urgent need for developing new anti-TB drugs and vaccines becomes more evident. Component enzymes of fundamental metabolic pathways seem to be attractive as define molecular targets. Guanosine monophosphate synthase (GMPS), a G-type amidotransferase, catalyzes the amination of xanthosine monophosphate (XMP) to guanosine monophosphate (GMP) in a reaction that occurs in two domains, the glutamine amidotransferase and the ATP pyrophosphatase, where it attacks a highly reactive adenylyl-XMP intermediate, leading to GMP formation. The *guaA* (Rv3396c) gene, which codes for GMPS, was identified by sequence homology in the *M. tuberculosis* H37Rv genome. We evidenced that adenylyl-XMP formation causes enzyme inhibition by increase of ATP and XMP levels. In addition, *M. tuberculosis* GMPS (MtGMPS) displays an allosteric behavior to XMP variation, demonstrating positive cooperativity and different kinetic aspects from that reported for human and *Escherichia coli* enzymes. The proposed ordered mechanism of substrates binding, which results in the release of pyrophosphate before binding ammonia showed to be the same to other GMPSs. Our results on MtGMPS might be useful to reveal its role in *M. tuberculosis* purine metabolism, providing knowledge for the development of new drugs and vaccines to treat and prevent TB, respectively.

Keywords: Guanosine monophosphate synthase, Cooperative kinetics, Allosteric behavior, Adenylyl-XMP formation, Kinetic mechanism, Anti-mycobacterial agents

SUMÁRIO

1. Tuberculose	13
1.1 Tuberculose	13
1.2 Patogenia.....	15
1.3 Tratamento e Resistência as Drogas anti-TB	16
1.4 Desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da TB	17
1.5 Desenvolvimento de novas vacinas anti-TB	19
1.6 Metabolismo de Nucleotídeos.....	20
1.6.1 Síntese de novo e via de salvamento de purinas	20
1.6.1.1 Síntese <i>de novo</i>	22
1.6.1.2 Via de salvamento.....	24
1.7 Guanosina Monofosfato Sintetase	26
2. Justificativa	30
3. Objetivos	32
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. Materiais e Métodos	34
4.1 Amplificação do gene <i>guaA</i> de <i>M. tuberculosis</i>	34
4.2 Clonagem do gene <i>guaA</i> de <i>M. tuberculosis</i> em vetor pCR®-Blunt	34
4.3 Clonagem do gene <i>guaA</i> de <i>M. tuberculosis</i> em vetor de expressão pET23a(+) ...	36
4.4 Sequenciamento dos fragmentos clonados no vetor pET-23 ^a (+).....	37
4.5 Expressão da proteína recombinante MtGMPS.....	37
4.6 Purificação da proteína recombinante MtGMPS em HPLC	38
4.7 Quantificação da proteína total	39
4.8 Análise da pureza e identidade da proteína recombinante	40

4.9 Determinação do estado oligomérico da enzima	41
4.10 Determinação das constantes aparentes para a enzima MtGMPS.....	42
4.11 Influência do Mg ²⁺ sobre a atividade da enzima MtGMPS	44
4.12 Atividade ATPase	44
4.13 Atividade Glutaminase	45
4.14 Calorimetria de titulação isotérmica	45
4.15 Alinhamento de múltiplas sequências de GMPSs.....	46
5. Resultados e Discussão	49
6. Conclusão.....	70
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS.....	82
ANEXO 1	83
ANEXO 2	136

Capítulo 01

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose

A Tuberculose (TB) humana é uma doença infecto-contagiosa grave cujo principal agente causador é o *Mycobacterium tuberculosis* (Mt). Esse microorganismo tem afetado a humanidade há cerca de 8.000 anos [1], havendo indícios de que o gênero *Mycobacterium* tenha se originado há mais de 150 milhões de anos, e que o progenitor de *M. tuberculosis* (que parece ter se originado entre 15.000 a 30.000 anos atrás) tenha sido contemporâneo e co-evoluído com os primeiros homínídeos do leste da África há três milhões de anos. Historiadores estabeleceram a existência da TB endêmica no Egito, na Índia e na China a partir de múmias datando de 5.000, 3.300 e 2.300 anos a.C. respectivamente [2].

A identificação do material genético de *M. tuberculosis* em tecidos de mamíferos primitivos permitiu provar que a TB é uma doença bastante antiga e com ampla distribuição geográfica. A TB foi disseminada no Egito e em Roma, na América antes de Colombo e em Bornéu, antes mesmo de qualquer contato com o povo europeu. A presença de ácido desoxirribonucléico (DNA) da espécie *M. bovis*, que geralmente infectam animais, também foram encontrados em esqueletos humanos, evidenciando que os animais com os quais a população estava em constante contato podem ter sido reservatórios para a infecção em humanos [2].

No final do século XIX e início do século XX, a TB foi a principal causa de óbitos no mundo, uma vez que não havia um tratamento efetivo contra a doença, e sua causa era desconhecida [1]. Essa situação levou a criação, do primeiro estabelecimento sanatório em 1854 por Hermann Brehmer, pois, acreditava-se que com uma alimentação saudável, exercícios e altitude, os pacientes internados portadores de TB poderiam alcançar a cura. Esse modelo foi utilizado para a criação dos sanatórios subseqüentes, principalmente na Europa e nos Estados Unidos [2,3].

Apesar dos esforços de muitos estudiosos na definição dos sintomas, características, possíveis causas e forma de contágio da doença, apenas em 1882, o alemão Robert Koch (1843-1910) identificou o *M. tuberculosis* como sendo o agente etiológico da TB. Trinta e nove anos depois, a vacina bacilo Calmette-Guérin (BCG) foi introduzida para uso em humanos, e se tornou a principal estratégia profilática contra a TB [2,3].

Finalmente, a introdução de compostos anti-TB, como estreptomicina (1944), isoniazida (1952), pirazinamida (1952) e etambutol (1961), representaram uma quimioterapia efetiva que reduziu drasticamente a mortalidade causada pela TB [3]. A posterior introdução de outras drogas, como a rifampicina (1966) [4], pareceu fornecer um arsenal suficiente de agentes contra a doença.

No entanto, a TB nunca foi erradicada e até hoje é a principal causa de morte por doença infecciosa no mundo, especialmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, como os pertencentes à Ásia, África e inclusive o Brasil [1].

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Tuberculose causa mais mortes do que a soma de óbitos causados pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e Malária [5]. No Brasil, que ocupa o 14º lugar na relação dos 22 países que concentram 80% dos casos de TB no mundo [5], em 2008, foram registrados 73 mil novos casos, respondendo por uma incidência de 38,2 casos a cada 100.000 habitantes, e acometendo 4,5 mil mortes [7].

Dados epidemiológicos globais de 2009 indicam a incidência de 139 casos de TB a cada 100.000 habitantes, o que corresponde a 9,4 milhões de casos de TB no mundo, levando 1,3 milhões dos pacientes a óbito (**Figura 1**) [5], sendo que destes, cerca de 380 mil eram portadores da co-infecção TB-HIV (sigla em inglês para Human Immunodeficiency Virus) [5].

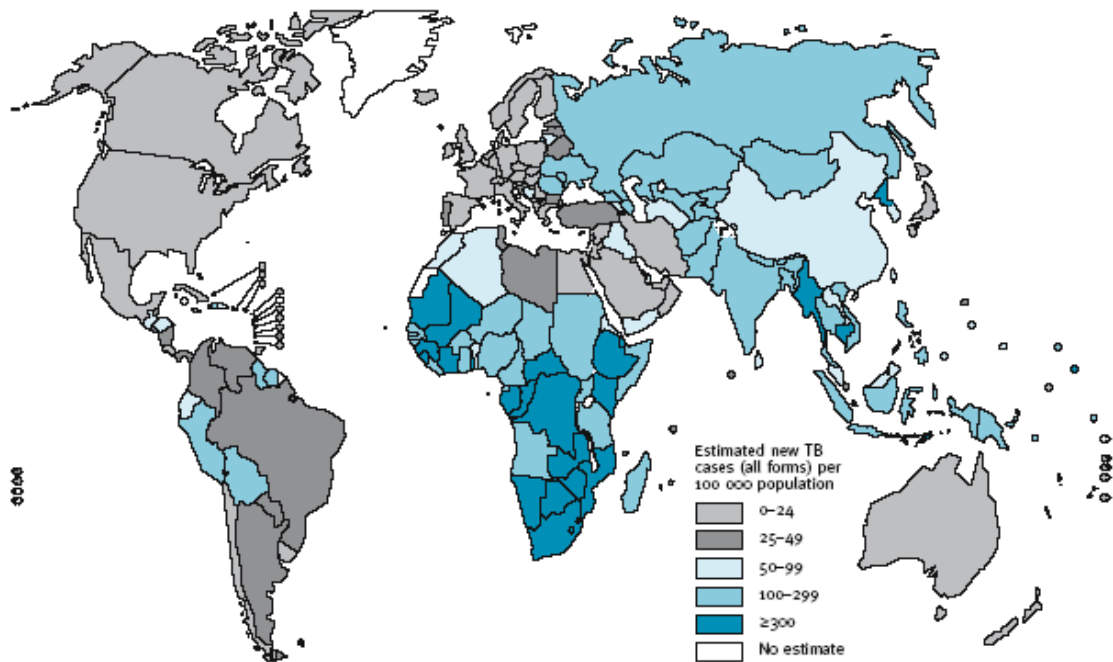


Figura 1. Estimativa das taxas de incidência de TB no mundo em 2009, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, adaptado de Report WHO/HTM/TB [5].

Países da Ásia e da África correspondem a 55% e 31% da incidência de TB no mundo, respectivamente. Os altos valores estimados, particularmente para países africanos devem-se, em parte, às taxas relativamente altas de co-infecção com o HIV. O Brasil representa 2% do total global de casos de TB-HIV positivos e, no ano de 2006, estimou-se que 12% dos novos casos de TB ocorreram em indivíduos portadores de HIV [8, 6]. Além disso, a tuberculose resistente a múltiplas drogas (TB-MDR), que surgem principalmente como resultado da baixa adesão ao tratamento, é um problema crescente em muitos países e será abordada no item 1.3 [6].

1.2 Patogenia

A TB pode ser causada por diversas espécies de micobactérias (*M. africanum*, *M. tuberculosis*, *M. avium* e *M. bovis*) [4,9]; porém, o principal agente

etiológico da doença em humanos é o *M. tuberculosis*, uma bactéria intracelular, fracamente Gram-positiva de crescimento lento, capaz de infectar diversos órgãos e sistemas do hospedeiro, como pleura, sistema nervoso, circulatório e urogenital, ossos, articulações e a pele. No entanto, a infecção pulmonar é a forma mais comum da doença manifestando-se a partir de fraqueza muscular, febre, sudorese noturna, dor no peito, insuficiência respiratória, tosse e hemoptise (rompimento de vasos sanguíneos) [10, 11, 12].

A TB é transmitida através de aerossóis expelidos pelo paciente que desenvolveu a forma ativa da doença, ao tossir, espirrar ou até mesmo falar, em decorrência da inflamação pulmonar [9, 13, 14, 15]. Essas partículas expelidas pelo pulmão infectado podem persistir em suspensão no ar por até quatro horas, contendo de dois a dez bacilos, o que mostra o alto potencial de contágio da doença [16]. Após a infecção, o bacilo inalado é fagocitado pelos macrófagos alveolares, podendo ser (1) rapidamente eliminado; (2) ficar na forma ativa e causar lesões pulmonares (fibrose e nódulos) conhecidas como tubérculos ou; (3) persistir por décadas dentro dos vacúolos intracelulares destes fagócitos (infecção latente) [9].

A incidência da TB nos dias atuais tem aumentado devido a fatores tais como a co-infecção com HIV, a resistência do microorganismo aos medicamentos utilizados na terapia, a falta de adesão do paciente ao tratamento e qualidade duvidosa dos medicamentos [17].

1.3 Tratamento e Resistência as Drogas anti-TB

O tratamento da TB atualmente consiste em diagnosticar e tratar os casos de TB o mais rapidamente possível, a fim de interromper a transmissão e evitar a difusão da doença [18]. A terapia resulta de uma associação de fármacos,

geralmente isoniazida (INH), rifampicina (RMP) e pirazinamida (PZA), durante dois meses, seguida por quatro meses com INH e RMP [18, 19]. Situações como monoterapia, prescrição inadequada dessa associação ou falta de colaboração do paciente para o uso desse esquema terapêutico estão levando ao surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* multirresistente a drogas (TB-MDR) e extensivamente resistentes a drogas (TB-XDR) [17, 18, 20]. O número de cepas resistentes tem aumentado em diversas partes do mundo, e altas taxas de resistência e multirresistência aos fármacos (resistência a, pelo menos, RMP e INH) têm sido descritas em diversos países [21].

A TB-MDR é definida pela resistência a no mínimo duas das principais drogas anti-TB, INH e RIF. Estima-se que em 2007 ocorreram cerca de 500 mil casos de TB-MDR [22]. Enquanto esta forma de TB é geralmente tratável, porém requerendo uma quimioterapia prolongada e mais cara além de utilizar drogas de segunda linha que provocam efeitos colaterais mais severos, as cepas denominadas de XDR, definidas como resistentes a no mínimo RMP, INH, qualquer droga injetável de segunda linha (capreomicina, canamicina ou amicacina) e uma fluoroquinolona, são cepas virtualmente intratáveis, geralmente levando os pacientes a óbito [22]. Novos dados de TB-XDR registrados pela OMS revelaram que em 2008 ocorreram 30.000 casos dessa forma de TB, estas foram detectadas em 45 países, sendo que só no mês de novembro do ano de 2009, 57 países registraram pelo menos um caso de TB-XDR [5, 6].

1.4 Desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da TB

Com o surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* MDR e XDR [17, 18, 20], e a baixa proteção da vacina BCG em adultos, torna-se evidente a necessidade de

novas estratégias para o desenvolvimento de novas vacinas para a prevenção da doença, bem como a pesquisa por novos fármacos para o tratamento da TB [23].

Em 1994, o National Institute of allergy and Infectious Diseases (NIAID) estabeleceu a “*Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility*” (TAACF), para estimular a pesquisa e desenvolvimento de novas drogas anti-TB [24]. Esse programa identificou numerosos análogos de purinas com atividade seletiva sobre o *M. tuberculosis*, o qual nos possibilitou estudar o metabolismo de purinas neste patógeno [23].

A estratégia racional para o desenvolvimento de qualquer novo medicamento para o tratamento ou vacina para a prevenção de uma doença infecciosa, tem como base estudar as características bioquímicas do organismo responsável pela doença, a fim de esclarecer o quanto determinadas rotas metabólicas, assim como suas enzimas fundamentais, contribuem para a patogenia e viabilidade do microorganismo [17]. Tal conhecimento pode ser explorado para desenvolver agentes que interajam especificamente com enzimas do *M. tuberculosis*, o que resultaria em toxicidade seletiva [17], com drogas mais eficazes, mais baratas, que reduzam o tempo de tratamento e com menos efeitos colaterais para o paciente.

O desenvolvimento racional de medicamentos requer pesquisas tanto estruturais como funcionais de proteínas. Inibidores enzimáticos formam cerca de 25% dos medicamentos comercializados nos Estados Unidos. Estes se aproveitam do conhecimento sobre as interações enzima/substrato ao longo da coordenada da reação química e estão entre as drogas mais potentes e eficazes atualmente conhecidas. Sendo assim, a análise mecanicista deve ser sempre uma prioridade no estudo de drogas alvo-específicas, permitindo o desenho racional baseado em função de inibidores mais potentes. O genoma tem sido o principal alvo de

abordagem para o desenvolvimento de novos medicamentos. Os primeiros passos para a validação de destino devem incluir os dados experimentais sobre a especificidade de substrato e mecanismo de cinética enzimática [25].

1.5 Desenvolvimento de novas vacinas anti-TB

No ano de 2004, a OMS estabeleceu que para o desenvolvimento de vacinas vivas, em particular as vacinas baseadas em cepas atenuadas de *M. tuberculosis*, deve-se obrigatoriamente realizar duas mutações independentes no genoma do microorganismo [26].

Diferentes abordagens tem sido tomadas para a construção das chamadas cepas “racionalmente atenuadas” de *M. tuberculosis*. Em geral estas são baseadas em lesões geneticamente definidas no DNA do bacilo, resultando em mutantes duplamente auxotróficos, que aumentam potencialmente a atenuação e também a estabilidade genética do fenótipo atenuado [26]. As vacinas vivas atenuadas tem oferecido uma potente prevenção contra diversas infecções humanas, e um grande número de vacinas deste tipo tem sido rotineiramente utilizadas na clínica, como por exemplo, as vacinas para a prevenção da poliomielite, rubéola, varicela e sarampo. Em geral essas vacinas são seguras, eficazes e induzem respostas tanto locais quanto sistêmicas. Estas ainda estimulam tanto uma resposta imune celular e humoral, mas também são capazes de ativar os ramos da resposta inata e adaptativa do sistema imunológico [27].

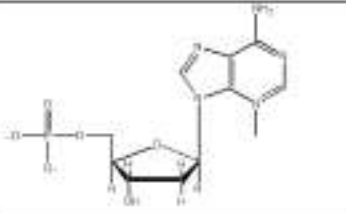
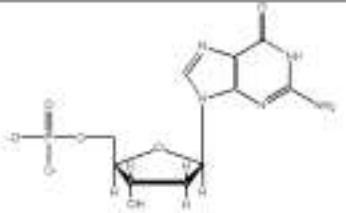
Num contexto geral, vacinas vivas atenuadas de cepas auxotróficas de bactérias intracelulares como *salmonella sp.*, *brucella sp.* e *yersinia sp.*, com deleções de aminoácidos que codificam genes para a síntese de bases púricas e/

ou pirimídicas demonstraram considerável proteção contra infecções em modelos animais [27].

Atualmente existem cepas mutantes auxotróficas de *M. tuberculosis* em estudos clínicos de fase I, II e III [28], porém, no mercado, a única vacina utilizada continua sendo a BCG. Variações desta também estão sendo testadas, porém a busca por uma vacina proveniente de mutações do próprio bacilo tem sido fortemente aplicada.

1.6 Metabolismo de nucleotídeos

Os nucleotídeos são componentes estruturais de co-fatores enzimáticos, intermediários metabólicos e componentes dos ácidos nucleicos, que funcionam ainda como sinalizadores químicos, respondendo a hormônios e outros estímulos extracelulares [29, 30]. Estes são compostos por uma base nitrogenada, uma pentose e um ou mais grupos fosfatos. As bases nitrogenadas podem ser púricas, as mais comuns são a adenina, a guanina, a hipoxantina e a xantina; ou pirimidínicas, onde as principais são a citosina, uracil, timina e ácido orótico [31] (Tabela 1).

Fórmula	Base	Nucleosídeo	Nucleotídeo
	Adenina Ade A	Adenosina Ado A	Ácido adenilico AMP
	Guanina Gua G	Guanosina Guo G	Ácido guanossilico GMP

	Citosina Cyt C	Citidina Cyd C	Ácido citidílico CMP
	Uracila Ura U	Uridina Urd U	Ácido uridílico UMP
	Timina Thy T	Desoxitimidina dThd dT	Ácido desoxitimidílico dTMP

Tabela 1. Nomes e abreviaturas das bases dos ácidos nucléicos, nucleosídeos e nucleotídeos. As estruturas mostradas correspondem aos desoxirribonucleotídeos, exceto para UMP, que ocorre apenas na forma ribonucleotídeo.

As purinas e pirimidinas são fundamentais para o processo metabólico e vida das células de todos os organismos. Estes nucleotídeos, tais como, adenosina trifosfato (ATP), deoxi-adenosina trifosfato (dATP), citidina trifosfato (CTP), uridina trifosfato (UTP) ou guanosina trifosfato (GTP), são necessários para a síntese de DNA e ácido ribonucléico (RNA), bem como para muitas outras funções celulares [23, 30].

Os nucleotídeos podem ser sintetizados de duas formas: pela síntese *de novo* que começa com os seus precursores metabólicos: aminoácidos, ribose-5-P, CO₂ e NH₃ e resulta em um alto consumo de energia pela célula; ou pela via de recuperação, também conhecida com via de salvamento (*salvage pathway*), onde ocorre uma reciclagem a partir de bases livres, ou a fosforilação de nucleosídeos liberados no catabolismo dos ácidos nucléicos, tendo um gasto menor de energia que a síntese *de novo*. Vários precursores importantes são compartilhados por

purinas e pirimidinas, como o 5-fosforribosil-1-pirofosfato (PRPP) sendo a estrutura da ribose mantida ou retirada do nucleotídeo sintetizado. Em cada via um aminoácido é um importante precursor: a glicina no caso das purinas e o aspartato no caso das pirimidinas [30, 32].

O metabolismo de purinas constitui um alvo potencial excelente para o desenho racional de regimes quimioterápicos antiparasitários, devido a diferenças estruturais de afinidade e especificidade de ligação entre as enzimas humanas e dos agentes infecciosos procariotos. Entre elas, está a especificidade do transporte de purinas, podendo ter um alto grau de seletividade e também as diferenças relacionadas à preferência pelo substrato utilizado [33, 34].

1.6.1 Síntese *de novo* e via de salvamento de purinas

1.6.1.1 Síntese *de novo*

Os nucleotídeos de purinas são sintetizados a partir de PRPP, que atua como fonte da porção ribose. O PRPP é obtido a partir de ribose-5-fosfato, que é produzido a partir de glicose pela via da pentose-fosfato [35], e de ATP, em reação catalisada pela enzima 5-fosforribosil-1-pirofosfato sintase (PRS), que é uma enzima regulatória. Na **Figura 2** é mostrada a rota metabólica da biossíntese *de novo* de inosina monofosfato (IMP) [36].

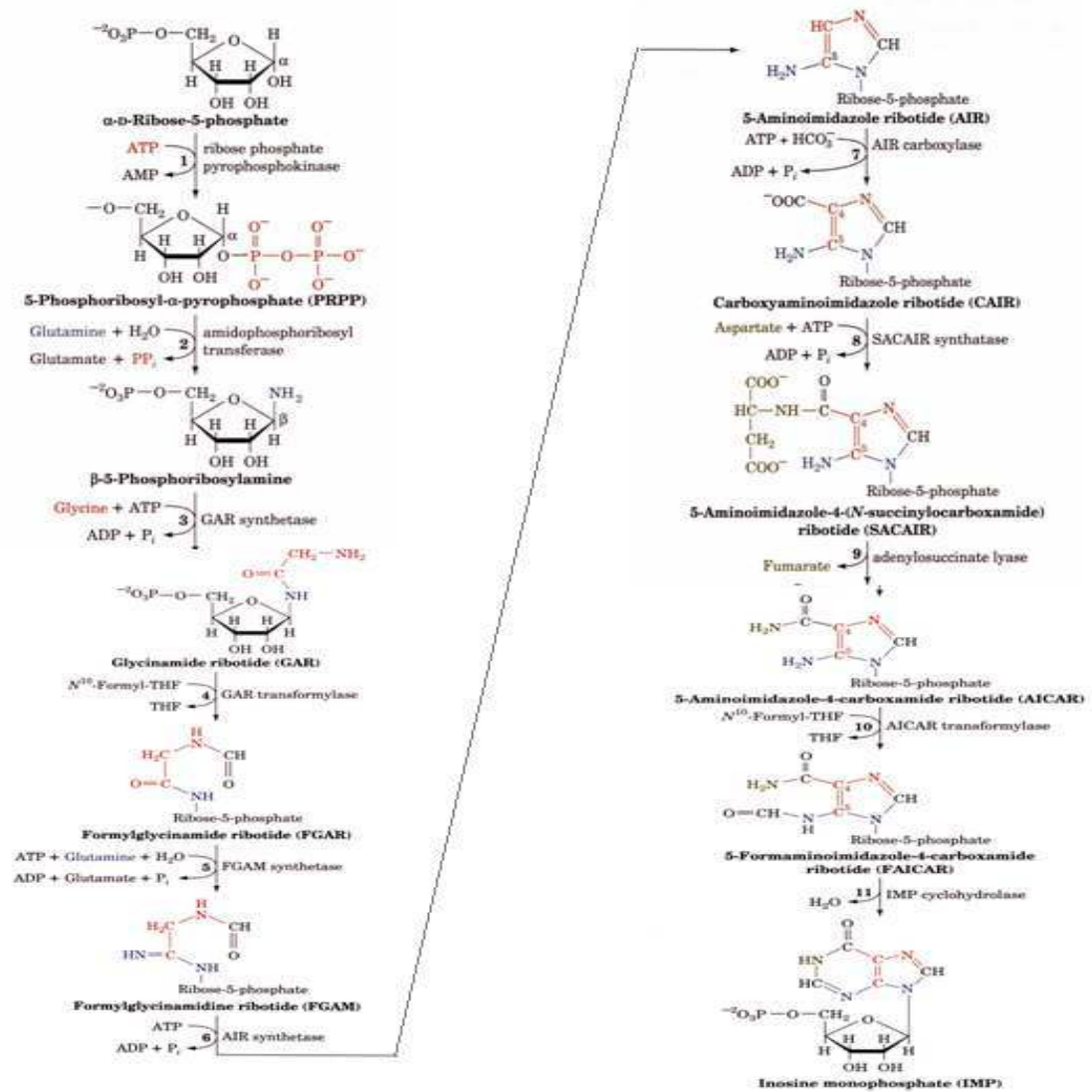


Figura 2. Rota metabólica da biossíntese de novo de IMP. A via inicia com a formação de PRPP a partir de ribose-5-fosfato e ATP, pela ação da enzima PRS. O resíduo de purina é construído a partir de um anel de ribose a partir de 11 reações enzimáticas [36].

As reações catalisadas pelas enzimas PRS, adenosina difosforil-transferase, adenosina difosforil-sintetase e IMP-desidrogenase são as etapas reguladas da via, sendo que as duas primeiras enzimas controlam a síntese de IMP e as duas últimas controlam a síntese de adenosina monofosfato (AMP) e guanosina monofosfato (GMP), respectivamente.

Um sítio primário de regulação é a síntese de PRPP. A PRS é negativamente afetada por guanosina difosfato GDP e, em um sítio alostérico distinto, por adenosina difosfato (ADP). Assim, a ligação simultânea de uma oxipurina e uma

aminopurina podem ocorrer, tendo como resultado uma inibição sinérgica da enzima [37] (**Figura 3**).

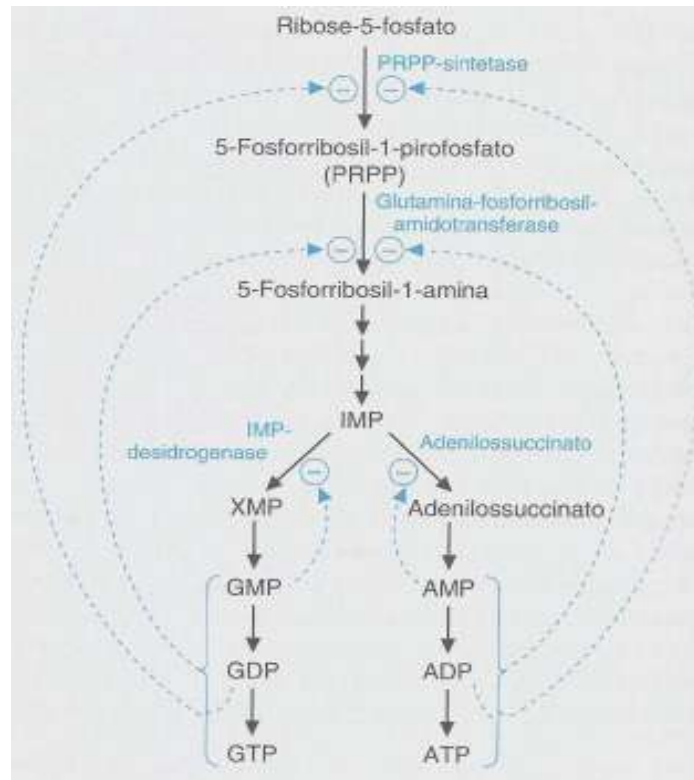


Figura 3. Regulação da síntese de purinas. A PRS tem dois sítios alostéricos, um para ADP e outro para GDP [37].

1.6.1.2 *Via de salvamento*

A maioria das células é capaz de utilizar a via de salvamento para a reciclagem de bases livres e nucleosídeos obtidos a partir da dieta ou de outros tecidos, podendo ser a principal forma de obtenção de nucleotídeos para determinadas linhagens celulares, como os linfócitos [37].

As reações da via de salvamento permitem que bases livres, nucleosídeos e nucleotídeos sejam facilmente interconvertidos. As principais enzimas são a nucleosídeo-purina-fosforilase, a fosforribosiltransferase e a deaminase.

A nucleosídeo purina fosforilase catalisa uma reação de fosforólise da ligação N-glicosídica que liga a base à porção glicídica nos nucleosídeos guanosina e inosina. Assim, guanosina e inosina são convertidos em guanina e hipoxantina, respectivamente, junto com a ribose-1-fosfato (**Figura 4**). A ribose-1-fosfato pode ser isomerizada a ribose-5-fosfato e, então, as bases livres recuperadas ou degradadas, dependendo das necessidades celulares.

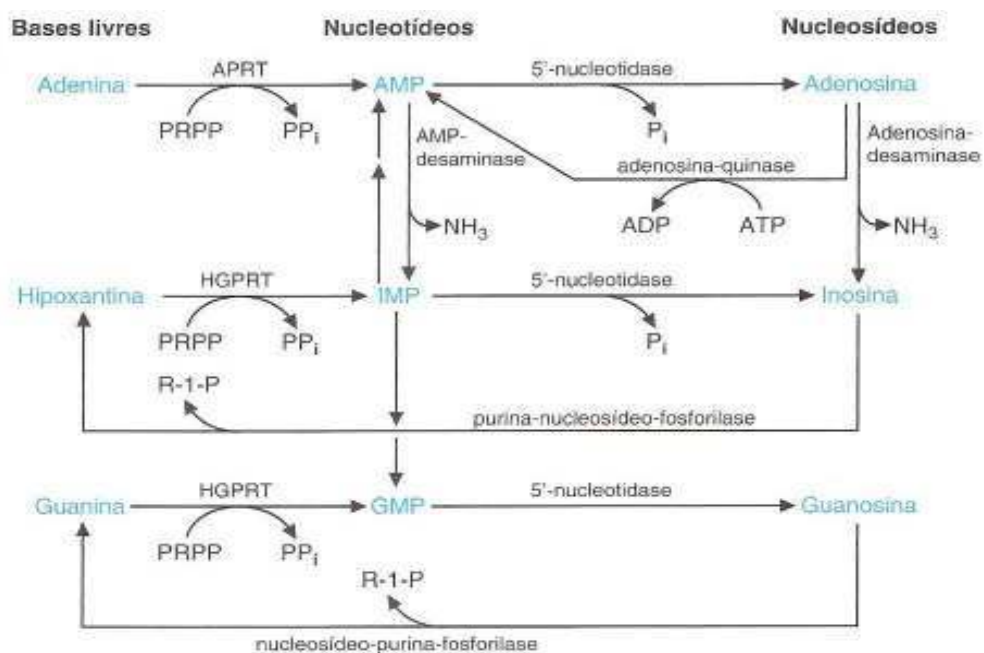


Figura 4. Recuperação de bases. As bases púricas hipoxantina e guanina reagem com PRPP para formar nucleotídeos monofosfato de inosina e monofosfato de guanosina, respectivamente [37].

