



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Purificação e Caracterização da proteína Hipoxantina-Guanina  
Fosforibosiltransferase (EC 2.4.2.8) de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

Autor  
**Gisele Biazus**

Orientador  
**Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos**

Co-orientador  
**Prof. Dr. Luiz Augusto Basso**

Porto Alegre  
Março de 2009



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências  
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**Purificação e Caracterização da proteína Hipoxantina-Guanina  
Fosforibosiltransferase (EC 2.4.2.8) de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular  
como requisito para a obtenção  
do grau de Mestre.

Autor

**Gisele Biazus**

Orientador

**Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos**

Co-orientador

**Prof. Dr. Luiz Augusto Basso**

Porto Alegre  
Março de 2009

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus orientadores Prof. Diógenes Santiago Santos e Prof. Luiz Augusto Basso pela oportunidade, ensinamentos e apoio dispensado na realização deste trabalho.

Ao Christopher Z. Schneider e Rodrigo G. Ducati pela ajuda, apoio, atenção e ensinamentos durante a execução deste trabalho.

À Jocelei, Gaby, Claudinha e Eraldo pela amizade, apoio e ensinamentos.

Aos colegas do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional e Quatro G Ltda. Pesquisa & Desenvolvimento Ltda pelo carinho, amizade, ajuda e força nos momentos mais difíceis que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Também agradeço à, M<sup>a</sup> Gleci A. Ferreira e Renilda Trapp de Mello pela amizade e apoio.

À Ana Paula Moreira pela amizade, ajuda e “quebra-galhos” durante a execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS.

À minha família pelo amor, carinho, compreensão, paciência e pela força para seguir em frente nos momentos difíceis, em especial ao Maurício pelo apoio e compreensão nos momentos de stress.

Agradeço, enfim, a todos que de alguma forma, contribuíram não só para a realização deste trabalho, como também para a minha formação pessoal e profissional. Muito obrigada a todos.

## ÍNDICE

<b>Agradecimentos</b>	i
<b>Lista de Abreviaturas</b>	iv
<b>Resumo</b>	vi
<b>Abstract</b>	vii
<b>1.Introdução e Objetivos</b>	
<b>1.1 Introdução</b>	1
1.1.1 Tuberculose: Uma visão geral	1
1.1.2 Tuberculose e latência	5
1.1.3 Tuberculose e HIV	6
1.1.4 Tratamento e cepas resistentes	7
1.1.5 Desenvolvimento de novas drogas	9
1.1.6 Metabolismo de nucleotídeos	10
1.1.7 Via de salvamento de purinas	11
1.1.8 Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase	13
<b>1.2 Objetivo geral</b>	16
1.2.1 Objetivos específicos	16
<b>2. Manuscrito do Trabalho Experimental</b>	17
2.1 Title Page	18
2.2 Abstract	20
2.3 Introduction	21
2.4 Materials and methods	24
2.5 Results and discussion	28
2.6 Acknowledgments	32
2.7 References	33
2.8 Figure legends	38
2.9 Figures	39
2.10 Tables	44
<b>3. Considerações Finais</b>	46
<b>Referências Bibliográficas</b>	49
<b>Anexo I:</b>	
Teste de purificação da proteína recombinante HGPRT de <i>M. tuberculosis</i>	53

## **AnexoII**

Determinação do estado oligomérico em solução da proteína recombinante

HGPRT de *M. tuberculosis* 54

## **AnexoIII**

Cristalização da proteína recombinante HGPRT de *M. tuberculosis* 56

## **Anexo IV**

Submissão do Manuscrito 59

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADA:** adenosina deaminase

**AIDS:** Síndrome da Deficiência Imune Adquirida

**AMP:** Adenosina 5`monofosfato

**APRT:** Adenina fosforibosiltransferase

**ATP:** Adenosina trifosfato

**Da:** Dalton

**dATP:** deoxi-adenosina trifosfato

**dGTP:** deoxi-guanosina trifosfato

***E. coli:*** *Escherichia coli*

**FPLC:** cromatografia líquida de rápida performance

**GMP:** Guanosina 5`-monofosfato

**GPRT:** Guanosina fosforibosiltransferase

**GTP:** Guanosina trifosfato

**HGPRT:** Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

**HIV:** Vírus da Imunodeficiência Humana

**HGXPRT:** Hipoxantina-guanina-xantina fosforibosiltransferase

**IFN- $\gamma$ :** interferon- $\gamma$

**IMP:** inosina 5`-monofosfato

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

**LB:** meio de cultura Luria – Bertani

***lon:*** gene que codifica uma protease dependente de ATP

**MDR-TB:** tuberculose resistente a múltiplas drogas

**OD<sub>600</sub>:** Densidade Óptica a 600 nm

**omp T:** gene que codifica uma protease de membrana

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PKnG:** Proteína quinase G

**PNP:** Purina nucleosídeo fosforilase

**PPi:** Pirofosfato inorgânico

**PRPP:** 5-fosforribosil-1-pirofosfato

**PRT:** Purina fosforibosiltransferase

**SAXS:** espalhamento de raio X de baixo ângulo

**SDS-PAGE:** Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

**TB:** Tuberculose

**TNF- $\alpha$ :** Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$

**XPRT:** Xantina fosforibosiltransferase

**XDR-TB:** Tuberculose extensivamente resistente a drogas

## RESUMO

A tuberculose humana (TB), causada por um único agente infeccioso, *Mycobacterium tuberculosis*, representa uma ameaça global liderando a morte em adultos, responsável por cerca de dois milhões de óbitos por ano no mundo. Estima-se que aproximadamente um terço da população está latentemente infectada com o bacilo. A Índia, China, Indonésia, África do Sul e Nigéria são os primeiros cinco países do *ranking* com maiores números absolutos de casos e o Brasil encontra-se na 15ª posição. O *M. tuberculosis* pode permanecer viável dentro da célula do hospedeiro infectado por longo tempo. Esta condição é chamada de TB latente, que é a forma não contagiosa da doença, onde a bactéria permanece inativa. Agentes quimioterápicos mais eficazes e menos tóxicos são necessários para reduzir a duração do tratamento atual, assim como melhorar as possibilidades de tratamento para as cepas MDR-TB e XDR-TB. Além disso, há necessidade de um tratamento eficaz para a TB latente, impedindo que a doença se desenvolva para a forma ativa e, também, drogas que não interfiram com os anti-retrovirais, utilizados para o tratamento da AIDS. Neste contexto, enzimas envolvidas no salvamento de purinas são de interesse particular. A hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT – EC 2.4.2.8) é uma enzima chave da via de salvamento de purinas que catalisa a transferência reversível, dependente de magnésio, de um grupo fosforibosil do 5-fosfo- $\alpha$ -D-ribosil-pirofosfato (PRPP) para uma base purina (hipoxantina ou guanina) para formar o ribonucleotídeo purina, inosina monofosfato ou guanosina monofosfato, liberando pirofosfato (PPi). Neste trabalho, relatamos a clonagem, a expressão em células *E. coli* BL21(DE3), a purificação para homogeneidade, o sequenciamento N-terminal, a análise da espectrometria de massas e a determinação dos parâmetros cinéticos aparentes da enzima HGPRT.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, Via de salvamento de purinas, Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, Purificação da proteína, Parâmetros cinéticos.



## ABSTRACT

Human tuberculosis (TB), caused by an infectious agent, *Mycobacterium tuberculosis*, represents a global threat leading the causes of death in adults, responsible for killing approximately 2 million of people a year throughout the world. It is estimated that one third of the population is latently infected with the bacillus. India, China, Indonesia, South African, and Nigeria are the first five countries in the ranking of the greatest absolute numbers of cases and Brazil is in the 15<sup>th</sup> position. The *M. tuberculosis* can remain viable in the infected host cell for a long time. This condition is called latent TB, which is the non-contagious form of the disease when the bacteria persists inactive. More efficient and less toxic chemotherapy agents are needed to reduce the duration of current treatments, as well as to improve the possibilities of treatment for MDR-TB and XDR-TB strains. Moreover, two major approaches in combating this disease are a more effective treatment to latent TB, urgent to prevent the disease developing to the active form, and drugs that do not interfere with the anti-retroviral therapy used for AIDS. Enzymes involved in purine salvage pathway are of special interest to this effort. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT; EC 2.4.2.8) is a purine salvage enzyme that catalyzes the  $Mg^{+2}$ -dependent reversible transfer of the 5'-phosphoribosyl group from  $\alpha$ -D-ribofuranose 1'-pyrophosphate 5'-phosphate (also known as 5'-phosphorybosil- $\alpha$ -1'-pyrophosphate; PRPP) to a purine basis (guanine, hypoxanthine) to form the corresponding ribonucleotides IMP (inosine 5'-monophosphate), and GMP (guanosine 5'-monophosphate) with the release of P<sub>Pi</sub> (inorganic pyrophosphate). In this work, we have reported the cloning, expression in *E. coli* BL21(DE3) cells, purification for the homogeneity, N-terminal sequencing, mass spectrometry analysis, and determination of apparent steady-state kinetic parameters of HGPRT enzyme.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Purine salvage pathway, Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, Protein purification, Kinetic parameters.

# 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

## 1.1 Introdução

### 1.1.1 Tuberculose: Uma visão geral

Entre os séculos XVII e XVIII, a tuberculose humana (TB), foi conhecida como “Consumption”, “White Plague”, “phthisis” ou “wasting disease” devido aos seus graves sintomas clínicos. A TB estabeleceu-se em todos os níveis sociais, afligindo muitos intelectuais e artistas como Frédéric Chopin, Paganini, Eleanor Roosevelt, Charlotte Bronte, Lord Byron, Castro Alves, Alvarez de Azevedo, Augusto dos Anjos, Noel Rosa, entre muitos outros. Robert Koch, em 1882, identificou o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* como o agente etiológico da TB; em 1890 anunciou a descoberta de uma droga para TB e, logo após, ferramentas para diagnóstico, como a coloração de Ziehl-Nielsen e a tuberculina foram identificados, tornando-se os principais diagnósticos para a doença [1]. Entre 1906 e 1919, em Paris, Camille Calmett e Albert Guérin desenvolveram a vacina BCG (Bacille Calmette-Guérin) com bacilo vivo atenuado sendo administrada profilaticamente em crianças para combater, especialmente, as formas extrapulmonares de TB [2].

Com os programas de controle da TB reforçados pelo sucesso da quimioterapia, a TB tornou-se altamente controlada, mas nunca realmente desapareceu. Atualmente, essa doença representa uma ameaça global, tornando-se a causa líder de morte em adultos devido a um único agente infeccioso, o *M. tuberculosis*, sendo responsável por cerca de dois milhões de mortes por ano no mundo. Estima-se que 2 bilhões de pessoas, cerca de um terço da população mundial, estejam latentemente infectadas com o bacilo e que 1 em 10 pessoas

desenvolverá a doença ativa ao longo de sua vida. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou a ocorrência de 8,8 milhões de novos casos de TB no ano de 2005 e 9,2 milhões em 2006, com 1,7 milhões de mortes neste último ano, matando mais pessoas que a malária e AIDS juntas [1, 3, 4]. Índia, China, Indonésia, África do Sul e Nigéria são os primeiros cinco países do *ranking* com maiores números absolutos de casos, apresentando a região africana a maior taxa de incidência (com 363 casos por 100.000 habitantes). O Brasil encontra-se na 15ª posição, com 50 casos por 100.000 habitantes (tabela 1) [4].

