

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

**A enzima indol-3-glicerol fosfato sintase de  
*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv:  
caracterização cinética e mecanismo químico**

**Clarissa Melo Czekster**

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

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

**Porto Alegre, 2008**

*Este trabalho é dedicado a Rafael.*

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

## **Agradecimentos**

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

Ao Professor **Diógenes S. Santos**, pela oportunidade.

Ao professor **Brenno A.D. Neto**, pela colaboração e ajuda.

Aos colegas **Isabel Fonseca, Christopher Schneider, Eraldo Batista, Bruna Selbach, Isabel Werlang, Rodrigo Ducati, Maria Martha Campos, Fernanda Ely, Marcelo Pedroso e Ardala Breda**, pelo convívio e ensinamentos.

A minha família, **Elizabeth, Waldemar, Ricardo, Gustavo e Rafael**, sem a qual nada teria sentido.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Bioquímica**, pela oportunidade de desenvolver o mestrado.

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

# Índice

<b>Parte I</b> .....	1
Resumo .....	2
Abstract .....	3
Lista de Abreviaturas .....	4
Introdução .....	5
Objetivos .....	18
<b>Parte II</b> .....	19
Capítulo I .....	20
Capítulo II .....	21
<b>Parte III</b> .....	22
Discussão .....	23
Referências .....	35

# **PARTE I**

## Resumo

A enzima indol-3-glicerol fosfato sintase (IGPS) catalisa a formação irreversível do anel do composto 1-o-carboxifenilamino desoxiribulose-5-fosfato (CdRP), através de uma decarboxilação e de uma desidratação, liberando o composto indol-3-glicerol fosfato (IGP), o quinto passo na via de biossíntese do triptofano. Neste trabalho, é descrita a clonagem, expressão, purificação e caracterização cinética da IGPS, além da identificação de um intermediário reacional. Para a realização destes estudos, o substrato da enzima (CdRP) foi sintetizado quimicamente, purificado e caracterizado espectroscopicamente e espectrometricamente. A fluorescência do CdRP mostrou-se dependente de pH, possivelmente devido ao efeito de transferência intramolecular de prótons no estado excitado (ESIPT). Efeitos de temperatura foram analisados, indicando uma energia de ativação de  $8.4 \text{ kcal mol}^{-1}$  para a reação catalisada pela IGPS. Efeitos isotópicos de solvente mostraram que a transferência de próton é apenas modestamente limitante para a reação, e estudos de inventário de prótons demonstraram que apenas um próton é responsável pelo efeito isotópico de solvente observado. Perfis de pH foram realizados para avaliar a presença de catálise ácido-base, mostrando que um resíduo desprotonado de  $pK_a$  aparente igual a 6.0 é necessário para a catálise e que um resíduo com  $pK_a$  aparente igual a 6.8 é necessário para a ligação do CdRP. Sugerimos que ambos os  $pK_a$  estejam reportando para um mesmo resíduo, que poderia ser um glutamato conservado em todas as IGPS caracterizadas até o presente. Um modelo é proposto para explicar o ESIPT, assim como uma seqüência cinética baseada nos perfis de pH. Para identificar possíveis intermediários reacionais, a técnica de ESI-MS foi empregada para estudar a reação catalisada pela IGPS, e um intermediário químico foi interceptado e caracterizado.