As enzimas fosforribosiltransferases catalisam a adição de um grupo ribose-5-fosfato a uma base livre, produzindo um nucleotídeo e pirofosfato. Essa reação é feita por duas enzimas, a adenina fosforribosiltransferase (APRT, do inglês *adenine phosphoribosyl transferase*) e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferase (HGPRT, do inglês *hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase*). As reações que elas catalisam são similares, diferindo apenas na sua especificidade de substrato (**Figura 5**) [37].

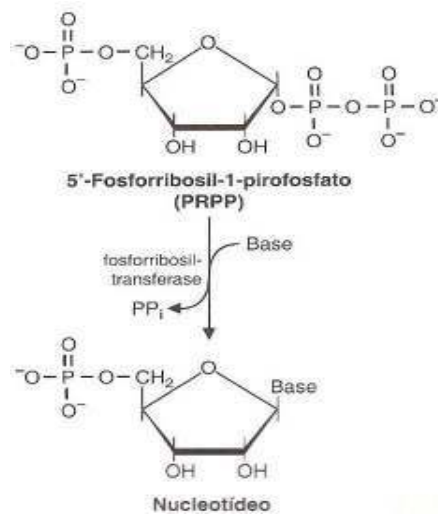


Figura 5. Reação da fosforribosil transferase. A APRT utiliza uma base livre adenina; a HGPRT pode usar hipoxantina ou guanina como substrato [37].

1.7 Guanosina Monofosfato Sintase

Guanosina Monofosfato Sintase (GMPS, do inglês *guanosine monophosphate synthase*) é uma enzima chave na biossíntese de purinas que faz parte da família de amidotransferases do tipo G, catalisando o último passo da síntese *de novo* de nucleotídeos guanina, convertendo xantosina monofosfato (XMP) à GMP [38, 39] (**Figura 6**). A designação “tipo G” é baseada na similaridade da sequência quando comparado ao gene *trpG* que codifica o componente II da enzima antranilato sintase. Como outros membros da família, a GMPS pode utilizar tanto amônia quanto glutamina como fonte de nitrogênio. Durante a catálise, a glutamina é hidrolisada para gerar o grupo amino necessário para a reação de aminação. Na presença do íon Mg^{+2} o ATP dirige a reação. A GMPS é a única enzima da família das amidotransferases do tipo G que hidrolisa ATP para AMP e pirofosfato inorgânico [39]. A GMPS já foi caracterizada em *Homo sapiens* [40], *Escherichia coli* [44] *Pyrococcus horikoshii* OT3 [45], *Plasmodium falciparum* [43], *Francisella tularensis* [41] e *Shigella flexneri* [45, 46], apresentando dois domínios de

ligação que estão associados a diferentes funções: o domínio C-terminal, com atividade ATPase (ATP pirofosfatase), catalisa a condensação de XMP com ATP; e o domínio N-terminal com atividade GATase (glutamina amidotransferase), libera amônia através da hidrólise da glutamina. A enzima GMPS tem sido muito estudada como alvo de drogas antiproliferativas [43], bem como para o desenvolvimento de amostras atenuadas [45, 46].

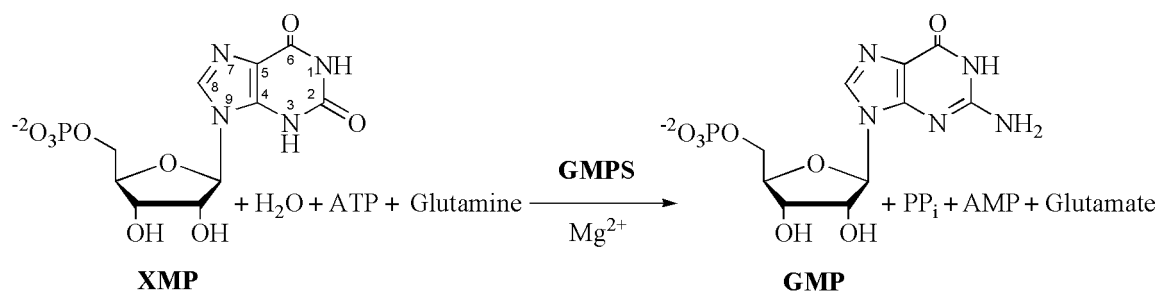


Figura 6. Reação catalisada pela enzima GMPS

A acumulação de nucleotídeos guanina não é somente importante para a síntese de DNA e RNA, mas também fornece GTP, que está envolvido em um número grande de processos celulares importantes para a divisão celular. A hidrólise de GTP é necessária para a montagem dos microtúbulos, glicosilação de proteínas, síntese de nucleotídeos adenina, translação de proteínas, e ativação de proteínas G [40].

A enzima GMPS e IMP desidrogenase (IMPDH, do inglês inosine monophosphate dehydrogenase) são duas enzimas que estão envolvidas no metabolismo celular e que possuem elevados níveis de atividade durante a proliferação das células, como em neoplasias e regeneração de tecidos. Devido aos efeitos antiproliferativos dos inibidores de IMPDH e GMPS, ambas as enzimas possuem um grande potencial como alvos para o desenho de novas drogas

antitumorais, novas quimioterapias imunossupressoras e para o desenvolvimento de novas cepas atenuadas [40, 43].

A GMPS, assim como a IMPDH, é extremamente necessária para síntese de nucleotídeos guanina a partir da via de novo, e a inibição e/ou nocaute desta enzima poderiam resultar na depleção de nucleotídeos guanina [40], que no caso do *M. tuberculosis* são indispensáveis para a viabilidade do bacilo, tendo em vista que seu genoma é composto por aproximadamente 65 a 70% de nucleotídeos guaninas e citosinas [44]. Além disso, já foi descrito que em *S. flexneri* [41] e *F. tularensis* [45, 46], que assim como o *M. tuberculosis* são bactérias intracelulares, a deleção concomitante do gene *guaA* que codifica à enzima GMPS e do gene *guaB* que codifica à enzima IMPDH, geraram amostras atenuadas com efeito imunoprotetor [44]. O gene *guaB2* de *M. tuberculosis*, bem como seu respectivo produto a enzima IMPDH já foi bem caracterizada e demonstrou ser um alvo promissor para o desenvolvimento de novas drogas [47] Tal fato sugere que o estudo do gene *guaA* e de seu respectivo produto em *M. tuberculosis* é extremamente relevante, podendo servir de alvos para o desenvolvimento de um novo fármaco contra a TB, bem como para o desenvolvimento de uma amostra vacinal atenuada.

Capítulo 02

Justificativa

2. Justificativa

Enzimas envolvidas no metabolismo de purinas tornam-se alvos interessantes para o desenvolvimento de novas drogas anti-TB e vacinas protetoras contra a infecção, uma vez que essas proteínas são responsáveis pela biossíntese dos precursores do DNA e RNA e, portanto, importantes para a progressão da doença [40].

A GMPS de *M. tuberculosis* parece ser uma enzima essencial da via de síntese dos nucleotídeos de purinas [40, 45, 46], o que torna o gene que a codifica, um alvo potencial para o desenvolvimento de cepas atenuadas, uma vez que os nucleotídeos guaninas são essenciais para a replicação do bacilo.

A caracterização do produto do gene *guaA* a partir da clonagem, expressão, purificação, bem como a determinação da estrutura e do mecanismo catalítico da GMPS, é de grande relevância, uma vez que permite conhecer suas propriedades enzimáticas e pode auxiliar a desvendar o seu papel no *M. tuberculosis*.

O gene *guaA* (Rv 3396c) que codifica a enzima GMPS, foi identificado por homologia de seqüência, no genoma de *M. tuberculosis*, apresentando 1.578 pares de bases. A análise de sequência de nucleotídeos indica que a provável enzima GMPS de *M. tuberculosis* apresenta 56.02 kDa de massa molecular, e 525 aminoácidos.

Capítulo 03

Objetivos

Objetivos Gerais
Objetivos Específicos

3.Objetivos

3.1 Objetivo geral

Caracterização do produto do gene *guaA* de *M. tuberculosis* H37Rv, buscando identificar se o mesmo codifica para uma enzima GMPS funcional, através da clonagem, expressão, purificação e caracterização bioquímica da enzima (EC 6.3.5.2), para posteriores estudos de nocaute do gene visando-o como um possível alvo para o desenvolvimento de amostras atenuadas.

3.2 Objetivos específicos

- i. Amplificar a região codificante para a GMPS de *M. tuberculosis* através da reação em cadeia da polimerase (PCR);
- ii. Clonar o fragmento amplificado em vetor de expressão procariótico;
- iii. Subclonar em vetor de expressão pET-23a(+);
- iv. Expressar a enzima em diferentes cepas de *E. coli* a fim de obtê-la na fração solúvel;
- v. Purificar a proteína através da técnica de HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*);
- vi. Quantificação da proteína total;
- vii. Análise da identidade da proteína recombinante purificada, por espectrometria de massas
- viii. Realizar ensaios de atividade enzimática;
- ix. Determinar parâmetros cinéticos através de espectrometria.
- x. Determinar mecanismo catalítico através de microcalorimetria.

Capítulo 04

Materiais e Métodos

4. Materiais e Métodos

Este trabalho faz parte de um trabalho maior realizado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose – INCT-TB no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional – CPBMF, localizado no TECNOPUC – PUCRS.

4.1 Amplificação do gene *guaA* de *M. tuberculosis*

Foram desenhados dois oligonucleotídeos iniciadores 5'-TGCATATGGTGCAGCCTGCTGACATCGACG-3' e 5'-GGGGATCCTCACTCCCACTCGATGGTGGC-3') complementares à região codificante amino-terminal e carboxi-terminal do gene *guaA* de *M. tuberculosis*, contendo sítios de restrições *NdeI* e *BamHI* respectivamente (sublinhado). Estes oligonucleotídeos foram utilizados para amplificação por PCR do gene *guaA* (*Rv3396c*) de *M. tuberculosis* H37Rv a partir de DNA genômico total de *M. tuberculosis* [48].

O amplicon (1.578 pares de bases, pb) foi analisado por meio de eletroforese em gel agarose 1% contendo 5 mg/mL de brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o kit Quick Gel Extraction (Invitrogen), conforme instruções do fabricante.

4.2 Clonagem do gene *guaA* de *M. tuberculosis* em vetor pCR®-Blunt

5 Para a reação de PCR foi utilizada a enzima *Pfu* Turbo® DNA polimerase de *Pyrococcus furiosus* (Stratagene), que possui atividade de exonuclease 3'–5', tampão de reação 10x *Pfu* Turbo® DNA Polymerase (Stratagene), dNTPs,

oligonucleotídeos sintéticos contendo os sítios de restrição para clonagem (oligonucleotídeos iniciadores direto e reverso) e DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv. As condições para a obtenção dos produtos de amplificação esperados foram otimizadas segundo protocolos padronizados de biologia molecular, variando fatores como temperatura de anelamento, e presença ou ausência de DMSO (dimetilsulfóxido).

O fragmento purificado foi ligado em vetor de clonagem pCR®-Blunt (Invitrogen), utilizando a enzima T4 DNA ligase e incubação de 16 horas a 16°C. Este Kit tem como objetivo a clonagem de fragmentos de PCR de extremidades cegas, selecionando os plasmídeos recombinantes, pois a ligação do fragmento ao vetor interrompe a expressão de um gene letal para a célula. A reação de ligação contendo o vetor de clonagem e o fragmento amplificado foi inserido em células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B, por eletroporação, (200 Ohms, 25 µF, 2,45 V - Gene Pulser II; Capacitance Extender II; Pulse Controller II, BIO-RAD). Após o choque elétrico, as células foram transferidas para meio de cultura SOC, onde permaneceram durante 1 hora em estufa à 37°C. Para a seleção de células recombinantes, foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura LB (Luria-Bertani) e canamicina (50µg/mL). As células recombinantes selecionadas em colônias isoladas foram inoculadas em meio LB líquido contendo a mesma concentração de canamicina, sob agitação de 180 rotações por minuto (RPM) por 16 horas a 37°C. A extração de DNA plasmidial foi realizada com o Kit QIAprep Spin Miniprep (Quiagen). A confirmação da inserção do fragmento de 1.578 pb no vetor pCR®-Blunt foi realizada pela clivagem do vetor recombinante selecionado com a enzima de restrição *EcoRI* (Biolabs), tendo em vista que o sítio de reconhecimento para esta enzima se encontra nas extremidades do vetor de clonagem. Para a

reação de clivagem foram utilizados 8 unidades de enzima *EcoRI* a 37°C por 4 horas e analisados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta.

4.3 Clonagem do gene *guaA* de *M. tuberculosis* em vetor de expressão pET-23a(+)

Para a transferência do gene de interesse para um plasmídeo de expressão, o vetor pCR®-Blunt contendo o inserto obtido anteriormente foi clivado com enzimas de restrição específicas (*NdeI* e *BamHI*). Os produtos da reação de clivagem do vetor pCR®-Blunt::*guaA*, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para verificação da linearização do vetor e liberação do fragmento de interesse, que foi então purificado do gel com o kit comercial Concert (Gibco). O fragmento purificado (1.578 pb) foi ligado em vetor de expressão pET-23a(+), na presença de 8 unidades de T4 DNA ligase (Invitrogen) em um volume de 10µL, a 16°C durante 16 horas. O vetor de expressão recombinante foi introduzido por eletroporação em células de *E. coli* DH10B, nas mesmas condições utilizadas anteriormente. Estas células foram inoculadas em placas contendo o antibiótico ampicilina (50µg/mL), tendo em vista que o vetor pET-23a(+) (Novagem) confere resistência a este antibiótico. As células recombinantes foram então inoculadas em meio LB líquido contendo a mesma concentração de ampicilina, e mantidas por 16 horas a 37°C sob agitação. O DNA plasmidial foi novamente extraído utilizando o Kit MiniPrep (Quiagen), sendo que o produto obtido nesta etapa é designado como o plasmídeo pET-23a(+>::*guaA*. A confirmação da presença do inserto em vetor de expressão pET-23a(+) foi realizada pela clivagem do plasmídeo recombinante com as enzimas de restrição *NdeI* e

*Bam*HI a 37°C por 16 horas. A reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose e a liberação do inserto foi visualizada sob iluminação UV.

4.4 Sequenciamento dos fragmentos clonados no vetor pET-23a(+)

O DNA plasmidial contendo o inserto (pET-23a(+):*guaA*) foi quantificado mediante o uso do marcador λ HindIII (Invitrogen) e enviado para sequenciamento automático no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CBiot-UFRGS), a fim de confirmar a identidade, integridade e ausência de mutações no gene clonado.

4.5 Expressão da proteína recombinante MtGMPS

Diferentes cepas de *E. coli* (Novagen) foram transformadas por eletroporação (200 Ohms, 25 μ F, 2,45 V - Gene Pulser II; Capacitance Extender II; Pulse Controller II, BIO-RAD), com a construção de interesse. As células eletroporadas foram incubadas em meio SOC, e transferidas para placas de Petri contendo meio LB sólido, os antibióticos adequados a cada cepa e ampicilina (50 μ g/mL), cuja resistência é oferecida pelo plasmídeo pET-23a(+). Após incubação das placas a 37°C por 16 horas, uma colônia isolada foi aleatoriamente selecionada e inoculada em 5 mL de meio LB com os antibióticos apropriados (pré- inoculo). Ao atingir densidade óptica (DO600) igual a 1,0, 1 mL deste pré-inoculo foi transferido para outro Erlenmeyer contendo 50 mL de meio LB líquido, os devidos antibióticos, e incubado a 37°C até atingir densidade óptica (DO600) entre 0,4 a 0,6. A DO foi medida em espectrofotômetro (Ultrospec 3100 Pro Amersham). Estas culturas foram induzidas com isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), na concentração de 1 mM, com exceção dos controles negativos para indução. As culturas foram

incubadas sob agitação em agitador orbital a 180 rpm, a 37°C. Após a indução, foram realizadas coletas de 1 mL em 2, 4, 6, 24 e 48 horas. As amostras coletadas foram centrifugadas por 3 minutos a 13.000 rpm. Os sedimentos foram ressuspensos em 600 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e as células foram rompidas por ultrassom (Vibra cell, SONICS) em ciclos de dois pulsos de 10 segundos, com intervalo de 1 min entre os pulsos, e amplitude de 21%. As amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm, por 30 minutos à 4°C. As frações solúveis (sobrenadante) foram separadas das frações insolúveis (sedimento), sendo que as frações insolúveis foram novamente ressuspensas em 300 µL de tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5. As amostras das coletas, tanto das frações solúveis quanto das insolúveis, foram submetidas à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 12% SDS – PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio). O marcador utilizado para a identificação da proteína expressa foi o Protein Marker (Fermentas).

4.6 Purificação da proteína recombinante MtGMPS em HPLC

Aproximadamente 2 g de células foram resuspensas em 10 mL de tampão três (hidroximetil) aminometano (Tris) 50 mM pH 7,5 (Tampão A) e deixados sob gentil agitação na presença de lisozima (0,2 mg/mL) (Sigma Aldrich) por 30 minutos. As células foram então rompidas por ultrassom -10 pulsos de 10 segundos a uma amplitude de 60%, utilizando um probe de 13 mm- sendo a fração solúvel separada por centrifugação a 18.000 rpm durante 30 minutos. A fração solúvel foi coletada e tratada sob agitação com 1% (massa/volume) (concentração final) de sulfato de estreptomicina, no intuito de precipitar os ácidos nucléicos e proteínas ribonucleares, durante 30 minutos. Após este período a amostra foi centrifugada a

18.000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi dializado contra o Tampão A e aplicado em uma coluna de troca aniônica *Q-Sepharose Fast Flow* (GE Healthcare), previamente equilibrada com o Tampão A, utilizando um gradiente de 0 a 400 mM de NaCl. As frações contendo a proteína de interesse foram reunidas e concentradas utilizando um Amicon com membrana de ultrafiltração (*cutoff* de 10 kDa de peso molecular) até um volume final de 10 mL, e então aplicadas em uma coluna de exclusão por tamanho *HiLoad Superdex 200* (GE Healthcare) previamente equilibrada com o Tampão A, eluída isocraticamente com um fluxo de 0.5 mL/min. As frações contendo a proteína alvo foram tratadas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até uma concentração final de 1M sob gentil agitação durante 30 minutos, e posteriormente centrifugada para a remoção do precipitado a 18.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de interação hidrofóbica *Butyl Sepharose High Performance* (GE Healthcare), previamente equilibrada com o Tampão A contendo 1M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para que houvesse a eluição da proteína, utilizou-se um gradiente linear de 1 a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. As frações contendo a proteína foram coletadas e dializadas contra o Tampão A, para que houvesse a total remoção de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e então estocadas a 80 °C. Todos os passos da purificação foram realizados utilizando o sistema Äkta Purifier (GE Healthcare) a 4°C. As frações e passos da purificação foram analisados através de SDS-PAGE e mensuração da atividade através de espectrometria.

4.7 Quantificação da proteína total

Para determinação da concentração total de proteína utilizou-se o kit Bio-Rad Protein Assay (BIORAD), o qual se baseia na técnica desenvolvida por Bradford [49]. A curva-padrão foi realizada utilizando albumina de soro bovino.

Todos os pontos da curva e quantificação da proteína recombinante foram feitos em triplicata utilizando o espectrofotômetro Ultrospec 3100pro.

4.8 Análise da pureza e identidade da proteína recombinante

A enzima MtGMPS homogênea foi analisada por um espectrômetro de massas (MS, do inglês mass spectrometry) para confirmar sua identidade e massa molecular. A amostra foi incubada com Rapigeste 0,1%, 50 mM de bicarbonato de amônia pH 8,0 por 2 minutos a 100°C, e posteriormente tratada com 5mM de ditioneitol (DTT) por 30 minutos a 60°C, a fim desnaturar a enzima e reduzir as pontes dissulfeto, respectivamente. As pontes sulfidrilas foram alquiladas com iodoacetato (IAA) 15 mM por 30 minutos a temperatura ambiente. Um total de 50 µg de proteína foi digerido com 0,4 µg de tripsina por 1 hora a 37°C. A digestão foi interrompida com a adição de HCl até concentração final de 100 mM e incubada a 37°C por 45 min. O digerido foi separado em uma coluna caseira de fase sólida (Kinetex C18 de partículas de 2,6 µm, 0,15 x 100 mm) usando nanoUPLC (nanoLC Ultra 1D plus, Eksigent, USA) e eluído diretamente utilizando um nanospray de fonte iônica conectado a um espectrômetro de massas (LTQ-XL e LTQ Orbitrap Discovery, Thermo, USA). O fluxo foi ajustado para 1 µL min⁻¹, usando um gradiente de 10-40% de acetonitrila, 0.1% de ácido fórmico por 1 h. O espectro de massas foi criado para fazer um levantamento MS da faixa de 400 a 1800 da relação entre massa e carga (m/z) (resolução 30000) e MS/MS para os cinco espectros de íons mais intensos verificados durante a pesquisa do gradiente.

A janela de massa isolada de 15 ppm foi usada como um precursor na seleção dos íons e a energia de colisão, ajustada para 35%, foi utilizada para a fragmentação. Para adquirir um espectro MS/MS de baixa intensidade de íons,

utilizou-se uma exclusão dinâmica contínua por 30 segundos. Na pesquisa MS, o modo de visualização FTMS (do inglês, Fourier transform mass spectrometry) foi ligado, e somente os íons duplamente ou triplamente carregados foram selecionados para MS/MS. Os dados do LC-MS/MS (do inglês, liquid chromatography) foram processados com o *Proteome Discoverer 1.0* (Thermo, USA), para comparação do espectro MS/MS com o espectro teórico gerado pela digestão triptica *in silico* dos proteomas de *M. tuberculosis* e de *E. coli* BL21 (DE3) (download: <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/>). Os seguintes parâmetros foram analisados: digestão por tripsina, perda de dois subsídios de clivagem, carbamidometilação na cisteína, oxidação variável da metionina, tolerância do precursor de 10 ppm, e tolerância de fragmentação de 0,8 Da. Para excluir falsas identificações foram aceitos somente parâmetros: Xcore > 2.0 para peptídeos duplamente carregados e Xcore > 2.5 para peptídeos triplamente carregados.

Para a determinação da massa molecular, a enzima MtGMPS homogênea foi processada para a remoção do sal utilizando uma coluna caseira (Poros 50 R2 de partículas de 10 µm, 0,15 × 50 mm) em um nanoUPLC, eluída com 80% de acetonitrila contendo de ácido fórmico 0.1%, diretamente para uma fonte iônica de nanospray conectado a um espectrômetro de massas. O espectro médio foi processado com o *software MagTran* [50] para análise do estado de carga.

4.9 Determinação do estado oligomérico da enzima

A massa molecular da enzima MtGMPS nativa em solução foi determinada utilizando uma coluna de exclusão por tamanho *Superdex 200 HR 10/30* (GE Healthcare) previamente equilibrada com Tris 50 mM pH 7,5 contendo NaCl 200 mM a um fluxo de 0.4 mL min⁻¹. Os Kits Gel Filtração de calibração LMW e HMW (GE

Healthcare) foram usados como controle de massa molecular da proteína para a determinação da curva de calibração, medindo o volume de eluição das várias amostras (ferritina, catalase, aldolase, albumina, ovalbumina, quimotripsinogênio A, e Ribonuclease A), calculando os coeficientes de partição correspondentes (K_{av}), e plotando estes valores *versus* o logaritmo de suas massas moleculares. Os valores de K_{av} foram determinados através da equação (Eq.1), onde V_e e V_t são o volume de eluição da amostra e volume total da coluna respectivamente, e V_o , volume percolado da fase móvel da coluna, foi determinado utilizando blue dextran. A eluição da proteína foi monitorada a 215, 254, e 280 nm.

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

4.10 Determinação das constantes aparentes para a enzima MtGMPS

A atividade da enzima MtGMPS foi continuamente monitorada espectrofotometricamente usando um espectrofotômetro UV-2550 (Shimadzu). A reação catalisada pela enzima foi monitorada observando o decréscimo da absorbância a 290 nm pela conversão de XMP ($\epsilon = 3.834 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em GMP ($\epsilon = 2.686 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O valor do $\Delta\epsilon$ de $1.148 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para calcular a quantidade de produto formado. Todos os ensaios de atividade foram realizados utilizando tampão Tris HCl 50 mM pH 7.5 a 40°C, contendo XMP, ATP, glutamina (ou $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), MgCl_2 20 mM, e EDTA (ácido etilenodiaminatetracético) 0,3 mM, em um volume total de 0,5 mL, sendo iniciados pela adição de 16 μg de MtGMPS (quantidade necessária de enzima para obtenção da atividade linear durante um determinado curso de tempo). Todos os experimentos foram realizados em

duplicata e/ou triplicata, e analisados através de regressão linear utilizando o *software SigmaPlot* (Systat Software, Inc.).

Para determinar o pH ótimo da reação catalisada pela enzima, a atividade específica da enzima MtGMPS foi monitorada em diferentes pH (6,0 a 9,5), variando 0,5 unidades de pH. Para provar o efeito da temperatura frente à atividade específica da enzima, a reação catalisada pela enzima MtGMPS foi monitorada a 25, 30, 37, e 40 °C. Tanto os experimentos de pH quanto os experimentos de temperatura foram realizados utilizando todos os substratos em concentrações saturantes (XMP 0,15 mM, ATP 1 mM, e glutamina 5 mM) e iniciados com a adição da enzima na reação.

As constantes cinéticas aparentes para XMP, ATP, e glutamina ((NH₄)₂SO₄ como NH₄⁺) foram determinadas pela variação da concentração de um substrato enquanto fixando os outros dois na concentração saturante. Os dados foram fitados pela equação de Michaelis-Menten (Eq.2) para curvas de saturação hiperbólicas, equação de Hill (Eq.3) para curvas de saturação sigmoidais, ou equação de inibição pelo substrato (Eq.4) [51, 52] sempre que observado este perfil. Para estas equações, v é a velocidade da reação medida, V é a velocidade máxima, S é a concentração de substrato, K_M é a constante de Michaelis -Menten, K_i é a constante de inibição, n é o coeficiente de Hill, o qual indica o índice de cooperatividade, e $K_{0,5}$ é a concentração de substrato onde $v = 0,5V$.

$$v = \frac{V[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Eq.2}$$

$$v = \frac{V[S]^n}{K_{0,5}^n + [S]^n} \quad \text{Eq.3}$$

$$v = \frac{VS}{K_M + S \left(1 + \frac{S}{K_1} \right)} \quad \text{Eq.4}$$

4.11 Influência do Mg²⁺ sobre a atividade da enzima MtGMPS

Para investigar a influência do íon Mg²⁺ na atividade específica da enzima MtGMPS, a reação catalisada foi monitorada variando as concentrações de MgCl₂, fixando todos os outros substratos da reação em concentrações saturantes. As constantes cinéticas aparentes foram obtidas através da equação de Hill (Eq.3).

4.12 Atividade ATPase

A atividade do domínio ATPase foi avaliada utilizando o *EnzCheck Pyrophosphate Assay Kit* (Invitrogen), que inclui a enzima pirofosfatase inorgânica, responsável pela conversão de pirofosfato (PP_i) em dois equivalentes de fosfato inorgânico (P_i). O P_i formado é consumido pela enzima purina nucleosídeo fosforilase (PNP- do inglês purine nucleoside phosphorilase), o qual pode ser monitorado pelo aumento da absorbância a 360 nm [53,54]. A reação foi previamente incubada por 10 min para excluir qualquer possível contaminação com P_i, e continha Tris 50 mM pH 7.5, XMP 0,15 mM, ATP, MgCl₂ 20 mM, EDTA 0,3 mM, e os tampões e enzimas (PNP e pirofosfatase inorgânica) do kit nas concentrações recomendadas pelo fabricante. Todas as reações foram iniciadas com a adição de 16 µg da enzima MtGMPS, e as concentrações de ATP foram variadas na mistura pré- incubada até atingir a saturação. Os dados foram fitados na equação de inibição pelo substrato (Eq. 4).

4.13 Atividade Glutaminase

A entalpia calorimétrica (ΔH^{cal}) e as constantes cinéticas para a reação catalisada pelo domínio GATase da enzima GMPS de *M. tuberculosis* na ausência dos substratos XMP e ATP foram determinadas através de um termograma (fluxo de calor em função do tempo) utilizando o microcalorímetro *iTC200 Microcalorimeter* (Microcal Inc., Northampton, MA) a 40°C. Os princípios da utilização da calorimetria de titulação isotérmica (ITC, do inglês, isothermal titration calorimetry) já foram previamente descritos [55]. A reação foi iniciada com a injeção de 2 μ L da enzima MtGMPS (80 μ M) na célula de amostra depois de 60 segundos de adiamento (delay) e 900 segundos de espessamento entre a primeira e a segunda injeção, em uma concentração final de 1,6 μ M. A reação continha HEPES 50 mM pH 7,5, MgCl₂ 20 mM, glutamina 5 mM, e enzima na concentração previamente mencionada.

4.14 Calorimetria de titulação isotérmica

A calorimetria de titulação isotérmica foi realizada utilizando o microcalorímetro *iTC200*, onde a célula de referência e a célula da amostra (200 μ L) foram carregadas com água Milli Q e com a enzima GMPS de *M. tuberculosis* (80 μ M), respectivamente durante todos os experimentos. A cada ensaio a seringa de injeção (39,7 μ L) continha um dos substratos ou produtos nas seguintes concentrações: 1,5 mM (XMP, ATP, GMP, AMP, glutamato e PP_i) ou 3,5 mM (glutamina). Os experimentos foram realizados por titulação direta (ligante/macromolécula) e os dados obtidos a cada ensaio de ligação foram analisados individualmente para a determinação dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na formação do complexo, bem como para a determinação das constantes de dissociação (K_d) e estequiometria de ligação. A enzima foi dialisada contra ácido N-2-Hidroxi-etilpiperazina-N'-2-etanosulfônico (HEPES) 50 mM pH 7,5,

contendo 20 mM de $MgCl_2$ e o mesmo tampão foi utilizado para preparar todas as soluções dos possíveis ligantes, substituindo o Tris, utilizado nos ensaios cinéticos, por possuir uma adequada entalpia de ionização [56]. Todos os ensaios foram realizados a 40°C e 500 rpm. A primeira injeção (0,5 μ L) foi descartada na análise de dados a fim de subtrair os calores de diluição e de rotação do aparelho em cada experimento, seguidas por 11 injeções de 3,9 μ L em intervalos de 180 segundos. Titulações controle foram realizadas a fim de subtrair o calor de diluição e de mistura em cada experimento. Os dados resultantes das isotermas geradas pelo ITC depois da integração dos picos foram subtraídos dos dados gerados nas titulações controle e o *software Origin 7 SR4* (Micorcal, Inc.) foi utilizado para a análise dos dados.

A energia livre de Gibbs (ΔG) da ligação foi calculada usando a relação descrita na equação 5 (Eq.5), onde R é a constante dos gases (8.314 J K⁻¹ mol⁻¹), T é a temperatura em Kelvin ($T = ^\circ C + 273.15$), e K_a é a constante de associação no equilíbrio. A entropia da ligação (ΔS) também pode ser calculada por esta fórmula matemática. As estimativas iniciais para n, K_a , e ΔH foram refinadas por regressão não linear Marquardt através do software Origin 7 SR4.

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \text{Eq.5}$$

4.15 Alinhamento de múltiplas sequências de GMPSs

A fim de comparar os resíduos de aminoácido conservados e a similaridade existente entre as enzimas GMPSs de diferentes organismos e o *M. tuberculosis*, foi realizado um alinhamento de múltiplas sequências de aminoácido utilizando as sequências de microorganismos cujas estruturas tridimensionais já foram resolvidas, tais como, *E. coli* (YP_001731437.1) e *P. horikoshii* (2DPL_B). A sequência da proteína humana (NP_003866.1) também foi incluída no alinhamento e comparada à

sequência de *M. tuberculosis* (CAB01027.1). O alinhamento foi realizado através do ClustalW [57], utilizando a matriz Gonnet para identificar as substituições de aminoácidos e considerar as lacunas das sequência, identificar os resíduos essenciais de ligação dos substratos, bem como para inferir possíveis similaridades no mecanismo catalítico. Para um melhor entendimento sobre a sequência de aminoácidos do domínio ATPase da enzima GMPS, foi utilizada a sequência de *P. horikoshii*, codificada pelo gene *ph1347*, cuja a estrutura foi previamente elucidada.