	POPULATION 1000s	INCIDENCE <sup>a</sup>				PREVALENCE ALL FORMS		MORTALITY ALL FORMS		HIV PREV. IF INCIDENT TB CASES <sup>b</sup>
		ALL FORMS		SMEAR-POSITIVE		NUMBER 1000s	PER 100 000 POP PER YEAR	NUMBER 1000s	PER 100 000 POP PER YEAR	
		NUMBER 1000s	PER 100 000 POP PER YEAR	NUMBER 1000s	PER 100 000 POP PER YEAR					
1 India	1 151 751	1 933	168	867	75	3 445	299	325	28	1.2
2 China	1 320 864	1 311	99	590	45	2 658	201	201	15	0.3
3 Indonésia	228 864	534	234	240	105	578	253	88	38	0.6
4 South Africa	48 282	454	940	184	382	482	998	105	218	44
5 Nigéria	144 720	450	311	198	137	890	615	117	81	9.6
6 Bangladesh	155 991	351	225	158	101	610	391	70	45	0.0
7 Ethiopia	81 021	306	378	136	168	520	641	68	83	6.3
8 Pakistan	160 943	292	181	131	82	423	263	55	34	0.3
9 Philippines	86 264	248	287	111	129	373	432	39	45	0.1
10 DR Congo	60 644	237	392	105	173	391	645	51	84	9.2
11 Russian Federation	143 221	153	107	68	48	179	125	24	17	3.8
12 Viet Nam	86 206	149	173	66	77	194	225	20	23	5.0
13 Kenya	36 553	141	384	56	153	122	334	26	72	52
14 UR Tanzania	39 459	123	312	53	135	181	459	26	66	18
15 Uganda	29 899	106	355	46	154	168	561	25	84	16
16 Brazil	189 323	94	50	59	31	104	55	7.6	4.0	12
17 Mozambique	20 971	93	443	39	186	131	624	24	117	30
18 Thailand	63 444	90	142	40	62	125	197	13	20	11
19 Myanmar	48 379	83	171	37	76	82	169	6.1	13	2.6
20 Zimbabwe	13 228	74	557	30	227	79	597	17	131	43
21 Cambodia	14 197	71	500	31	220	94	665	13	92	9.6
22 Afghanistan	26 088	42	161	19	73	60	231	8.3	32	0.0
High-burden countries	4 150 313	7 334	177	3 265	79	11 889	286	1 330	32	11
AFR	773 792	2 808	363	1 203	155	4 234	547	639	83	22
AMR	899 388	331	37	165	18	398	44	41	4.5	6.4
EMR	544 173	570	105	256	47	826	152	108	20	1.1
EUR	887 455	433	49	194	22	478	54	62	7.0	3.0
SEAR	1 721 049	3 100	180	1 391	81	4 975	289	515	30	1.3
WPR	1 764 231	1 915	109	860	49	3 513	199	291	17	1.2
Global	6 590 088	9 157	139	4 068	62	14 424	219	1 656	25	7.7

Tabela 1: *Ranking* dos países com maiores taxas de incidência de TB.

Fonte: WHO, 2008

A TB é uma doença infecto-contagiosa causada principalmente pelo *M. tuberculosis*, uma das espécies patogênicas do gênero *Mycobacterium*. Atualmente, existem aproximadamente 70 espécies conhecidas, sendo a minoria causadora de doenças no ser humano. Entre as espécies patogênicas estão *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium leprae* [5]. O *M. tuberculosis* é um patógeno intracelular de crescimento lento que estabelece sua infecção preferencialmente no sistema pulmonar, onde normalmente é condicionado em um estado de latência por um período de tempo variável, em que o sistema imune do hospedeiro prevalecer. A tuberculose também pode afetar a pleura, o sistema nervoso, linfático, circulatório e urogenital, os ossos, as articulações e até mesmo a pele, cujo processo patológico e inflamatório produz características como enfraquecimento, febre, perda de peso, sudorese noturna, dor no peito, insuficiência respiratória, tosse e hemoptise (rompimento de vasos sanguíneos na TB pulmonar) [6]. O sequenciamento completo do genoma da linhagem *M. tuberculosis* H37Rv permitiu a identificação de algumas características únicas do bacilo, como um cromossoma circular com 4.411,529 pares de bases e um conteúdo de G+C de 65,6%. A estrutura da parede celular é extremamente incomum, quando comparada com outras bactérias. Uma característica marcante é que até 60% da parede celular micobacteriana é composta de lipídeos incomuns, denominados de ácidos micólicos, que consiste basicamente de ácidos graxos de cadeia longa com 60 até 90 carbonos [1, 7].

O principal meio de transmissão da TB ocorre por partículas infecciosas, que podem permanecer em suspensão por horas. Assim, a TB é transmitida pela inalação de aerossóis, contendo o *M. tuberculosis*, geradas pela emissão a partir de uma pessoa ativamente infectada [1, 8, 9]. Essas partículas podem conter uma

quantidade muito pequena de bacilos como foi demonstrado em experimentos com modelos animais, onde partículas em suspensão continham de 1 a 10 bacilos [1]. O bacilo, uma vez no pulmão, é internalizado através de fagocitose pelos macrófagos alveolares, onde eles podem ser destruídos nos lisossomas ou então escapar e sobreviver dentro do macrófago. Esses macrófagos infectados tanto podem permanecer no pulmão como se disseminarem para outros órgãos do corpo humano. A fagocitose dos bacilos pelos macrófagos procede através de uma série de invaginações da membrana, brotamentos e eventos de fusão, resultando na formação do fagossoma. A entrada do bacilo, no macrófago, ocorre via moléculas de receptores de diferentes tipos que podem estar relacionadas à estrutura complexa da superfície celular da micobactéria (Figura 1) [9]. Depois da penetração no trato respiratório, o bacilo infecta macrófagos, enquanto linfócitos-T  $CD4^+$  e linfócitos  $T\gamma\delta$  produzem interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina-2, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e fator estimulador de colônias de macrófagos, que ativam macrófagos e células citotóxicas para inibir seu crescimento intracelular [10].

A maioria das pessoas que entram em contato com o bacilo regula a infecção inicial por manter uma resposta imune mediada por células que controlam a infecção, mas que pode levar a uma população residual de micobactérias viáveis. A TB primária desenvolve-se dentro de um ou dois anos depois de uma infecção inicial e está geralmente associada com uma infecção disseminada. Porém, existe a possibilidade da infecção se desenvolver ao longo da vida (a chamada TB pós-primária), que é causada pela reativação da bactéria e ocorre predominantemente nos pulmões. O risco da doença se manifestar depende do estado imune do indivíduo; sendo assim, pessoas co-infectadas com HIV ou com a imunidade

diminuída por outras doenças têm uma incidência mais alta de ambas as formas da doença [11].

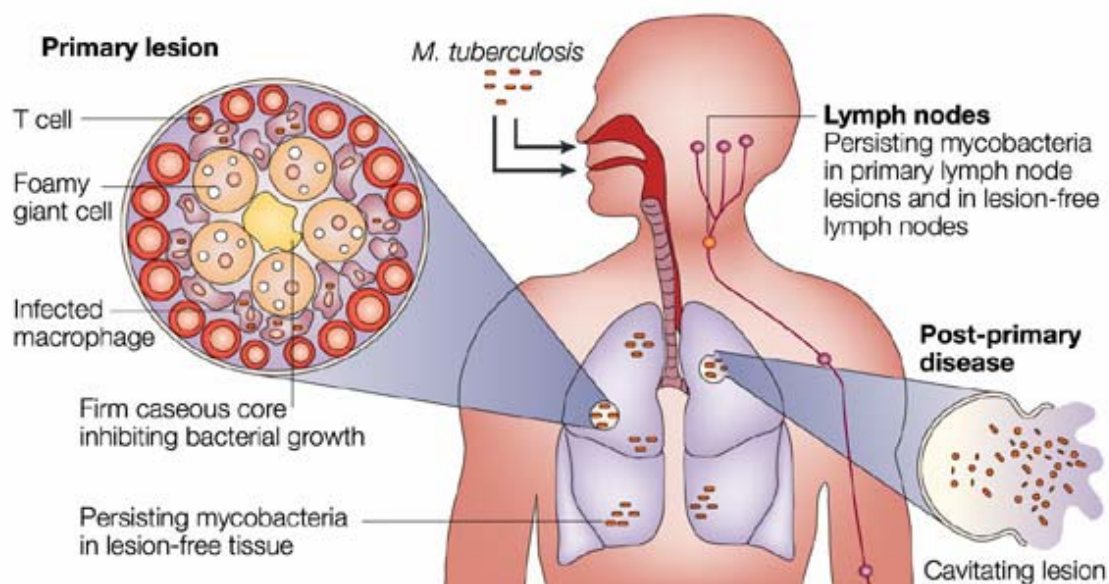


Figura 1: Esquema da infecção do *M. tuberculosis*

Fonte: Nature Reviews Microbiology, 2003

### 1.1.2. Tuberculose e Latência

Uma capacidade adicional do *M. tuberculosis* é permanecer viável dentro das células do hospedeiro infectado por longo tempo, controlando a replicação bacteriana, impedindo a progressão da doença e limitando-a ao local inicial da infecção. Esta condição é chamada de TB latente, que é a forma não contagiosa da doença, onde a bactéria permanece inativa, período durante o qual a pessoa infectada não apresenta TB clinicamente aparente. Isto é o que ocorre com a maioria dos indivíduos saudáveis que são infectados com o *M. tuberculosis*, devido à capacidade do bacilo de estabelecer e manter latência, pois a completa eliminação do patógeno é lenta e geralmente difícil de ser atingida. O bacilo pode permanecer

neste estado “dormente” por meses, anos ou até décadas. O mecanismo de latência do bacilo da TB no hospedeiro ainda é desconhecido; entretanto, acredita-se que esses mecanismos sejam geneticamente programados e que envolvam várias rotas de sinalização intracelular, podendo ser influenciados por fatores associados à imunidade do hospedeiro, incluindo condições supressoras do sistema imune, como co-infecção com HIV, terapia esteróide, idade e má nutrição [6, 12, 13]. Sabe-se que dentro do fagossoma, o *M. tuberculosis* secreta proteínas que impedem a fusão do fagossoma ao lisossoma, evitando assim a sua destruição. Especula-se que as micobactérias patogênicas interferem diretamente nas vias de tráfico do hospedeiro através da expressão de suas próprias moléculas de transdução de sinal, especialmente a PkG (proteína quinase G), que é uma das várias proteínas quinases serina/treonina tipo eucariótica, encontradas em *M. tuberculosis* [14]. Além disso, a sobrevivência do bacilo da TB dentro do organismo do hospedeiro também ocorre devido a sua espessa parede celular que fornece grande resistência contra os mecanismos microbicidas dos macrófagos [9].

### **1.1.3 Tuberculose e HIV**

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a TB formam uma forte combinação. O HIV promove a progressão da infecção latente da TB para a doença ativa e essa associação é a causa líder de morte em pessoas soropositivas. A luta contra a associação HIV-TB permanece entre as prioridades mais altas da OMS [15]. Em 2006, 200.000 pessoas co-infectadas com HIV morreram e mais de 30% dos casos de TB na África são em pessoas co-infectadas com HIV. O risco de desenvolver TB depois de um contato infeccioso tem sido estimado entre 5 a 15% por ano em pacientes infectados com HIV [4, 10]

As características da doença e a apresentação clínica diferem de acordo com o grau de imunidade da pessoa. De fato, a figura clássica de TB pulmonar é vista em pacientes com contagem normal de células CD4<sup>+</sup>, como ocorre em pacientes não severamente imunocomprometidos. Nesses pacientes, os sintomas são principalmente tosses, suores noturnos e perda de peso. Em contraste, em pacientes infectados com HIV, severamente imunocomprometidos ocorre sintomas e sinais mais atípicos, existindo associação entre TB pulmonar e extrapulmonar. Esse tipo de associação pode ocorrer em 9 a 40% dos casos [10, 15].

Durante a infecção pelo HIV, a produção de IFN- $\gamma$  é drasticamente diminuída, em paralelo com a redução de linfócitos-T CD4<sup>+</sup>, o que leva a um risco marcadamente alto de desenvolver reativação ou reinfecção pelo *M. tuberculosis*. A produção de citocinas pró-inflamatórias pelos granulomas infectados tem sido associada com a alta viremia de HIV, que pode acelerar o caminho para uma imunossupressão severa [10].