## Abstract

The enzyme indole-3-glycerol phosphate synthase (IGPS) catalyzes the irreversible ring closure of 1-o-carboxyphenylamino deoxyribulose-5-phosphate (CdRP), through a decarboxylation and a dehydration, releasing indole-3-glycerol phosphate (IGP), the fifth step in the biosynthesis of tryptophan. In the present work, we describe cloning, expression, purification, and kinetic characterization of IGPS. In order to perform kinetic studies, CdRP was chemically synthesized, purified, and spectroscopically and spectrometrically characterized. CdRP fluorescence was pH-dependent, probably owing to excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) effect. Temperature effects were analyzed, indicating an activation energy of  $8.4 \text{ kcal mol}^{-1}$  for the IGPS catalyzed reaction. Solvent isotope effects showed that a proton transfer is only modestly limiting for the reaction, and proton inventory studies pointed to a single proton responsible for the observed solvent isotope effect. pH-rate profiles were carried out to probe for acid/base catalysis, showing that a deprotonated residue with an apparent  $\text{pK}_a$  of 6.0 is required for catalysis and a deprotonated residue with an apparent  $\text{pK}_a$  of 6.8 is necessary for CdRP binding. It was suggested that both apparent  $\text{pK}_a$  report on the same residue, which might be a glutamate conserved amongst all IGPS characterized so far. A model is proposed to explain the ESIPT, and a kinetic sequence is suggested based on the pH-rate profiles. ESI-MS was employed to identify possible chemical intermediates of the IGPS catalyzed reaction, and one chemical intermediate was intercepted and characterized.



## Lista de abreviaturas

WHO	Organização Mundial da Saúde
TB	Tuberculose
MDR-TB	<i>M. tuberculosis</i> resistente a múltiplas drogas
XDR-TB	<i>M. tuberculosis</i> extensivamente resistentes a drogas
PRAT	fosforibosil antranilato transferase
PRAI	fosforibosil antranilato isomerase
MtIGPS	indol-3-glicerol fosfato sintase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CdRP	1-o-carboxifenilamino desoxiribulose-5-fosfate
IGP	indol-3-glicerol fosfato
ESI-MS	espectrometria de massas por ionização com spray de elétrons
ESIPT	transferência intramolecular de prótons no estado excitado
RMN	ressonância magnética nuclear
$V$	Velocidade máxima
$K$	Constante de Michaelis
$k_{cat}$	Constante catalítica
$D_2O V$	Efeito isotópico de solvente em $V$
$D_2O V/K$	Efeito isotópico de solvente em $V/K$

## Introdução

"The Earth is suffocating... Swear to make them cut me open, so that I won't be buried alive."

- *Frederic Chopin (1810-1849), compositor e pianista polonês, antes de sua morte causada pela tuberculose.*

Esta frase dita no leito de morte por Frederic Chopin ilustra o sofrimento de experimentar algo semelhante à “morte em vida”: sentir-se permanentemente sufocado pela tosse prolongada e hemoptise, além de sentir-se fraco e consumido pela dor no peito e pelo cansaço fácil, apenas alguns dos males a que uma pessoa com tuberculose está sujeita.

Esta doença também vitimou outros personagens famosos de nossa história, e Simon Bolívar, Edgar Allan Poe, Eleanor Roosevelt, George Orwell, Vivien Leigh, Niccolò Paganini, Alexander Graham Bell, Erwin Schrödinger, são apenas alguns exemplos. Porém, simplesmente considerar personalidades mortas, muitas ainda em tenra idade, subestima em muito a extensão da quantidade de vidas que a tuberculose já ceifou. De acordo com estimativas da Organização mundial de saúde (OMS), apenas no período de 1990 a 2005, aproximadamente 26 milhões pessoas vieram a óbito devido à tuberculose, nos 208 países monitorados pela OMS (TB, incidência global, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/index.html>).

## Histórico

A tuberculose não foi identificada como doença até a segunda década do século 19 e foi nomeada por Schoenlein em 1839. Apesar desta identificação bastante tardia, alguns relatos demonstram que a tuberculose já havia sido identificada em humanos desde a antiguidade, já que as origens da doença coincidem com o início da domesticação do gado. Alguns esqueletos de humanos pré-históricos, que datam em torno de 4000 a.C., já tinham tuberculose, assim como algumas múmias egípcias (Nerlich *et. al*, 1997). Os primeiros trabalhos que identificaram a tuberculose nas Américas utilizaram múmias peruvianas de 1000 anos de idade, identificando um caso de tuberculose pulmonar (Salo *et. al*, 1994)

Apesar de possuir uma sintomatologia que já era amplamente conhecida, o bacilo causador da doença, *Mycobacterium tuberculosis* foi descrito apenas em 24 de março de 1882 por Robert Koch, descoberta que foi agraciada em 1905 por um Prêmio Nobel de medicina. Além de descobrir o bacilo causador da TB, Koch sugeriu um extrato de glicerina com o bacilo da tuberculose como um "remédio" para a doença em 1890, que recebeu o nome de tuberculina. Este "remédio" não teve eficácia, sendo posteriormente adaptado por von Pirquet para um teste para tuberculose pré-sintomática, realizado até os dias atuais (Daniel, 2006).