Capítulo 05

Resultados e Discussão

5. Resultados e Discussão

5.1 Amplificação e clonagem do gene *guaA* de *M. tuberculosis*

O gene *guaA* (Rv 3396c) de *M. tuberculosis* foi amplificado através de PCR na presença de 5% de DMSO na mistura da reação (**Figura 7**). O DMSO é um co-solvente que ajuda a desnaturar as fitas de DNA, sobretudo das estruturas secundárias ricas em G e C facilitando o trabalho da DNA polimerase. O que é muito condizente, principalmente em se tratando de DNA de *M. tuberculosis* que possui 65.6% de G+C em seu genoma [48]. O produto do PCR apresentando 1.578 pb, foi purificado do gel de agarose e inserido no vetor de clonagem pCR®-Blunt para propagação do inserto. A confirmação da clonagem se deu a partir da clivagem dos clones com a enzima *EcoRI*, onde foi possível observar a liberação do inserto através de eletroforese em gel de agarose e visualizada em luz Ultra Violeta. O clone número 3 foi escolhido para dar seguimento ao trabalho (**Figura 8**).

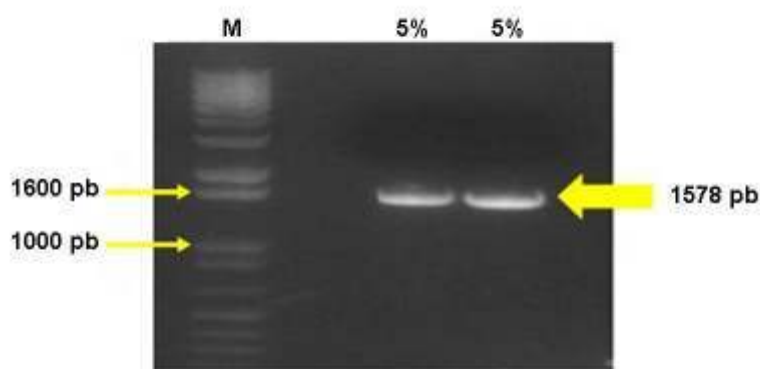


Figura 7. Análise da amplificação do gene *guaA* de *M. tuberculosis* por PCR através de eletroforese em gel de agarose utilizando 5% de DMSO.

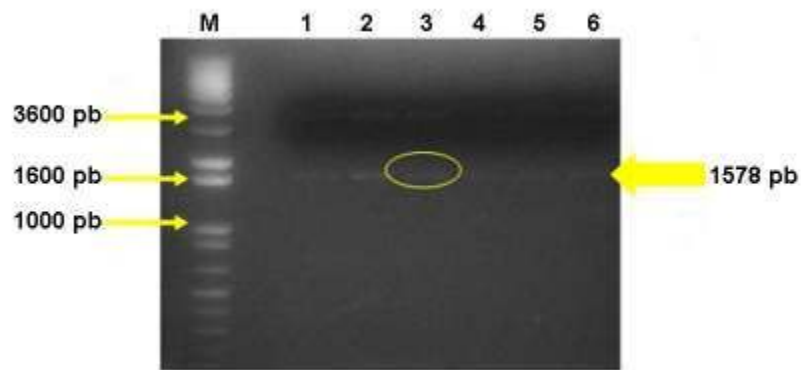


Figura 8. Análise da clivagem dos clones pCR@-Blunt:*guaA* com a enzima *EcoRI* através de eletroforese em gel de agarose.

5.2 Subclonagem e expressão do produto do gene *guaA* de *M. tuberculosis*

O clone recombinante número 3 - pCR@-Blunt::*guaA* - foi escolhido para os próximos experimentos e digerido com as enzimas *NdeI* e *BamHI*, cujos sítios de reconhecimento encontram-se nos oligonucleotídeos iniciadores. O fragmento *guaA* foi clonado com êxito em vetor de expressão pET-23a(+), pela realização da reação de ligação entre o vetor pET-23a(+) e o fragmento liberado do vetor pCR@-Blunt, também utilizando a enzima T4 DNA ligase. A triagem dos clones foi realizada por meio de clivagem com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*. Somente dois dos clones recombinantes liberaram o fragmento de 1.578 pb (**Figura 9**) e o clone nº 4 foi escolhido para dar prosseguimento aos testes.

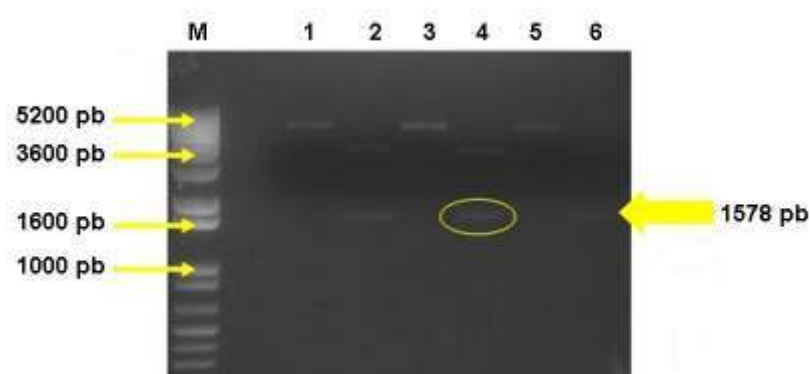


Figura 9. Análise da liberação do fragmento do gene *guaA* do vetor pET-23a(+) após clivagem com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*.

5.3 Sequenciamento dos fragmentos clonados no vetor pET-23a(+)

A análise do seqüenciamento automático do clone nº 4 confirmou a identidade, integridade e a ausência de mutações do gene clonado.

5.4 Super expressão e purificação da proteína recombinante MtGMPS

A proteína MtGMPS foi super expressa em células eletrocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo recombinante pET23a(+)::*guaA*. A análise em gel de acrilamida confirmou a expressão da mesma na fração solúvel, apresentando o peso molecular esperado para a MtGMPS de aproximadamente 56kDa (**Figura10**). Os dados provenientes da análise SDS-PAGE mostraram também que a melhor expressão da proteína se deu às 6 horas de crescimento, após atingir $DO_{600nm} = 0.4-06$ a 37°C em meio LB (**Figura 10**), sem a adição de IPTG. No sistema pET, o gene de interesse é posicionado em uma região abaixo do promotor T7. De acordo com nossos resultados, altos níveis de expressão de proteína na ausência de indutor já foram apresentados utilizando o sistema pET [58, 59, 60]. Já foi proposto que a expressão da proteína é um vazamento controlados pelo sistema lac, que ocorre principalmente na fase estacionária, quando em meio complexo em que AMP cíclico, acetato e baixo pH são necessários para alcançar altos níveis de expressão na falta do IPTG. Isto pode ser parte da resposta celular à limitação geral de nutrição [61]. No entanto, foi demonstrado mais recentemente a indução não intencional do sistema pET devido a presença de 0,0001% de lactose no meio [62].

A superexpressão da proteína recombinante MtGMPS foi purificada utilizando três passos cromatográficos que consistem, em uma coluna de troca aniônica (Q-

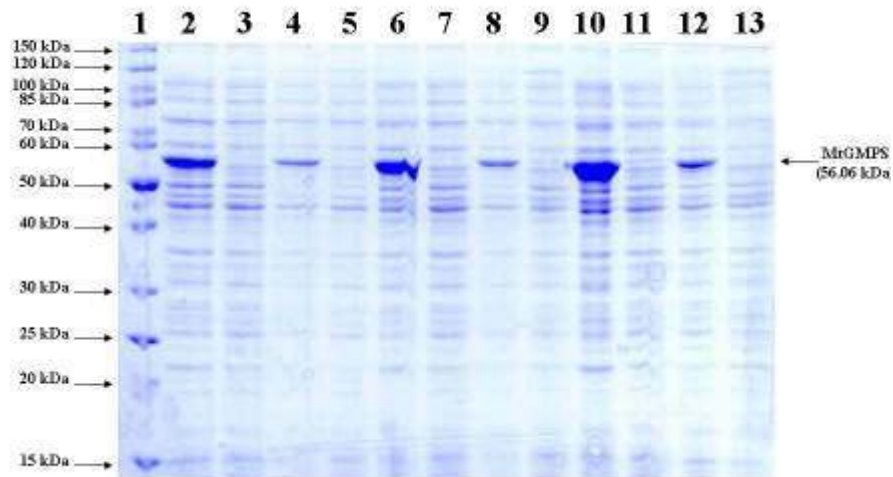


Figura 10. Análise da expressão da proteína por eletroforese em gel de acrilamida. Canaleta 1, Marcador de peso molecular (Fermentas); canaletas 2, 6 e 10, amostras sem indução de IPTG das coletas de 2, 4 e 6 horas após DO_{600nm} 0,4-0,6, respectivamente; canaletas 4, 8 e 12, amostras com indução de IPTG das coletas de 2, 4 e 6 horas após DO_{600nm} 0,4-0,6, respectivamente; canaletas 3, 7 e 11, controle de amostra sem indução de IPTG das coletas de 2, 4 e 6 horas após DO_{600nm} 0,4-0,6, respectivamente; canaletas 5, 9 e 13, controles de amostra com indução de IPTG de 2, 4 e 6 horas após DO_{600nm} 0,4-0,6, respectivamente.

Sephaorse Fast Flow), uma coluna de exclusão por tamanho (Hiloal Superdex 200), seguidas por uma coluna de interação hidrofóbica (Butyl Sepharose High Performance). A análise em gel de acrilamida demonstrou que a proteína MtGMPS aparentemente homogênea (**Figura 11**). Este protocolo de purificação rendeu aproximadamente 10 mg de proteína homogênea a partir de 2 g de célula, rendendo um total de 32% (**Tabela 2**). Interessantemente a atividade específica da enzima MtGMPS diminuiu após a eluição da coluna de interação aniônica (**Tabela 2**). Isto pode ser atribuído a mudanças causadas pelas forças iônicas bem como variações de pH, que afetam a conformação, estabilidade e atividade da enzima [38 Basso]. A proteína recombinante MtGMPS foi estocada a $-80^{\circ}C$ em Tris HCl 50 mM pH 7.5 (este tampão foi escolhido por não comprometer a atividade da enzima). Nenhuma perda de atividade pode ser observada depois de três meses de estocagem da enzima a temperatura supracitada (dados não apresentados).

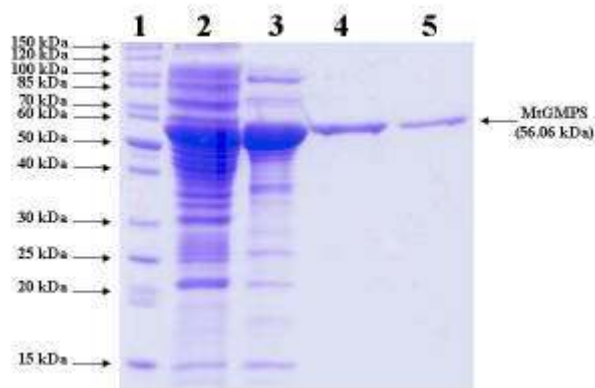


Figura 11. Análise por SDS-PAGE 12% dos passos da purificação da enzima MtGMPS. Canaleta 1, marcador de peso molecular (Fermentas); canaleta 2, extrato bruto de proteínas da fração solúvel; canaleta 3, fração eluída da primeira coluna cromatográfica; canaleta 4, fração eluída da segunda coluna cromatográfica; canaleta 5, fração eluída da terceira coluna cromatográfica.

Passos da Purificação	Proteína total (mg)	Atividade total da enzima (U)	Atividade específica (U mg ⁻¹)	<i>Fold</i>	Rendimento (%)
Crude extract	103	66.95	0.65	1	100
Q Sepharose Fast Flow	60	27	0.45	0.7	40
Hiload Superdex 200	28	26.32	0.94	1.4	39
Butyl Sepharose HP	10	21.65	2.16	3.3	32

Tabela 2. Protocolo de purificação da enzima MtGMPS a partir de 2 g de células de *E. coli* BL21 DE(3).

5.5 Espectrometria de massas

Para confirmar a identidade da proteína homogênea obtida através do protocolo de purificação previamente mencionado, a proteína MtGMPS passou por um processo de digestão por tripsina e posteriormente analisada em espectrometro de massas. Os resultados mostram 422 espectros identificados em 39 peptídeos (**Tabela 3**), correspondendo a 82% da seqüência primária da MtGMPS. A análise do proteoma de *E.coli* BL21(DE3) mostrou que a proteína em análise realmente era a MtGMPS homogênea, pois nenhum contaminante, ou seja, nenhuma proteína de *E.*

coli da pode cepa heteróloga pode ser detectada. Para a determinação da massa molecular, a proteína intacta MtGMPS foi analisada e o espectro de anotação apresentou picos correspondentes às cargas desta proteína (de 28+ a 73+). O espectro deconvoluto apresentou um único pico, correspondente a massa molecular da subunidade da MtGMPS (55.928,64 Da), sugerindo que houve a remoção do resíduo de metionina N-terminal (massa teórica=56.027,6 Da) (**Figura 12**). O espectrometro de massas não revelou o pico esperado para a GMPS de *E. coli* (58.679,6), o que confirma a identidade da proteína MtGMPS e sua homogeneidade.

Peptide	Position	XCorr
AFEGAVRDVLDGK	316-328	2.75
AIGDRLT CVFVDHGLLR	248-264	4.53
ARQPVALVLSGGPASVYADGAPK	55-77	6.02
AVGRELGLPEEIVAR	385-399	4.26
AVGRELGLPEEIVARQPFPGPGLGIR	385-410	3.77
DFVAATGANLVTVDAAETFLEALSGVSAPEGKR	274-306	4.16
DFVAATGANLVTVDAAETFLEALSGVSAPEGKRK	274-307	3.58
DVLDGKTAEFLVQGTLYPDVVESGGSGGTANIK	323-355	6.17
EARVFSEVIPHTASIEEIR	36-54	3.36
EELTAAGLDNQIWQCPVLLADVR	432-455	7.51
ELGLPEEIVAR	389-399	3.11
ELGLPEEIVARQPFPGPGLGIR	389-410	3.68
EYGRTELK	114-121	2.24
FLHDFAGLGAQWTPANIANALIEQVR	195-220	6.79
FTLVEPLR	369-376	2.93
HADSIVREELTAAGLDNQIWQCPVLLADVR	425-455	5.33
ITNEVAEVNR	500-509	4.14
ITNEVAEVNRVVLDTISKPPATIEWE	500-525	4.55
IVGEVTAKE	411-418	2.04
IVGEVTAKE	411-419	2.36
LAGVQYHPEVMHTPHGQQVLSR	173-194	5.35
LHSDLPEVQPVWMSHGDAVTAAPDGFDDVVASSAGAP VAAFEAFDR	127-171	4.33
LHSDLPEVQPVWMSHGDAVTAAPDGFDDVVASSAGAP VAAFEAFDRR	127-172	4.36
LLFKDEV	377-384	3.30
LTCVFDHGLLR	253-264	3.68
QPVALVLSGGPASVYADGAPK	57-77	5.37
RLAGVQYHPEVMHTPHGQQVLSR	172-194	5.86
SHHNVGGLPDDLK	356-368	3.88
SHHNVGGLPDDLKFTLVEPLR	356-376	5.14
SVGVQGDGR	456-464	3.00
TAEFLVQGTLYPDVVESGGSGGTANIK	329-355	6.41
TELKVLGGK	118-126	2.15
TQIGDGHAIICGLSGGVDSAVAAALVQR	221-247	5.74
TYGHPIVLRPVSSDAMTADWTR	465-487	3.91
TYGHPIVLRPVSSDAMTADWTRVPYEVLER	465-495	3.24
VFSEVIPHTASIEEIR	39-54	4.09
VFSEVIPHTASIEEIRAR	39-56	2.91
VPYEVLER	488-495	2.89
VVLDTISKPPATIEWE	510-525	4.50

Tabela 3. Sequência de peptídeos identificados na enzima MtGMPS a partir da digestão por tripsina, por espectro MS/MS em comparação com o espectro teórico gerado *in silico* a partir do proteoma de *M. tuberculosis* H37Rv.

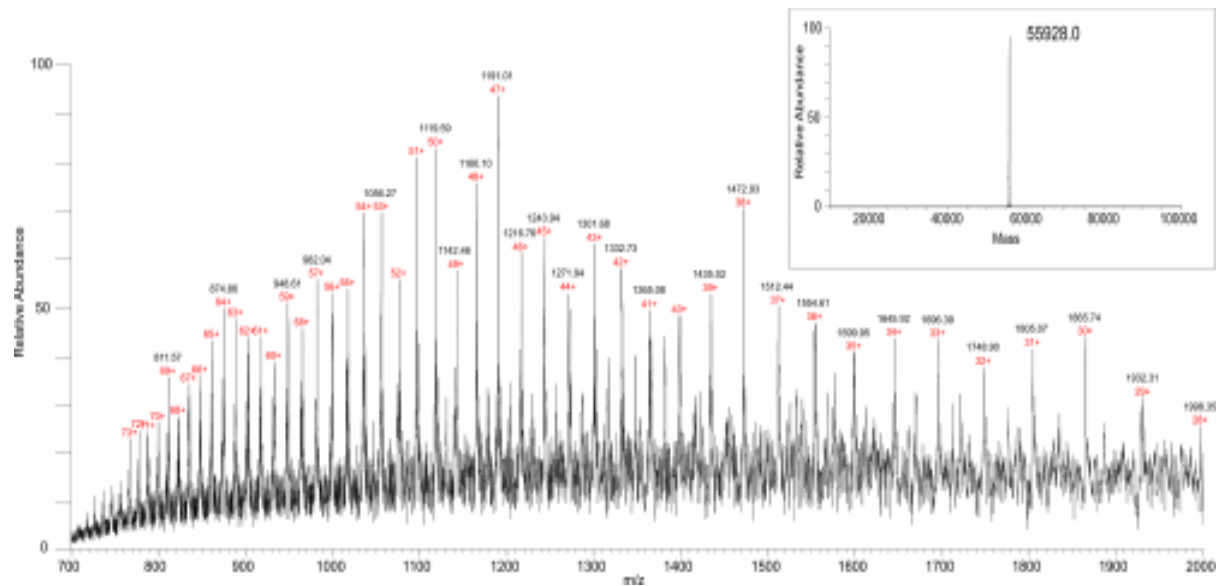


Figura 12. Espectros coletados na MtGMPS não digerida. O espectro deconvolvido (imagem menor inserida) apresenta um pico único correspondente ao peso molecular da enzima MtGMPS sem a metionina inicial (55.928,60 Da).

5.6 Determinação do estado oligomérico da enzima MtGMPS

A análise das subunidades da enzima MtGMPS foi realizada afim de estabelecer seu estado oligomérico em solução, através de cromatografia, utilizando uma coluna de exclusão por tamanho, onde obtivemos a eluição em um único pico de 12,35 mL, correspondendo a uma massa molecular de aproximadamente 136.96 kDa, a qual sugere que a proteína GMPS em questão é um dímero em solução (136,96kDa/56,06 kDa \approx 2,4). Este resultado corrobora com os resultados encontrados para *E. coli* [41], *P. falciparum* [43] e *P. horikoshii* [42], mas não corresponde aos encontrados para humanos, onde a proteína se apresenta como um monômero em solução [39]. A presença de uma grande inserção perto do domínio de dimerização parece não permitir a formação de um dímero para enzima eucariótica [62]. Isto reflete na diversidade de estados oligoméricos para esta classe de enzimas e por isso, estas podem exibir diferentes modos de regulação e função.

5.7 Constantes aparentes e parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos aparentes para a enzima MtGMPS homogênea foram determinados a valores de pH e temperatura ótimos (7,5 e 40°C, respectivamente **Figura 13**).

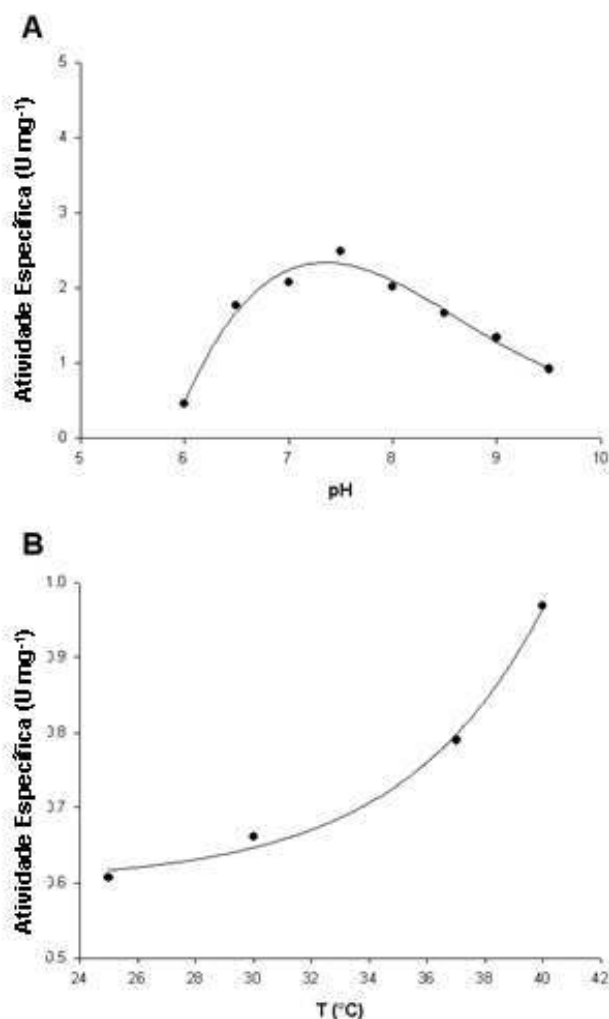


Figura 13. Triagem da atividade específica da MtGMPS em função do pH (A) e temperatura (B).

Gráficos de atividade específica versus concentrações de XMP, ATP e glutamina (e NH_4^+), mostraram distintas magnitudes para os parâmetros cinéticos aparentes (**Figura 14**) (**Tabela 4**). Os valores encontrados na determinação das constantes aparentes para o substrato XMP, utilizando a equação de Hill, foram $45,1 \pm 1,3 \mu\text{M}$ e $0,230 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$ ($K_{0,5}$ e k_{cat} , respectivamente), sugerindo uma cinética cooperativa.

Os valores de $K_{0.5}$ encontrados para XMP foram muito similares aos encontrados para a enzima GMPS humana ($45,4 \pm 5,3 \mu\text{M}$) [39], e o perfil da curva de saturação encontrado foi diferente do já proposto para outros procariotos. Além do mais, também foi observado que o aumento das concentrações de XMP causa a inibição da atividade da enzima pelo respectivo substrato (dados não apresentados). O valor limítrofe para o coeficiente de Hill (n) é 2, uma vez que a enzima MtGMPS apresenta-se como um dímero em solução. Nossos resultados encontraram um n igual a 2,4, indicando que a enzima possui cooperatividade positiva para o XMP. Os valores de $K_{0.5}$ e k_{cat} obtidos para NH_4^+ foram diferentes dos reportados para as enzimas de *E. coli* e *P. falciparum* ($6 \pm 1.0 \text{ mM}$ e $0,101 \pm 0,04 \text{ s}^{-1}$, respectivamente). Além disso, foi possível observar que a MtGMPS pode utilizar amônia diretamente para a aaminação do XMP, porém a reação é inviável a altas concentrações de amônia, o que indica a preferência fisiológica da enzima pela glutamina. Isto é melhor compreendido ao observarmos o gráfico da atividade da MtGMPS pela variação da concentração de glutamina, o qual demonstrou um perfil Michelis-Menten ($K_M = 1235 \pm 62 \mu\text{M}$ e $k_{\text{cat}} 3.05 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$), muito similar ao à cinética encontrada na GMPS de *E. coli*, e com um K_M 2,6 vezes maior do que a enzima humana ($K_M = 472 \mu\text{M}$). Em contraste, o perfil observado para a curva de saturação do ATP, foi diferente de todos os resultados já propostos para esta enzima, tanto em eucariotos quanto procariotos. Em detrimento a diminuição da atividade quando em altas concentrações de ATP, foi utilizada a equação de inibição pelo substrato, onde os valores de K_M e k_{cat} para o ATP foram de $26,93 \pm 1,88 \mu\text{M}$ e $k_{\text{cat}} 2,39 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$ respectivamente, enquanto os outros substrato XMP e glutamina estavam fixados a concentrações saturantes. A constante de inibição pelo substrato (ATP), K_i , foi $21 \pm 3 \text{ mM}$, o qual é 807 vezes maior do que o respectivo valor de K_M encontrado,

apresentando aproximadamente 14% de inibição. Um perfil similar de inibição pelo substrato foi observado em uma enzima micobacteriana que catalisa a reação anterior à catalisada pela enzima GMPS na via de novo de purinas, Inosina Monofosfato Desidrogenase (IMPDH, do inglês Inosine Monophosphate Dehydrogenase) [47]. A inibição pelo substrato observada na MtIMPDH é atribuída à formação de um complexo IMPDH-XMP*NAD, o qual é um intermediário de reação [63, 64]. Estudos cinéticos em *E. coli* e *P. falciparum* demonstraram que o domínio responsável pela catálise e formação do intermediário adenil-XMP pela enzima GMPS, é o domínio ATPase [41, 43]. A enzima GMPS de *M. tuberculosis* codificada pelo gene *guaA*, demonstra possuir propriedades cinéticas atípicas. Esta observação demonstra que os subdomínios presentes na enzima são necessários para a completa atividade da mesma.

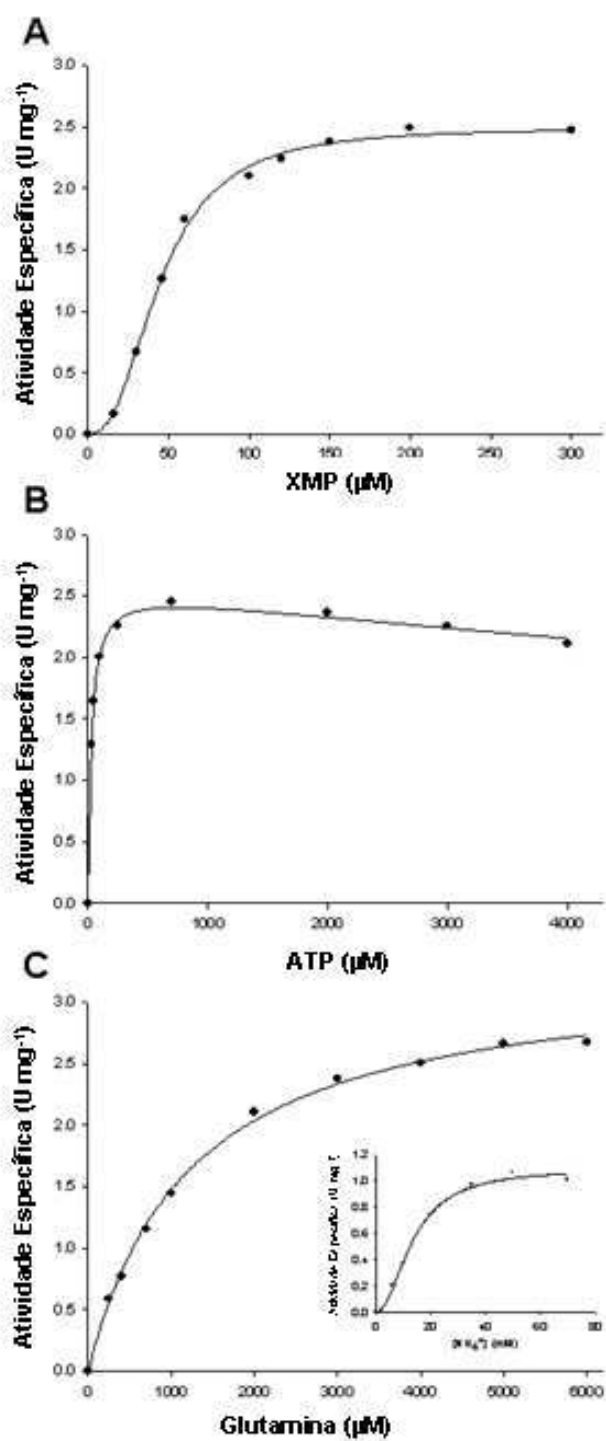


Figura 14. Parâmetros cinéticos aparentes para MtGMPS. Atividade Específica em função da concentração de (A) XMP, (B) ATP e (C) Glutamina. A figura menor representa a atividade da MtGMPS em função da concentração de amônia.

	K_{05} (μM)	K_M (μM)	V_{max} (U mg^{-1})	k_{cat} (s^{-1})
XMP	45 ± 1	-	2.49 ± 0.04	0.23 ± 0.04
ATP	-	27 ± 2	2.58 ± 0.04	2.39 ± 0.04
glutamina	-	$1.24 (\pm 0.06) \times 10^3$	3.30 ± 0.05	3.05 ± 0.05
NH_4^+	$13 \pm 1^*$	-	1.10 ± 0.04	0.10 ± 0.04

Tabela 4. Constantes cinéticas aparentes da variação de XMP, ATP, glutamina e amônia.

5.8 Atividade dependente de Mg^{2+}

Para avaliar a atividade da enzima MtGMPS na presença do íon metálico Mg^{2+} , foram realizados ensaios cinéticos, variando as concentrações do mesmo. Nossos resultados mostram que a atividade da enzima MtGMPS é dependente de Mg^{2+} . (**Figura 15**). Os dados foram obtidos através da equação de Hill (Eq.3), levando à construção de um gráfico de curva de saturação sigmóide, com cooperatividade positiva ($n=2,67$), $K_{0.5}$ de $1,18 \pm 0,03$ mM para Mg^{2+} , e o k_{cat} de $1,96 \pm 0,02$ s^{-1} . Estes, sugerem a presença de múltiplos sítios de ligação para Mg^{2+} na enzima MtGMPS. A enzima demonstrou ter sua completa atividade quando com 5 mM de Mg^{2+} , o que é 5 vezes maior do que a concentração de ATP (1 mM) na mistura da reação, sugerindo que existem sítios de ligação adicionais na enzima para o metal. A dependência sigmóide da atividade da enzima no aumento da concentração de Mg^{2+} , também foi observada nas enzimas de humanos [39] e *E. coli* [65]. A existência ou não de sítios adicionais de ligação para Mg^{2+} livre serão futuramente evidenciados com a elucidação da estrutura tridimensional da enzima MtGMPS. De qualquer forma, os parâmetros cinéticos e outros experimentos foram realizados fixando o Mg^{2+} em uma concentração saturante de 20 mM.

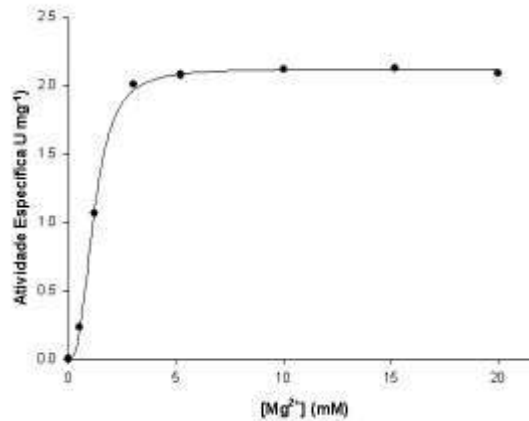


Figura 15. Dependência de Mg^{2+} da enzima MtGMPS.