#### **1.1.4 Tratamento e Cepas Resistentes**

A quimioterapia efetiva da TB deve incluir ação bactericida contra o crescimento rápido do organismo e subsequente esterilização dos bacilos dormentes. Entre os métodos de controle disponíveis para *M. tuberculosis* estão tratamento e diagnóstico precoces, tratamento da latência e a vacinação por BCG [2]. O tratamento da TB envolve uma quimioterapia composta de diversos medicamentos. As drogas de primeira linha de uso são isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida. Essa terapia ocorre em duas fases sendo que a primeira fase de tratamento, que dura aproximadamente dois meses, consiste no uso concomitante de quatro drogas (isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol) e



a segunda fase do tratamento consiste no uso de duas drogas (isoniazida e rifampicina) por quatro meses adicionais. Contudo, essa terapia deve ser estritamente seguida pelo paciente, para que previna-se a resistência aos medicamentos e reincidência [16]. As drogas de segunda linha para o tratamento da TB compreendem capreomicina, ciclosserina, estreptomicina, claritromicina e floxacinas. Estas drogas podem ser utilizadas em infecções por bacilos da tuberculose resistentes às drogas de primeira linha ou, quando os agentes de primeira linha tem que ser abandonados devido a reações indesejáveis [17]

A TB resistente a drogas normalmente surge através da seleção de cepas mutadas pela quimioterapia inadequada, tendo uma relação direta com a disponibilidade de drogas e uma relação inversa com a eficácia do tratamento [18]. Os fatores mais importantes na emergência de resistência bacteriana a drogas incluem regime de tratamento não apropriado e não adesão à terapia prescrita [16]. Uma forma perigosa de TB é a tuberculose multi-resistente a drogas (MDR-TB), que é definida como resistência a no mínimo duas principais drogas anti-TB, isoniazida e rifampicina. Em 2006, estimou-se 500 mil de casos por MDR-TB [18]. Enquanto a MDR-TB é geralmente tratável, requerendo uma quimioterapia prolongada e mais cara e usando drogas de segunda linha que provocam efeitos colaterais mais severos, as cepas denominadas de XDR-TB (tuberculose extensivamente resistente a drogas), definidas como resistentes a no mínimo rifampicina, isoniazida, uma droga injetável de segunda linha (capreomicina, canamicina ou amicacina) e uma fluoroquinolona são cepas virtualmente intratáveis [18]. O aparecimento das cepas resistentes MDR-TB e XDR-TB, especialmente em áreas onde pacientes estão infectados com o HIV, confirmam a necessidade de fortalecer a terapia básica anti-

tuberculose [3]. Novos dados de XDR-TB confirmam que essa forma de TB foi detectada em 45 países até o momento [19].

### **1.1.5 Desenvolvimento de novas drogas**

Terapias antimicobacterianas existem; porém, as drogas atualmente disponíveis são parcialmente eficazes devido à natureza impermeável da parede celular micobacterianas e a propensão do bacilo para desenvolver resistência [9]. Agentes quimioterápicos mais eficazes e menos tóxicos são necessários para reduzir a duração do tratamento atual, assim como melhorar as possibilidades de tratamento contra as cepas MDR-TB e XDR-TB. Além disso, há a necessidade de um tratamento eficaz para a TB latente, impedindo que a doença progrida para a forma ativa, e também drogas que não interfiram com os anti-retrovirais, podendo assim ser utilizadas em pacientes co-infectados com HIV [20]. A droga mais nova usada para tratar a TB surgiu aproximadamente há 33 anos e hoje em dia existem aproximadamente trinta drogas contra a TB em desenvolvimento, sendo que a maioria está em testes pré-clínicos [21].

O desenho racional de uma droga é normalmente baseado no estudo da bioquímica e da fisiologia básica do organismo responsável pela doença para determinar no que ele difere em relação às células humanas. O metabolismo de purinas e pirimidinas é um processo celular fundamental, crítico para a vida de todos os organismos. Análogos de purinas e pirimidinas há muito tempo são usados no tratamento de câncer e viroses, mas não têm sido considerados como agentes antibacterianos [22]. O sequenciamento completo do genoma da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv tem possibilitado o estudo e a validação de alvos moleculares para o desenho racional de novas drogas anti-TB. As enzimas envolvidas na

biossíntese e na reciclagem de nucleotídeos purínicos podem ser alvos promissores para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para o tratamento da TB [7].

### **1.1.6 Metabolismo de nucleotídeos**

As purinas são biomoléculas de importância vital para todos os organismos vivos. Elas são essenciais para a síntese de ácidos nucleicos, proteínas e outros metabólitos, assim como para reações que necessitam de energia. Em geral, os nucleotídeos de purinas podem ser sintetizados pela via *de novo*, que utiliza compostos simples para a síntese de vários nucleotídeos de purinas, e/ou pela via de salvamento, constituída por rotas de reutilização pelas quais as células podem satisfazer a necessidade de purinas a partir de fontes endógenas e/ou exógenas de purinas pré-formadas [23].

O metabolismo de purinas constitui um alvo potencial excelente para o desenho racional de regimes quimioterápicos antiparasitários, devido a algumas diferenças que se destacam entre parasitas e seus hospedeiros. 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 [22, 23].

Embora qualquer uma das enzimas do metabolismo de purinas possa ser alvo para o desenvolvimento de drogas anti-TB, enzimas envolvidas no salvamento de purinas são de interesse particular. O objetivo do desenvolvimento de drogas desse tipo é identificar análogos de purinas que possam ser convertidos a nucleotídeos tóxicos em células do *M. tuberculosis*, mas não em células humanas [22].

### **1.1.7 Via de Salvamento de purinas**

Dados sobre as enzimas envolvidas no salvamento de purinas em células humanas já existem, devido ao desenvolvimento significativo de drogas antitumorais e antivirais. A rota de salvamento de purinas em células humanas ocorre quando adenina e adenosina são convertidas a AMP pela adenina fosforribosiltransferase (APRT) e adenosina quinase, respectivamente, e hipoxantina e guanina são convertidas a inosina monofosfato (IMP) ou guanosina monofosfato (GMP) pela hipoxantina fosforribosiltransferase (HGPRT). Estes nucleotídeos são convertidos a nucleotídeos trifosfatados (ATP, GTP, dATP e dGTP), os quais são substratos de RNA e DNA polimerases (Figura 2). Outra enzima de grande importância ao metabolismo de purinas é a fosforilase de nucleosídeo purínico (PNP), a qual utiliza como substrato inosina e guanosina para convertê-las em hipoxantina e guanina, respectivamente. Embora a adenosina não seja substrato da PNP em *M. tuberculosis*, outra enzima, a adenosina deaminase (ADA) converte-a em inosina, a qual será convertida a hipoxantina pela PNP. Em humanos, a hipoxantina é catabolisada por outras enzimas a xantina e finalmente excretada pela urina como ácido úrico. Com relação ao *M. tuberculosis* existe muito pouca informação específica sobre o metabolismo de purinas; entretanto, é conhecido que o bacilo expressa todas as enzimas necessárias para a síntese *de novo* dos nucleotídeos de purina e, seu metabolismo, é similar ao que ocorre em células humanas e outros organismos. Podem ocorrer, no entanto, variações importantes e uma regulação diferenciada da expressão e da atividade das enzimas que compõem o metabolismo de purinas nas espécies de micobactérias. No sequenciamento do genoma do *M. tuberculosis* foram identificados genes que são capazes de expressar adenosina deaminase e PNP. Esta última possui uma seqüência e estrutura similar a PNP humana e não reconhece adenosina como substrato, divergindo de outros

organismos. Ademais é capaz de reciclar hipoxantina, adenina e adenosina do meio. Em extratos de células livres de *M. avium* foi detectada a atividade das enzimas HGPRT e APRT [22].

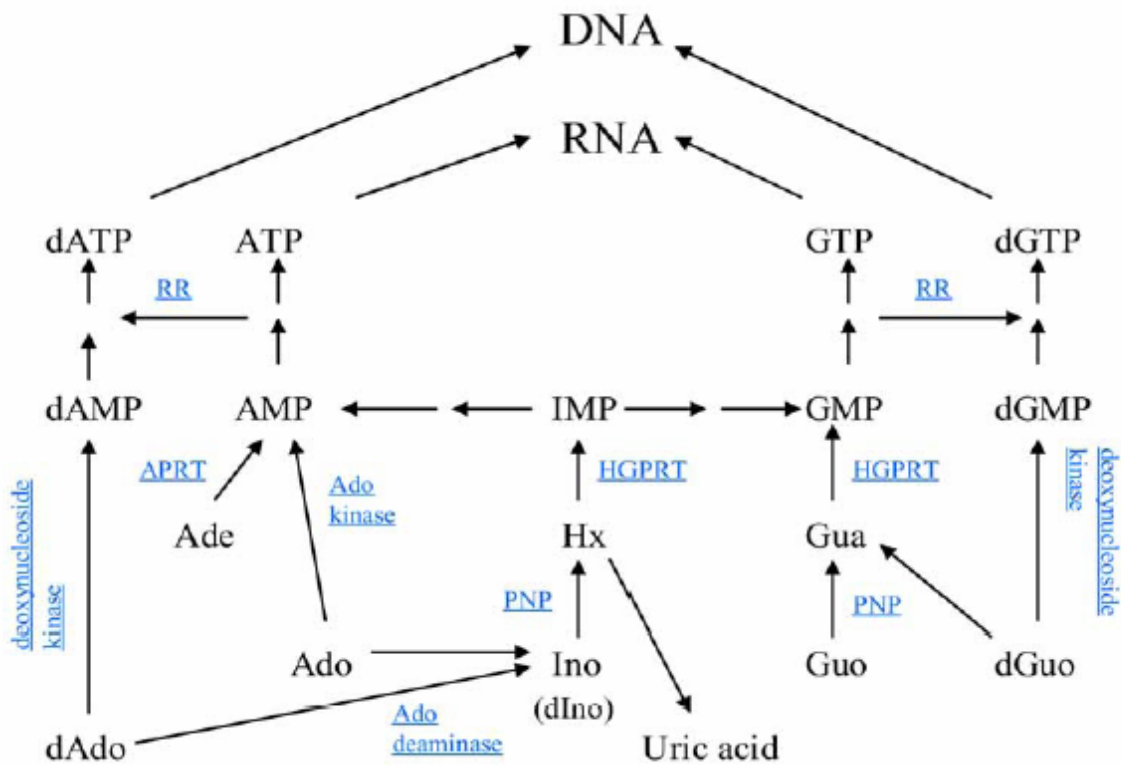


Fig 2 Metabolismo de purinas em células humanas.

Fonte: Parker WB, *et al.*, 2007

### 1.1.8 Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

A família das purina fosforibosiltransferases (PRT) é encontrada em vários parasitas; entretanto, a especificidade dessas enzimas varia entre diferentes espécies. Entre elas estão APRT (EC 2.4.2.7) específica para adenina; GPRT (EC 2.4.2.-) para guanina; XPRT (EC 2.4.2.22) para xantina; HGXPRT (EC 2.4.2.8) para xantina, guanina e hipoxantina; e HGPRT (EC 2.4.2.8) para hipoxantina e guanina [23, 24, 25]. Embora exista pouca similaridade na sequência de aminoácidos dessas enzimas, uma gama de resíduos altamente conservados, chamado de sítio motivo de

ligação ao PRPP tem sido identificada em muitas PRTs. A hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT – EC 2.4.2.8) é uma enzima chave da via de salvamento de purinas, sendo estudada por mais de uma década para o desenho de drogas. Tem-se sido mostrado que a depleção de hipoxantina de culturas de parasitas leva à morte do organismo, indicando que a formação do IMP, catalisada pela HGPRT, não é realizada por uma reação alternativa [26]. Porém, estes parasitas não possuem a biosíntese *de novo* de purinas, enquanto que o *M. tuberculosis* possui as duas vias de síntese de purinas [7]. A enzima tem ampla distribuição filogenética e nos tecidos, tendo sido relatada em *Babesia divergens*, *Leishmania donovani*, *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma brucei* e *cruzi*. Em humanos, pode ser encontrada no fígado, hemácias e tecido nervoso [23, 27]. O gene codificante da HGPRT (*hpt*; Rv3624c) foi identificado por homologia de sequência no genoma de *M. tuberculosis* H37Rv [7]. A enzima HGPRT de *M. tuberculosis* consiste de 202 resíduos de aminoácidos, com uma massa molecular teórica de 22.250,10 Da. No entanto, até o presente, não há qualquer estudo sobre a HGPRT de *M. tuberculosis* que confirme os dados previstos *in silico*. Além disso, não há evidências experimentais sobre o possível papel desta enzima da rota de salvamento de purinas nos mecanismos de latência do bacilo da TB.