Foi apenas em 1921 que o primeiro sucesso na prevenção da tuberculose foi atingido. Uma vacina utilizando cepas atenuadas de tuberculose bovina foi elaborada, sendo nomeada vacina BCG (Bacilo de Calmette e Guérin), honrando os pesquisadores que a desenvolveram. A BCG foi administrada em humanos pela primeira vez em julho de

1921 na França, mas diversas questões impediram sua disseminação nos EUA, Reino Unido ou Alemanha até o final da Segunda Guerra Mundial.

Em 1946, com a descoberta do antibiótico estreptomicina, o tratamento, e não apenas a prevenção da TB, tornou-se possível. Antes disso, somente a intervenção cirúrgica apresentava-se como tratamento (além dos sanatórios), incluindo a técnica do pneumotórax: provocar o colapso de um pulmão infectado para deixá-lo "descansar" e permitir a cicatrização das lesões, técnica muito habitual, porém pouco benéfica, sendo posta de lado após 1946.

Durante o século 19 e início do século 20, a TB foi um motivo de grande preocupação pública, principalmente entre as classes menos favorecidas. Desta forma, após ter ficado claro que a TB era uma doença contagiosa, diversas medidas foram tomadas, essencialmente por países europeus e nos Estados Unidos, para que a TB fosse notificada e mesmo para que pessoas doentes fossem isolados, evitando a disseminação da doença. Com essas medidas, juntamente com uma melhoria na saúde pública, as mortes por TB diminuíram significativamente nestes países, mesmo antes do surgimento de antibióticos.

Apesar da doença nunca ter sido controlada nos países em desenvolvimento, principalmente devido à precariedade dos sistemas de saúde e à imunodepressão causada tanto pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) quanto por subnutrição, esperava-se que a doença pudesse ser controlada nos países desenvolvidos. Entretanto, as elevadas taxas de cepas resistentes a drogas, a co-infecção com o HIV, as práticas precárias de controle de infecções e os problemas causados por imigrações frustraram esta expectativa (Fätkenheuer *et al.*, 1999). Por exemplo, os casos de TB no Reino Unido, que beiravam os 50.000 em 1955, caíram para cerca de 5.500 em 1987, mas, em 2001,

havia mais de 7.000 casos confirmados. Além disso, inúmeros pacientes interrompem seu tratamento, originando ainda mais cepas resistentes a muitas das drogas normalmente usadas. Devido à chamada “ressurgência” da doença, em 1993, a OMS declarou a TB uma doença de emergência global.

Além das cepas multirresistentes a drogas (MDR-TB), o surgimento das cepas extensivamente resistentes (XDR-TB), aumentou ainda mais a preocupação com a disseminação desta doença, já que a infecção por XDR-TB é virtualmente incurável e tais cepas já foram identificadas em 41 países, uma progressão bastante acelerada se considerarmos que as primeiras notificações de XDR-TB ocorreram na década de 90 (CDC report 2000-2004).

### **Surgimento e evolução**

Os membros do complexo do *M. tuberculosis* (espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, e *M. caprae*), causadores da TB, estão entre os patógenos humanos mais bem sucedidos. Ainda que os membros da MTBC possuam características diversas e hospedeiros variáveis, eles possuem uma homogeneidade genética surpreendente, com nenhum traço significativo de troca gênica entre eles. Devido a isto, acredita-se que os membros da MTBC sejam resultantes de um único ancestral (Brosch, 2002).