5.9 Atividade ATPase

Proteínas GMPS consistem de duas unidades catalíticas, uma domínio GATase e outra domínio ATPase. O domínio ATPase liga ATP e XMP na presença de Mg^{2+} para formar um intermediário ativado adenil-XMP com a concomitante formação de PP_i [43,62,65]. Na tentativa de determinar se a atividade ATPase é independente ou não da existência da atividade glutaminase, foram realizados ensaios onde a formação do PP_i foi mensurada em um ensaio acoplado com as enzimas PNP e pirofosfatase na ausência de glutamina, enquanto o XMP foi fixado à concentração saturante (0,15 mM). Os dados (**Figura 16**) foram obtidos através da equação (Eq.5) de inibição pelo substrato, onde: K_M 56 ± 6 , k_{cat} $0,71 \pm 0,02$ s^{-1} e K_i 9 ± 6 . Estes resultados sugerem a formação do complexo intermediário adenil-XMP, com concomitante liberação de PP_i na ausência de glutamina. Os valores de K_M na ausência (56 μM) ou presença (27 μM) de glutamina são semelhantes, enquanto o valor de k_{cat} na presença de glutamina ($2,39$ s^{-1}) é maior do que na ausência do substrato ($0,71$ s^{-1}). Os dados sugerem que a glutamina não exerce efeito na constante de dissociação do ATP, embora pareça aumentar a velocidade catalítica do domínio ATPase da enzima.

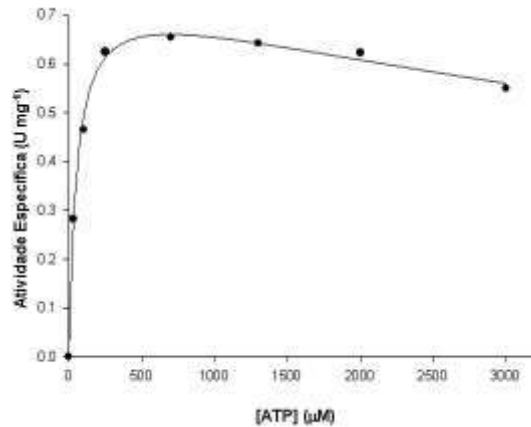


Figura 16. Atividade específica da enzima MtGMPS em função da concentração de ATP sem a adição de glutamina na mistura da reação, revela a liberação de PP_i e formação de Adenil-XMP.

5.10 ITC: ligação dos substratos e atividade glutaminase

Para determinar os parâmetros cinéticos verdadeiros e a velocidade inicial através dos gráficos de duplo recíproco, a mensuração da atividade da enzima MtGMPS foi realizada na presença de concentrações variantes de glutamina (100-5055 μM) contra diferentes concentrações fixas de ATP (100-2000 μM), enquanto o substrato XMP fora mantido a concentrações fixas de 0,15 mM. Contudo, como os gráficos de duplo recíproco obtidos apresentaram-se curvados para cima para o ATP, mostrando uma dependência inconsistente do aumento das concentrações de glutamina (dados não apresentados), somado ao fato de o gráfico de dependência do aumento das concentrações de XMP ter apresentado um perfil sigmoidal, impossibilitou a proposta de um mecanismo enzimático baseado na determinação dos parâmetros cinéticos de dependência do aumento das concentrações de glutamina e ATP.

Para tentar propor a ordem de adição dos substratos e/ou liberação dos produtos, a formação do complexo binário foi acessada através de ITC, determinando o calor gerado ou consumido sobre a ligação ligante-macromolécula na formação do complexo binário a valores constantes de temperatura e pressão.

Os dados obtidos no ITC também forneceram a termodinâmica das interações não covalentes entre substratos e/ou produtos na ligação da proteína MtGMPS. A mensuração do calor liberado sobre a ligação dos substratos, permitiram a determinação da entalpia (ΔH) do processo, estequiometria da interação e constante de associação no equilíbrio (K_a). A constante de dissociação (K_d) pode ser calculada como o inverso de K_a ($K_d=1/ K_a$). Além disso, A energia livre de Gibbs (ΔG) e entropia (ΔS) da ligação foram determinadas através dos valores da constante de associação no equilíbrio como descrito na equação 5. As isotermas de ligação para XMP, ATP, e glutamina foram melhor adequadas ao modelo de ligação de um único conjunto de sítios (*one set of sites*) assumindo que o substrato liga no monômero com a mesma afinidade em todos os sítios ativos (**Figura 17 A, B e C**) (**Tabela 5**). A isoterma de ligação do PP_i (**Figura 17 D**) não foi suficientemente definida para gerar dados e gráfico adequados para nenhum modelo, provavelmente por que este substrato pode exercer efeitos diferentes e simultâneos sobre a enzima MtGMPS. Além do mais, a alta temperatura dos ensaios (40°C) gerou um elevado calor de diluição, afetando a leitura e coleta de dados. De qualquer forma, a ligação entre o produto PP_i e a enzima MtGMPS livre, pode ser detectada pelo ITC (**Figura 17 D**). Os resultados obtidos no ITC mostraram que o XMP (**Figura 17 A**) e o ATP (**Figura 17 B**) ligam na enzima livre na presença de Mg^{2+} , o que sugere que o mecanismo de ligação de ambos os substratos no domínio ATPase da enzima MtGMPS é aleatório. A glutamina, substrato hidrolisado pelo domínio GATase da MtGMPS, também é capaz de ligar na enzima livre (**Figura 17 C**). Nenhuma ligação à enzima livre pode ser observada nos experimentos de ITC para os produtos GMP, AMP ou glutamato (**Figura 17 A, B, C e D**, respectivamente).

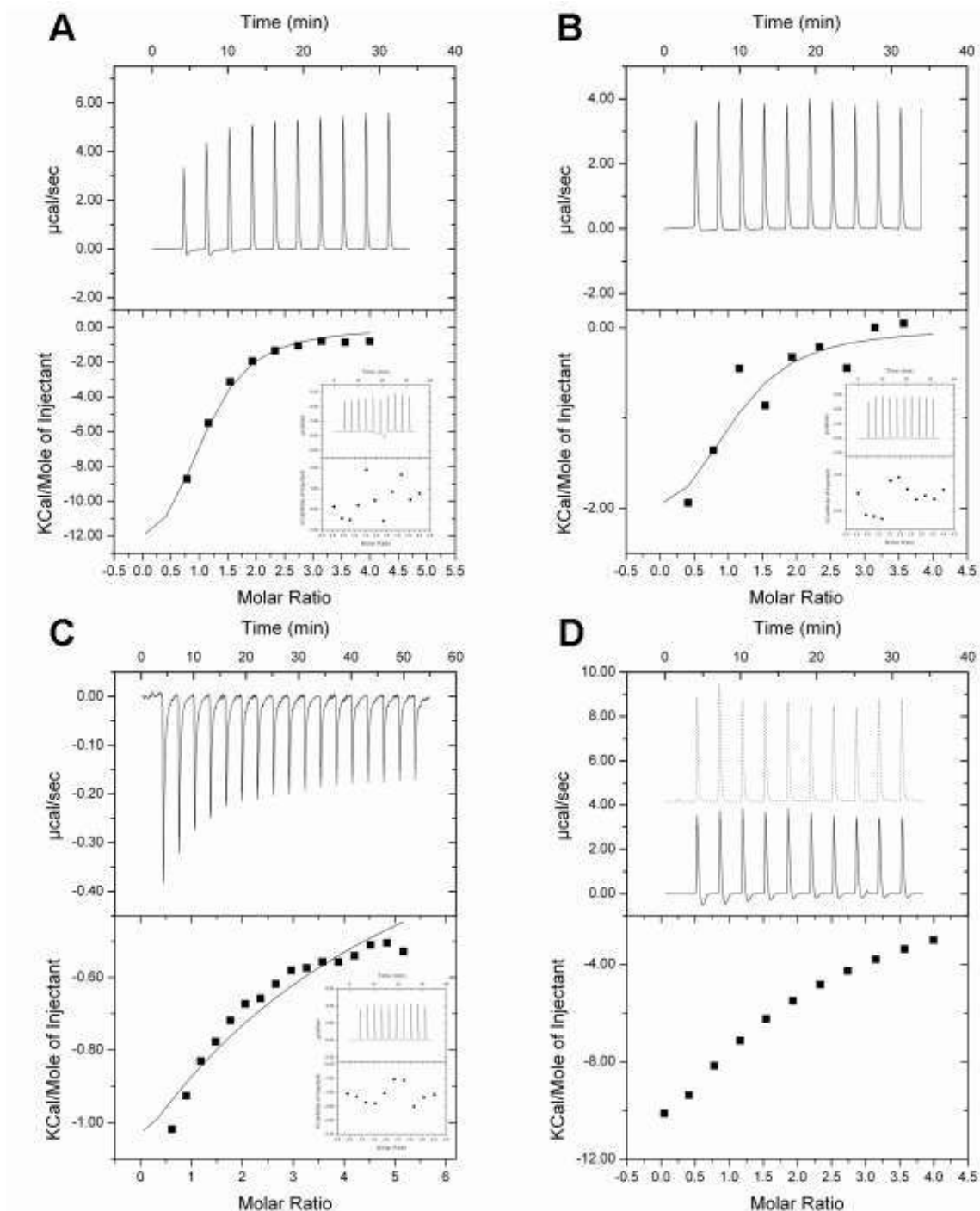


Figura 17. Curvas de ligação dos substratos à enzima MtGMPS (80 μM) livre. (A) Titulação de 1,5 mM de XMP ;(B) Titulação de 1,5 mM de ATP; (C) Titulação de 3.5 mM de glutamina; (D) Titulação de 1,5 mM de PP_i . As figuras menores ilustram as titulações de (A) GMP, (B) AMP, e (C) glutamato, respectivamente. A mesma escala foi utilizada para o eixo X em todos os painéis.

Os resultados sugerem que a ligação dos substratos à enzima livre é aleatório e que o último produto a ser liberado é o PP_i . Entretanto, a existência ou não de uma ordem para a liberação de glutamato, AMP e GMP não pode ser obtida através dos

dados gerados pelo ITC. Já foi descrito que a enzima GMPS humana possui um mecanismo ordenado [65], no qual o MgATP liga na enzima seguido do XMP. Para este organismo a glutamina é o último substrato a ligar na enzima e o PP_i é o último produto a ser liberado. Este mesmo mecanismo também foi descrito para a enzima GMPS de *P. falciparum* baseado em estudos de inibição pelos produtos [43]. Além disso, a ligação da glutamina na enzima GMPS de *P. falciparum* demonstrou ser independente da ligação do ATP e do XMP, bem como a enzima MtGMPS, e o glutamato demonstrou ser o primeiro produto a ser liberado, seguido do AMP, GMP e PP_i [43]. Por outro lado, um mecanismo do tipo ordenado diferente foi proposto para a estrutura cristalográfica da GMPS de *E. coli*, no qual o XMP liga primeiro seguido de MgATP, sendo a glutamina também o último substrato a ligar na enzima livre [62].

A atividade glutaminase também foi realizada no intento de determinar a existência ou não de hidrólise de glutamina no domínio GATase na ausência de XMP e ATP. Apesar de o substrato glutamina ser capaz de ligar na enzima livre, como demonstrado nos resultados anteriores, o domínio GATase da enzima MtGMPS não demonstrou ter atividade sem a presença dos outros dois substratos. Ao que parece que para que haja atividade deste domínio, a enzima deva atingir uma determinada conformação, a qual necessita da ligação do XMP e do ATP pelo domínio ATPase da enzima [39,62]. Isto é condizente com a proposta de que a enzima MtGMPs possui uma atividade glutaminase muito pobre na ausência de ambos os substratos (XMP e ATP), impossibilitando que a hidrólise de glutamina seja realizada de forma indiscriminada, com conseqüente excesso de formação de NH_3 e glutamato [43, 62]. Do mesmo modo, foi proposto que a formação do complexo intermediário adenil-XMP pelo domínio ATPase serve como um sinal

para que o domínio GATase tenha atividade completa, levando à canalização de NH_3 formada no domínio GATase para o domínio ATPase, somente na presença do aduto [43].

5.11 Alinhamento de múltiplas sequências de GMPSs

As estruturas tridimensionais de proteínas GMPSs de organismos procariotos e eucariotos já elucidadas, depositadas no banco de dados de proteínas (PDB, do inglês Protein Data Bank), tais como *E. coli* (código de acesso PDB 1GPM) [62], *P. horikoshii* (código de acesso PDB 3A4I), [42] e humana (código de acesso PDB 2VXO, Welin et al., resultados não publicados) permitem a descoberta e o desenho racional de novas drogas, baseado no modelo detalhado do sítio de ligação dos substratos e produtos. O alinhamento das múltiplas sequências foi realizado e os resultados sugerem que os resíduos de aminoácidos Cys 93, His 179 e Glu 181 (numeração de acordo com *M. tuberculosis*), estão conservados e são equivalentes aos resíduos que estão envolvidos na catálise da glutamina no domínio glutaminase em *E. coli* [62]. A analogia de sequência de muitas enzimas hidrolíticas mostra a existência de um sítio catalítico Cys-His-Glu, onde a His 179 é responsável pelo ataque nucleofílico ao carbono da amida Cys 93 [62]. Além disso, o domínio ATPase contém um sítio de ligação, denominado “motivo alça-P” (P-loop motif) (resíduos 233-239, SGGVDSS), estritamente conservado no domínio ATPase da enzima GMPS (**Figura 18**), e que é considerado como sendo o responsável pela ligação do ATP [39] e confirma a sua relação funcional como um membro da família das enzimas que contém um domínio ATPase. Os membros desta família possuem um domínio de ligação do ATP estruturalmente homólogos, e um mecanismo comum para a formação e aminólise do intermediário adenilado

específico. Além do mais, os resíduos Arg 509, Val 510, Tyr 512, Asp 513 e Thr 521, os quais formam as ligações de hidrogênio, estão conservados em *P. horikoshii* e *E. coli* (**Figura 18**). Estes resíduos também são conservados na enzima de *M. tuberculosis* e humana, com a exceção da Tyr 512 (Leu em *M. tuberculosis*), e Val 510 (Ile em *Homo sapiens*), que não está envolvida na dimerização do cristal (PDB 2VXO), e que possui um modo diferente de dimerização, quando em comparação ao *P. horikoshii*, *E. coli* e *M. tuberculosis*, uma vez que encontra-se como um monômero em solução [39]. O domínio de dimerização é adjacente ao sítio de ligação do ATP no ATPase domínio. O contato entre estes domínios é altamente conservado, incluindo o laço de peptídico rico em prolínas e glicinas (resíduos 403-408), que em *E. coli* (PDB GPM), está ancorado no domínio de dimerização pelo contato específico dos resíduos invariantes [62]. Por outro lado, todos os resíduos aminoácidos que estão relacionados com o reconhecimento e ligação do substrato XMP, estão conservados em todos os organismos analisados no alinhamento (**Figura 18**). Nossos resultados mostram que existe uma alta taxa de identidade entre as GMPSs (*M. tuberculosis* e *E. coli*, 47.39%; *M. tuberculosis* e *P. horikoshii*, 31.81% e humana 15.50%) com organismos tanto procariotos quanto eucariotos.

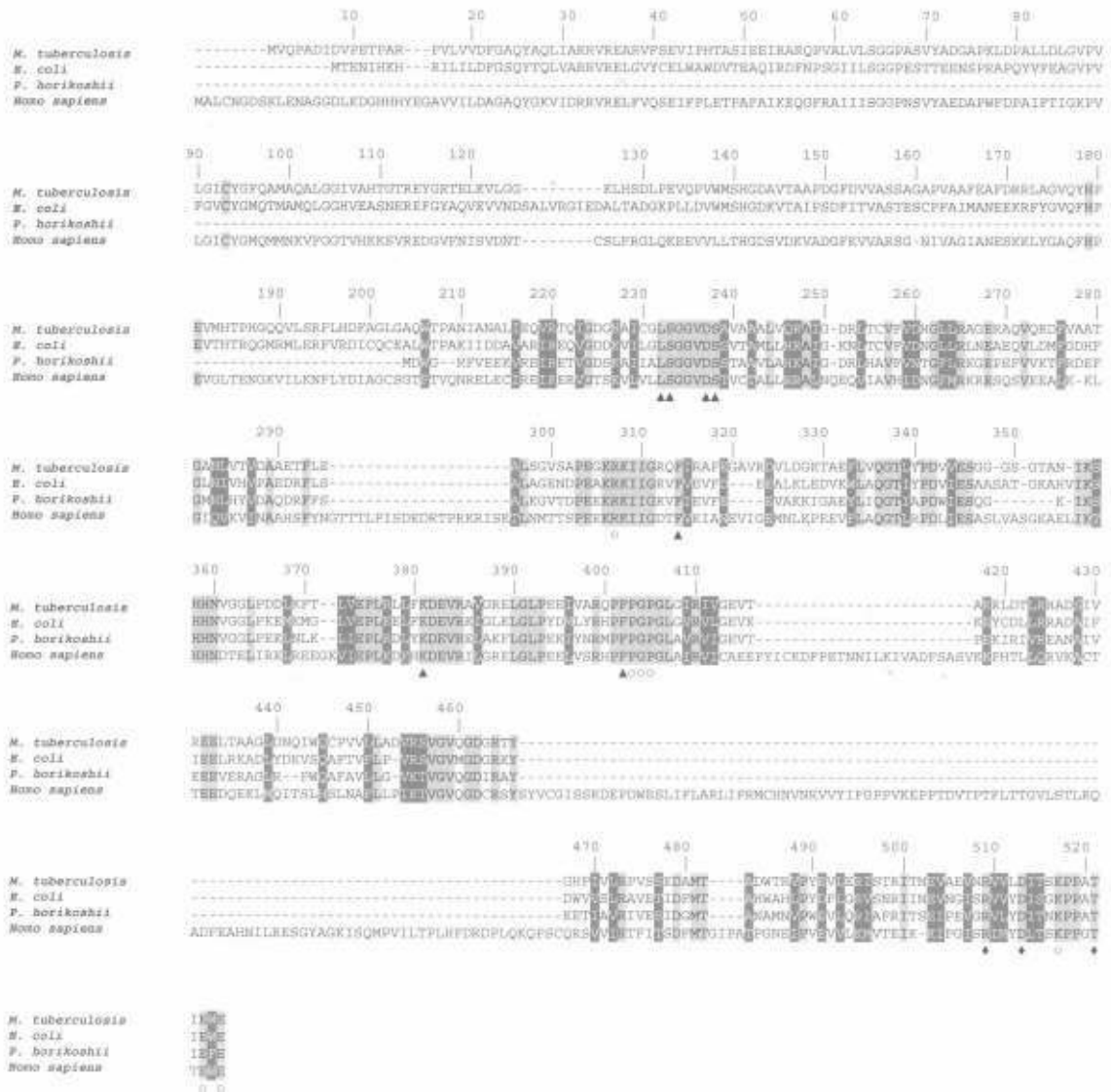


Figura. 18. Alinhamento de multiplas seqüências de cadeias polipeptídicas de enzimas GMPS. Os resíduos completa e altamente conservados estão contidos em caixas de cor cinza indicados com letras de cor preta e branca, respectivamente. Triângulos e círculos indicam os resíduos de ligação do ATP e XMP, respectivamente. Losângulos indicam os resíduos que formam as ligações de hidrogênio intermoleculares do dímero das enzimas GMPS de *P. horikoshii* (domínio ATPase), *E. coli*, e *M. tuberculosis*. O alinhamento foi realizado utilizando o CLUSTAL W.[57]

Capítulo 06

Conclusão

6. CONCLUSÕES

Particularidades do *M. tuberculosis*, como as enzimas essenciais das vias metabólicas exclusivas [66] e ou de síntese de nucleotídeos do microorganismo [67, 68], as quais possuem características únicas quando comparadas ao hospedeiro humano, podem ser exploradas a fim de direcionar esforços para o desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção e combate da TB. Enzimas da biossíntese de purinas, incluindo a enzima MtGMPS, são consideradas alvos atrativos para o desenvolvimento de novas cepas auxotróficas ou novos agentes antimicobacteriais [40, 44, 45, 68]. Apesar de o gene *guaA* já ter sido previsto no genoma de *M. tuberculosis* em análises *in silico*, a proteína por este gene codificada, bem como suas características bioquímicas, até o presente, não haviam sido descritas para suportar as informações computacionais. Abrindo os caminhos para determinar se a possível deleção do gene *guaA* pode resultar em uma cepa auxotrófica de *M. tuberculosis* de virulência atenuada, o presente trabalho apresenta os dados bioquímicos da enzima codificada pelo gene *guaA*, MtGMPS. Neste, a amplificação por PCR, clonagem e seqüenciamento do gene *guaA* de *M. tuberculosis* da cepa H37Rv são apresentados. A expressão heteróloga da enzima bem como o protocolo de purificação também estão descritos. A análise da proteína homogênea através do espectômetro de massas confirmou a identidade da proteína recombinante e a cromatografia por exclusão de tamanho demonstrou que a proteína MtGMPS apresenta-se como um dímero em solução. Além disso, os experimentos cinéticos mostraram que o gene *guaA* codifica uma enzima GMPS composta por dois domínios funcionais, convertendo XMP, MgATP e glutamina em GMP, AMP, PP_i e glutamato. A enzima MtGMPS exibe cooperatividade homotrópica positiva para o XMP e para o NH⁴⁺ e saturação hiperbólica para ATP e glutamina. Além do mais,

XMP e ATP inibem a atividade da enzima quando em altas concentrações. A medida da atividade da enzima MtGMPS em diferentes concentrações de Mg^{2+} , mostrou que a atividade é dependente do metal apresentando uma curva de perfil sigmóide, sugerindo que a enzima possui múltiplos sítios de ligação para o metal. Proteínas GMPS possuem dois domínios catalíticos, uma ATPase e um GATase. A análise da formação de PP_i na ausência de glutamina mostrou que a atividade do domínio ATPase é independente da atividade do domínio GATase, sugerindo que há a formação do aduto adenil-XMP no curso da reação. A glutamina demonstrou não exercer efeito sobre a constante de dissociação do ATP no sítio de ligação do domínio ATPase, mas o aumento da velocidade catalítica da reação neste domínio, quando na presença deste substrato pode ser observada. Por outro lado, os dados obtidos no ITC mostraram que o domínio GATase não possui atividade catalítica na ausência de XMP e ATP. Os estudos de ligação realizados por ITC sugerem um mecanismo de ligação aleatório de ligação do ATP, XMP e glutamina, e que o último substrato a ser liberado pode ser o PP_i . A comparação das sequências de polipeptídios mostrou que os resíduos catalíticos Cys-His-Glu característico existentes no N-terminal do domínio amidotransferase de classe I estão conservados na MtGMPS (Cys 93, His 179 e Glu 181). Os resultados obtidos pelo alinhamento das múltiplas sequências demonstrou que a conservação dos resíduos de aminoácidos da alça-P do domínio ATPase ($S_{233}GGVDSS_{239}$), indicando que a enzima MtGMPS pertence a família de proteínas tipo ATP pirofosfatase.

Como o advento do completo seqüenciamento inspirou a criação da genômica funcional, tem sido descrito que embora muitas vezes a partir do produto do gene possa se inferir similaridade entre as sequências de aminoácidos, isso não é necessariamente equivalente no que diz respeito à similaridade funcional celular e

molecular [69]. Além do mais, estimasse que exista um erro em torno de 5 a 40% na anotação funcional das enzimas por escassez de dados experimentais validados [70]. Vacinas são amplamente reconhecidas por serem um dos mais importantes avanços médicos da história, no entanto, o desenvolvimento de vacinas para a prevenção da TB ainda é um grande desafio científico e político. Recentemente um estudo empreendido por Aeras rompeu as barreiras e direcionou a descoberta de novas vacinas para a prevenção da TB introduzindo a seguinte conclusão [71]: “a pesquisa colaborativa resolverá os obstáculos científicos e políticos, e novas colaborações entre economias emergentes e organizações para o desenvolvimento de vacinas, serão criticamente necessárias para o desenvolvimento de novas vacinas que possam servir como potencial de saúde pública no intuito de salvar vidas e reduzir as taxas dessa doença.” Seguindo este pensamento, no presente trabalho nós apresentamos um primeiro passo para posteriores estudos, que mostrem se a deleção do gene *guaA* pode ou não resultar em uma cepa auxotrófica de *M. tuberculosis* com virulência atenuada. Nesse âmbito, esperamos que os dados bioquímicos aqui apresentados futuramente contribuam com os esforços enquadrados na genômica funcional. Além disso, a compreensão do mecanismo de ação do *M. tuberculosis* pode ser utilizada por químicos medicinais interessados no desenho de compostos químicos baseados na função biológica do bacilo e assim elucidar o papel desta enzima em um todo da célula deste microorganismo.

REFERÊNCIAS

- [1] RODRIGUES, L.; BARRETO, M.; KRAMER, M.; BARATA, R. C. B. **Resposta Brasileira à Tuberculose: Contexto, desafios e perspectivas**. Ver. Saúde Pública 2007, 41 (Supl. 1): 1-2.
- [2] PALOMINO JC, LEÃO SC, RITACCO V. TUBERCULOSIS 2007 - From **basic science to patient care**. Disponível em: <www.TuberculosisTextbook.com>. Acesso em: julho de 2008.
- [3] BLOOM BR, MURRAY CJL. **Tuberculosis: Commentary on a Reemergent Killer**. Science. 1992;257:1055-1064.
- [4] JARLIER V, NIKAIDO H. **Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics**. FEMS Microbiol Lett. 1994;123:11-18.
- [5] WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Global Tuberculosis Control 2010** WHO/HTM/TB/2010., 2010.
- [6] WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response**, WHO/HTM/TB/2010.3, 2010.
- [7] Disponível em: portal da saúde http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalhes&id_area=124&CO_NOTICIA=10039. Acesso em abril de 2011.
- [8] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control: surveillance, planning, financing. WHO, Geneva 2008.
- [9] DUCATI RG, RUFFINO-NETO A, BASSO LA, SANTOS DS. **The resumption of consumption – A review on tuberculosis**. Ment Inst Oswaldo Cruz. 2006;101:697-714.

- [10] ZAHRT, T. C. **Molecular mechanisms regulating persistent Mycobacterium tuberculosis infection.** *Microbes and Infection.* 2003, 5: 159-167.
- [11] BLOOM, B. R.; MURRAY, C. J.L.; **Tuberculosis: commentary on a reemergent killer.** *Science* 1992, 257: 1055-1064.
- [12] PASQUALOTO, K. F. M; FERREIRA, E. I. **Na approach for the rational design of a new antituberculosis agents.** *Curr Drug Targets* 2001, 2: 427-437.
- [13] RODRIGUES, L.; BARRETO, M.; KRAMER, M.; BARATA, R. C. B. **Resposta Brasileira à tuberculose: contexto, desafios e perspectivas.** *Ver. Saúde Pública* 2007, 41 (Supl. 1): 1-2.
- [14] YOUNG, D.; STARK, J.; KIRSCHNER, D.; **System biology of persistent infection: tuberculosis as a case study.** *Nat. Rev. Microbiol.* 2008, 6 (7): 520-8.
- [15] PIETERS, J. **Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance.** *Cell Host Microbe.* 2008, 3 (6): 399-407.
- [16] GLICKMAN, M. S.; JACOB, W. R.; **Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: dawn of a discipline.** *Cell* 2001, 104: 447-485.
- [17] MENDONÇA, J. D; ELY, F. PALMA, M. S. FRAZZON, J.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. **Functional Characterization by Genetic Complimentation of aro B-Encoded Dehydroquinase Synthase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv and its Heterologous Expression and Purification.** *Journal of Bacteriology,* 2007, p. 6246-6252.
- [18] ROSSETTI, M. L. R. et al. **Tuberculose resistente? Revisao molecular.** *Revista de saúde publica,* São Paulo, 2002, v. 36, n. 4.
- [19] CUNHA, F. A; FROTA C.C. **Bases moleculares da Resistencia do Mycobacterium tuberculosis as drogas usadas no tratamento da tuberculose.** *RBCA* 2005, v. 37, n. 3, p. 157-161.
- [20] SHAH, N. S ET AL. **Worldwide Emergence of Extensively Drug-resistant Tuberculosis.** *Emerging Infectious Diseases,* 2007, v. 13, n. 3.

- [21] HEEP, M. ET AL. **Frequency of rob mutation inside and outside the cluster I regions in rifanpin-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates.** Journal of Clinical Microbiology, 2001. v. 39, n. 1, p. 107-110.
- [22] ZAGER EM, MCNERNEY R. **Multidrug-resistant tuberculosis.** BMC Infect Diseases 2008; 8:10.
- [23] PARKER, W. B.; LONG, M. C.; **Purine Metabolism in Mycobacterium tuberculosis as a Target for Drug Development.** Current Pharmaceutical Design, 2007, 13, 599-608.
- [24] ORME I. **Search for new drugs for treatment of tuberculosis. Tuberculosis drug screening Program.** Antimicrob Agents Chemother 2001, 45: 1943-6.
- [25] ROBERTSON, J. G.; **Enzymes as a special class of therapeutic target: clinical drugs and modes of action.** Current Opinion in Structural Biology 2007, 17:674–679.
- [26] MARTIN, C.; WALKER, B.; **Attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis complex for laboratory and clinical use.** Tuberculosis 2008, (88) 371-374.
- [27] SAMBANDAMURTHY, V. K.; JACOBS JR, W.R.; **Live attenuated mutants of Mycobacterium tuberculosis as candidate vaccines against tuberculosis.** Microbes and Infection 2005, (7)955-961.
- [28] LY, L. H.; MCMURRAY, D. N.; **Tuberculosis: vaccines in the pipeline.** Expert Reviews Vaccines 2008, 7(5) 635-650.
- [29]. KOUNI, M. H. **Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites.** Pharmacology and therapeutics. 2003, 99:283-309.
- [30] ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; WALTER, P. **Os Nucleotídeos são as subunidades do DNA e do RNA,** pág. 56-58. Fundamentos de Biologia Celular e Molecular 4^º Edição, ED. ARTMED.

- [31] CLELAND, W. W. **Determining the chemical mechanisms of enzyme – catalyzed reactions by kinetic studies.** Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol 1997, 45: 273-387.
- [32] ZALKIN, H., AND P. NYGAARD. **Biosynthesis of purine nucleotides.** , p. 561-579. In F. C. Neidhard et al. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
- [33] GROSSMAN, T. H.; KAWASAKI, 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 1998, 209: 95-103.
- [34] CHEN, Q.; YOU, D.; HU, M.; GU, X.; LUO, M.; LU, S. **Cloning, purification, and characterization of thermostable hypoxanthine - guanine phosphoribosyltransferase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*.** Protein Expr. Purif. 2003, 32:239-245.
- [35] TOZZI MG, CAMICI M, MASCIA L, SGARRELLA F, IPATA PL. **Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism.** *FEBS J.* 2006;273:1089-1101.
- [36] VOET D, VOET JG. **Bioquímica.** 3^a ed. Editora Artmed, Brasil, 2006.
- [37] SMITH CS, MARKS AD, LIEBERMAN M. **Bioquímica médica Básica de Marks.** 2^a edição. Editora Artemed, Brasil, 2007.
- [38] KAMALAKANNAN, V.; RAMACHANDRAN, G.; NARAYANAN, S.; VASAN, S.K.; NARAYANAN, P.R. **Identification of a novel mycobacterial transcriptional regulator and its involvement in growth rate dependence and stringent control.** FEMS Microbiology Letters 2002, 209: 261-266.