A enzima HGPRT catalisa a transferência reversível dependente de magnésio de um grupo fosforibosil do 5-fosfo- $\alpha$ -D-ribosil-pirofosfato (PRPP) para uma base purínica (hipoxantina ou guanina) para formar o ribonucleotídeo purina, inosina monofosfato ou guanosina monofosfato, liberando pirofosfato (PPi) (Figura 3) [24, 25, 28, 29]. Os mecanismos cinéticos das HGPRTs de alguns organismos têm sido estudados. Estudos com *Schistosoma mansoni* e *Tritrichomonas foetus* demonstraram um mecanismo bi bi ordenado no qual o PRPP liga depois da base

purina e então o PPI é liberado seguido pelo ribonucleotídeo purina. Porém, estudos mais recentes com a HGPRT humana indicam que a liberação do produto é amplamente ordenada com o PPI precedendo o nucleotídeo na reação direta [28].

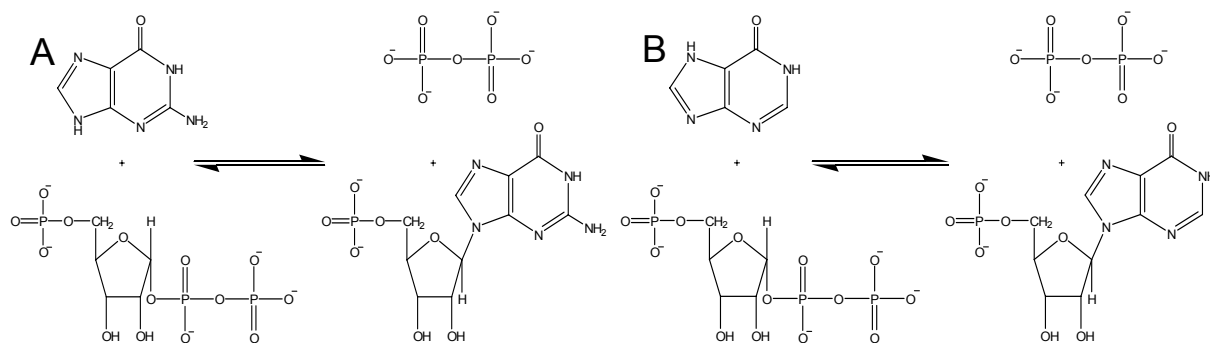


Fig. 3: Reação catalisada pela enzima HGPRT

Inibidores específicos e potentes para HGPRTs de parasitas devem explorar as diferenças funcionais e estruturais entre a enzima do parasita e o seu hospedeiro. A estrutura tetramérica do cristal da HGPRT humana revelou a arquitetura do sítio ativo mostrando que na região C-terminal ocorre uma mudança conformacional quando associada com a ligação da base, sugerindo também que tanto o PRPP quanto a base devem ser capazes de se ligar simultaneamente. Porém, ainda não se sabe se as enzimas de parasitas, que mostram similaridade de sequência entre 28 a 48% com a enzima humana, demonstram diferenças estruturais específicas [27]. As evidências disponíveis sugerem que, em adição à sua especificidade pelo substrato, a enzima do hospedeiro difere da enzima do parasita pelos seguintes aspectos: diferentemente da enzima humana estável, a HGPRT do parasita é instável na ausência de PRPP e o  $K_M$  da enzima do parasita por seu substrato varia substancialmente da enzima humana [30].

A importância da HGPRT humana não é bem conhecida devido às vias de síntese de purinas (salvamento e *de novo*) estarem presentes como vias ativas. Entretanto, em humanos, a deficiência completa da atividade enzimática da HGPRT, chamada de síndrome de Lesch-Nyhan, está associada com hiperuricemia, distúrbios neurológicos severos, auto-mutilação e incapacidade de movimentos motores. A deficiência parcial é então chamada de síndrome Kelly-Seegmiller apresentando sintomas relacionados à superprodução de ácido úrico, distúrbios hematológicos e leves manifestações de distúrbios neurológicos [31].



## 1.2. Objetivo Geral

Este trabalho faz parte de um projeto maior que tem como objetivo caracterizar as enzimas da rota de salvamento e da síntese *de novo* de purinas e pirimidinas de *Mycobacterium tuberculosis* como alvos potenciais para o desenvolvimento de drogas. Na busca de um entendimento maior acerca do papel da HGPRT de *M. tuberculosis*, este trabalho tem como objetivo validar e caracterizar a enzima MthGPRT para o posterior desenvolvimento de inibidores seletivos.

### 1.2.1 Objetivos Específicos

- Expressar e purificar a proteína recombinante HGPRT de *M. tuberculosis* em cepas de *E.coli*;
- Determinar espectrometria de massas e seqüenciamento N-terminal da proteína recombinante HGPRT de *M. tuberculosis*;
- Determinar o estado oligomérico em solução da proteína recombinante HGPRT de *M. tuberculosis*;
- Realizar o ensaio de atividade da proteína recombinante HGPRT de *M. tuberculosis*, confirmando seu papel;
- Caracterizar a proteína recombinante HGPRT de *M. tuberculosis* por cinética enzimática;
- Determinar a estrutura tridimensional da proteína recombinante HGPRT de *M. tuberculosis* por cristalografia de raio X.

## 2. Manuscrito do Trabalho Experimental

Este manuscrito foi submetido para a revista **Protein Expression and Purification** com índice de impacto 1.940.

Título: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning, expression, and biochemical characterization

**Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*  
H37Rv: cloning, expression, and biochemical characterization**

Gisele Biazus<sup>a,b</sup>, Cristopher Z. Schneider<sup>a</sup>, Mario S. Palma<sup>c</sup>, Luiz A. Basso<sup>a\*</sup>, Diógenes S. Santos<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

<sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica, Centro de Estudos de Insetos Sociais, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - Rio Claro, SP 13506-900, Brazil

*Running title:* HGPRT from *Mycobacterium tuberculosis*

*Keywords:* *Mycobacterium tuberculosis*; Purine salvage pathway; Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; HGPRT; Protein purification; Kinetic parameters

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

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

Phone/Fax: +55 51 33203629

E-mail addresses: [luiz.basso@pucrs.br](mailto:luiz.basso@pucrs.br) or [diogenes@pucrs.br](mailto:diogenes@pucrs.br)

*Abbreviations used:* HGPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; IPTG, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; LB, Luria-Bertani; MDR-TB, multidrug-resistant TB; MtHGPRT, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *M. tuberculosis*; PPi, inorganic pyrophosphate; PRTase, purine phosphoribosyltransferase; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TB, tuberculosis; XDR-TB, extensively drug-resistant TB.

## Abstract

Human tuberculosis (TB) is a major cause of morbidity and mortality worldwide, especially in poor and developing countries. Moreover, the emergence of *Mycobacterium tuberculosis* strains resistant to first- and second-line anti-TB drugs raises the prospect of virtually incurable TB. Enzymes of the purine phosphoribosyltransferase (PRTase) family are components of the purine salvage pathway and have been proposed as drug targets for the development of chemotherapeutic agents against infective and parasitic diseases. The PRTase-catalyzed chemical reaction involves the ribophosphorylation in one step of purine bases (adenine, guanine, hypoxanthine, or xanthine) and their analogues to the respective nucleoside 5'-monophosphate and pyrophosphate. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT; EC 2.4.2.8) is a purine salvage pathway enzyme that specifically recycles hypoxanthine and guanine from the medium, which are in turn converted to, respectively, IMP and GMP. Here we report cloning, DNA sequencing, expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells, purification to homogeneity, N-terminal amino acid sequencing, mass spectrometry analysis, and determination of apparent steady-state kinetic parameters for an *in silico* predicted *M. tuberculosis* HGPRT enzyme. These data represent an initial step towards future functional and structural studies, and provide a solid foundation on which to base *M. tuberculosis* HGPRT-encoding gene manipulation experiments to demonstrate its role in the biology of the bacillus.

## Introduction

Human tuberculosis (TB), whose major etiological agent is *Mycobacterium tuberculosis*, remains a leading cause of morbidity and mortality worldwide, especially in Asia and Africa, with approximately 8.8 million new reported cases in 2005, and 9.2 million in 2006 [1, 2]. Moreover, HIV-*M. tuberculosis* co-infection represents a devastating problem for both infected and non-infected people, significantly increasing the probability to develop the active disease [3, 4]. According to World Health Organization (WHO) international surveys, nearly 2 billion people are latently infected with *M. tuberculosis*, and 1 in 10 of them will develop active TB in their lifetime [3]. To compound the problem, there has been an increase in emergence of *M. tuberculosis* strains resistant to first- and second-line anti-TB drugs. In 2007, the WHO estimated that 0.5 million cases of multidrug-resistant TB (MDR-TB, defined as a *M. tuberculosis* strain resistant to at least the two major anti-TB drugs, isoniazid and rifampicin, which are the most effective ones) occurred. More recently, the worldwide emergence of extensively drug-resistant TB (XDR-TB) cases, defined as cases in persons with TB whose isolates are MDR as well as resistant to any one of the fluoroquinolone drugs and to at least one of the three injectable second-line drugs, raises the prospect of virtually incurable TB [1, 5]. Factors underlying the emergence and dissemination of both MDR- and XDR-TB include inappropriate treatment regimens and patient non-compliance in completing the prescribed therapy courses, owing to the lengthy standard treatment or when the side effects become unbearable [6]. Thus, there is a need of new drugs and a combination of agents with different mechanisms of action to curb the spread of drug-resistant TB and contain latent disease. However, an understanding of metabolic pathways essential for *M. tuberculosis* growth or that play an important role in adaptation of this pathogen to a particular physiological state of the host is required.

The complete genome sequencing of *M. tuberculosis* H37Rv strain has accelerated the study and validation of molecular targets aiming at the rational design of anti-TB drugs [7]. Enzymes involved in purine nucleotide biosynthesis might be promising targets for developing novel chemotherapeutic agents to treat TB. Notwithstanding, purine metabolism data are relatively scarce in *M. tuberculosis*. It is believed that the purine salvage pathway is used when the bacillus takes up hypoxanthine, guanine, and adenine from the external medium, which are subsequently converted to, respectively, IMP, GMP, and AMP. As in humans, purine nucleoside phosphorylase, guanosine kinase, and adenosine kinase, as well as others proteins, have been identified in *M. tuberculosis*, becoming evident that the TB bacillus expresses a complex set of enzymes involved in purine salvage metabolism [8].

Enzymes of the purine salvage pathway, the purine phosphoribosyltransferase (PRTase) family, are found in most microbes and mammals; their reaction involves the ribophosphorylation in one step of purine nucleobases (hypoxanthine, guanine, adenine, or xanthine) and their analogues to their respective nucleoside 5'-monophosphate and pyrophosphate [9]. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT; EC 2.4.2.8) is a purine salvage enzyme that catalyzes the  $Mg^{+2}$ -dependent reversible transfer of the 5'-phosphoribosyl group from  $\alpha$ -D-ribofuranose 1'-pyrophosphate 5'-phosphate (also known as 5'-phosphorybosil- $\alpha$ -1'-pyrophosphate; PRPP) to the N9 position of 6-oxopurines (guanine, hypoxanthine) to form the corresponding ribonucleotides GMP (guanosine 5'-monophosphate; Fig. 1A) and IMP (inosine 5'-monophosphate; Fig. 1B), with the release of PPi (inorganic pyrophosphate) [10].

PRTases are of significant interest both in human genetic diseases and parasite treatments, such as, respectively, Lesch-Nyhan syndrome and Chagas' disease [11, 12]. Investigation of purine salvage pathway enzymes in *M. tuberculosis*, including HGPRT, might reveal insightful data on the complex balance that exists between the bacillus and the host.

Accordingly, considerable interest has been focused on the understanding of this enzyme in infectious and parasitic diseases and its mechanism of action. The target-based rational design of new agents with anti-TB activity includes functional and structural efforts. However, the first step to enzyme target validation must include experimental data demonstrating that a gene predicted by *in silico* analysis to encode a particular protein catalyzes the proposed chemical reaction. In this work, we describe PCR amplification, cloning, DNA sequencing, expression in *E. coli* BL21(DE3) host cells, purification to homogeneity, and biochemical characterization of a predicted *M. tuberculosis* HGPRT (MtHGPRT).