Através da análise filogenética de alguns genes constitutivamente expressos, estima-se que o *M. tuberculosis* tenha surgido há aproximadamente 3 milhões de anos, na África, sofrendo uma expansão clonal posterior. Após esta primeira expansão, acredita-se que um clone mais adaptado do bacilo tenha colonizado o resto do mundo, possivelmente devido às ondas de migração humana para fora da África (Gutierrez *et.al*, 2005).

## A doença

### Transmissão e patogenicidade

A TB é uma doença contagiosa que se espalha pelo ar, quando indivíduos contaminados manifestando a doença na sua forma ativa espirram, tosem ou falam, e, ao fazê-lo, emitem aerossóis que contêm o bacilo. Estima-se que cada pessoa com TB ativa possa contaminar 10 a 15 pessoas saudáveis a cada ano (OMS).

A probabilidade de transmissão depende do quão doente está o indivíduo com TB, quantos bacilos foram expelidos, do grau de virulência do bacilo infectante e do tempo de exposição ao contágio. De cada 10 pessoas que entram em contato com o bacilo, apenas 1 irá desenvolver a doença ativa durante sua vida, ainda que estes números variem consideravelmente para indivíduos portadores de HIV, podendo chegar a 1 indivíduo soropositivo desenvolvendo a TB a cada 10 infectados por ano (OMS; Gómez e McKinney, 2004). O bacilo também pode infectar o hospedeiro e ficar em uma condição de latência, na qual o hospedeiro não desenvolve os sintomas da doença, mas ela permanece em seu corpo, podendo, ou não, ser ativada ao longo da vida.

Algumas situações que aumentam a chance de desenvolver a doença ou de retirar o bacilo de seu estado de latência são infecções recentes de tuberculose (últimos 2 anos), lesões fibróticas e nódulos nos pulmões; *diabetes mellitus*, silicose, terapia prolongada com corticosteróides e outras terapias imunossupressivas, câncer na cabeça ou pescoço, doenças no sangue ou reticuloendoteliais (leucemia e doença de Hodgkin), doença renal em estágio avançado, gastrectomia, síndromes crônicas de mal-absorção, ou baixo peso corporal (10% ou mais de peso abaixo do ideal). Alguns estudos têm demonstrado a

importância de fatores genéticos no desenvolvimento da doença, sendo que a susceptibilidade à TB é claramente poligênica (Rengarajan *et. al*, 2001; Marquet *et. al*, 2001; Meya e McAdam, 2007).

## Infecção

A infecção pela TB ocorre quando o bacilo atinge os alvéolos pulmonares, de onde ele pode se espalhar para os nódulos linfáticos e, conseqüentemente, para a corrente sanguínea. Se penetrar na corrente sanguínea, o bacilo pode colonizar tecidos mais distantes do pulmão, como a pleura, o sistema nervoso central (meninges), o sistema linfático, o sistema genitourinário, ossos e juntas, ou pode ser disseminada pelo corpo (tuberculose miliar - assim chamada porque as lesões que se formam parecem pequenas sementes). Estas formas da doença são mais comuns em pessoas com supressão imunológica e em crianças. Na maioria dos casos, porém, a tuberculose fica restrita aos pulmões, sendo chamada tuberculose pulmonar (Myers, 2007; Meya e McAdam, 2007).

Os sintomas da doença incluem tosse prolongada com duração de mais de três semanas, dor no peito e sangue no escarro (hemoptise). Outros sintomas são febre, calafrios, suores noturnos, perda de apetite e de peso, e cansaço fácil. A palavra *consumção* (*consumpção*, em Portugal) surgiu porque os doentes pareciam ter sido "consumidos por dentro" pela doença (Daniel, 2006).

Na maior parte dos casos, ao entrar em contato com a doença, o bacilo será eliminado pelo próprio sistema imune do hospedeiro, ocasionando a formação de um granuloma. Os "tubérculos", ou nódulos de tuberculose são pequenas lesões que podem consistir de tecidos mortos de cor acinzentada contendo a bactéria da tuberculose. No

entanto, têm-se um conhecimento restrito acerca do tipo de metabolismo o bacilo adota neste microambiente particular.