- [39] NAKAMURA, J.; LOU, L. **Biochemical Characterization of Human GMP Synthase**. The Journal of Biological Chemistry 1995, 270 (13) 7347-7353.
- [40] HIRST, M.; HALIDAY, E.; NAKAMURA, J.; LOU, L. **Human GMP Synthetase – Protein purification, cloning, and functional expression of cDNA**. The Journal of Biological Chemistry 1994, 269 (38) 23830-23837.
- [41] ABBOTT, J. L.; NEWELL, J. M.; LIGHTCAP, C. M.; OLANICH, M. E.; LOUGHLIN, D. T.; WELLER, M. A.; LAM, G.; POLLAK, S.; PATTON, W. A. **The effects of removing the GAT domain from *E. coli* GMP Synthetase**. The Protein Journal 2006, 25: 483-491.
- [42] MARUOKA, S.; HORITA, S.; LEE, W. C.; NAGATA, K.; TANOKURA, M. **Crystal structure of the ATPase subunit and its substrate-dependent association with the GATase subunit: a novel regulatory mechanism for a two-subunit-type GMP synthetase from *Pyrococcus horikoshii* OT3**. Molecular Biology 2010, 15;395(2):417-29.
- [43] BHAT, J. Y.; SHASTRI, B. G.; BALARAM, H. **Kinetic and biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* GMP Synthase**. Biochemistry Journal 2009, 409: 263-273.
- [44] SANTIAGO, E. A.; COLE, L. E.; FRANCO, A.; VOGEL, S. N.; LEVINE, M. M.; BARRY, E. M. **Characterization of rationally attenuated *Francisella tularensis* vaccine strains that harbor deletions in the *guaA* and *guaB* genes**. Vaccine 2009, 27: 2426-2436.
- [45] KOTLOFF, K. L.; PASETTI, M. F.; BARRY, E. M.; NATARO, J.P.; WASSERMAN, S. S.; SZTEIN, M. B. **Deletion in the *Shigella* enterotoxin genes further attenuates *Shigella flexneri* 2a bearing guanine auxotrophy in a phase 1 trial of CVD 1204 and CVD 1208**. J Infect Dis 2004;190 (10):1745–54.
- [46] KOTLOFF, K. L.; PASETTI, M. F.; BARRY, E. M.; NATARO, J.P.; WASSERMAN, S. S.; SZTEIN, M. B. **Safety and immunogenicity of CVD 1208S, a**

live, oral deltaguaBA deltasen deltaset *Shigella flexneri* 2a vaccine grown on animal-free media. Hum Vaccine 2007, 3 (6).

[47] CHEN, L. ; WILSON, D.J.; XU, Y.; ALDRICH, C.C.; FELGZAK, K.; SHAM, Y.Y.; PANKIEWICZ, K.W. **Triazole-linked inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase from human and *Mycobacterium tuberculosis***, J. Med. Chem. 53 (2010) 4768-4778.

[48] COLE, S.T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S.V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY 3RD, C.E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M.A.; RAJANDREAM, M.A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J.E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G.; **Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence**, Nature 393 (1998) 537-544.

[49] BRADFORD, M.M.; **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**, Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254.

[50] ZHANG, Z.; MARSHALL, A.G. **A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra**, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 9 (1998) 225-233.

[51] I. Segel, Enzyme Kinetics, Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-state Enzyme Systems, John Wiley and Sons, New York, 1975.

[52] COPELAND, R.A.; **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**, John Wiley and Sons, Inc., New Jersey, 2005.

- [53] WEBB, M.R.; **A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems**, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 89 (1992) 4884-4887.
- [54] DUCATI, R.G.; SANTOS, D.S.; BASSO, L.A.; **Substrate specificity and kinetic mechanism of purine nucleoside phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis***, Arch. Biochem. Biophys. 486 (2009) 155-164.
- [55] BIANCONI, M.L. **Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensation of the yeast hexokinase isozymes**, J. Biol. Chem. 21 (2003) 18709-18713.
- [56] ROSTIROLLA, D.C.; BREDA, A.; ROSADO, L.A.; PALMA, M.S.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S. **UMP kinase from *Mycobacterium tuberculosis*: Mode of action and allosteric interactions, and their likely role in pyrimidine metabolism regulation**, Arch. Biochem. Biophys. 505 (2011) 202-212.
- [57] CLUSTAL, W.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. **Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice**. Nucleic Acids Res. 1994, 22:4673-4680.
- [58] SÁNCHEZ-QUITIAN, Z.A.; SCHNEIDER, C.Z.; DUCATI, R.G.; DE AZEVEDO JR, W.F.; BLOCH JR, C.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S. **Structural and functional analyses of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3315c-encoded metal-dependent homotetrameric cytidine deaminase**, J. Struct. Biol. 169 (2010) 413-423.
- [59] DE MENDONÇA, J.D.; ADACHI, O.; ROSADO, L.A.; DUCATI, R.G.; SANTOS, D.S.; BASSO, L.A. **Kinetic mechanism determination and analysis of metal requirement of dehydroquinase synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: an essential step in the function-based rational design of anti-TB drugs**, Mol. Biosyst. 7 (2011) 119-128.
- [60] MARTINELLI, L.K.; DUCATI, R.G.; ROSADO, L.A.; BREDA, A.; SELBACH, B.P.; SANTOS, D.S.; BASSO, L.A. **Recombinant *Escherichia coli* GMP**

reductase: kinetic, catalytic and chemical mechanisms, and thermodynamics of enzyme-ligand binary complex formation, *Mol. Biosyst.* 7 (2011) 1289-1305.

[61] GROSSMAN, T.H.; KAWASAKI, 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 (1998) 95-103.

[62] TESMER, J.J.; KLEM, T.J.; DERAS, M.L.; DAVISSON, V.J.; SMITH, J.L.; **The crystal structure of GMP synthetase reveals a novel catalytic triad and is a structural paradigm for two enzyme families**, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 74-86.

[63] ZHOU, X.; CAHOON, M.; ROSA, P.; HEDSTROM, L.; **Expression, purification, and characterization of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase from *Borrelia burgdorferi***, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 21977-21981.

[64] UMEJIEGO, N.N.; LI, C.; RIERA, T.; HEDSTROM, L.; STRIEPEN, B. ***Cryptosporidium parvum* IMP dehydrogenase: identification of functional, structural, and dynamic properties that can be exploited for drug design**, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 40320-40327.

[65] VON DER SAAL, W.; CRYSLER, C.S.; VILLAFRANCA, J.J. **Positional isotope exchange and kinetic experiments with *Escherichia coli* guanosine-5'-monophosphate synthetase**, *Biochemistry*, 24 (1985) 5343-5350.

[66] DUCATI, R.G.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S. **Mycobacterial shikimate pathway enzymes as targets for drug design**, *Curr. Drug Targets* 8 (2007) 423-435.

[67] VILLELA, A.D.; SÁNCHEZ-QUITIAN, Z.A.; DUCATI, R.G.; SANTOS, D.S.; BASSO, L.A. **Pyrimidine salvage pathway in *Mycobacterium tuberculosis***, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 1286-1298.

[68] DUCATI, R.G.; BREDA, A.; L BASSO,.A.; SANTOS, D.S. **Purine Salvage Pathway in *Mycobacterium tuberculosis***, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 1258-1275.

[69] DUCKWORTH, B.P.; ALDRICH, C.C.; **Assigning enzyme function from the metabolic milieu**, *Chem. Biol.* 17 (2010) 313-314.

[70] N. Furnham, J.S. Garavelli, R. Apweiler, J.M. Thornton, *Nat. Chem. Biol.* 5 (2009) 521–525.

[71] BARKER, L.F.; LEADMAN, A.E.; CLAGETT, B. **The challenges of developing new tuberculosis vaccines**, *Health Affairs* 30 (2011) 1073-1079.

Anexos

Anexo A

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

Anexo B

In vitro effects antiepileptic drugs on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain

Anexo A

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

Tathyana Mar Amorim Franco, Diana Carolina Rostirola, Rodrigo Gay Ducati, Daniel Macedo Lorenzini, Luiz Augusto Basso, Diógenes Santiago Santos.

Artigo submetido ao *Archives in Biochemistry and Biophysics*

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

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

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

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

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

Running Title: Mycobacterium tuberculosis GMP synthetase

Abstract

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

Keywords: Guanosine monophosphate synthetase; recombinant protein, steady-state kinetics, cooperative kinetics; protein function; tuberculosis

1. Introduction

Human tuberculosis (TB)¹ remains a major global health concern worldwide. In 1993, the World Health Organization (WHO) declared TB as a global health emergency. Recent epidemiological studies have shown that each year up to 9.4 million people are infected with *Mycobacterium tuberculosis*, the main aetiological agent of TB in humans, causing approximately 3 million deaths [1]. The efficacy of TB chemotherapy has been diminished due to the emergence of multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR) [2], and totally drug-resistant (TDR) [3] strains. The global burden of TB remains high, particularly in countries with high prevalence of drug-resistance and TB-HIV co-infection [4]. Despite important achievements, the control of TB epidemic remains elusive, which underlines the need for new strategies to combat TB.

The only vaccine currently in use, bacille Calmette-Guérin (BCG), consists of an attenuated *M. bovis* live strain that has been in use since the 1920s. Although the BCG vaccine protects very young children from invasive forms of TB, adolescents and adults are variably protected and remain susceptible to pulmonary diseases caused by *M. tuberculosis* [5]. The search for second generation vaccine to prevent TB development is thus warranted. Notwithstanding, the basic rationale underlying generation of novel TB vaccines is not to

¹ Abbreviations used: AMP, adenosine 5'-monophosphate; ATP, adenosine 5'-triphosphate; ATPase, ATP pyrophosphatase; BCG, bacille Calmette-Guérin; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTT, dithiothreitol; GATase, glutamine amidotransferase domain; GMP, guanosine 5'-monophosphate; GMPS, guanosine monophosphate synthetase; Hepes, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; IAA, iodoacetamide; IMP, inosine 5'-monophosphate; IMPDH, inosine monophosphate dehydrogenase; IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; LB, Luria-Bertani; MDR, multidrug-resistant; MESG, 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside; MtGMPS, *M. tuberculosis* GMPS; P_i, inorganic phosphate; PNP, purine nucleoside phosphorylase; PP_i, pyrophosphate; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TB, human tuberculosis; TDR, totally drug-resistant; Tris, tris(Hydroxymethyl)aminomethane; WHO, World Health Organization; XMP, xanthosine 5'-monophosphate; XDR, extensively drug-resistant; XMP, xanthosine monophosphate.

replace the current BCG vaccine, but to develop new vaccination strategies that can complement BCG's scope of action. Live attenuated vaccines often provide a means to prevent human diseases (e.g., polio, measles, mumps, rubella, and varicella) inducing both local and systemic immune responses [6]. A new live vaccine based on rationally attenuated *M. tuberculosis* strains has been predicted to offer a more relevant repertoire of species-specific antigens and thus elicit a more effective protective immune response as compared to BCG [7]. However, for a live attenuated *M. tuberculosis* vaccine strain, at least two independent mutations in the mycobacterial genome have been recommended as a safe strategy to reduce the likelihood of occurring second-site suppressor mutation or a recombination event leading to loss of auxotrophy, as well as to avoid severely compromising immunogenicity [8].

The synthesis of guanosine 5'-monophosphate (GMP) from inosine 5'-monophosphate (IMP) requires both *guaB*-encoded inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) and *guaA*-encoded guanosine monophosphate synthetase (GMPS). Deletions in the *Shigella flexneri* *guaBA* operon led to an attenuated auxotrophic strain that conferred both immunogenicity and safety in volunteers [9, 10]. As *Francisella tularensis* [11] and unlike enteric organisms, the *M. tuberculosis* H37Rv *guaB* and *guaA* (Rv3396c) genes are not located in a bicistronic operon, but rather present as independent loci [12]. Of the three IMPDH paralogs in *M. tuberculosis* (*guaB1*, Rv1843c; *guaB2*, Rv3411c; and *guaB3*, Rv3410c), the *guaB2* gene has been shown to encode a protein with IMPDH activity that was tested as target for triazole-linked enzyme inhibitors [13].

GMPS (EC 6.3.5.2) is a key enzyme in both de novo synthesis and purine salvage pathway [14, 15] of guanine nucleotides. GMPS belongs to a G-type amidotransferase family that catalyzes the conversion of xanthosine 5'-monophosphate (XMP) and L-glutamine in the presence of H₂O, adenosine 5'-monophosphate (ATP) and Mg²⁺ into GMP, pyrophosphate

(PP_i), adenosine 5'-monophosphate (AMP) and L-glutamate (Fig. 1) [16, 17]. In both prokaryotes and eukaryotes, the tertiary structure of GMPS is formed by two domains with distinct functions. The C-terminal ATP pyrophosphatase (ATPPase) domain catalyses the condensation of XMP with ATP, and the N-terminal glutamine amidotransferase (glutaminase, GATase) domain catalyses the hydrolysis of glutamine to ammonia and glutamate [18]. Biochemical studies have been reported for GMPS enzymes from human [16], *Escherichia coli* [19], *F. tularensis* [11], *Pyrococcus horikoshii* [20], and *Plasmodium falciparum* [18]. The *guaA*-encoded protein has been predicted to be essential for *in vitro* growth of *M. tuberculosis* based on transposon-site hybridization studies [21]. However, no formal biochemical data have been presented to show whether or not the *guaA* gene codes for a protein with GMPS activity as predicted by *in silico* analysis of *M. tuberculosis* genome sequence. To pave the way for further efforts to show that deletion of the *guaA* gene may result in an auxotrophic *M. tuberculosis* strain for guanine with attenuated virulence, biochemical characterization of the *guaA*-encoded protein is worth pursuing. Accordingly, here we describe cloning, expression, purification to homogeneity, mass spectrometry, oligomeric state determination, steady-state kinetics, isothermal titration calorimetry, and multiple sequence alignment of *M. tuberculosis* GMPS (MtGMPS). It is hoped that these data may contribute to functional efforts towards a better understanding of the basic biology of *M. tuberculosis*.

2. Materials and methods

2.1. PCR amplification, cloning, and recombinant protein expression

Synthetic oligonucleotide primers (5'-**tgcatatg**gtgcagcctgctgacatcgacg-3' and 5'-**gggatcctc**actcccactcgcgatggtggc-3') complementary to the amino-terminal coding and carboxy-terminal noncoding strands of the *M. tuberculosis* *guaA* (Rv3396c) gene [12] were designed to contain, respectively, NdeI and BamHI restriction sites (in bold). These primers were used to amplify the *guaA* structural gene (1,578 bp) from *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA using standard PCR conditions (Perkin-Elmer), in the presence of 5% dimethyl sulfoxide (DMSO; final concentration). The PCR product was digested with NdeI and BamHI (New England Biolabs), and ligated into a pET23a(+) expression vector (Novagen). The DNA sequence of the cloned fragment, expected to correspond to the *M. tuberculosis* *guaA* gene, was determined by automated DNA sequencing to confirm gene identity and integrity, and ensure that no mutations were introduced by the PCR amplification step.

The recombinant pET23a(+):*guaA* plasmid was introduced into *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) host cells by electroporation, and the transformed cells were selected on Luria-Bertani (LB) agar plates containing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin. LB medium (2.5 L) containing 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin was inoculated with single colonies, and the bacterial culture grown at 180 rpm and 37°C for 6 h after reaching an $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.4-0.6$, without isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. Cells were harvested by centrifugation at 4,000 g for 30 min at 4°C and stored at -20°C. Soluble and insoluble fractions were analyzed by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [22].

2.2. Protein purification

All purification steps were performed using an Äkta Purifier (GE Healthcare) system at 4°C. Approximately 2 g of wet cell paste were suspended in 10 mL of 50 mM

tris(Hydroxymethyl)aminomethane (Tris) pH 7.5 (buffer A) and gently stirred for 30 min in the presence of lysozyme (0.2 mg mL^{-1}) (Sigma Aldrich). Cells were disrupted by sonication with 10 pulses of 10 seconds each at 60 % amplitude with a 13 mm probe, and cell debris was removed by centrifugation at 48,000 g for 30 min. To precipitate nucleic acids and ribonuclear proteins, the supernatant was treated with 1% (wt/vol) streptomycin sulfate (final concentration) for 30 min and centrifuged at 48,000g for 30 min. The supernatant was dialyzed against buffer A and loaded on a Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) anion exchange column, pre-equilibrated with buffer A. Adsorbed protein elution was carried out using a 0-0.4 M NaCl linear gradient in buffer A, and the fractions containing the target protein were pooled, concentrated using an Amicon ultrafiltration membrane (10 kDa molecular weight cutoff), and loaded on a HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) size exclusion column pre-equilibrated with buffer A, and isocratically eluted at a 0.5 mL min^{-1} flow rate. The fractions containing the target protein were pooled, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was added to a final concentration of 1 M, the solution was clarified by centrifugation at 48,000 g for 30 min, and the supernatant was loaded on a Butyl-Sepharose High Performance (GE Healthcare) hydrophobic interaction column, pre-equilibrated with buffer A containing 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Adsorbed protein was eluted using 1-0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ linear gradient yielding homogeneous recombinant protein, which was dialyzed against buffer A and stored at -80°C . Pooled fractions of all purification steps were analyzed by SDS-PAGE and enzyme activity measurements. Protein concentration was determined by the method of Bradford [23] using the Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad) and bovine serum albumin as standard.

2.3. Mass spectrometry: protein identity and molecular mass

Protein identity and subunit molecular mass of homogeneous recombinant MtGMPS were assessed by mass spectrometry. The sample was incubated in 0.1% Rapigest (Waters) and 50 mM ammonium bicarbonate pH 8.0 for 2 min at 100°C for protein denaturation and treated with 5 mM dithiothreitol (DTT) for 30 min at 60°C to reduce disulfide bonds. Free thiolate anions were alkylated with 15 mM iodoacetamide (IAA) for 30 min at room temperature. A total of 50 µg of protein was digested with 0.4 µg of trypsin for 1 h at 37°C. The digestion was quenched and the Rapigest hydrolyzed by the addition of HCl to a final concentration of 100 mM and incubating the sample at 37°C for 45 min. The tryptic digest was separated on a homemade column (solid phase Kinetex C18 of 2.6 µm particles, 0.15 × 100 mm) using a nanoUPLC (nanoLC Ultra 1D plus, Eksigent, USA) and eluted directly to a nanospray ion source connected to a hybrid mass spectrometer (LTQ-XL and LTQ Orbitrap Discovery, Thermo, USA). The flow rate was set to 1 µL min⁻¹, using a gradient of 10-40% acetonitrile, 0.1% formic acid over 1 h, and the mass spectrometer was set to acquire one MS survey scan for the m/z range of 400-1800 (30000 resolution) and MS/MS spectra for the five most intense ions from the survey scan during the gradient. An isolation mass window of 15 ppm was used for the precursor ion selection, and the normalized collision energy of 35% was used for fragmentation. Dynamic exclusion lasting for 30 s was used to acquire MS/MS spectra from low intensity ions. In MS survey, the preview mode for FTMS master scan was turned on, and only doubly and triply charged ions were selected for MS/MS. LC-MS/MS data were processed with Proteome Discoverer 1.0 (Thermo, USA) for comparison of MS/MS spectra with theoretical spectra generated from in silico tryptic digestion of proteomes of *M. tuberculosis* H37Rv and *E. coli* BL21(DE3) (downloaded from <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/>). The search parameters were as follows: trypsin digestion, two missed cleavage allowance, carbamidomethylation of cysteine, variable oxidation of methionine, precursor tolerance of 10 ppm, and fragment tolerance of 0.8 Da. To exclude

false identifications, only matches with XCore > 2.0 for doubly charged peptides and XCore > 2.5 for triply charged peptides were accepted.

For molecular mass determination, the homogeneous MtGMPS was processed in-line for removal of salts using a homemade column (Poros 50 R2 of 10 μm particles, 0.15×50 mm) on a nanoUPLC, and eluted with 80% acetonitrile/0.1% formic acid directly to a nanospray ion source connected to a hybrid mass spectrometer. The average spectrum was processed with the MagTran software [24] for charge state deconvolution.

2.4. Determination of molecular mass and oligomeric state of MtGMPS in solution

The molecular mass of native recombinant MtGMPS was determined using a Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare) size exclusion column, pre-equilibrated with 50 mM Tris pH 7.5 containing 200 mM NaCl, and a flow rate of 0.4 mL min^{-1} was employed for isocratic protein elution. The LMW and HMW Gel Filtration Calibration Kits (GE Healthcare) were used to prepare a calibration curve. The elution volumes (V_e) of standard proteins (ferritin, catalase, aldolase, coalbumin, ovalbumin, ribonuclease A) were used to calculate their corresponding partition coefficient (K_{av} , Eq. 1). Blue dextran 2000 (GE Healthcare) was used to determine the void volume (V_o). V_t is the total bed volume of the column. The K_{av} value for each protein was plotted against their corresponding molecular mass. Protein elution was monitored at 215, 254, and 280 nm.

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

2.5. Apparent steady-state kinetic parameters

MtGMPS activity was continuously monitored by measuring the decrease in absorbance at 290 nm upon conversion of XMP ($\epsilon = 3834 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) to GMP ($\epsilon = 2686 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) using a UV-2550 spectrophotometer (Shimadzu). A $\Delta\epsilon_{290}$ value of $1148 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was employed to calculate the rate of MtGMPS-catalyzed product formation. All activity assays were performed at 40°C in 50 mM Tris pH 7.5, unless stated otherwise, and assay mixtures contained XMP, ATP, glutamine (or $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), MgCl_2 (20 mM), and EDTA (0.3 mM), in a total reaction volume of 0.5 mL. Measurements of enzyme activity were initiated by the addition of 16 μg of MtGMPS (protein concentration that yielded linear time courses). Each individual initial rate datum is the average of duplicate or triplicate measurements, and all data were analyzed by non-linear regression using the SigmaPlot software (Systat Software, Inc.). One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme catalyzing the conversion of 1 μmol of substrate into product per minute.

The pH optimum value for MtGMPS reaction was determined by measuring specific activity at pH values ranging from 6.0 to 9.5, with increments of 0.5 pH units. To probe the effect of temperature on enzyme specific activity, the MtGMPS catalyzed reaction was monitored at 25, 30, 37, and 40°C . Both (pH and temperature) experiments were performed keeping all substrates at saturating concentrations (0.15 mM XMP, 1 mM ATP, and 5 mM glutamine) and initiated by the addition of MtGMPS into the reaction mixture.

Apparent kinetic constants for XMP, ATP, and glutamine (and NH_4^+ , as $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) were determined by varying the concentration of one substrate while keeping the other two at saturating concentrations. The data were either fitted to the Michaelis-Menten equation (Eq. 2) for a hyperbolic saturation curve, to the Hill equation (Eq. 3) for a sigmoidal saturation curve, or to the substrate inhibition equation (Eq. 4) [25, 26]. For these equations, v is the measured reaction velocity, V is the maximal velocity, S is the substrate concentration, K_M is the Michaelis constant, K_i is the dissociation constant for substrate inhibition, n is the Hill

coefficient (indicating the cooperative index), and $K_{0.5}$ is the substrate concentration in which $v = 0.5V$.

$$v = \frac{V[S]}{K_M + [S]} \quad \text{Eq. 2}$$

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

$$v = \frac{VS}{K_M + S \left(1 + \frac{S}{K_i} \right)} \quad \text{Eq. 4}$$

2.6. MtGMPS activity dependence on increasing Mg^{2+} concentration

To investigate the influence of Mg^{2+} on MtGMPS specific activity, the enzyme-catalyzed chemical reaction was monitored at varying concentrations of $MgCl_2$, keeping all substrates at saturating concentrations. Apparent steady-state kinetic constants were obtained by fitting the data to the Hill equation (Eq. 3) for a sigmoidal saturation curve.

2.7. ATPase activity measurements

MtGMPS ATPase activity was evaluated by the EnzCheck Pyrophosphate Assay Kit (Invitrogen). This pyrophosphate assay kit couples the conversion of pyrophosphate (PP_i) into two equivalents of inorganic phosphate (P_i) catalyzed by inorganic pyrophosphatase, followed by phosphorolysis of 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside (MESG)

catalyzed by purine nucleoside phosphorylase (PNP) to form ribose 1-phosphate and 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine, which is detected by measuring the increase in absorbance at 360 nm ($\epsilon = 11,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [27, 28]. The reaction mixture was previously incubated for 10 min to remove any P_i contamination, and contained 50 mM Tris pH 7.5, 0.15 mM XMP, varying ATP concentration, 20 mM MgCl_2 , 0.3 mM EDTA, and EnzCheck Pyrophosphate Assay Kit buffer and enzymes (PNP and inorganic pyrophosphatase) at concentrations recommended by the supplier. All reactions were started by adding MtGMPS. ATP concentrations were varied in the pre-incubated reaction mixture until saturation was reached. The data were best fitted to the substrate inhibition equation (Eq. 4).

2.8. Isothermal Titration Calorimetry (ITC): measurements of ligand binding and MtGMPS glutaminase activity

Isothermal titration calorimetry (ITC) experiments were carried out using an iTC200 Microcalorimeter (Microcal, Inc., Northampton, MA). The reference cell (200 μL) was loaded with Milli Q water for all experiments and the sample cell (200 μL) was filled with MtGMPS at a concentration of 80 μM . For each binding assay, the injection syringe (39.7 μL) contained only one ligand (1.5 mM for XMP, ATP, GMP, AMP, glutamate or PP_i , or 3.5 mM for glutamine). The ligand binding isotherms were measured by direct titration (ligand into macromolecule). Recombinant MtGMPS protein was prepared for ITC experiments by dialysing against 50 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (Hepes) pH 7.5 containing 20 mM MgCl_2 . The same buffer was used to prepare all ligand solutions used in the kinetic assays, replacing Tris, which has high enthalpy of ionization [29]. The stirring speed was set to 500 rpm at a temperature of 40°C for all experiments. The first titration injection (0.5 μL), which was discarded for data analysis, was followed by 11 injections of

3.9 μL each at 180 s intervals. Control titrations (ligand into buffer) were performed to subtract the heat of dilution and mixing for each experiment prior to data analysis. The data after peak integration of the isotherm generated by ITC were subtracted by the control titration data and concentration normalization (heat normalized to the molar ratio).

The ΔG (Gibbs free energy) of binding was calculated using the relationship described in Eq. 5, in which in which R is the gas constant ($8.314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T is the temperature in Kelvin ($T = ^\circ\text{C} + 273.15$), and K_a is the association constant at equilibrium. The entropy of binding (ΔS) can also be determined by this mathematical formula. Estimates for K_a and the binding enthalpy (ΔH) were refined by standard Marquardt nonlinear regression method provided in the Origin 7 SR4 software (Microcal, Inc., Northampton, MA).

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \text{Eq. 5}$$

The observed calorimetric enthalpies (ΔH^{cal}) and the rate constant for the reaction catalyzed by the MtGMPS glutaminase domain in the absence of XMP and ATP was determined from the thermograms (heat flow as a function time) obtained in the iTC200 Microcalorimeter at 40°C . The principles of ITC implementation were described elsewhere [30]. The reaction started by the injection of 2 μL of 80 μM MtGMPS into the sample cell after 60 s of initial delay and 900 s of spacing time between the first and second injections, in a final concentration of 1.6 μM . The reaction contained 50 mM Hepes pH 7.5, 20 mM MgCl_2 , 5 mM glutamine, and enzyme at 80 μM initial concentration.

2.9. Multiple sequence alignment

The amino acid sequences of prokaryotes GMPS proteins that have three-dimensional structures solved were included in the alignment: *E. coli* (YP_001731437.1), *P. horikoshii* (2DPL_B). Human (NP_003866.1) was also included in the alignment and compared with *M. tuberculosis* (CAB01027.1). Multiple amino acid sequence alignment was performed by CLUSTAL W [31], using the Gonnet matrix for amino acid substitutions and considering gap penalties, to identify essential residues for nucleotide substrate(s) binding, as well as to infer possible similarities in their mechanisms of catalysis. For alignment improvement, the ATPase sequence of GMPS from *P. horikoshii* that is encoded by *ph1347* gene, of which structure has been reported, was also analyzed.

3. Results and discussion

3.1. *M. tuberculosis* *guaA* amplification and cloning

The *M. tuberculosis* *guaA* (Rv3396c) gene was amplified using standard PCR conditions in the presence of 5% DMSO in the reaction mixture (data not shown). The DMSO co-solvent helps overcome polymerase extension difficulties due to DNA secondary structures and improves the denaturation of GC-rich DNAs [32], which is consistent with the 65.6% G+C content of the *M. tuberculosis* genome [12]. The PCR product consistent with the expected size (1,578 bp) was purified and inserted into the pET23a(+) expression vector between the NdeI and BamHI restriction sites. Nucleotide sequence analysis of the cloned DNA fragment confirmed the identity of the insert as *M. tuberculosis* *guaA* coding sequence and demonstrated that no mutations were introduced by the PCR amplification step.

3.2. Heterologous protein expression and purification

MtGMPS was overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) electrocompetent host cells transformed with pET-23a(+):guaA recombinant plasmid. SDS-PAGE analysis confirmed the expression of a protein in the soluble fraction with apparent subunit molecular mass consistent with the one expected for MtGMPS (approximately 56 kDa) (Fig. 2). SDS-PAGE data also showed that the highest yield of soluble recombinant MtGMPS expression was obtained at 6 h of host cell growth after reaching an $OD_{600\text{ nm}} = 0.4-0.6$ at 37°C in LB medium (Fig. 2), without IPTG addition. In the pET vector system, target genes are positioned downstream of the strong bacteriophage T7 late promoter. In agreement with the results presented here, high levels of protein expression in the absence of inducer have been shown to occur in the pET system [33, 34, 35]. It has been proposed that leaky protein expression is a property of the lac-controlled system when cells approach stationary phase in complex medium and that cyclic adenosine monophosphate, acetate, and low pH are required to achieve high-level expression in the absence of IPTG induction, which may be part of the general cellular response to nutrition limitation [36]. However, more recently, it has been shown that unintended induction in the pET system is due to the presence of as little as 0.0001% of lactose in the medium [37].

The overexpressed recombinant MtGMPS protein was purified by a three-step protocol consisting of an anion exchange column (Q-Sepharose Fast Flow), a gel filtration column (HiLoad Superdex 200), followed by a hydrophobic interaction column (Butyl-Sepharose High Performance). SDS-PAGE analysis showed that MtGMPS was apparently homogeneous (Fig. 3). This purification protocol yielded 10 mg of homogeneous recombinant protein from 2 g of wet cell paste, with an overall protein yield of 32% (Table 1). Interestingly, the specific activity of MtGMPS decreased after eluting from the anion exchange column (Table 1). It may be attributed to ionic strength which, such as pH

variations, is recognized to affect enzyme conformation, stability and activity [38].

Recombinant MtGMPS was stored at -80°C in 50 mM Tris pH 7.5, as this buffer was found to be appropriate for further steady-state enzyme activity measurements, and no loss of enzyme activity could be observed after storing for three months at this temperature (data not shown).

3.3. Mass spectrometry

LC-MS/MS analysis of trypsin-digested MtGMPS resulted in 422 spectra identified to 39 peptides (Table 2), corresponding to 82% of MtGMPS primary sequence. No protein could be identified from a search against *E. coli* BL21(DE3) proteome, which lends support to MtGMPS homogeneity. For molecular mass determination, the spectra recorded from intact MtGMPS presented peaks corresponding to charged states (from 28+ to 73+) of this protein. Deconvoluted spectra presented a single peak corresponding to the average subunit molecular mass of MtGMPS (55,928.64 Da), suggesting removal of N-terminal methionine residue (theoretical = 56,027.6) (Fig. 4). The MS result also revealed no peak at the expected mass of *E. coli* GMPS (58,679 Da), thus providing further support for homogeneity of recombinant MtGMPS.