## Materials and methods

### *Bacterial strains, media, and growth conditions.*

*Escherichia coli* DH10B and BL21(DE3) (Novagen) strains were grown at 37°C in Luria-Bertani (LB; Difco) medium containing 50 µg/mL ampicillin. All reagents used in biochemical studies of MtHGPRT (hypoxanthine, guanine, xanthine, and PRPP) were purchased from Sigma-Aldrich.

### *Amplification, cloning, and expression of the M. tuberculosis hpt gene.*

The coding sequence of MtHGPRT was amplified by PCR using primers HGPRTa (5'-ACCATATGCACGTGACCCAGAGCTCCTCGG-3') and HGPRTb (5'-CTAAGCTTTCACTGATAGACCCTGGGGTCCAG-3'), which are complementary to 5' and 3' ends of the putative *M. tuberculosis hpt* (*Rv3624c*) gene [7]. Primers were designed to contain, respectively, *Nde*I and *Bam*HI restriction sites (underlined). The PCR product (606 bp) was purified by agarose gel electrophoresis, cleaved with *Nde*I and *Bam*HI (New England Biolabs), and ligated into the pET-23a(+) expression vector (Novagen). The sequence of the *M. tuberculosis hpt* gene was determined by automated DNA sequencing to confirm the identity, integrity, and absence of PCR-introduced mutations in the cloned fragment.

### *Expression of recombinant MtHGPRT.*

The recombinant plasmid pET-23a(+):*hpt* was transformed into *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) electrocompetent cells and selected on LB agar plates containing 50 µg/mL ampicillin. LB medium (3 L) containing 50 µg/mL ampicillin was inoculated with a single colony, and when OD<sub>600</sub> reached a value of 0.6 it was grown for 6 additional hours at 180 rpm and 37°C without isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. Cells (12 g) were

harvested by centrifugation at 7,690 g for 30 min at 4°C and were stored at -20°C. Soluble and insoluble fractions were analyzed by 12% SDS-PAGE and Coomassie Brilliant Blue staining [13].

*Purification of recombinant MtHGPRT.*

Approximately 12 grams of frozen *E. coli* BL21(DE3) cells were resuspended in 60 mL of buffer A (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.3), and incubated with lysozyme (0.2 mg/mL) (Sigma-Aldrich). Cells were disrupted by sonication (15 times for 10 s at an amplitude value of 60%), and cell debris was removed by centrifugation at 48,000 g for 30 min. Streptomycin sulfate (Sigma-Aldrich) was added to the supernatant up to 1% (wt/vol), stirred for 30 min, and the mixture centrifuged at 48,000 g for 30 min. The resulting supernatant was dialyzed three times against 2 L of buffer A, using a dialysis tubing with molecular weight exclusion limit of 12,000-14,000 Da. This sample was clarified by centrifugation at 48,000 g for 30 min and loaded onto a diethylaminoethyl (DEAE)-Sepharose anion exchange column (GE Healthcare) pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 7.3. The column was washed with 3 column volumes of buffer A and the adsorbed material was eluted with 15 column volumes of a linear gradient from 0 to 100% of 50 mM Tris-HCl, pH 7.3, containing 0.5 M NaCl (buffer B) at 1 mL min<sup>-1</sup>. MtHGPRT protein fractions were pooled and concentrated down to 5 mL using an Amicon ultrafiltration cell (molecular weight cutoff = 10,000). This protein sample was loaded on a HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 size exclusion column (GE Healthcare), which was previously equilibrated with buffer A, and isocratically eluted with buffer A at a flow rate of 0.25 mL min<sup>-1</sup>. Fractions containing MtHGPRT were pooled and ammonium sulfate was added to a final concentration of 1 M, clarified by centrifugation at 48,000 g for 30 min, and the resulting supernatant loaded on a HiLoad 16/10 Phenyl-Sepharose High Performance column (GE Healthcare) pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 7.3, containing 1 M

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (buffer C). The column was washed with 10 column volumes of buffer C and the adsorbed material eluted with 20 column volumes of a linear gradient from 0 to 100% of buffer A at 1 mL min<sup>-1</sup> flow rate. The homogeneous recombinant protein was concentrated to 20 mL and dialyzed three times against 2 L of buffer A, using a dialysis tubing with molecular weight exclusion limit of 12,000-14,000 Da to remove ammonium sulfate from the protein solution, and stored at - 80°C. All purification steps were carried out at 4°C and sample elution monitored by UV detection at 215, 254, and 280 nm. Purification protocol samples were analyzed by 12% SDS-PAGE with Coomassie Brilliant Blue staining. Total protein concentration was determined by Bradford's method using bovine serum albumin as standard (Bio-Rad Laboratories) [14].

#### *N-terminal amino acid sequencing.*

The N-terminal amino acid residues of homogeneous recombinant MtHGPRT protein were identified by automated Edman degradation sequencing using a PPSQ 21A gas-phase sequencer (Shimadzu).

#### *Mass spectrometry analysis.*

The homogeneity of the protein preparation was assessed by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), employing some adaptations made to the system described by Chassigne and Lobinski system [15]. Samples were analyzed on a triple quadrupole mass spectrometer (model QUATTRO II) equipped with a standard ESI probe (Micromass, Altrincham, United Kingdom) and adjusted to a flow rate of ca. 250 µL min<sup>-1</sup>. The source temperature (80°C) and needle voltage (3.6 kV) were maintained constant throughout experimental data collection, applying a drying gas (nitrogen) flow of 200 L h<sup>-1</sup> and a nebulizer gas flow of 20 L h<sup>-1</sup>. The mass spectrometer was calibrated with intact horse heart

myoglobin and its typical cone voltage-induced fragments. The molecular mass of the recombinant MtHGPRT subunit was determined by ESI-MS, by adjusting the mass spectrometer to give a peak with a half-height of 1 mass unit, and the sampling cone-to-skimmer lens voltage controlling the transfer of ions to the mass analyzer was set to 38 V. About 50 pmol of sample was injected into electrospray transport solvent. The ESI spectrum was obtained in the multichannel acquisition mode, with scanning from 500 to 1,800  $m/z$  at a scan time of 7 s. The mass spectrometer is equipped with MassLynx and Transform software for data acquisition and spectrum handling.

#### *Enzyme activity assay of MtHGPRT.*

MtHGPRT enzyme activity of pooled fractions of the various steps of the protein purification protocol was assayed in the forward direction by a continuous spectrophotometric assay, using an UV-2550 UV/Visible Spectrophotometer (Shimadzu). The standard assay, performed at 25°C in 100 mM Tris-HCl at pH 7.4, contained 100  $\mu\text{M}$  of either hypoxanthine or guanine, 1 mM PRPP, and 12 mM  $\text{MgCl}_2$ . The reaction was initiated by addition of MtHGPRT and monitored for 1 min. The formation of either IMP or GMP was monitored by the change in absorbance at 245 or 257.5 nm, respectively, using extinction coefficients values of 1900  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  for IMP and 5900  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  GMP [16]. In order to determine the apparent steady-state kinetic parameters,  $K_M$  and  $V_{\text{max}}$ , assays were carried out at varying concentration of one substrate and fixed-saturating concentration of the other. The concentration range of purine base (hypoxanthine or guanine) was from 10 to 120  $\mu\text{M}$  at fixed PRPP concentration of 3,500  $\mu\text{M}$ , whereas the concentration range of PRPP was from 100 and 3,500  $\mu\text{M}$  at fixed purine base (hypoxanthine or guanine) concentration of 120  $\mu\text{M}$ .

## Results and discussion

### *Cloning and DNA sequencing*

A PCR amplification product consistent with the expected size for the *M. tuberculosis* *hpt* (606 bp) coding sequence was detected by agarose gel electrophoresis (data not shown), purified, and ligated into the pET-23a(+) expression vector. DNA sequence of the cloned fragment was confirmed by restriction analysis and automated DNA sequencing.

### *Expression of recombinant M<sub>t</sub>HGPRT protein*

The recombinant pET-23a(+):*hpt* plasmid was introduced into *E. coli* BL21(DE3) host cells by electroporation. SDS-PAGE analysis (Fig. 2) showed expression of a protein in the soluble fraction with apparent subunit molecular mass of ~25 kDa in agreement with that predicted for M<sub>t</sub>HGPRT (22,250.10 Da). Recombinant M<sub>t</sub>HGPRT protein expression was tested at various times of cell growth after an OD<sub>600</sub> of 0.6 was reached, and the best result was 6 hours of cell growth at 37°C in LB medium without IPTG induction (Fig. 2, lanes 6-9). In the pET vector system (Novagen), 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 [17-21]. 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 AMP, acetate, and low pH are required to achieve high-level expression in the absence of IPTG induction, which may be part of a general cellular response to nutrition limitation [22].

### *Purification of M<sub>t</sub>HGPRT*

MtHGPRT was purified to homogeneity (Fig. 3) by a three-step protocol. First, adsorbed recombinant MtHGPRT eluted from a DEAE-Sepharose anion exchange column at approximately 90 mM salt concentration. Second, the Sephacryl S-300 size exclusion chromatography of concentrated pooled fractions from the previous step removed substantial amount of contaminants and salt from the protein sample. In the third step, pooled fraction from size exclusion chromatography were loaded on a Phenyl-Sepharose hydrophobic interaction column, from which homogeneous MtHGPRT eluted at approximately 21% of buffer A, yielding ca. 11.28 mg of recombinant protein per liter of cell culture. The homogeneous recombinant MtHGPRT protein preparation (concentration of 0.47 mg/mL) was stored at -80°C with no apparent loss of activity.

#### *N-terminal amino acid sequencing*

The first 13 N-terminal amino acid residues of recombinant MtHGPRT were identified as MHVTQSSSAITPG by the Edman degradation chemistry protocol. This result unambiguously identifies the homogeneous recombinant protein as MtHGPRT and confirmed the presence of the N-terminal methionine residue.

#### *Mass spectrometry analysis*

The subunit molecular mass of active MtHGPRT was determined to be 22,250.10 Da by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), showing that removal of the N-terminal methionine residue from the full length gene product (predicted molecular mass: 22,251.2 Da) did not occur. The ESI-MS result also revealed only one peak, thus providing evidence for both the identity and purity of the recombinant protein preparation (Fig. 4).

#### *Enzyme activity assay of MtHGPRT*

To confirm the correct assignment to the structural gene encoding HGPRT from *M. tuberculosis*, the biological activity of recombinant MtHGPRT was probed by steady-state kinetics. The apparent steady-state kinetic constants and substrate specificities for homogeneous MtHGPRT were determined for hypoxanthine, guanine, xanthine, and PRPP (Table 2). Data were fitted to a hyperbolic equation, indicating that the recombinant enzyme-catalyzed chemical reaction obeys Michaelis-Menten kinetics for all substrates tested (Fig. 5). No HGPRT activity with xanthine as substrate could be detected, indicating that the recombinant MtHGPRT protein does not utilize xanthine in its enzyme reaction. A similar situation has been demonstrated for HGPRTs from *Leishmania donovani*, *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Thermoanaerobacter tengcongensis* [9, 23]. This result was confirmed by HPLC assay (data not shown). The steady-state  $K_M$  value represents the overall dissociation constant of all enzyme-bound species. The MtHGPRT  $K_M$  value for hypoxanthine as substrate (50  $\mu\text{M}$ ) is larger than that for *Thermoanaerobacter tengcongensis* (2.4  $\mu\text{M}$ ) [23], *Leishmania donovani* (7.6  $\mu\text{M}$ ) [24], and *Trypanosoma cruzi* (30.8  $\mu\text{M}$ ) [11]. The MtHGPRT  $K_M$  value for guanine (25  $\mu\text{M}$ ) is also larger than the ones for *T. tengcongensis* (3.6  $\mu\text{M}$ ), *L. donovani* (3.8  $\mu\text{M}$ ) and *T. cruzi* (12.4  $\mu\text{M}$ ). The  $k_{\text{cat}}/K_M$  ratio is an apparent second-order rate constant that determines the specificity for competing substrates. The results presented here (Table 2) demonstrate that MtHGPRT has a higher preference for hypoxanthine than for guanine as a substrate, which is in agreement with the results for *T. tengcongensis* [23].