3.4. Oligomeric state of MtGMPS

The molecular mass of native MtGMPS was determined by gel-filtration chromatography and yielded a single peak with elution volume (12.35 mL) corresponding to 136.96 kDa, suggesting that MtGMPS is a dimer in solution ($136,960 \text{ Da}/55,928.64 \text{ Da} \cong 2.4$). This result is in agreement with the oligomeric state of GMPS proteins from *E. coli* [19],

P. falciparum [18], and *P. horikoshii* [20]; but differs from high eukaryotes, including humans [17], which are monomeric. The presence of a large insertion near the dimerization domain in GMPS of higher eukaryotes seems to preclude dimer formation [39]. It has been suggested that the diversity in oligomeric states of this class of enzymes may reflect different modes of regulation and varied functions [18].

3.5. Apparent steady-state kinetics

Prior to embarking on determining the apparent steady-state kinetic parameters, the optimum pH value was determined. MtGMPS activity measurements at saturating substrate concentrations showed that the optimum pH value was 7.5 (Fig. 5A). To allow comparisons to be made between velocities of MtGMPS, human [17] and *E. coli* [19, 40] enzymes, specific activity values were determined at various temperatures. Not surprisingly, MtGMPS specific activity increased as a function of temperature up to 40°C (Fig. 5B). Steady-state velocity measurements were thus carried out at 40°C in 50 mM Tris pH 7.5 buffer.

Saturations curves for MtGMPS specific activity plotted against increasing concentrations of XMP (Fig. 6A), ATP (Fig. 6B), glutamine (Fig. 6C) and NH_4^+ (Fig. 6C-inset) showed to obey distinct functions. The apparent steady-state kinetic parameters are given in Table 3. Fitting the sigmoidal data for XMP saturation curve to Eq. 3, yielded values of $45 (\pm 1) \mu\text{M}$ for the Hill constant ($K_{0.5}$) and $0.23 (\pm 0.04) \text{ s}^{-1}$ for k_{cat} , suggesting positive homotropic cooperative kinetics for XMP. Similar pattern has also been observed for human GMPS isozymes, which have $K_{0.5}$ values of 35.6 and 45.4 μM [17]. Interestingly, to the best of our knowledge, sigmoidal profile for XMP saturation curve has never been observed for GMPS enzymes of prokaryotes. Increasing XMP concentrations resulted in inhibition of MtGMPS activity (data not shown). The limiting value for the Hill coefficient (n) is 2 as

MtGMPS is a dimer in solution. The n value of 2.4 thus indicates strong positive homotropic cooperativity for XMP.

The saturation curve for NH_4^+ was also sigmoidal (Fig. 6C-inset) and fitting the data to Eq. 3 yielded values of $13 (\pm 1)$ mM for $K_{0.5}$ and $0.10 (\pm 0.04)$ s^{-1} for k_{cat} (Table 3). Interestingly, saturation curves for increasing NH_4^+ concentrations were shown to be hyperbolic for human ($K_M = 5.1$ mM) [17], *E. coli* ($K_M = 41$ or 293 mM) [40], and *P. falciparum* ($K_M = 5.4$ mM) [18] GMPS enzymes. As shown for human GMPS [17], the catalytic constant is significantly lower for NH_4^+ ($k_{\text{cat}} = 0.10$ s^{-1}) as compared to glutamine ($k_{\text{cat}} = 3.05$ s^{-1} ; Table 2), suggesting that the latter is likely the preferred physiological substrate for MtGMPS. The K_M value for glutamine (1.24 mM), derived from fitting the hyperbolic saturation curve data (Fig. 6C) to Eq. 2, is smaller than that found for *E. coli* GMPS (13 mM) [40] and larger than those for human GMPS isozymes (406 and 358 μM) [17].

The saturation curve for ATP in the presence of saturating concentrations of XMP and glutamine showed reduced MtGMPS activity at large (post-saturating) concentrations of ATP (Fig. 6B). Accordingly, these data were fitted to Eq. 4, yielding K_M and k_{cat} values of 27 ± 2 μM and 2.39 ± 0.04 s^{-1} for ATP (Table 3). The substrate inhibition constant, K_i , was 21 ± 3 mM for ATP, which is approximately 780-fold larger than the K_M (Table 3). A similar profile was observed for the mycobacterial enzyme that catalyzes the previous step in the pathway, IMPDH [13]. Substrate inhibition of MtIMPDH was attributed to the formation of an IMPDH-XMP*:NAD complex, which is an intermediate of the reaction [41, 42].

3.6. Activity dependence on Mg^{2+} concentration

To evaluate the Mg^{2+} metal requirement of MtGMPS, enzyme activity measurements were carried out at increasing metal concentrations. The Mg^{2+} saturation curve was apparently sigmoidal and the data were best fitted to Eq. 3 (Fig. 7), yielding a value of 2.67 for the Hill coefficient (n), 1.18 ± 0.03 mM for $K_{0.5}$, and 1.96 ± 0.02 s⁻¹ for k_{cat} . These data suggest strong positive homotropic cooperativity upon increasing concentrations of Mg^{2+} . Maximum specific activity was achieved at approximately 5 mM Mg^{2+} , which is 5-fold larger than the concentration of ATP (1 mM) in the reaction mixture, suggesting that there may be an additional binding site for Mg^{2+} in MtGMPS. Sigmoidal dependence of enzyme activity on increasing Mg^{2+} concentration has also been observed for human GMPS [17] and *E. coli* GMPS [40]. Although additional binding sites for free Mg^{2+} have been proposed for human [17] and *E. coli* [40] GMPS proteins, whether or not there exists an additional binding for free Mg^{2+} should await experimental evidence on MtGMPS structure. At any rate, enzyme activity measurements to determine the apparent steady-state kinetic parameters for XMP, ATP, glutamine, and NH_4 were carried out at fixed-saturating concentration of $MgCl_2$ (20 mM).

3.7. ATPase activity of MtGMPS

GMPS proteins consist of two catalytic units, a GATase domain and an ATPase domain. The GATase domain has glutaminase activity. The ATPase domain binds ATP and XMP, in the presence of Mg^{2+} , to form the activated adenylyl-XMP intermediate with concomitant PP_i formation [18, 39, 40]. As an attempt to determine whether or not the ATPase activity of MtGMPS is independent of glutamine amidotransferase activity, measurements of PP_i formation were carried out by a coupled assay with PNP and pyrophosphatase in the absence of glutamine and fixed-saturating concentration of XMP

(0.15 mM). The data (Fig. 8) were best fitted to the substrate inhibition equation (Eq. 4), yielding values of $56 \pm 6 \mu\text{M}$ for K_M , $0.71 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ for k_{cat} , and $9 \pm 6 \mu\text{M}$ for K_i . These results suggest formation of adenylyl-XMP with concomitant release of PP_i in the absence of glutamine. The K_M values in either the absence ($56 \mu\text{M}$) or presence ($27 \mu\text{M}$) of glutamine are somewhat similar, whereas the k_{cat} value in the presence of glutamine (2.39 s^{-1}) is larger than in the absence of glutamine (0.71 s^{-1}). These data suggest that glutamine has no effect on the overall dissociation constant of ATP, whereas it appears to increase the overall catalytic rate of the ATPase domain of MtGMPS.

3.8. ITC: ligand binding and glutaminase activity

To determine the true steady-state kinetic parameters and initial velocity patterns in double-reciprocal plots for MtGMPS, enzyme activity measurements were made in the presence of varying glutamine (100-5055 μM) concentrations and several fixed-varied ATP (100-2000 μM) concentrations, while keeping XMP at a fixed (150 μM) concentration. However, the double-reciprocal plots were curved upwards for ATP and showed a non-consistent dependence on increasing glutamine concentration (data not shown), thereby precluding a proposal for MtGMPS enzyme mechanism based on measurements of dependence of steady-state velocities on increasing ATP or glutamine concentrations. In addition, the dependence of MtGMPS on increasing XMP concentration was sigmoidal.

To try to address the order of substrate addition and/or product release, equilibrium binary complex formation were assessed by ITC, determining the heat generated or consumed upon ligand-macromolecule binary complex formation at constant temperature and pressure (Fig. 9). The ITC data also provide thermodynamic signatures of non-covalent interactions of substrate(s)/product(s) binding to MtGMPS. The measure of heat released

upon binding of the ligands allowed determination of binding enthalpy (ΔH) of the process, stoichiometry of the interaction (

the binding of ATP and XMP as for MtGMPS, and glutamate is the first product to be released, followed by AMP, GMP, and PP_i [18]. On the other hand, a different ordered mechanism of substrate binding has been proposed based on the crystal structure of *E. coli* GMPS, in which XMP binding is followed by MgATP and glutamine is the last substrate to bind to *E. coli* GMPS [39].

The glutaminase activity assay was carried out to determine whether hydrolysis of the glutamine to NH₃ and glutamate occurs in the absence of XMP and ATP. Although the ITC data showed that glutamine binds to free MtGMPS, no glutaminase activity could be detected in the absence of XMP and ATP. To achieve the enzymatic conformation for hydrolysis of glutamine, it is necessary for these XMP and ATP substrates to be present in the binding site [17, 39]. This is consistent with the proposal that GMPS has poor glutaminase activity in the absence of XMP and ATP to guarantee that hydrolysis of glutamine is tightly coupled with product formation, thereby preventing indiscriminate conversion of glutamine to NH₃ and glutamate [18, 39]. Formation of adenylyl-XMP reaction intermediate in the ATPase domain has been proposed to signal the glutaminase domain for complete activity, leading to channeling of NH₃ formed in the GATase to ATPase domain only in the presence of adduct in the latter [18].

3.9. Multiple sequence alignment

The polypeptide sequences of prokaryotic and eukaryotic GMPSs, to which three-dimensional structures have been reported, were included in the primary sequence comparison analysis carried out using Clustal W (Fig. 10). Namely, the two-domain type GMPS proteins from *E. coli* (PDB ID: 1GPM) [39] and *Homo sapiens* (PDB ID: 2VXO; Welin et al., unpublished results), and the ATPase subunit of two-subunit type GMPS

protein from the hyperthermophilic archaeon *P. horikoshii* OT3 (PDB code: 3A4I) [20]. This analysis suggests that the residues of the Cys-His-Glu catalytic triad in the N-terminal Class I amidotransferase domain of *E. coli* GMPS [39] are conserved in MtGMPS, namely Cys93, His179, and Glu181 (*M. tuberculosis* numbering) (Fig. 10). By analogy to many hydrolytic enzymes, it has been proposed that the His residue of the Cys-His-Glu catalytic triad serves as a general base in the nucleophilic attack of Cys side chain on the amide carbon of glutamine [39]. In addition, MtGMPS contains a glycine-rich ATP-binding motif called the “P-loop” (residues 233-239; SGGVDSS) (Fig. 10), which is strictly conserved in the ATPase subunits/domains of GMPS proteins [20, 39]. These results suggest that MtGMPS belongs to N-type ATP pyrophosphatase family. The members of this family have structurally homologous ATP-binding domains, and a common mechanism in which the carboxyl or carbonyl groups are activated by adenylation (releasing PP_i) followed by attack of a nitrogen nucleophile releasing AMP [39]. The largest differences between the primary sequences of prokaryotic and eukaryotic GMPS proteins map to the C-terminal amino acids of the dimerization domain [39]. Monomeric eukaryotic GMPS has several large insertions as compared to prokaryotes, which are thought to form an additional domain that eliminates the need for dimerization. The residues Arg509, Val510, Tyr512, Asp513, and Thr521, which form intermolecular hydrogen bonds, are conserved in *P. horikoshii* and *E. coli* (Fig. 10). These residues are also conserved in *M. tuberculosis* and human with the exception of Val510 (Ile in human) and Leu512 in *M. tuberculosis*, which are obviously not involved in dimerization in the crystal (PDB 2VXO) of monomeric human GMPS [17]. The dimerization domain is adjacent to the ATP-binding site of the ATPase domain. Contacts between the domains are highly conserved, including the proline- and glycine-rich linker peptide (residues 403-408), which in *E. coli* (PDB ID 1GPM) is anchored in the dimerization domain by the specific contacts of invariant residues [39]. On the other hand, all residues of the putative

XMP-recognizing amino acid residues are conserved between the polypeptide sequences included in the alignment (Fig. 10). MtGMPS has fairly high identity to prokaryotic GMPSs (M tuberculosis and E. coli GMPSs: 47.39%; M tuberculosis and P. horikoshii GMPSs: 31.81%), and relatively low identity to human protein (M. tuberculosis and human GMPSs: 15.50%).

4. Conclusions

Particular features of *M. tuberculosis*, such as enzymes of either essential metabolic pathways exclusive to the microorganism [43] or nucleotide salvage pathways [15, 44] with unique characteristics as compared to the human host can be explored to direct efforts towards developing new strategies to combat TB. Purine biosynthetic enzymes, including MtGMPS, are considered to be attractive targets for the development of new auxotrophic strains or novel anti-mycobacterial agents [11, 15, 16, 45]. Although the *guaA* gene has been predicted by in silico analysis of *M. tuberculosis* genome sequence to encode a protein with GMPS activity, no formal biochemical data have been presented to lend support to this computational prediction. To pave the way for further efforts to show whether or not deletion of the *guaA* gene may result in an auxotrophic *M. tuberculosis* strain with attenuated virulence, the present work presents biochemical data on *guaA*-encoded MtGMPS. The present work describes PCR amplification, cloning and sequencing of *guaA* gene from *M. tuberculosis* H37Rv strain are presented. Heterologous protein expression and a protein purification protocol are also described. LC-MS/MS analysis of homogeneous recombinant MtGMPS confirmed the identity of the recombinant protein. Analytical gel filtration showed that MtGMPS is a homodimer in solution. Steady-state kinetics showed that the *guaA* gene encodes a two-domain type GMPS enzyme in *M. tuberculosis*, converting XMP, MgATP and

glutamine into GMP, ADP, PP_i and glutamate. MtGMPS exhibits positive homotropic cooperativity for XMP and NH_4^+ , and hyperbolic saturation curves for ATP and glutamine. XMP and ATP inhibited the enzyme activity at large concentrations. Measurements of dependence of MtGMPS activity on increasing Mg^{2+} concentrations showed a sigmoidal curve and suggested that there may be an additional binding site for this metal. GMPS proteins consist of two catalytic units, a GATase domain and an ATPase domain. Measurements of PP_i formation in the absence of glutamine showed that the ATPase activity is independent of glutamine amidotransferase activity and suggested formation of adenylyl-XMP adduct in the course of reaction. In addition, glutamine was shown to have no effect on the overall dissociation constant for ATP recognition site in the ATPase domain, but it increases the overall catalytic rate of this domain. On the other hand, the ITC data showed that the GATase domain of MtGMPS cannot catalyze hydrolysis of glutamine to NH_3 and glutamate in the absence of XMP and ATP. ITC measurements of binary complex formation suggested random order of binding of ATP, XMP and glutamine, and that PP_i is the last product to be released to yield free enzyme. Comparison of polypeptide sequences showed that the residues of the Cys-His-Glu catalytic triad in the N-terminal Class I amidotransferase domain of GMPSs are conserved in MtGMPS (Cys93, His179, and Glu181). Multiple sequence alignment results and showed conservation of the amino acid residues of the P-loop in the ATPase domain (S₂₃₃GGVDSS₂₃₉), indicating that MtGMPS belongs to the N-type ATP pyrophosphatase family of proteins.

The advent of whole-genome sequencing inspired the creation of functional genomics. It has recently been pointed out that although function of a gene product can be inferred from similarity to amino acid sequences of proteins with known functions, protein sequence similarity does not necessarily equate to cellular or molecular functional similarity [46]. Moreover, it has been estimated there is an error rate of 5%–40% exists in the functional

annotation of enzymes partly due to the relative sparseness of validated experimental data [47]. Vaccines are widely recognized to be one of the most important medical advances in history. However, the field of TB vaccine faces formidable scientific and policy challenges. A recently published study undertaken by Aeras to assess the barriers and drivers to the introduction of new TB vaccines arrived at the following conclusions [48]: “a collaborative approach to solving scientific, policy, and resource obstacles - as well as new partnerships among emerging economies and vaccine development organizations – will be critical to developing a new tuberculosis vaccine that could achieve its public health potential to save lives and reduce the burden of disease.” Accordingly, the work reported here represents a first step towards further efforts to show whether or not deletion of *guaA* gene may result in an auxotrophic *M. tuberculosis* strain with attenuated virulence. It is also hoped that the biochemical data here presented may contribute to functional genomic efforts. In addition, understanding the mode of action of MtGMPS may be useful to chemical biologists interested in designing function-based chemical compounds to elucidate the biological role of this enzyme in the context of whole *M. tuberculosis* cells.

Acknowledgements

This work was supported by funds of Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPES to National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (INCT-TB) to D.S.S. and L.A.B. L.A.B. and D.S.S. also acknowledge financial support awarded by FAPERGS-CNPq-PRONEX-2009. D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06) and L.A.B. (CNPq, 520182/99-5) and are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). T.M.A.F., D.C.R., R.G.D., L.A.R., and D.M.L. acknowledge scholarships awarded by CNPq.

References

- [1] World Health Organization, Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response, WHO/HTM/TB/2010.3, 2010.
- [2] W.W. Yew, C.C. Leung, Management of multidrug-resistant tuberculosis: Update 2007, *Respirology* 13 (2008) 21-46.
- [3] A.A. Velayati, P. Farnia, M.R. Masjedi, T.A. Ibrahim, P. Tabarsi, R.Z. Haroun, H.O. Kuan, J. Ghanavi, P. Farnia, M. Varahram, Totally drug-resistant tuberculosis strains: evidence of adaptation at the cellular level, *Eur. Respir. J.* 34 (2009) 1202-1203.
- [4] R.G. Ducati, A. Ruffino-Netto, L.A. Basso, D.S. Santos, The resumption of consumption - a review on tuberculosis, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101 (2006) 697-714.
- [5] B.B. Trunz, P. Fine, C. Dye, Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness, *Lancet* 367 (2006) 1173-1180.
- [6] M. Knuf, J. Faber, I. Barth, P. Habermehl, A combination vaccine against measles, mumps, rubella and varicella, *Drugs Today (Barc)* 44 (2008) 279-292.
- [7] V.K. Sambandamurthy, W.R. Jacobs Jr, Live attenuated mutants of *Mycobacterium tuberculosis* as candidate vaccines against tuberculosis, *Microbes Infect.* 7 (2005) 955-961.

- [8] C. Martín, B. Walker, Attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex for laboratory and clinical use, *Tuberculosis* 88 (2008) 371-374.
- [9] K.L. Kotloff, M.F. Pasetti, E.M. Barry, J.P. Nataro, S.S. Wasserman, M.B. Sztein, W.D. Picking, M.M. Levine, Deletion in the *Shigella* enterotoxin genes further attenuates *Shigella flexneri* 2a bearing guanine auxotrophy in a phase 1 trial of CVD 1204 and CVD 1208, *J. Infect. Dis.* 190 (2004) 1745-1754.
- [10] K.L. Kotloff, J.K. Simon, M.F. Pasetti, M.B. Sztein, S.L. Wooden, S. Livio, J.P. Nataro, W.C. Blackwelder, E.M. Barry, W. Picking, M.M. Levine, Safety and immunogenicity of CVD 1208S, a live, oral DeltaguaBA Deltasen Deltaset *Shigella flexneri* 2a vaccine grown on animal-free media, *Hum. Vaccin.* 3 (2007) 268-275.
- [11] A.E. Santiago, L.E. Cole, A. Franco, S.N. Vogel, M.M. Levine, E.M. Barry, Characterization of rationally attenuated *Francisella tularensis* vaccine strains that harbor deletions in the *guaA* and *guaB* genes, *Vaccine* 27 (2009) 2426-2436.
- [12] S.T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J.E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, B.G. Barrell, Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature* 393 (1998) 537-544.

- [13] L. Chen, D.J. Wilson, Y. Xu, C.C. Aldrich, K. Felczak, Y.Y. Sham, K.W. Pankiewicz, Triazole-linked inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase from human and *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 4768-4778.
- [14] V. Kamalakannan, G. Ramachandran, S. Narayanan, S.K. Vasan, P.R. Narayanan, Identification of a novel mycobacterial transcriptional regulator and its involvement in growth rate dependence and stringent control, *FEMS Microbiol. Lett.* 209 (2002) 261-266.
- [15] R.G. Ducati, A. Breda, L.A. Basso, D.S. Santos, Purine Salvage Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 1258-1275.
- [16] M. Hirst, E. Haliday, J. Nakamura, L. Lou, Human GMP synthetase. Protein purification, cloning, and functional expression of cDNA, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 23830-23837.
- [17] J. Nakamura, L. Lou, Biochemical characterization of human GMP synthetase, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 7347-7353.
- [18] J.Y. Bhat, B.G. Shastri, H. Balaram, Kinetic and biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* GMP synthetase, *Biochem. J.* 409 (2008) 263-273.
- [19] J.L. Abbott, J.M. Newell, C.M. Lightcap, M.E. Olanich, D.T. Loughlin, M.A. Weller, G. Lam, S. Pollack, W.A. Patton, The effects of removing the GAT domain from *E. coli* GMP synthetase, *Protein J.* 25 (2006) 483-491.

- [20] S. Maruoka, S. Horita, W.C. Lee, K. Nagata, M. Tanokura, Crystal structure of the ATPase subunit and its substrate-dependent association with the GATase subunit: a novel regulatory mechanism for a two-subunit-type GMP synthetase from *Pyrococcus horikoshii* OT3, *J. Mol. Biol.* 395 (2010) 417-429.
- [21] C.M. Sasseti, D.H. Boyd, E.J. Rubin, Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 77-84.
- [22] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [23] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254.
- [24] Z. Zhang, A.G. Marshall, A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9 (1998) 225-233.
- [25] I. Segel, *Enzyme Kinetics, Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-state Enzyme Systems*, John Wiley and Sons, New York, 1975.
- [26] R.A. Copeland, *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*, John Wiley and Sons, Inc., New Jersey, 2005.

- [27] M.R. Webb, A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 89 (1992) 4884-4887.
- [28] R.G. Ducati, D.S. Santos, L.A. Basso, Substrate specificity and kinetic mechanism of purine nucleoside phosphorylase from *Mycobacterium tuberculosis*, *Arch. Biochem. Biophys.* 486 (2009) 155-164.
- [29] D.C. Rostirolla, A. Breda, L.A. Rosado, M.S. Palma, L.A. Basso, D.S. Santos, UMP kinase from *Mycobacterium tuberculosis*: Mode of action and allosteric interactions, and their likely role in pyrimidine metabolism regulation, *Arch. Biochem. Biophys.* 505 (2011) 202-212.
- [30] M.L. Bianconi, Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensation of the yeast hexokinase isozymes, *J. Biol. Chem.* 21 (2003) 18709-18713.
- [31] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673-4680.
- [32] P.R. Winship, An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 1266.

- [33] Z.A. Sánchez-Quitian, C.Z. Schneider, R.G. Ducati, W.F. de Azevedo Jr, C. Bloch Jr, L.A. Basso, D.S. Santos, Structural and functional analyses of Mycobacterium tuberculosis Rv3315c-encoded metal-dependent homotetrameric cytidine deaminase, *J. Struct. Biol.* 169 (2010) 413-423.
- [34] J.D. de Mendonça, O. Adachi, L.A. Rosado, R.G. Ducati, D.S. Santos, L.A. Basso, Kinetic mechanism determination and analysis of metal requirement of dehydroquinate synthase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv: an essential step in the function-based rational design of anti-TB drugs, *Mol. Biosyst.* 7 (2011) 119-128.
- [35] L.K. Martinelli, R.G. Ducati, L.A. Rosado, A. Breda, B.P. Selbach, D.S. Santos, L.A. Basso, Recombinant Escherichia coli GMP reductase: kinetic, catalytic and chemical mechanisms, and thermodynamics of enzyme-ligand binary complex formation, *Mol. Biosyst.* 7 (2011) 1289-1305.
- [36] T.H. Grossman, E.S. Kawasaki, S.R. Punreddy, M.S. Osburne, Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability, *Gene* 209 (1998) 95-103.
- [37] F.W. Studier, Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, *Protein Expr. Purif.* 41 (2005) 207-234.
- [38] Y. Zhang, P.S. Cremer, Interactions between macromolecules and ions: The Hofmeister series, *Curr Opin Chem Biol.* 10 (2006) 658-663.

- [39] J.J. Tesmer, T.J. Klem, M.L. Deras, V.J. Davisson, J.L. Smith, The crystal structure of GMP synthetase reveals a novel catalytic triad and is a structural paradigm for two enzyme families, *Nat. Struct. Biol.* 3 (1996) 74-86.
- [40] W. von der Saal, C.S. Crysler, J.J. Villafranca, Positional isotope exchange and kinetic experiments with *Escherichia coli* guanosine-5'-monophosphate synthetase, *Biochemistry*, 24 (1985) 5343-5350.
- [41] X. Zhou, M. Cahoon, P. Rosa, L. Hedstrom, Expression, purification, and characterization of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase from *Borrelia burgdorferi*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 21977-21981.
- [42] N.N. Umejiego, C. Li, T. Riera, L. Hedstrom, B. Striepen, *Cryptosporidium parvum* IMP dehydrogenase: identification of functional, structural, and dynamic properties that can be exploited for drug design, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 40320-40327.
- [43] R.G. Ducati, L.A. Basso, D.S. Santos, Mycobacterial shikimate pathway enzymes as targets for drug design, *Curr. Drug Targets* 8 (2007) 423-435.
- [44] A.D. Villela, Z.A. Sánchez-Quitian, R.G. Ducati, D.S. Santos, L.A. Basso, Pyrimidine salvage pathway in *Mycobacterium tuberculosis*, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 1286-1298.
- [45] R. Rodriguez-Suarez, D. Xu, K. Veillette, J. Davison, S. Sillaots, S. Kauffman, W. Hu, J. Bowman, N. Martel, S. Trosok, H. Wang, L. Zhang, L.Y. Huang, Y. Li, F. Rahkhoodae, T. Ransom, D. Gauvin, C. Douglas, P. Youngman, J. Becker, B. Jiang, T. Roemer, Mechanism-

of-action determination of GMP synthase inhibitors and target validation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*, *Chem. Biol.* 14 (2007) 1163-1175.

[46] B.P. Duckworth, C.C. Aldrich, Assigning enzyme function from the metabolic milieu, *Chem. Biol.* 17 (2010) 313-314.

[47] N. Furnham, J.S. Garavelli, R. Apweiler, J.M. Thornton, Missing in action: enzyme functional annotations in biological databases, *Nat. Chem. Biol.* 5 (2009) 521–525.

[48] L.F. Barker, A.E. Leadman, B. Clagett, The challenges of developing new tuberculosis vaccines, *Health Affairs* 30 (2011) 1073-1079.

Figure legends:

Fig. 1. MtGMPS catalyzes the irreversible conversion of XMP into GMP through a reaction that requires ATP and involves the transfer of an amino group from glutamine to XMP via an adenylyl-XMP intermediate, generating PP_i , adenosine monophosphate (AMP), and glutamate.

Fig. 2. SDS-PAGE (12%) analysis of total soluble protein as a function of growth time. Lane 1, PageRuler unstained protein ladder (Fermentas Life Sciences); lanes 3, 7, and 11, *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a(+)] (control) without IPTG induction at 2, 4, and 6 h of cell growth, respectively; lanes 5, 9, and 13, *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a(+)] (control) with IPTG induction (1 mM) at 2, 4, and 6 h of cell growth, respectively; lanes 2, 6, and 10, *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a(+)::guaA] without IPTG induction at 2, 4, and 6 h of cell growth, respectively; lanes 4, 8, and 12, *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a(+)::guaA] with IPTG induction (1 mM) at 2, 4, and 6 h of cell growth, respectively.

Fig. 3. SDS-PAGE (12%) analysis of pooled fractions from the various steps of the MtGMPS purification protocol. Lane 1, PageRuler unstained protein ladder (Fermentas Life Sciences); lane 2, crude extract loaded on a Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) anion exchange column; lane 3, supernatant loaded on a HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) size exclusion column; lane 4, supernatant loaded on a Butyl-Sepharose High Performance (GE Healthcare) hydrophobic interaction column; lane 5, homogeneous MtGMPS eluted from the hydrophobic column.

Fig. 4. Averaged spectra collected from non digested MtGMPS. Deconvoluted spectrum (insert) presents a single peak corresponding to the average molecular of MtGMPS without

the first amino acid methionine (55928.64 Da). Peaks in original spectrum are assigned to charged states (from 28+ to 73+) of MtGMPS.

Fig. 5. Screening of MtGMPS specific activity as a function of (A) pH and (B) temperature.

Fig. 6. Apparent kinetic parameters for MtGMPS. Specific activity as a function of the concentration of (A) XMP, (B) ATP, and (C) glutamine. Inset displays the specific activity as a function of ammonia.

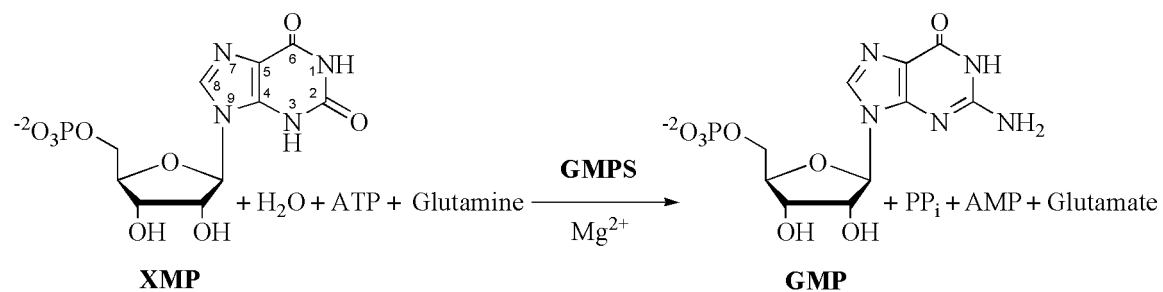
Fig. 7. MtGMPS enzyme activity dependence on Mg^{2+} .

Fig. 8. MtGMPS specific activity as a function of ATP concentration without glutamine in the reaction mixture reveals the release of PP_i and the formation of adenylyl-XMP.

Fig. 9. Isothermal titration calorimetric (ITC) curves for binding of ligands to MtGMPS (80 μ M). (A) Titration of XMP at a final concentration of 1.5 mM. (B) Titration of ATP at a final concentration of 1.5 mM. (C) Titration of glutamine at a final concentration of 3.5 mM. (D) Titration of PP_i at a final concentration of 1.5 mM. The insets are titration of (A) GMP, (B) AMP, and (C) glutamate, respectively. The same scale was employed for the Y-axis of large panels and insets.

Fig. 10. Multiple sequence alignment of polypeptide chains of GMPS enzymes. Completely and highly conserved residues are boxed and indicated by black letters on a gray background and white letters on a gray background, respectively. Triangles and circles indicate the putative binding residues for ATP and XMP, respectively. Diamonds indicate residues

forming intermolecular hydrogen bonds in homodimers of *P. horikoshii* (ATPPase domain), *E. coli*, and *M. tuberculosis* GMPS enzymes. Sequence alignment was obtained with CLUSTAL W.

**Figure 1.**

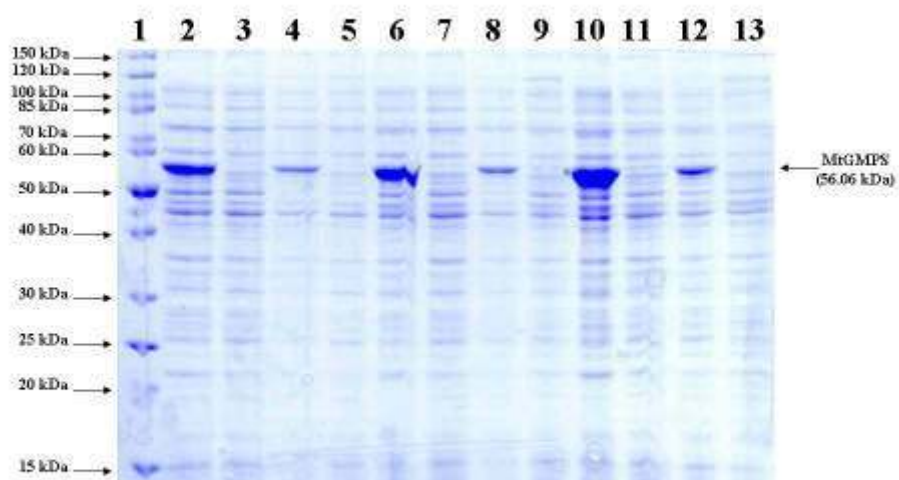


Figure 2.

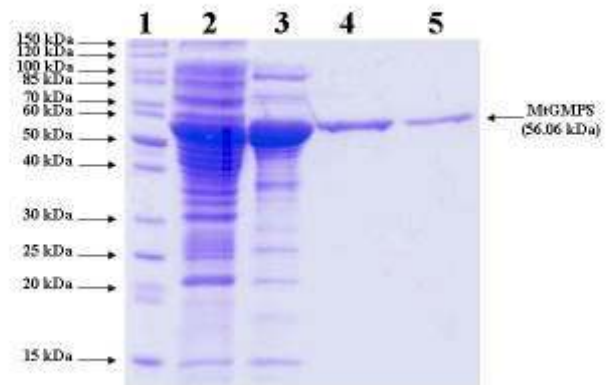


Figure 3.

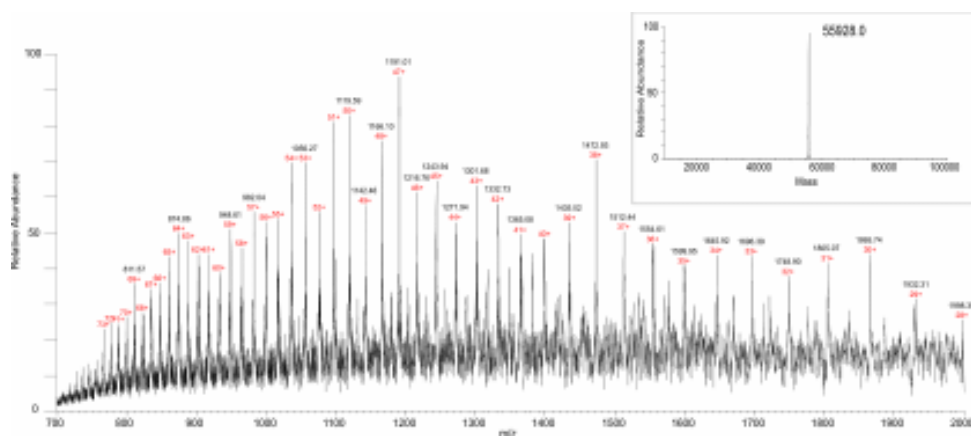


Figure 4.

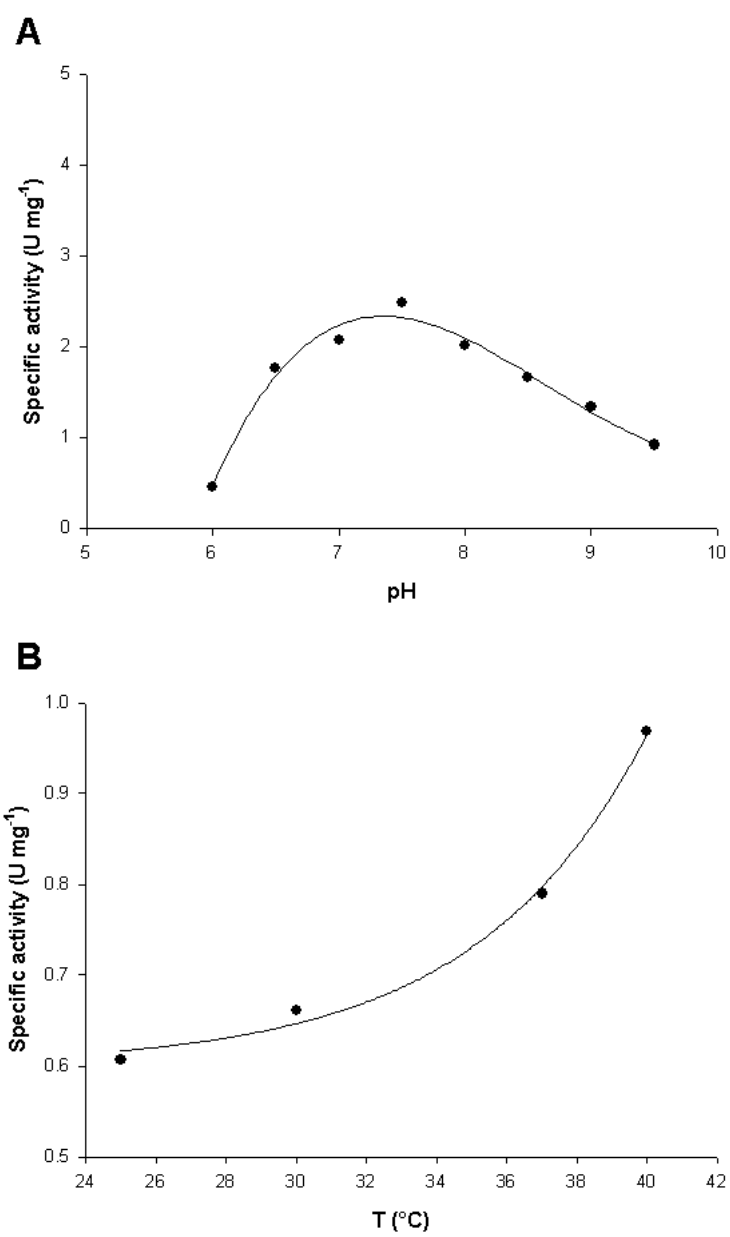


Figure 5.

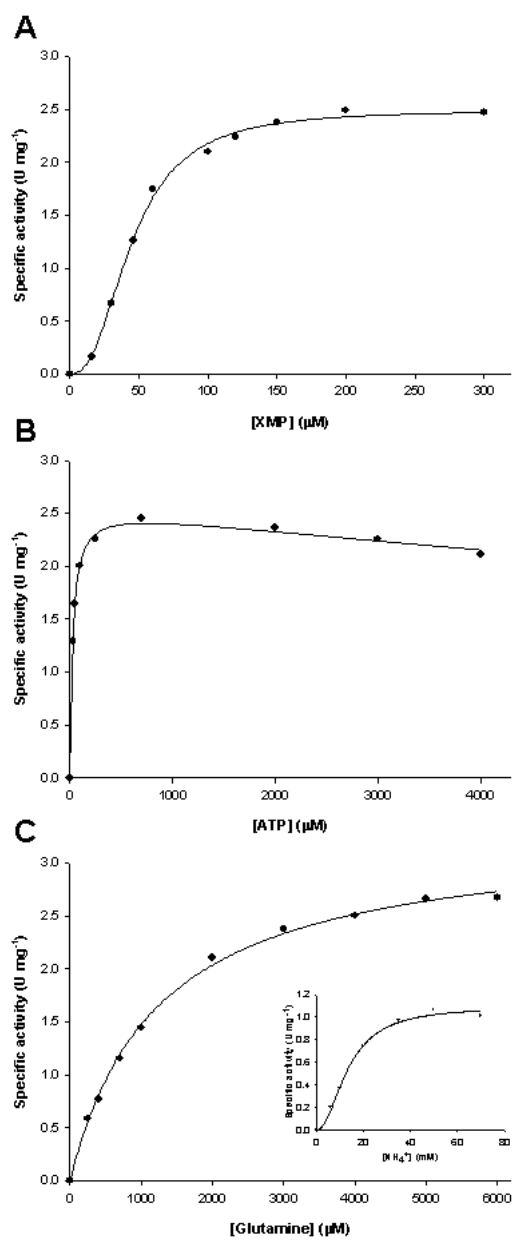


Figure 6.

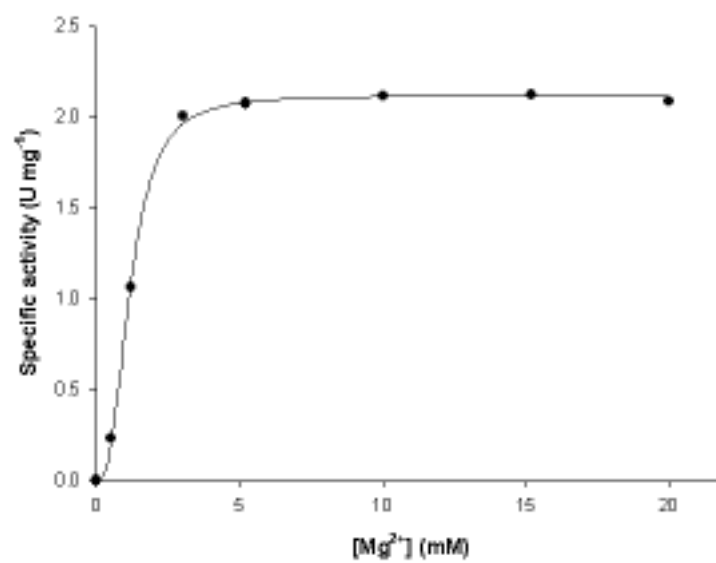


Figure 7.

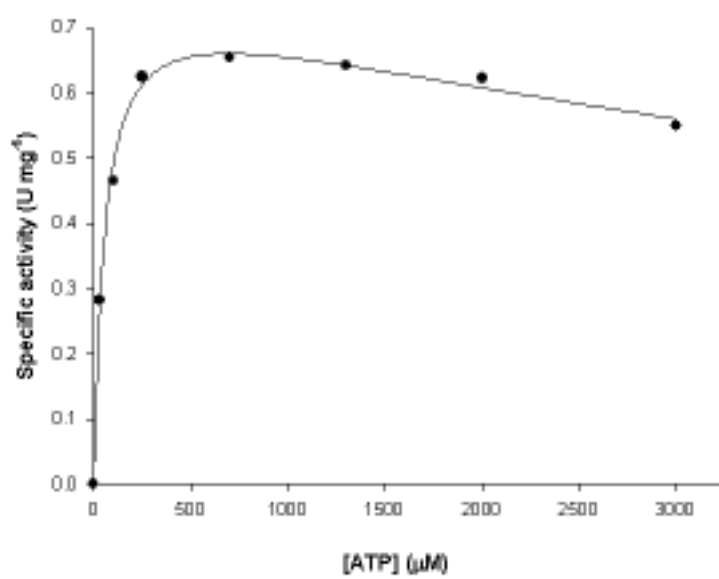


Figure 8.

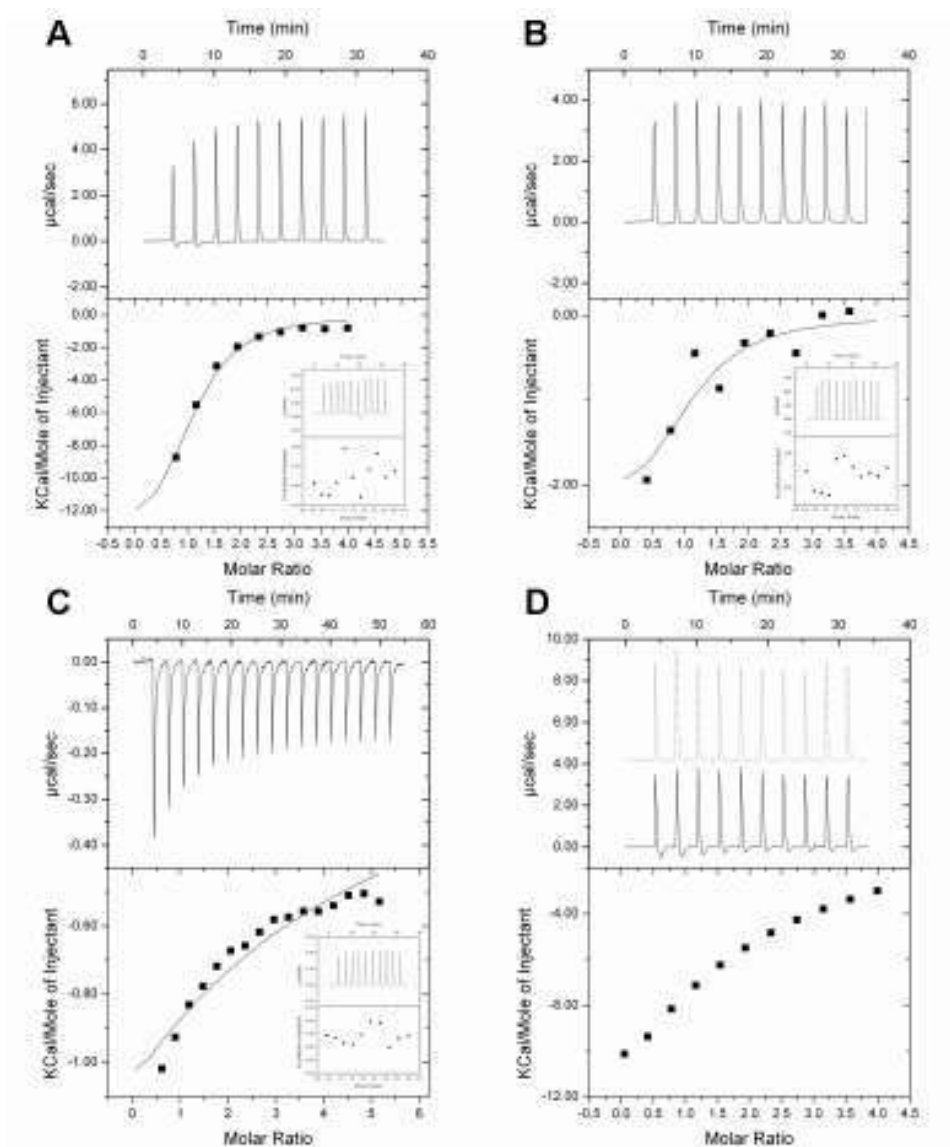


Figure 9.

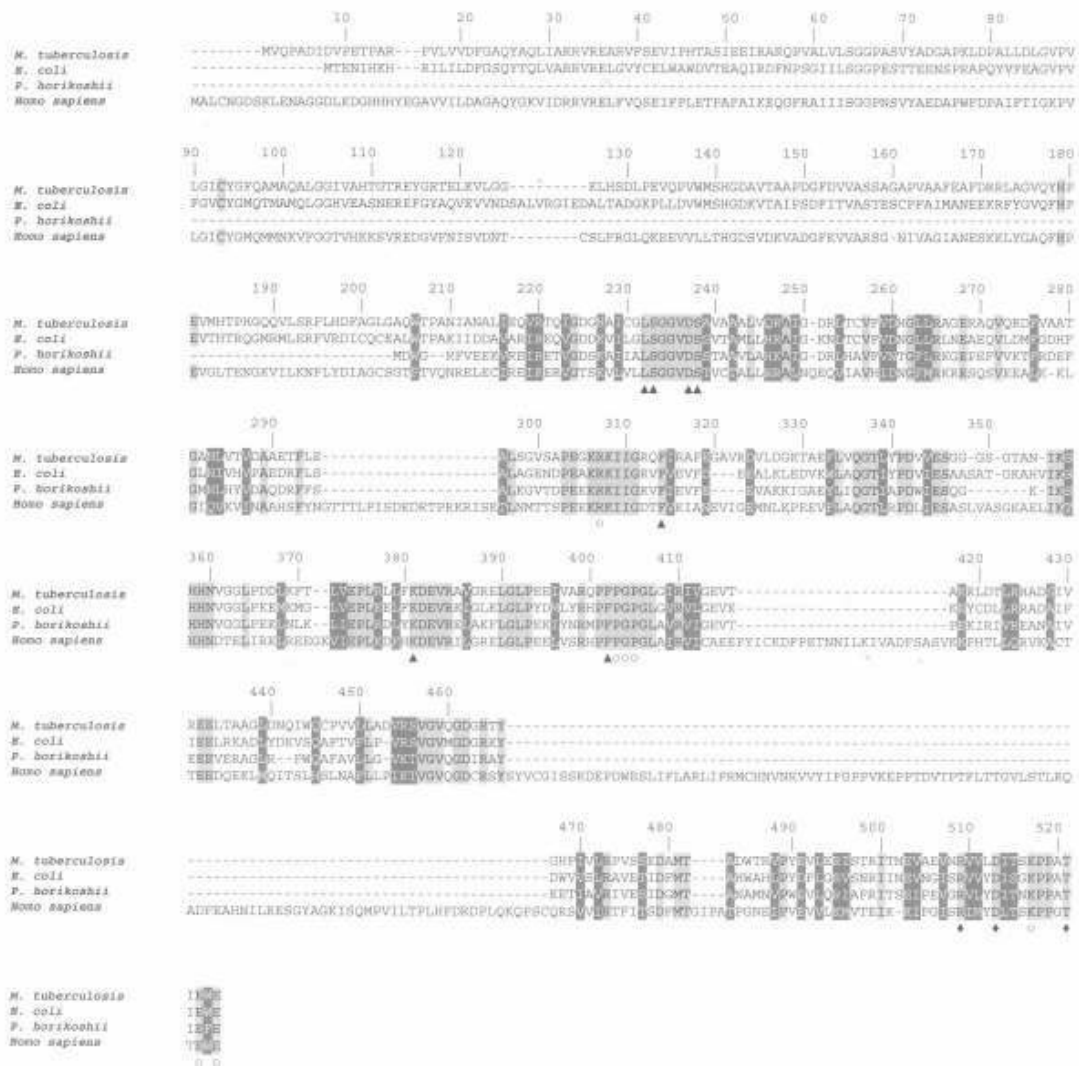


Figure 10.

Purification step	Total protein (mg)	Total enzyme activity (U)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	103	66.95	0.65	1	100
Q Sepharose Fast Flow	60	27	0.45	0.7	40
Hiload Superdex 200	28	26.32	0.94	1.4	39
Butyl Sepharose HP	10	21.65	2.16	3.3	32

Table 1.

Peptide	Position	XCorr
AFEGAVRDVLDGK	316-328	2.75
AIGDRLTCVFVDHGLLR	248-264	4.53
ARQPVALVLSGGPASVYADGAPK	55-77	6.02
AVGRELGLPEEIVAR	385-399	4.26
AVGRELGLPEEIVARQPFPGPLGIR	385-410	3.77
DFVAATGANLVTVDAAETFLEALSGVSAPEGKR	274-306	4.16
DFVAATGANLVTVDAAETFLEALSGVSAPEGKRK	274-307	3.58
DVLDGKTAEFLVQGTLYPDVVESGGSGGTANIK	323-355	6.17
EARVFSEVIPHTASIEEIR	36-54	3.36
EELTAAGLDNQIWQCPVVLLADVR	432-455	7.51
ELGLPEEIVAR	389-399	3.11
ELGLPEEIVARQPFPGPLGIR	389-410	3.68
EYGRTELK	114-121	2.24
FLHDFAGLGAQWTPANIANALIEQVR	195-220	6.79
FTLVEPLR	369-376	2.93
HADSIVREELTAAGLDNQIWQCPVVLLADVR	425-455	5.33
ITNEVAEVNR	500-509	4.14
ITNEVAEVNRVVLDTISKPPATIEWE	500-525	4.55
IVGEVTAK	411-418	2.04
IVGEVTAKR	411-419	2.36
LAGVQYHPEVMHTPHGQQVLSR	173-194	5.35
LHSDLPEVQPVWMSHGDAVTAAPDGFDDVVASSAGAP VAAFEAFDR	127-171	4.33
LHSDLPEVQPVWMSHGDAVTAAPDGFDDVVASSAGAP VAAFEAFDRR	127-172	4.36
LLFKDEVK	377-384	3.30
LTCVFVDHGLLR	253-264	3.68
QPVALVLSGGPASVYADGAPK	57-77	5.37
RLAGVQYHPEVMHTPHGQQVLSR	172-194	5.86
SHHNVGGLPDDLK	356-368	3.88
SHHNVGGLPDDLKFTLVEPLR	356-376	5.14
SVGVDGDR	456-464	3.00
TAEFLVQGTLYPDVVESGGSGGTANIK	329-355	6.41
TELKVLGGK	118-126	2.15
TQIGDGHAIICGLSGGVDSAVAAALVQR	221-247	5.74
TYGHPIVLRPVSSDAMTADWTR	465-487	3.91
TYGHPIVLRPVSSDAMTADWTRVPYEVLER	465-495	3.24
VFSEVIPHTASIEEIR	39-54	4.09
VFSEVIPHTASIEEIRAR	39-56	2.91
VPYEVLER	488-495	2.89
VVLDTISKPPATIEWE	510-525	4.50

Table 2.

	K_{05} (μM)	K_M (μM)	V_{max} (U mg^{-1})	k_{cat} (s^{-1})
XMP	45 ± 1	-	2.49 ± 0.04	0.23 ± 0.04
ATP	-	27 ± 2	2.58 ± 0.04	2.39 ± 0.04
glutamine	-	$1.24 (\pm 0.06) \times 10^3$	3.30 ± 0.05	3.05 ± 0.05
NH_4^+	$13 \pm 1^*$	-	1.10 ± 0.04	0.10 ± 0.04

Table 3.

Ligands	n^a	$K_d (M^{-1})^b$	ΔH° (kcal mol ⁻¹) ^c	ΔC_p° (kcal mol ⁻¹ K ⁻¹) ^d	ΔS° (cal mol ⁻¹ K ⁻¹) ^e	$K_d (M)^f$
UMP	1	$55 (\pm 9) \times 10^3$	-14.9 ± 0.6	-7 ± 4	-25.1	$18 (\pm 3) \times 10^{-6}$
ATP	1	$4 (\pm 3) \times 10^4$	-3 ± 5	-7 ± 5	13.0	$24 (\pm 18) \times 10^{-6}$
glutamine	1	$0.51 (\pm 0.08) \times 10^3$	-16 ± 2	-3.4 ± 0.4	-39.6	$2.0 (\pm 0.3) \times 10^{-3}$

Table 4.

From: ees.yabbi.0.125716.726bf0e8@eesmail.elsevier.com on behalf of ABB

Sent: Fri 7/8/2011 2:06 AM

To: Luiz Augusto Basso

Subject: Manuscript number assigned

Dear Dr Basso,

Your submission entitled "Biochemical characterization of recombinant guaA-encoded guanosine monophosphate synthetase (EC 6.3.5.2) Mycobacterium tuberculosis H37Rv strain" has been assigned the following manuscript number: ABB1-11-298.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/yabbi/>.

Thank you for submitting your work to Archives of Biochemistry and Biophysics.

Kind regards,

D. Jones

Administrative Support Agent [24-Jan-11]

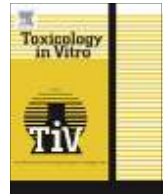
Archives of Biochemistry and Biophysics

Anexo B

In vitro effects of antiepileptics drugs on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain

A.M. Siebel, E.P. Rico, K.M. Capiotti, A.L. Piatto, C.T. Cusinato, **T.M.A. Franco**, M.R. Bogo, C.D. Bonan

Artigo publicado – *Toxicology in vitro*, 2010
24:1279-1284



In vitro effects of antiepileptic drugs on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain

A.M. Siebel^{a,b}, E.P. Rico^c, K.M. Capiotti^{a,b}, A.L. Piato^{a,b}, C.T. Cusinato^a, T.M.A. Franco^a, M.R. Bogo^{b,d}, C.D. Bonan^{a,b,*}

^a Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^d Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2010

Accepted 28 March 2010

Available online 31 March 2010

Keywords:

Acetylcholinesterase
Antiepileptic drugs
Nucleoside triphosphate
diphosphohydrolase
Ecto-5'-nucleotidase
Zebrafish

ABSTRACT

Carbamazepine (CBZ), phenytoin (PHT), and gabapentine (GBP) are classical antiepileptic drugs (AEDs) that act through a variety of mechanisms. We have tested the *in vitro* effects of CBZ, PHT, and GBP at different concentrations on ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities in zebrafish brain. CBZ inhibited ATP hydrolysis at 1000 μM (32%) whereas acetylcholine hydrolysis decreased at 500 μM (25.2%) and 1000 μM (38.7%). PHT increased AMP hydrolysis both at 500 μM (65%) and 1000 μM (64.8%). GBP did not promote any significant changes on ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities. These results have shown that CBZ can reduce NTPDase (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) and PHT enhance ecto 5'-nucleotidase activities. Therefore, it is possible to suggest that the AEDs induced-effects on ectonucleotidases are related to enzyme anchorage form. Our findings have also shown that high CBZ concentrations inhibit acetylcholinesterase activity, which can induce an increase of acetylcholine levels. Taken together, these results showed a complex interaction among AEDs, purinergic, and cholinergic systems, providing a better understanding of the AEDs pharmacodynamics.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Epilepsy, a neurological disorder characterized by the occurrence of spontaneous recurrent seizures, is one of the most common pathologies of the central nervous system (CNS), affecting individuals of all ages (Badawy et al., 2009; Banerjee et al., 2009). Epilepsy damages the brain as a whole showing significant influence on dynamic and functional properties, mental development, cognition, and behavior (Hamed, 2009). Classical AEDs such as GBP, PHT, and CBZ work through a variety of mechanisms, often

acting to suppress ion channels, promote gabaergic neurotransmission, and/or decrease glutamatergic neurotransmission. AEDs may be used for the treatment of several types of epilepsy and GBP, PHT and CBZ are treatments for partial and generalized tonic-clonic seizures (Rogawski and Löscher, 2004). Studies have suggested that AEDs can interfere in the purinergic (Borowicz et al., 1997, 2002) and cholinergic systems in CNS (Boccia et al., 2001; D'Antuono et al., 2007).

The purinergic system employs extracellular nucleotides as signaling molecules. ATP is a neurotransmitter co-released with other signaling molecules, such as glutamate, GABA, and acetylcholine in different subpopulations of neurons in CNS. ATP acts through activation of G-protein-coupled P2Y receptors and P2X ionotropic receptors, linked to Ca^{2+} channels (Burnstock, 2004, 2009; Pankratov et al., 2009). Extracellular nucleotides can be hydrolyzed by a variety of soluble or cell-surface-located enzymes named ectonucleotidases (Zimmermann et al., 1998). Nucleoside 5'-tri- and diphosphates may be hydrolyzed by members of the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase), ectonucleoside pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and alkaline

Abbreviations: AChE, acetylcholinesterase; AEDs, antiepileptic drugs; BuChE, butyrylcholinesterase; CBZ, carbamazepine; CNS, central nervous system; GBP, gabapentine; NTPDase, nucleoside triphosphate diphosphohydrolase; PHT, phenytoin.

* Corresponding author at: Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3353 4158; fax: +55 51 3320 3568.

E-mail address: cbonan@puccrs.br (C.D. Bonan).

phosphatase protein families. AMP may be hydrolyzed by the ecto-5'-nucleotidase family and alkaline phosphatases to produce the nucleoside adenosine (for review see Abbracchio et al. (2009)). In this way, ectonucleotidases control the availability of ligands (ATP, ADP, AMP and adenosine) for both nucleotide and nucleoside receptors and, consequently, the extent and duration of receptor activation (Chen and Guidotti, 2001). Therefore, this is an enzymatic pathway with double function of removing one signaling molecule, ATP, and generating a second one, adenosine, a well-known neuromodulator (Zimmermann, 2006; Abbracchio et al., 2009; Burnstock and Verkhratsky, 2009). Adenosine acts through four known subtypes of P1 metabotropic receptors (A_1 , A_{2A} , A_{2B} and A_3) and reduces excessive neuronal activity through inhibitory A_1 receptors, acting as an endogenous anticonvulsant (Fredholm et al., 2001; Sebastião and Ribeiro, 2009). Adenosine modulates the acetylcholine release through A_1 receptor-mediated inhibition or by A_{2A} receptor-mediated facilitation of release (Cunha, 2001).

In cholinergic neurotransmission, acetylcholine is synthesized by cholineacetyltransferase in the presynaptic neuron, then released into the synaptic cleft and bound to muscarinic (metabotropic) and nicotinic (ionotropic) acetylcholine receptors. After its release, acetylcholine is degraded by the cholinesterases that cleave acetylcholine into choline and acetate. Two different types of cholinesterases are able to hydrolyze acetylcholine: acetylcholinesterase (AChE) (E.C.3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BuChE) (E.C.3.1.1.8) (Soreq and Seidman, 2001). Cholinergic mechanisms, in particular those related to the activation of muscarinic receptors, regulate brain excitability and can promote and maintain synchronous epileptiform discharges (Liu et al., 1994; Nagao et al., 1996; Dickson and Alonso, 1997). Moreover, cholinergic agents, such as pilocarpine, produce limbic seizures that are followed by histopathological changes resembling that encountered in temporal lobe epileptic patients (Turski et al., 1989; Mello et al., 1993).

PHT and CBZ blocked the pilocarpine-induced increase on ATP, ADP, and AMP hydrolysis in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex in rats (Cognato et al., 2007). Moreover, CBZ inhibited *in vitro* ATP hydrolysis from synaptosomal plasma membranes (Horvat et al., 2006). GBP and other AEDs, when administered together with adenosine receptor antagonists, showed decreased effect in mice models of seizure (Zuchora et al., 2004). In rats, the supraeffective dose of CBZ (100 mg/kg) inhibited the activities of acetylcholinesterase (9.5%) and butyrylcholinesterase (24.7%) whereas the effective dose of CBZ (25 mg/kg) did not alter acetylcholine degradation (Mizuno et al., 2000). Moreover, Sudha et al. (1995) showed that PHT decreased acetylcholinesterase activity in the hippocampus (50 and 75 mg/kg) and in the striatum (75 mg/kg).

Zebrafish is a small freshwater teleost fish that has been used to study learning and memory process, development, pharmacology, toxicology, behavior, and teratology (Kosmehl et al., 2008; Bencan et al., 2009; Gerlai et al., 2009; Ingham, 2009; Yang et al., 2009). This specie has been used as a tool for the study of seizure and to screen potential novel AEDs (Baraban et al., 2005; Baraban, 2007; Berghmans et al., 2007). NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities have been characterized in zebrafish in our laboratory (Rico et al., 2003; Senger et al., 2004). Acetylcholinesterase is encoded by a single gene and butyrylcholinesterase was not found in zebrafish genome (Clemente et al., 2004). Other drugs used for neurological disorder treatments were tested *in vitro* (haloperidol, olanzapine, and sulpiride) and inhibited NTPDase and acetylcholinesterase activities whereas did not change ecto-5'-nucleotidase activity in zebrafish brain (Seibt et al., 2009a,b). However, haloperidol significantly increased the acetylcholinesterase activity after *in vivo* treatments (Seibt et al., 2009b).

Considering that zebrafish may be a model organism to study human diseases and drug mechanisms, and purinergic and cholin-

ergic systems have been described in this specie, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* effects of different concentrations of the antiepileptic drugs GBP, PHT, and CBZ on ectonucleotidase and acetylcholinesterase activities of zebrafish brain.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult wild-type zebrafish (*Danio rerio*) of both sexes were obtained from a commercial supplier (Red Fish, RS, Brazil) and acclimated for 2 weeks before the experiments in a 50 l thermostated aquarium filled with continuously aerated and unchlorinated water. The fish were conditioned at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 14–10 h light/dark cycle photoperiod. The animals were maintained healthy and free of any signs of disease and fed twice a day with commercial food for fish. The use and maintenance of zebrafish were according to the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" published by the US National Institutes of Health. The protocol was approved by the Ethics Committee of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS) under the number 085/06-CEP.