The genomic revolution has been the main driver of the target-based approach to drug development. The rational design for target-based drug development includes structural and functional efforts. Enzyme inhibitors make up approximately 25 % of the drugs marketed in United States [25]. As has been pointed out by James G. Robertson [26], enzymes catalyze multi-step chemical reactions and achieve phenomenal rate accelerations by matching protein

and substrate chemical groups in the transition state. Inhibitors that take advantage of these chemical interactions are among the most potent and effective known drugs [26]. Mechanistic analysis should thus always be a top priority for enzyme-targeted drug development programs to allow for function-based design of potent inhibitors. However, as pointed out above, the first step to enzyme target validation must include experimental data demonstrating that a gene predicted by *in silico* analysis does encode a particular protein that catalyzes the proposed chemical reaction. Accordingly, the demonstration of *M. tuberculosis hpt*-encoded protein as a HGPRT and availability of functional homogeneous recombinant MtHGPRT will significantly contribute to future functional and structural efforts, which are of paramount importance for the rational design of chemotherapeutic agents. Moreover, the results presented here are pivotal for providing a reliable basis on which to conduct genetic experiments [27] to further investigate the role, if any, of *hpt* in the biology of *M. tuberculosis*.



## **Acknowledgments**

This work was supported by the National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPES) and the Millennium Initiative Program (CNPq), Brazil, to DSS and LAB. DSS and LAB also acknowledge grants awarded by FINEP. DSS (304051/1975-06), LAB (520182/99-5) and MSP (500079/90-0) are research career awardees from the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq). GB was supported by a studentship from FARMASA (Laboratório Americano de Farmacoterapia SA). CZS was funded by BNDES.

## References

1. The World Health Organization Global Tuberculosis Program. WHO. 2007 World Health Organization (<http://www.who.int/tb/en/>).
2. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report 2008. World Health Organization, (<http://www.who.int/tb/en/>).
3. 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) 679-714.
4. L.A. Basso, J.S. Blanchard, Resistance to antitubercular drugs, *Adv. Exp. Med. Biol.* 456 (1998) 115-144.
5. E.M. Zager, R. McNerney, Multidrug-resistant tuberculosis, *BMC Infect. Dis.* 8 (2008) 10.
6. K. Duncan, Progress in TB drug development and what is still needed. *Tuberculosis* 83 (2003) 201-207.
7. S.T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C Churcher, D. Harris, S. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham<sup>1</sup>, D. Brown<sup>1</sup>, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwe, 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.
8. W.B. Parker, M.C. Long, Purine metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* as a target for drug development, *Curr. Pharm. Des.* 13 (2007) 599-608.
  9. M.H. Kouni, Potencial chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites, *Pharmacol. Ther.* 99 (2003) 283-309.
  10. J. Hochstadt, Hypoxanthine phosphoribosyltransferase and guanine phosphoribosyltransferase from enteric bacteria, *Methods Enzymol.* 51 (1978) 549-558.
  11. M.A. Wenck, F.J. Medrano, A.E. Eakin, S.P. Craig, Steady-state kinetics of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi*, *Biochim. Biophys. Acta* 1700 (2004) 11-18.
  12. R.J. Torres, J.G. Puig, Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome, *Orphanet J. Rare Dis.* 2 (2007) 48.
  13. U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227(1970) 680-685.

14. M.M. Bradford, R.A. Mcrorie, W.L. Williams, 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.
15. H. Chassaigne, R. Lobinski, Characterization of horse kidney metallothionein isoforms by electrospray MS and reversed-phase HPLC-electrospray MS, *Analyst* 123 (1998) 2125-2130.
16. Y. Xu, J. Eads, J.C. Sacchettini, C. Grubmeyer, Kinetic mechanism of human hypoxanthine – guanine phosphoribosyltransferase: rapid phosphoribosyl transfer chemistry, *Biochemistry* 36 (1997) 3700 – 3710.
17. J.S. Oliveira, C.A. Pinto, L.A. Basso, D.S. Santos, Cloning and overexpression in soluble form of functional shikimate kinase and 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*, *Protein Expr. Purif.* 22 (2001) 430-435.
18. M.L.B. Magalhães, C.P. Pereira, L.A. Basso, D.S. Santos, Cloning and expression of functional shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.25) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Protein Expr. Purif.* 26 (2002) 59-64.
19. R.G. Silva, L.P.S. Carvalho, J.S. Oliveira, C.A. Pinto, M.A. Mendes, M.S. Palma, L.A. Basso, D.S. Santos, Cloning, overexpression, and purification of functional human purine nucleoside phosphorylase, *Protein Expr. Purif.* 27 (2003) 158-164.
20. C. Rizzi, J. Frazzon, F. Ely, P.G. Weber, I.O. Fonseca, M. Gallas, J.S. Oliveira, M.A. Mendes, B.M. Souza, M.S. Palma, D.S. Santos, L.A. Basso, DAHP synthase from

- Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning, expression, and purification of functional enzyme, *Protein Expr. Purif.* 40 (2005) 23-30.
21. J.D. Mendonça, F. Ely, M.S. Palma, J. Frazzon, L.A. Basso, D.S. Santos, Functional characterization by genetic complementation of *aroB*-encoded dehydroquinase synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its heterologous expression and purification, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 6246-6252.
22. 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.
23. Q. Chen, D. You, M. Hu, X. Gu, M. Luo, S. Lu, Cloning, purification, and characterization of thermostable hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Protein Expr. Purif.* 32 (2003) 239-245.
24. P.S. Monzani, J.D. Alfonzo, L. Simpson, G. Oliva, O.H. Thiemann, Cloning, characterization and preliminary crystallographic analysis of *Leishmania* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, *Biochim. Biophys. Acta* 1598 (2002) 3-9.
25. J.G. Robertson, Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs, *Biochemistry* 44 (2005) 5561-5571.
26. J.G. Robertson, Enzymes as a special class of therapeutic target: clinical drugs and modes of action, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17 (2007) 674-679.

27. C.Z. Schneider, T. Parish, L.A. Basso, D.S. Santos, The two chorismate mutases from both *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*: biochemical analysis and limited regulation of promoter activity by aromatic amino acids, J. Bacteriol. 190 (2008) 122-134.

## Figure legends

**Figure 1:** Chemical reaction catalyzed by hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT). Transfer of 5'-phosphoribosyl group of PRPP to (A) guanine to form GMP, and (B) hypoxanthine to form IMP.

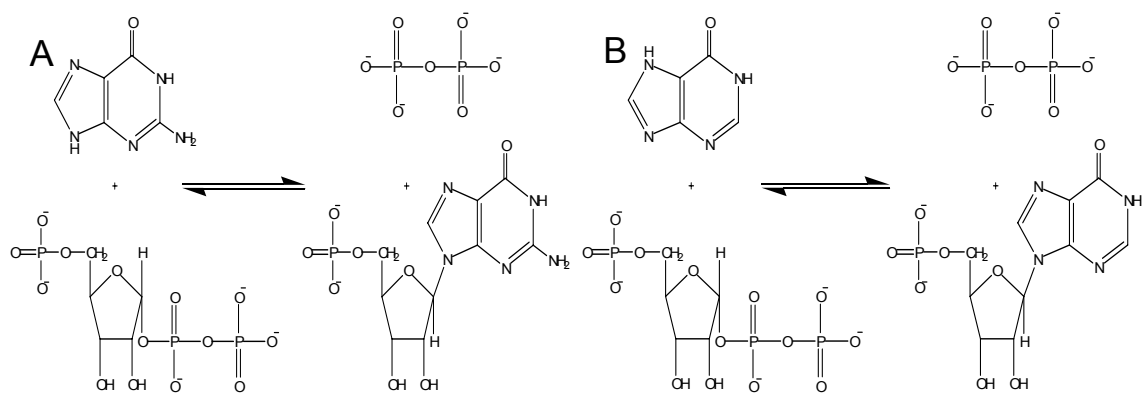
**Figure 2:** 12% SDS-PAGE analysis of total soluble protein as a function of growth time. Lane 1, MW marker Low Range (Gibco); lanes 2, 6, and 10 *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a (+) (control)] with IPTG induction; lanes 3, 7, and 11 *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a (+)::*hpt*] with IPTG induction; lanes 4, 8, and 12 *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a (+) (control)] without IPTG induction; lanes 5, 9, and 13 *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a (+)::*hpt*] without IPTG induction. Times of cell growth were 4 h (lanes 2-5), 6 h (lanes 6-9), and 8 h (lanes 10-13).

**Figure 3:** 12% SDS-PAGE analysis of pooled fractions from the various steps of the purification protocol of MthGPRT. Lane 1, MW marker Low Range (Gibco); lane 2, crude extract; lane 3, DEAE-Sepharose anion exchange column; lane 4, Sephacryl S-300 size exclusion; lane 5, addition of 1 M ammonium sulfate; lane 6, Phenyl-Sepharose hydrophobic interaction.

**Figure 4: Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) of MthGPRT.** ESI-MS result revealed a single peak at 22,250.10 Da.

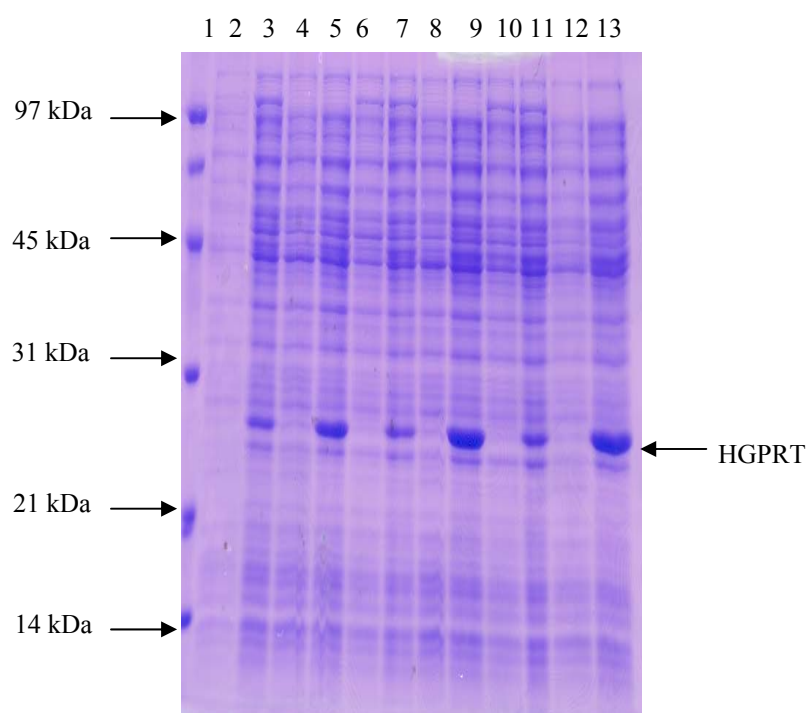
**Figure 5:** Determination of apparent steady-state kinetic parameters. Substrate saturation curves for (A) hypoxanthine, and (B) guanine as the variable substrate, at a PRPP fixed-saturating concentration of 3 mM.