2.2. Chemicals

PHT, GBP, CBZ, acetylthiocholine, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), Trizma Base, EDTA, EGTA, sodium citrate, Coomassie blue, bovine serum albumin, malachite green, ammonium molybdate, polyvinyl alcohol, nucleotides, calcium, and magnesium chloride were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents used were from analytical grade.

2.3. *In vitro* treatments

PHT, GBP, and CBZ were tested at 10, 50, 100, 500, and 1000 μM . PHT and GBP were diluted in deionized water. CBZ was diluted in 2% ethanol. Control treatments with equal volume of vehicle were performed to exclude the ethanol effect on the enzyme activities. Antiepileptic drugs were added to the reaction medium before the preincubation with the enzyme and were maintained during the enzyme assays.

2.4. Determination of ectonucleotidase activities

The brain membranes for the ectonucleotidase assays were prepared as described previously by Barnes et al. (1993). For each membrane preparation, a pool of five whole brains was obtained and briefly homogenized in 60 vol. (v/w) of chilled Tris-citrate buffer (50 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, pH 7.4) in a glass-Teflon homogenizer. This homogenate was centrifuged at 1000g for 10 min and the pellet was discarded in order to remove cell debris. The supernatant was centrifuged for 25 min at 40,000g. The resultant pellet was frozen in liquid nitrogen and thawed in order to ensure the lysis of the brain membranes. The pellet was resuspended in Tris-citrate buffer and centrifuged for 20 min at 40,000g. The final pellet was resuspended and used in the enzyme assays. The samples were maintained at $2-4^\circ\text{C}$ throughout preparation.

NTPDase and 5'-nucleotidase assays were performed as described previously (Rico et al., 2003; Senger et al., 2004). Brain membranes of zebrafish (3 μg protein for NTPDase and 5 μg protein for 5'-nucleotidase) were added to the reaction medium containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 5 mM CaCl_2 (for the NTPDase activity) or 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) and 5 mM MgCl_2 (for the 5'-nucleotidase activity) at a total volume of 200 μl . The samples were preincubated for 10 min at 37°C and the reaction

was initiated by the addition of substrate (ATP, ADP or AMP) to a final concentration of 1 mM. After 30 min the reaction was stopped by the addition of 200 μ l 10% trichloroacetic acid and the samples were kept on ice during 10 min. In order to determine the inorganic phosphate released (Pi) 1 ml of a colorimetric reagent composed of 2.3% polyvinyl alcohol, 5.7% ammonium molybdate, and 0.08% malachite green was added to the samples for 20 min (Chan et al., 1986). The quantification of inorganic phosphate (Pi) released was determined spectrophotometrically at 630 nm and the specific activity was expressed as nanomole of Pi released per minute per milligram of protein. In order to correct non-enzymatic hydrolysis of the substrates we used controls with the addition of the enzyme preparation after the addition of trichloroacetic acid. Incubation times and protein concentrations were chosen to ensure the linearity of the reactions. All enzyme assays were performed in at least four different experiments, each one performed in triplicate.

2.5. Determination of acetylcholinesterase activity

Zebrafish were euthanized and their whole brains were removed by dissection. The brains (five whole brains for each sample) were homogenized on ice in 60 vol. (v/w) of 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, in a glass-Teflon homogenizer. Acetylcholinesterase activity was measured as the method described previously (Ellman et al., 1961) determining the rate of hydrolysis of acetylthiocholine (ACSh, 0.8 mM) in 2 ml assay solutions with 100 mM phosphate buffer, pH 7.5, and 1.0 mM DTNB. Samples containing protein (10 μ g) and the reaction medium described above were preincubated during 10 min at 25 °C followed by starting of reaction with addition of substrate. The hydrolysis of substrate was monitored by the formation of thiolate dianion of DTNB at 412 nm every 30 s for 2–3 min. The linearity of absorbance towards time and protein concentration was previously determined. Acetylcholinesterase activity was expressed as micromole of thiocholine (SCh) released per hour per milligram of protein. All enzyme assays were performed in at least four different experiments, each one performed in triplicate.

2.6. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method (Bradford, 1976) and bovine serum albumin was used as standard.

2.7. Statistical analysis

Results are expressed as means \pm S.D. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan post-hoc test, considering $P < 0.05$ as significant. SPSS 16.0 was used for statistical analysis.

3. Results

The *in vitro* effect of GBP, PHT, and CBZ (at concentrations ranging from 10 to 1000 μ M) was tested on acetylcholinesterase, NTP-Dase, and ecto-5'-nucleotidase activities in zebrafish brain. CBZ significantly decreased (32%; $P < 0.05$) ATP hydrolysis at 1000 μ M (285 ± 63.06 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ of protein) when compared to the ethanol group (419.54 ± 111.17 nmol Pi min⁻¹ mg⁻¹ of protein) (Fig. 1) whereas this drug did not alter both ADP and AMP hydrolysis (data not shown). The results demonstrated that CBZ inhibited (25.2% and 38.7%, respectively; $P < 0.05$) acetylcholinesterase activity at 500 μ M (24.13 ± 5.35 μ mol SCh h⁻¹ mg⁻¹ of protein) and at 1000 μ M (19.75 ± 3.76 μ mol SCh h⁻¹ mg⁻¹ of protein) when compared to the ethanol group (32.25 ± 6.49 μ mol SCh h⁻¹ mg⁻¹ of protein; Fig. 2).

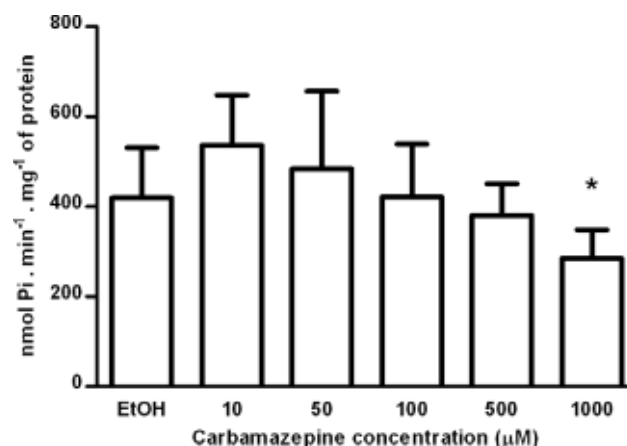


Fig. 1. *In vitro* effect of carbamazepine on ATP hydrolysis evaluated in different concentrations (10–1000 μ M). Bars represent the mean \pm S.D. The symbol (*) indicates significantly difference when compared to the ethanol group. The specific enzyme activity is reported as nanomole of inorganic phosphate released per minute per milligram of protein.

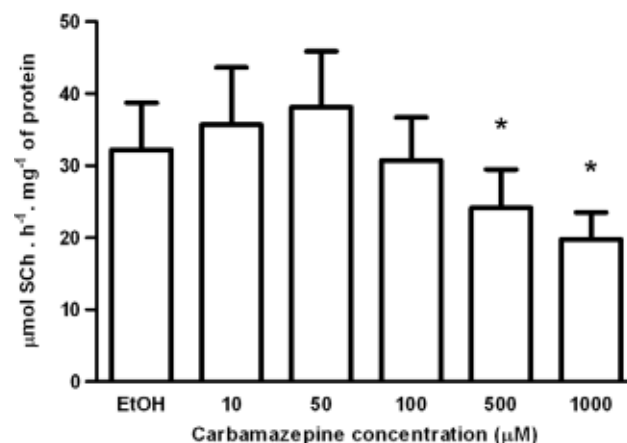


Fig. 2. *In vitro* effect of carbamazepine on acetylcholine hydrolysis evaluated in different concentrations (10–1000 μ M). Bars represent the mean \pm S.D. The symbol (*) indicates significantly difference when compared to the ethanol group. The specific enzyme activity is reported as micromole of thiocholine released per hour per milligram of protein.

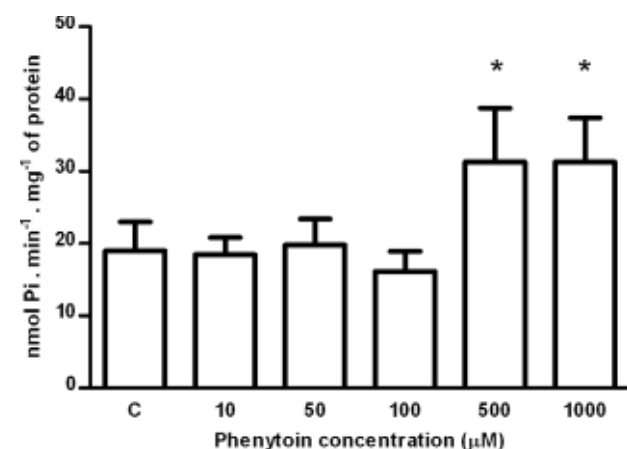


Fig. 3. *In vitro* effect of phenytoin on AMP hydrolysis evaluated in different concentrations (10–1000 μ M). Bars represent the mean \pm S.D. The symbol (*) indicates significantly difference when compared to the control group. The specific enzyme activity is reported as nanomole of inorganic phosphate released per minute per milligram of protein.

PHT significantly increased (65%; $P < 0.05$ and 64.8%; $P < 0.05$) AMP hydrolysis at 500 μM ($31.31 \pm 7.42 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of protein) and 1000 μM ($31.28 \pm 6.14 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of protein) when compared to the control group ($18.98 \pm 3.98 \text{ nmol Pi min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ of protein; Fig. 3). However, PHT did not change ATP, ADP, and acetylcholine hydrolysis (data not shown). Similarly, GBP did not alter ATP, ADP, AMP, and acetylcholine hydrolysis (data not shown).

4. Discussion

The interactions of AEDs and ectonucleotidases have been investigated and these drugs have demonstrated different effects in several studies. Cognato et al. (2007) observed the *in vitro* and *in vivo* effects of PHT, valproate, and CBZ on ectonucleotidase activities in synaptosomes from hippocampus and cerebral cortex of rats. These results have shown that these drugs did not alter the ectonucleotidase activities both *in vitro* and *in vivo* experiments in hippocampus and cerebral cortex. However, the authors observed that previous treatment with CBZ and PHT can modulate plastic events associated to the nucleotidase activities preventing the pilocarpine-induced increase on ATP, ADP, and AMP hydrolysis (Cognato et al., 2007). Horvat et al. (2006) observed ecto-ATPase inhibition in rat brain synaptosomal plasma membranes treated with CBZ. This effect may represent a potential neuromodulatory action of this drug given that by inhibiting ecto-ATPase activities, CBZ may increase the extracellular ATP content and decrease the production of adenosine.

Ectonucleotidases modulate activation of P2 or P1 receptors by controlling extracellular concentrations of ATP and adenosine. NTPDase family, which hydrolyzes both nucleoside triphosphates and diphosphates, comprises cell-surface-enzymes with an extracellular active site, anchored to the membrane via two transmembrane domains that are essential to catalytic activity and substrate specificity (Grinthal and Guidotti, 2006; Robson et al., 2006). The ectonucleotidase chain is also constituted by ecto-5'-nucleotidase, which is able to promote the hydrolysis of nucleoside monophosphates to adenosine. Unlike NTPDases, ecto-5'-nucleotidase is attached to the extracellular membrane by a glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchor (Sträter, 2006).

Changes in membrane constituents can affect membrane-bound enzymes activity. Cholesterol depletion from membranes of NTPDase1-expressing cells reduces ATPase activity to the same extent as solubilization does (Papanikolaou et al., 2005). Intra and intermolecular oxidative cross-linking decreases ATPase activity (Chiang and Knowles, 2008). These results showed that changes at the balance between stability and mobility of the transmembrane domains can alter NTPDase activity (Grinthal and Guidotti, 2006).

Our findings demonstrated that CBZ decreased NTPDase whereas did not change ecto-5'-nucleotidase activities. A study with human erythrocyte have shown that CBZ perturbed outer moiety lipids inducing a disordering effect on the polar head groups and acyl chains of the membrane lipid showing that CBZ can lead interactions in membrane bilayer (Suwalsky et al., 2006). Therefore, it is possible to suggest that the effects on NTPDase activities induced by CBZ may be due to changes promoted in the bilayer membrane. Previous studies from our laboratory have shown that other drug classes, such as antidepressant (Pedrazza et al., 2007) and antipsychotic drugs (Seibt et al., 2009a) also promoted different effects on NTPDase when compared with ecto-5'-nucleotidase activities, probably by modifying plasma membranes.

PHT did not change NTPDase while significant increase of ecto-5'-nucleotidase activity was observed. Ecto-5'-nucleotidase has

several functions, including generation of adenosine leading to the activation of adenosine receptors (Hunsucker et al., 2005). This enzymatic effect may represent further ways by PHT modulate the neuronal activity. Adenosine is known to be very effective in the suppression of seizures. Binding of adenosine to the high affinity A_1 receptor reduces excitability of the cells by modulation of Ca^{2+} and K^+ fluxes and inhibits the release of various neurotransmitters, such as glutamate, dopamine, serotonin, and acetylcholine (Boison, 2005, 2008).

Our results showed that CBZ and PHT can increase ATP and adenosine levels, respectively. It is possible to suggest that these effects are involved, at least partially, in the antiepileptic mechanisms of these AEDs. Although it has been shown that adenosine inhibits neurotransmission (Dunwiddie and Masino, 2001; Fredholm et al., 2005; Boison, 2008), some studies indicate that ATP can also inhibit synaptic transmission (Yoshioka and Nakata, 2004; Nakata et al., 2005). The colocalization of A_1 and $P2Y_1$ receptors in several regions in the brain suggests a potential heterodimerization and functional interaction mechanism between these receptors. $A_1/P2Y_1$ heterodimerization forms an ATP-sensitive adenosine receptor and ATP can work as an A_1 agonist to inhibit neurotransmission (Yoshioka and Nakata, 2004; Nakata et al., 2005). Furthermore, a cross-talk of A_1 - $P2Y_1$ receptors might be a mechanism by which low and high concentrations of adenosine or purines could regulate glutamate release (Tonazzini et al., 2007).

Acetylcholine is a neurotransmitter involved in essential brain functions, including memory and learning (Shaked et al., 2008). Acetylcholinesterase, the key enzyme that hydrolyzes and inactivates acetylcholine, modulates also non-cholinergic functions, such as glutamatergic and dopaminergic systems (Soreq and Seidman, 2001; Zimmermann and Soreq, 2006; Shaked et al., 2008). Several studies have shown the cholinergic system is also involved in the mechanisms related to epilepsy and acetylcholinesterase inhibitors lead to an increase in acetylcholine levels inducing seizures (Friedman et al., 2007; Pernot et al., 2009). Different studies have demonstrated the effect of AEDs on acetylcholinesterase activity and acetylcholine levels. Previous studies showed that cortical injury and enhanced neural excitability are associated with modifications in the isoform of acetylcholinesterase. The variation in distribution patterns suggested a possible isoform shift of acetylcholinesterase enzyme in epileptic brains from membrane adhered AChE-S protein, located in cellular layers, to the soluble AChE-R monomers, which may diffuse to extrasynaptic regions. The results suggested an increased production of AChE-R monomers, which may access the synaptic microenvironment and potentially protect the epileptic tissue from cholinergic hyperexcitation (Zimmermann et al., 2008). In another study with rats, chronic treatment with PHT (ranging from 5 to 75 mg/kg) did not modify significantly the acetylcholinesterase activity in the motor cortex, pyriform cortex, and olfactory bulb when compared to control group. On the other hand, PHT decreased acetylcholinesterase activity in the hippocampus (50 and 75 mg/kg) and also in the striatum (75 mg/kg) (Sudha et al., 1995). Likewise, in rats, acute treatment with effective dose of CBZ (25 mg/kg) enhances acetylcholine synthesis without affecting the degradation, increasing acetylcholine levels. The supraeffective tested dose of CBZ (100 mg/kg) decreased the activity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase and also inhibited acetylcholine synthesis, reducing the levels of this neurotransmitter. Therefore, effective dose of CBZ increased acetylcholine levels, which were reduced by increasing of CBZ dose (Mizuno et al., 2000). It also has been reported that CBZ had biphasic effects on acetylcholine release and synthesis (Zhu et al., 2002).

Previous studies have shown the IC_{50} of CBZ for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities were more than 300 μM (Mizuno et al., 2000). The authors suggest that the inhibitory ef-

fects of supraeffective CBZ concentrations on cholinesterase activities may not play a role in acetylcholine transmission (Mizuno et al., 2000). In contrast, both toxic concentration of acetylcholine receptor agonists, antagonists and cholinesterase inhibitor have been shown to have proconvulsant activities, whereas low doses of cholinesterase inhibitor reduced seizure activities (Bhattacharya et al., 1991; Cruickshank et al., 1994). This evidence supports the hypothesis that drastic elevation of cholinergic function induces seizure activity. The therapeutic ranges of serum concentration of CBZ are from 15 to 45 μM (Loiseau and Duche, 1995). Our results showed an inhibitory effect on acetylcholinesterase only at high CBZ concentrations (500 and 1000 μM). Therefore, the inhibitory effect on acetylcholinesterase at these high doses of CBZ could promote an increase of acetylcholine levels, which could induce a seizure activity or a neurotoxic effect promoted by CBZ high concentrations. Here, the CBZ biphasic profile also was observed in purinergic system. Our results demonstrated a trend to increase ATP hydrolysis in the presence of low doses of CBZ (10 and 50 μM) and a decreased hydrolysis of this neurotransmitter in high CBZ dose (1000 μM). Such results demonstrate that CBZ induces a complex set of effects characterized by a biphasic profile. Additional studies are required to verify the *in vivo* effect of the high CBZ doses in the seizure activity and purinergic and cholinergic transmission.

These findings indicate that AEDs could show different pharmacokinetic profile depending on relevant end points, such as route of administration, dose of the drug tested and animal model used in the study. However, there are some limitations about the side effects and resistance developed of AEDs. The discovery and screening of new molecular targets and AEDs may increase the treatment spectrum, which will be reached with pharmacology studies focusing to this issue (Stefan and Feuerstein, 2007; Bialer and White, 2010; Luna-Tortós et al., 2010). In summary, this study highlight that enzymes related to purinergic and cholinergic systems can be modulated by antiepileptic drugs in zebrafish. Furthermore, these findings can contribute to a better understanding about the pharmacology of classical AEDs and their interaction with purinergic and cholinergic neurotransmission.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and by the FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” #01.06.0842-00. A.M.S., A.L.P., and E.P.R. were recipient of fellowship from CNPq.

References

- Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Verkhratsky, A., Zimmermann, H., 2009. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends in Neurosciences* 32 (1), 19–29.
- Badawy, R.A.B., Harvey, A.S., Macdonell, R.A.L., 2009. Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: understanding the mechanisms of epilepsy – part 1. *Journal of Clinical Neuroscience* 16, 355–365.
- Banerjee, P.N., Filippi, D., Hauser, W.A., 2009. The descriptive epidemiology of epilepsy: a review. *Epilepsy Research* 85 (1), 31–45.
- Baraban, S.C., 2007. Emerging epilepsy models: insights from mice, flies, worms and fish. *Current Opinion in Neurology* 20 (2), 164–168.
- Baraban, S.C., Taylor, M.R., Castro, P.A., Baier, H., 2005. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131 (3), 759–768.
- Barnes, J.M., Murphy, P.A., Kirkham, D., Henley, J., 1993. Interaction of guanine nucleotides with [3H] kainate and 6-[3H]cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione binding in goldfish brain. *Journal of Neurochemistry* 61 (5), 1685–1691.
- Bencan, Z., Sledge, D., Levin, E.D., 2009. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 94 (1), 75–80.
- Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., Goldsmith, P., 2007. Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Research* 75, 18–28.
- Bhattacharya, S.K., Sen, A.P., Mitra, S.K., 1991. Effects of muscarinic receptor agonists and antagonists on response of non-extensor rats to maximal electroshock. *Indian Journal of Experimental Biology* 29 (3), 237–240.
- Bialer, M., White, H.S., 2010. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery* 9 (1), 68–82.
- Boccia, M.M., Acosta, G.B., Baratti, C.M., 2001. Memory improving actions of gabapentine in mice: possible involvement of central muscarinic cholinergic mechanism. *Neuroscience Letters* 311, 153–156.
- Boison, D., 2005. Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. *The Neuroscientist* 11 (1), 25–36.
- Boison, D., 2008. Adenosine as a neuromodulator in neurological diseases. *Current Opinion in Pharmacology* 8 (1), 2–7.
- Borowicz, K.K., Kleinrok, K., Czuczwar, S.J., 1997. N⁶-2-4-aminophenyl/ethyl-adenosine enhances the anticonvulsive activity of antiepileptic drugs. *European Journal of Pharmacology* 372 (2–3), 125–133.
- Borowicz, K.K., Luszczyk, J., Czuczwar, S.J., 2002. 2-Chloroadenosine, a preferential agonist of adenosine A₁ receptors enhances the anticonvulsant activity of carbamazepine and clonazepam in mice. *European Neuropsychopharmacology* 12, 173–179.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 218–254.
- Burnstock, G., 2004. Cotransmission. *Current Opinion on Pharmacology* 4, 47–52.
- Burnstock, G., 2009. Purinergic signalling: past, present and future. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42, 3–8.
- Burnstock, G., Verkhratsky, A., 2009. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiologica* 195, 415–447.
- Chan, K.M., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 157, 375–380.
- Chen, W., Guidotti, G., 2001. Soluble pyrophosphatase release ADP during ATP hydrolysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282, 90–95.
- Chiang, W.C., Knowles, A.F., 2008. Inhibition of human NTPDase₂ by modification of an intramembrane cysteine by p-chloromercuriphenylsulfonate and oxidative cross-linking of the transmembrane domains. *Biochemistry* 47 (33), 8775–8785.
- Clemente, D., Porteros, A., Weruaga, E., Alonso, J.R., Arenzana, F.J., Aijon, J., Arevalo, R., 2004. Cholinergic elements in the zebrafish central nervous system: histochemical and immunohistochemical analysis. *Journal of Comparative Neurology* 474, 75–107.
- Cognato, G.P., Bruno, A.N., da Silva, R.S., Bog, M.R., Sarkis, J.J.F., Bonan, C.D., 2007. Antiepileptic drugs prevent changes induced by pilocarpine model of epilepsy in brain ectonucleotidases. *Neurochemical Research* 32, 1046–1055.
- Cruickshank, J.W., Brudzynski, S.M., McLachlan, R.S., 1994. Involvement of M1 muscarinic receptors in the initiation of cholinergically induced epileptic seizures in the rat brain. *Brain Research* 643, 125–129.
- Cunha, R.A., 2001. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry International* 38, 107–125.
- D’Antuono, M., Kawasaki, H., Palmieri, C., Cúria, G., Biagini, G., Avoli, M., 2007. Antiepileptic drugs and muscarinic receptor-dependent excitation in the rat subiculum. *Neuropharmacology* 52, 1291–1302.
- Dickson, C.T., Alonso, A., 1997. Muscarinic induction of synchronous population activity in the entorhinal cortex. *The Journal of Neuroscience* 17, 6729–6744.
- Dunwiddie, T.V., Masino, S.A., 2001. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annual Review of Neuroscience* 24, 31–55.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andrés, J.V., Feartherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95.
- Fredholm, B.B., Ijzerman, A.P., Jacobson, J.K., Klotz, K., Linden, J., 2001. International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews* 53 (4), 527–552.
- Fredholm, B.B., Chen, J.F., Cunha, R.A., Svenningsson, P., Vaugeois, J.M., 2005. Adenosine and brain function. *International Review of Neurobiology* 63, 191–270.
- Friedman, A., Behrens, C.J., Heinemann, U., 2007. Cholinergic dysfunction in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 48 (5), 126–130.
- Gerlai, R., Fernandes, Y., Pereira, T., 2009. Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: towards the development of an automated aversive task. *Behavioural Brain Research* 201, 318–324.
- Grinthal, A., Guidotti, G., 2006. CD39, NTPDase₁, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why? *Purinergic Signalling* 2, 391–398.
- Hamed, S.A., 2009. The aspects and mechanisms of cognitive alterations in epilepsy: the role of antiepileptic medication. *CNS Neuroscience and Therapeutics* 15, 134–156.
- Horvat, A., Orlic, T., Banjac, A., Momic, T., Petrovic, S., Demajo, M., 2006. Inhibition of rat brain ecto-atpase activity by various drugs. *General Physiology and Biophysics* 25, 91–105.

- Hunsucker, S.A., Mitchell, B.S., Spychala, J., 2005. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacology and Therapeutics* 107, 1–30.
- Ingham, P.W., 2009. The power of the zebrafish for disease analysis. *Human Molecular Genetics* 18, 107–112.
- Kosmehl, T., Hallare, A.V., Braunbeck, T., Hollert, H., 2008. DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutation Research* 650, 1–14.
- Liu, Z., Nagao, T., Desjardins, C.G., Gloor, P., Avoli, M., 1994. Quantitative evaluation of neuronal loss in the dorsal hippocampus in rats with longterm pilocarpine seizures. *Epilepsy Research* 17, 237–247.
- Loiseau, P., Duché, B., 1995. Carbamazepine clinical use. In: Levy, R.H., Mattson, R.H., Meldrum, B.S. (Eds.), *Antiepileptic Drugs*, fourth ed. Raven Press, New York, pp. 555–566.
- Luna-Tortós, C., Fedrowitz, M., Löscher, W., 2010. Evaluation of transport of common antiepileptic drugs by human multidrug resistance-associated proteins (MRP1, 2 and 5) that are overexpressed in pharmacoresistant epilepsy. *Neuropharmacology* 18, 1–14.
- Mello, L.E., Cavalheiro, E.A., Tan, A.M., Kupfer, W.R., Pretorius, J.K., Babb, T.L., Finch, D.M., 1993. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 34, 985–995.
- Mizuno, K., Okada, M., Murakami, T., Kamata, G.Z., Kawata, Y., Wada, K., Kaneko, S., 2000. Effects of carbamazepine on acetylcholine release and metabolism. *Epilepsy Research* 40, 187–195.
- Nagao, T., Alonso, A., Avoli, M., 1996. Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. *Neuroscience* 72, 399–408.
- Nakata, H., Yoshioka, K., Kamiya, T., Tsuga, H., Oyanagi, K., 2005. Functions of heteromeric association between adenosine and P2Y receptors. *Journal of Molecular Neuroscience* 26 (2–3), 233–238.
- Pankratov, Y., Lalo, U., Krishtal, O.A., Verkhratsky, A., 2009. P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* 158, 137–148.
- Papanikolaou, A., Papafotika, A., Murphy, C., Papamarcaki, T., Tsolas, O., Drab, M., Kurzchalia, T.V., Kasper, M., Christoforidis, S., 2005. Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ectonucleotidase CD39. *Journal of Biological Chemistry* 15, 26406–26414.
- Pedraza, E.L., Senger, M.R., Pedraza, L., Zimmermann, F.F., Sarkis, J.J.F., Bonan, C.D., 2007. Sertraline and clomipramine inhibit nucleotide catabolism in rat brain synaptosomes. *Toxicology In Vitro* 21, 671–676.
- Pernot, F., Carpentier, P., Baille, V., Testylier, G.A., Beaup, C., Foquin, A., Filliat, P., Liscia, P., Coutan, M., Piérard, C., Béracochea, D., Dorandeu, F., 2009. Intra-hippocampal cholinesterase inhibition induces epileptogenesis in mice without evidence of neurodegenerative events. *Neuroscience* 162 (4), 351–365.
- Rico, E.P., Senger, M.R., Fauth, M.G., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2003. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Science* 73, 2071–2082.
- Robson, S.C., Sévigny, J., Zimmermann, H., 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* 2, 409–430.
- Rogawski, M.A., Löscher, W., 2004. The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience* 5 (7), 553–564.
- Sebastião, A.M., Ribeiro, J.A., 2009. Adenosine receptors and the central nervous system. *Handbook of Experimental Pharmacology* 193, 471–534.
- Seibt, K.J., Oliveira, R.L., Rico, E.P., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2009a. Antipsychotic drugs inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicology In Vitro* 23, 78–82.
- Seibt, K.J., Oliveira, R.L., Rico, E.P., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2009b. Typical and atypical antipsychotics alter acetylcholinesterase activity and AChE expression in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology and Pharmacology* 150 (1), 10–15.
- Senger, M.R., Rico, E.P., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2004. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 139 (2), 203–207.
- Shaked, I., Zimmermann, G., Soreq, H., 2008. Stress-induced alternative splicing modulations in brain and periphery. *Annals of the New York Academy of Science* 1148, 269–281.
- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase: news roles for old actor. *Nature Reviews Neuroscience* 2 (4), 294–302.
- Stefan, H., Feuerstein, T.J., 2007. Novel anticonvulsant drugs. *Pharmacology and Therapeutics* 113, 165–183.
- Sträter, N., 2006. Ecto-5'-nucleotidase: structure function relationships. *Purinergic Signalling* 2, 343–350.
- Sudha, S., Lakshmanan, M.K., Pradhan, N., 1995. Chronic phenytoin induced impairment of learning and memory with associated changes in brain acetylcholine esterase activity and monoamine levels. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 52 (1), 119–124.
- Suwalsky, M., Mennickent, S., Norris, B., Villena, F., Sotomayor, C.P., 2006. Effects of the antiepileptic drug carbamazepine on human erythrocytes. *Toxicology In Vitro* 20, 1363–1369.
- Tonazzini, I., Trincavelli, M.L., Storm-Mathisen, J., Martini, C., Bergersen, L.H., 2007. Co-localization and functional cross-talk between A1 and P2Y1 purine receptors in rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience* 26, 890–902.
- Turski, L., Ikonomidou, C., Turski, W.A., Bortolotto, Z.A., Cavalheiro, E.A., 1989. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse* 3, 154–171.
- Yang, L., Ho, N.Y., Alshut, R., Legradi, J., Weiss, C., Reischl, M., Mikut, R., Liebel, U., Müller, F., Strähle, U., 2009. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reproductive Toxicology* 28 (2), 245–253.
- Yoshioka, K., Nakata, H., 2004. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system purinergic receptor complex: generating adenosine nucleotide-sensitive adenosine receptors. *Journal of Pharmacological Sciences* 94, 88–94.
- Zhu, G., Okada, M., Murakami, T., Kawata, Y., Kamata, A., Kaneko, S., 2002. Interaction between carbamazepine, zonisamide and voltage-sensitive Ca²⁺ channel on acetylcholine release in rat frontal cortex. *Epilepsy Research* 49 (1), 49–60.
- Zimmermann, H., 2006. Nucleotide signaling in nervous system development. *European Journal of Physiology* 452, 573–588.
- Zimmermann, G., Soreq, H., 2006. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell and Tissue Research* 326, 655–669.
- Zimmermann, H., Braun, N., Kegel, B., Heine, P., 1998. New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Neurochemistry International* 32, 421–425.
- Zimmermann, G., Njunting, M., Ivens, S., Tolner, E., Behrens, C.J., Gross, M., Soreq, M., Heinemann, U., Friedman, A., 2008. Acetylcholine-induced seizure-like activity and modified cholinergic gene expression in chronically epileptic rats. *European Journal of Neuroscience* 27, 965–975.
- Zuchora, B., Wielos, M., Urbanska, E.M., 2004. Adenosine A1 receptors and the anticonvulsant potential of drugs effective in the model of 3-nitropropionic acid-induced seizures in mice. *European Neuropsychopharmacology* 15, 85–93.