**Figure 1**

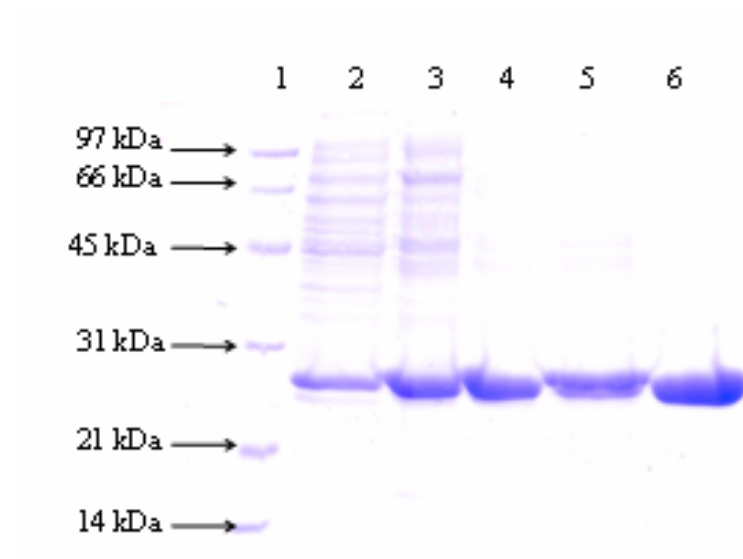




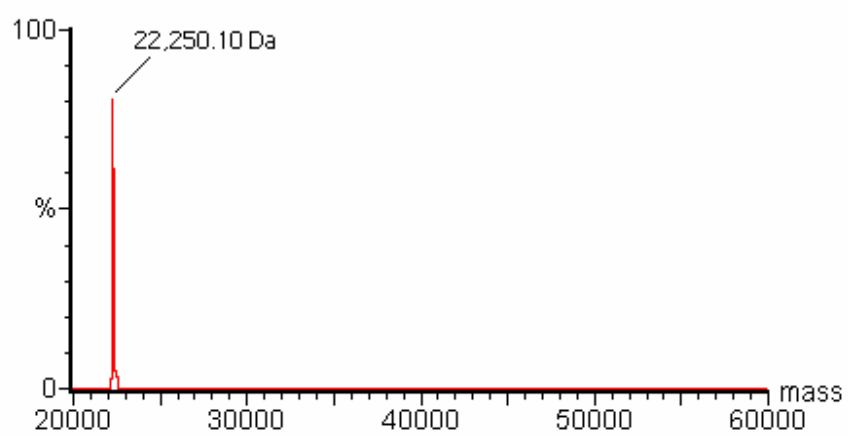
**Figure 2**



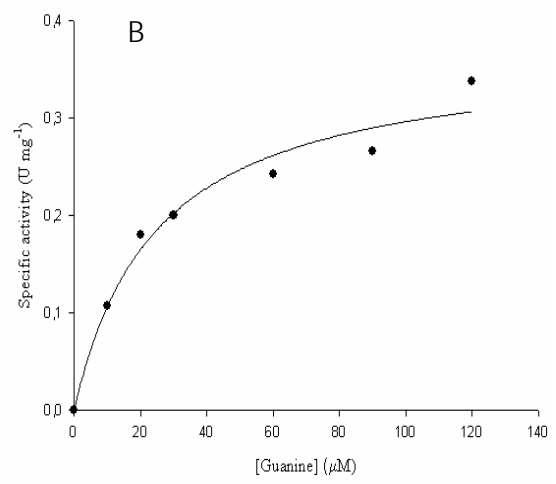
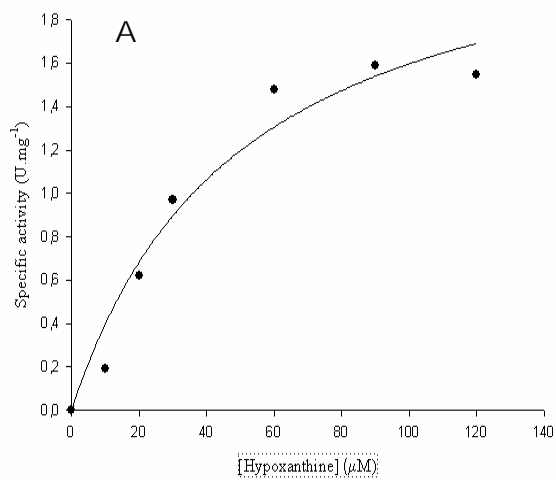
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



**Table 1: Purification of *M. tuberculosis* HGPRT from *E. coli* BL21(DE3)**

Typical purification protocol starting from 12 g wet cell paste from 3 L of culture.

<b>Purification step</b>	<b>Total protein (mg)</b>	<b>Total enzyme activity (U)</b>	<b>Specific activity (U mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Substrate</b>	<b>Purification fold</b>	<b>Yield (%)</b>
Crude extract	944.20	855.53	0.91	Hypoxanthine	1	100
		246.14	0.27	Guanine	1	100
DEAE Sepharose	208.29	94.36	0.45	Hypoxanthine	0.50	11.03
		30.03	0.14	Guanine	0.51	12.20
Sephacryl S-300	158.76	87.47	0.55	Hypoxanthine	0.51	10.22
		20.92	0.17	Guanine	0.63	8.50
Phenyl HP	33.84	48.80	1.44	Hypoxanthine	1.58	5.70
		13.38	0.40	Guanine	1.48	5.44

**Table 2: Apparent steady-state kinetic constants for the forward reaction catalyzed by MthGPRT**

Variable substrate	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\text{U mg}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_M$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
Guanine	$25 \pm 6$	$0.37 \pm 0.03$	$0.14 \pm 0.01$	$5.6 (\pm 1.5) \times 10^3$
PRPP	$360 \pm 26$	$0.376 \pm 0.006$	$0.139 \pm 0.002$	$386 \pm 29$
Hypoxanthine	$50 \pm 18$	$2.4 \pm 0.4$	$0.9 \pm 0.1$	$18 (\pm 7) \times 10^3$
PRPP	$2039 \pm 201$	$2.6 \pm 0.1$	$0.97 \pm 0.05$	$476 \pm 52$

All constants were measured in 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 at 25°C.

### 3. Considerações Finais

Com os programas para TB reforçados pelo sucesso da quimioterapia, a tuberculose tornou-se altamente controlada, mas nunca realmente desapareceu. Hoje em dia, essa doença ainda representa uma ameaça global, tornando-se causa líder de morte em adultos devido a um único agente infeccioso, o *Mycobacterium tuberculosis*, responsável por cerca de dois milhões de mortes por ano no mundo [1, 3, 4]. A quimioterapia efetiva de tuberculose deve incluir ação bactericida contra o crescimento rápido do organismo e subsequente esterilização dos bacilos dormentes. Terapias antimicobacteriais existem, porém drogas atualmente disponíveis são parcialmente eficazes devido à natureza impermeável da parede celular micobacteriana e a propensão do bacilo em desenvolver resistência [9]. Agentes quimioterápicos mais eficazes e menos tóxicos são necessários para reduzir a duração do tratamento atual, assim como melhorar as possibilidades de tratamento para as cepas MDR-TB e XDR-TB. Além disso, há a necessidade de um tratamento eficaz para a TB latente, impedindo que a doença se desenvolva para a forma ativa, e também drogas que não interfiram com os anti-retrovirais para que possam ser utilizados em pacientes co-infectados com HIV [20]. O desenho racional de uma droga é normalmente baseado em estudar a bioquímica e a fisiologia básica do organismo responsável pela doença para determinar no que ele difere com as células humanas [22].

Assim, este trabalho visou estudar a proteína HGPRT de *M. tuberculosis* através da construção do gene que codifica para a proteína HGPRT através do método baseado na patente desenvolvida pela empresa Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento LTDA em parceria com a PUCRS [32]. Como produto final das

reações de PCR obteve-se um fragmento de DNA de 606 pb. Este fragmento de DNA foi clonado no vetor pCR-Blunt® e subclonado no vetor de expressão pET23a(+). A identidade e integridade do gene e a ausência de mutações foram confirmadas por seqüenciamento automático de DNA da seqüência do plasmídeo recombinante. Essa construção foi utilizada para expressar a proteína recombinante em cepas de *E. coli*. O plasmídeo recombinante pET-23<sup>a</sup>(+):*hpt* mostrou expressão em cepa BL21(DE3) de *E. coli* na forma solúvel a 37°C em meio LB sem indução de IPTG.

A proteína recombinante foi purificada utilizando sistema de purificação de Cromatografia Líquida de Rápida Eficiência (FPLC) ÄKTA (GE Healthcare). Várias colunas cromatográficas foram utilizadas para avaliar qual seria o melhor protocolo quanto ao rendimento e otimização do processo, como descrito no Anexo II. O protocolo, definido após a otimização do processo, incluiu 3 colunas cromatográficas: troca aniônica, seguida por gel filtração e a eluição da proteína na sua forma homogênea foi através de interação hidrofóbica. Seguindo este protocolo de purificação, aproximadamente 3 mg da proteína recombinante homogênea podem ser obtidas a partir de 1 g de células de *E. coli* Rosetta(DE3). O protocolo de purificação descrito representa um método eficiente e com alto rendimento, no qual a proteína M<sub>t</sub>HGPRT é obtida com pelo menos 98% de pureza. Os valores das massas moleculares, experimental (22.250,10 Da) e teórico (22.251,20Da) foi confirmado pelo seqüenciamento N-terminal por Química Degredativa de Edman. O ensaio da atividade biológica da proteína recombinante M<sub>t</sub>HGPRT foi provado por cinética de estado-estacionário. A proteína alvo mostrou ter atividade com os substratos hipoxantina e guanina, porém não foi detectada atividade com o substrato xantina como é demonstrado em HGPRTs de *Leishmania donovani*, *Schistosoma*



*mansoni*, *Trypanosoma brucei* and *cruzi* e *Thermoanaerobacter tengcongensis* .  
Esse resultado foi confirmado pelo ensaio no *HPLC* que utiliza colunas de fase-reversa. Os valores de  $K_M$  em estado-estacionário mostraram uma preferência maior para hipoxantina do que para guanina como substrato.

A revolução genômica tem sido a principal abordagem na qual se baseia o desenvolvimento de drogas e este desenho racional inclui estudos estruturais e funcionais de proteínas alvo [33]. Os resultados apresentados neste trabalho são de grande importância para definir o papel do gene *hpt* na biologia do *M. tuberculosis*.

## Referências Bibliográficas

1. Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption – A review on tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006, 101(7):697-714.
2. Pereira SM, Dantas OMS, Ximenes R, Barreto ML. BCG vaccine against tuberculosis: its protective effect and vaccination policies. Rev. Saúde Pública 2007, 41(supl.1).
3. World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO Report 2006./WHO/HTM/TB/2006.35.
4. World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO Report 2008./ WHO/HTM/TB/2008.393.
5. Saunders BM, Britton WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. Immunology and cell biology. 2007, 85:103-111.
6. Zahrt TC. Molecular mechanisms regulating persistent Mycobacterium tuberculosis infection. Microbes and Infection. 2003, 5: 159-167.
7. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, *et al.*. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature 1998, 393:537-544.
8. Young D, Stark J, Kirschner D. Systems biology of persistent infection: tuberculosis as a case study. Nat Rev Microbiol. 2008, 6(7):520-8.
9. Pieters J. Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance. Cell Host Microbe. 2008, 3(6):399-407.
10. Aaron L, Saadoun D, Calatroni I, Launay O, Mémain N, Vicent V, *et al.*. Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review. Clin Microbiol Infect. 2004, 10:388-398.

11. Stewart GR, Robertson BD, Young DB. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol.* 2003, 1(2):97-105.
12. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA.* 1999, 282:677-86.
13. Hoft DF. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet.* 2008, 372:164–75.
14. Warner DF, Mizrahi V. The survival kit of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature.* 2007, 13(3):282-284.
15. Elston JWT, Thaker HKB. Co-infection with human immunodeficiency virus and tuberculosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008, 74(3):194-199.
16. Basso LA, Blanchard JS. Resistance to antitubercular drugs. *Adv Exp Med Biol.* 1998, 456:115-144.
17. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia*, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001, p 703.
18. Zager EM, McNerney R. Multidrug-resistant tuberculosis. *BMC Infect Diseases.* 2008, 8:10.
19. Hargreaves S. WHO report highlights alarming rise of resistant tuberculosis. v 8 p 220, 2008.
20. Ginsberg AM, Spigelman M. Challenges in tuberculosis drug research and development. *Nature.* 2007, 13(3):290-294.
21. After decades of drought, news drug possibilities flood TB pipeline. *Nature.* 2007, 13(3)266.
22. Parker WB, Long MC. Purine metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* as a target for drug development. *Current pharmaceutical design.* 2007, 13:599-608.

23. Kouni MH. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacology and therapeutics*. 2003, 99:283-309.
24. Monzani PS, Alfonzo JD, Simpson L, Oliva G, Thiemann OH. Cloning, characterization and preliminary crystallographic analysis of *Leishmania* hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Biochim Biophys Acta*. 2002, 1598:3-9.
25. 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 Expres Purif*. 2003, 32:239-245.
26. Shivashankar K, Subbayya INS, Balaram H. Development of a bacterial screen for novel hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase substrates. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol*. 2001, 3:557-562.
27. Xu Y, Eads J, Sacchettini JC, Grubmeyer C. Kinetic mechanism of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: rapid phosphoribosyl transfer chemistry. *Biochemistry*. 1997, 36:3700-3712.
28. Wenck MA, Medrano FJ, Eakin AE, Craig SP. Steady-state kinetics of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta*. 2004, 1700:11-18.
29. Giacomello A, Salerno C. Human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: steady-state kinetics of the forward and reverse reactions. *The journal of Biological Chemistry*. 1978, 17:6038-6044.
30. Sarkar D, Ghosh I, Datta S. Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase: role of histidine residue in substrate selectivity. *Mol Biochem Paras*. 2004, 137:267-276.
31. Torres RJ, Puig JG. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2007, 2:48.

32. Santos DS, Chies JM, Basso LA, Renard G, Fonseca IO. Method for the obtention of chimeric nucleotide sequence and chimeric nucleodite sequence. 2006. Patent PCT/Br 2006/000267.
  
33. Schneider CZ, Parish T, Basso LA, Santos DS. The two chorismate mutases from both *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*: biochemical analysis and limited regulation of promoter activity by aromatic amino acids. *J Bacteriol.* 2008, 190:122-134.

## ANEXO I

### **Teste de purificação da proteína recombinante HGPRT de *M. tuberculosis***

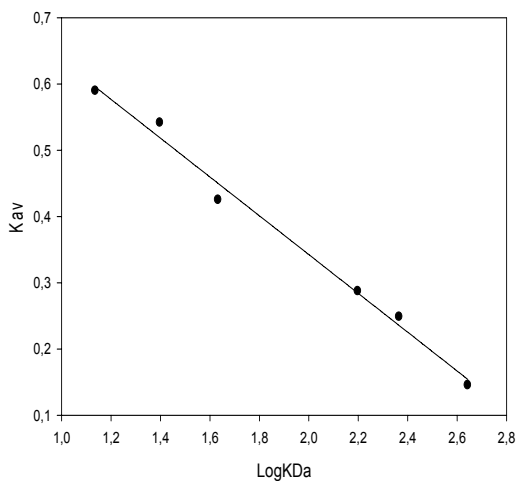
Os testes de purificação foram realizados utilizando o sistema de purificação de Cromatografia Líquida de Rápida Eficiência (*FPLC*) ÄKTA (GE Healthcare) para o controle do fluxo, pressão da coluna cromatográfica, detecção de vários comprimentos de onda, pH, temperatura, controle de gradiente, aplicação e coleta de amostras. As células foram preparadas conforme descrito no manuscrito e para a determinação do melhor protocolo de purificação várias colunas cromatográficas foram utilizadas, a fim de se obter o melhor rendimento e a otimização do processo. Foram utilizadas colunas cromatográficas de troca aniônica (como a Q Sepharose FF, DEAE Sepharose, Mono Q), de troca catiônica (Mono S), de interação hidrofóbica (Phenyl HP), de gel filtração (Sephacryl S200, Sephacryl S300).

As trocas aniônicas apresentaram um padrão semelhante, sendo que a coluna DEAE Sepharose foi a que melhor separou a proteína alvo das proteínas “contaminantes”. A coluna de troca catiônica não foi eficiente na purificação da proteína HGPRT. Na coluna de interação hidrofóbica, a proteína interagiu com a resina, melhorando o padrão de purificação. Como segunda coluna, sempre foi utilizada a Sephacryl S-300, sendo útil não só para retirar algumas proteínas contaminantes da amostra, mas também para trocar o tampão, tornando possível a utilização de uma terceira coluna. Entretanto, foram utilizadas três colunas cromatográficas para separar a proteína alvo das demais proteínas contaminantes, como descrito no manuscrito.

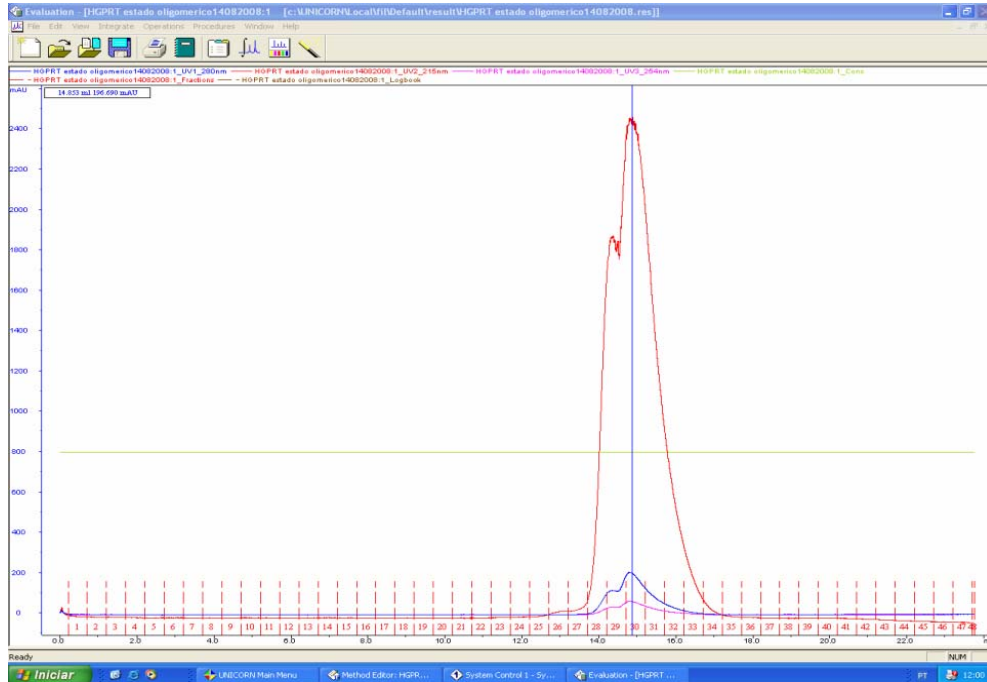
## ANEXO II

### Determinação do estado oligomérico em solução da proteína recombinante HGPRT de *M. tuberculosis*

Para a determinação do estado oligomérico da proteína em solução, ou seja, a massa molecular da proteína HGPRT homogênea recombinante, é utilizado o método cromatográfico com uma coluna de gel filtração Superdex 200 (HR 10/30) (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM + NaCl 0,2M pH 7.5 com um fluxo de 0,25mL/min. Foi feita uma curva de calibração com *kits* de padrões de proteínas de alto e baixo peso molecular (GEHealthcare) A eluição da proteína HGPRT foi monitorada a 280 nm. Após, os dados da curva de calibração foram utilizados para fazer uma regressão linear no programa SigmaPlot® onde a partir da equação da reta pode-se calcular a massa molecular da proteína alvo.



$$K_{av} = 0,9282 - 0,2928 \log KDa$$



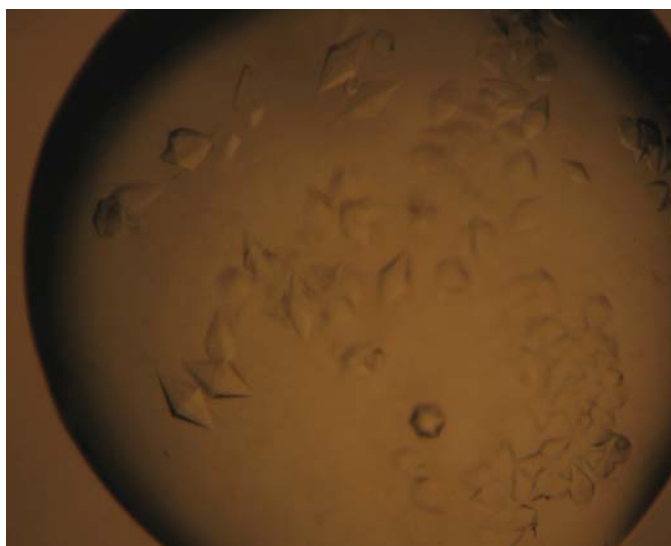
Como é visto no cromatograma, a proteína eluiu em dois picos não se podendo afirmar o estado oligomérico no qual a HGPRT de *M. tuberculosis* se encontra em solução. O primeiro pico eluiu num volume de 14,331mL e o segundo em 15,021mL. Colocando os valores na equação mostra-se como sendo um dímero. Porém, esse resultado tem de ser confirmado por SAXS, pois no cromatograma espera-se apenas a eluição de um pico da proteína alvo.



## ANEXO III

### **Determinação da estrutura tridimensional da proteína recombinante HGPRT de *M. tuberculosis***

As tentativas de cristalização para determinação da estrutura tridimensional foram feitas pelo método de difusão de vapor por gota em suspensão a 20°C. Os kits de triagem Hampton Crystal Screen e Crystal Screen 2 (Hampton Research) foram usados para determinar as condições de cristalização inicial. As gotas em suspensão foram preparadas misturando 1µL de uma solução contendo 5mg/mL da proteína recombinante HGPRT de *M. tuberculosis* em 20mM Tris-HCl pH7.5 e 1µL da solução do reservatório. Cristais foram obtidos em diferentes condições de solução; porém, a melhor condição foi com 0,1M de imidazol pH 6,5 e 1M de acetato de sódio trihidratado. Os cristais formaram-se após 24 horas.



Cristais da proteína recombinante HGPRT de *M. tuberculosis*

O conjunto de dados do padrão de difração de raio X dos cristais da proteína recombinante HGPRT de *M. tuberculosis* foram coletados e inseridos no programa MOSFLM e SCALA. Os dados foram coletados a um comprimento de onda de 1,437 Å, usando uma fonte de radiação síncrotron (LNLS, Campinas). Analisando os eixos e ângulos dos cristais chega-se a conclusão que é um sistema hexagonal.

Tabela 1. Resumo da estatística da coleta de dados da HGPRT.

Valores em parênteses são para a camada de resolução maior.

Comprimento de onda de raio X (Å)	1,43700
Parâmetros da célula	a=b= 82,7599 Å c= 172,900 Å  $\alpha=\beta=90^\circ \gamma=120^\circ$
Grupo Espacial	P3
Resolução (Å)	174,0-4,0
No. medidas com $I > 2\sigma(I)$	22323
No. reflexões independentes	11216
Completeza (%)	97,6(97,6)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	5,1(2,2)
Rsym (%)	10,5(29,3)

$R_{sym} = \frac{\sum_h \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I(h)_i}$  onde  $I(h)$  é a intensidade de reflexão h, a soma

$\sum_h$  é a soma de todas as reflexões e a soma  $\sum_i$  é a soma geral das medidas i da reflexão h.

Os cristais da proteína alvo difrataram, porém, com uma resolução baixa (174,0 – 4,0 Å). Contudo, visando a obtenção de um melhor padrão de difração, os

crístais serão otimizados por outras tentativas de cristalização. Estes estudos de determinação da estrutura tridimensional da proteína foram realizados no laboratório de Bioquímica LaBioQuest, na PUCRS, laboratório sob coordenação do Prof. Dr. Walter Figueira de Azevedo Jr. da PUCRS.

## ANEXO IV

### Submissão do Manuscrito

**From:** PEP (ELS) [mailto:[pep@elsevier.com](mailto:pep@elsevier.com)]

**Sent:** Fri 2/27/2009 12:29 PM

**To:** Luiz Augusto Basso

**Subject:** Protein Expression and Purification: Submission Confirmation

Title: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning, expression, and biochemical characterization

Corresponding Author: Dr. Luiz Augusto Basso

Authors: Gisele Biazus, MSc; Cristopher Z Schneider, PhD; Mario S Palma, PhD; Diogenes S Santos, PhD

Dear Dr. Basso,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Protein Expression and Purification.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Protein Expression and Purification as an author:

<http://ees.elsevier.com/prep/>

Your username is: LBASSO

If you can't remember your password, please click the "Send Password" link on the Login page.

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

Thank you for submitting your manuscript to Protein Expression and Purification. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Susan Ikeda  
Protein Expression and Purification  
Journal Manager  
Elsevier  
525 B Street, Suite 1900  
San Diego, CA 92101-4495  
USA  
Phone: 619 699 6793  
Fax: 619 699 6211  
E-mail: [pep@elsevier.com](mailto:pep@elsevier.com)