## Tratamento

O tratamento atualmente administrado para a tuberculose é longo e apresenta diversos efeitos colaterais. As chamadas drogas de primeira linha são utilizadas em pacientes que foram diagnosticados com TB pela primeira vez e que não estejam infectados por cepas resistentes. Estas drogas anti-tuberculose possuem três propriedades principais, que têm expressão variável em cada um dos diferentes fármacos: atividade bactericida, atividade esterilizante e capacidade de reduzir o surgimento da resistência quando utilizadas em combinação. Mitchison (1985) sugeriu a existência de quatro populações do bacilo da tuberculose para explicar a necessidade de um tratamento quimioterápico prolongado. A primeira população encontra-se em crescimento rápido que é alvo da ação da isoniazida, rifampicina, estreptomicina e etambutol. As populações semi-dormentes podem ser subdivididas em duas subpopulações: aquelas que têm episódios rápidos de atividade metabólica que são alvo da rifampicina, e aquelas em meio ácido que são alvo da pirazinamida. A utilização da pirazinamida para as populações semi-dormentes que não são afetadas pelas outras drogas anti-tuberculose reduz o tratamento de nove para seis meses. A quarta população é a de micobactérias dormentes, para a qual nenhuma droga do tratamento atual é eficaz. Assim, a OMS recomenda que o tratamento consista de duas fases, uma fase inicial para conter o bacilo e uma fase de continuação, geralmente mais longa, para impedir o surgimento de cepas resistentes (Mitchison, 1985).

Porém, quando o paciente está infectado por uma MDR-TB, o tratamento deve fazer uso das drogas de segunda linha, que são mais tóxicas e precisam ser usadas por um



tempo prolongado. As drogas anti-tuberculose de segunda linha são o último recurso no tratamento da TB crônica e MDR-TB.

O tratamento para casos de MDR-TB varia de acordo com o tipo de resistência que o paciente possui, podendo chegar a seis meses de fase inicial com administração diária de uma droga injetável, ciprofloxacina ou ofloxacina e mais 2 destas 3 drogas por via oral: ácido p-aminosalicílico, etionamida, cicloserina. A fase de continuação consiste na administração das mesmas drogas, exceto a injetável, por até 18 meses, totalizando um tratamento de dois anos (Meya e McAdam, 2007).

### ***Mycobacterium tuberculosis***

O bacilo é um aeróbio obrigatório, motivo pelo qual o pulmão é preferencialmente atacado e as infecções secundárias têm início nos ápices destes. O *M. tuberculosis* possui um tempo de crescimento lento (próximo de 20 horas), e suas colônias só podem ser visualizadas após várias semanas de crescimento.

Outra característica peculiar deste bacilo é a presença de lipídeos celulares únicos. A parede celular do *M. tuberculosis* é única entre os procariotos e grande determinante de sua virulência. Além de peptidoglicanos, a parede celular contém lipídeos complexos, o que faz com que o bacilo seja resistente a muitos antibióticos e também a oxidações letais, facilitando sua sobrevivência dentro de macrófagos (Keep, 2006).

O *M. Tuberculosis* é um patógeno intracelular facultativo, já que neutrófilos ou macrófagos não são capazes de exterminá-lo. O bacilo previne a acidificação dos fagolisossomos, resistindo aos mecanismos intracelulares de eliminação de micróbios destas células. Porém, uma vez confinado ao fagossomo, o bacilo deve obter seus

nutrientes a partir deste, modificando seu próprio ambiente vacuolar para permitir a aquisição de nutrientes (Desai *et.al*, 1993). O vacúolo das micobactérias parece ser um compartimento relativamente pobre em nutrientes, no qual a disponibilidade de ferro, magnésio, fosfato, purinas, cofatores e aminoácidos é limitada (Boshoff e Barry, 2005).

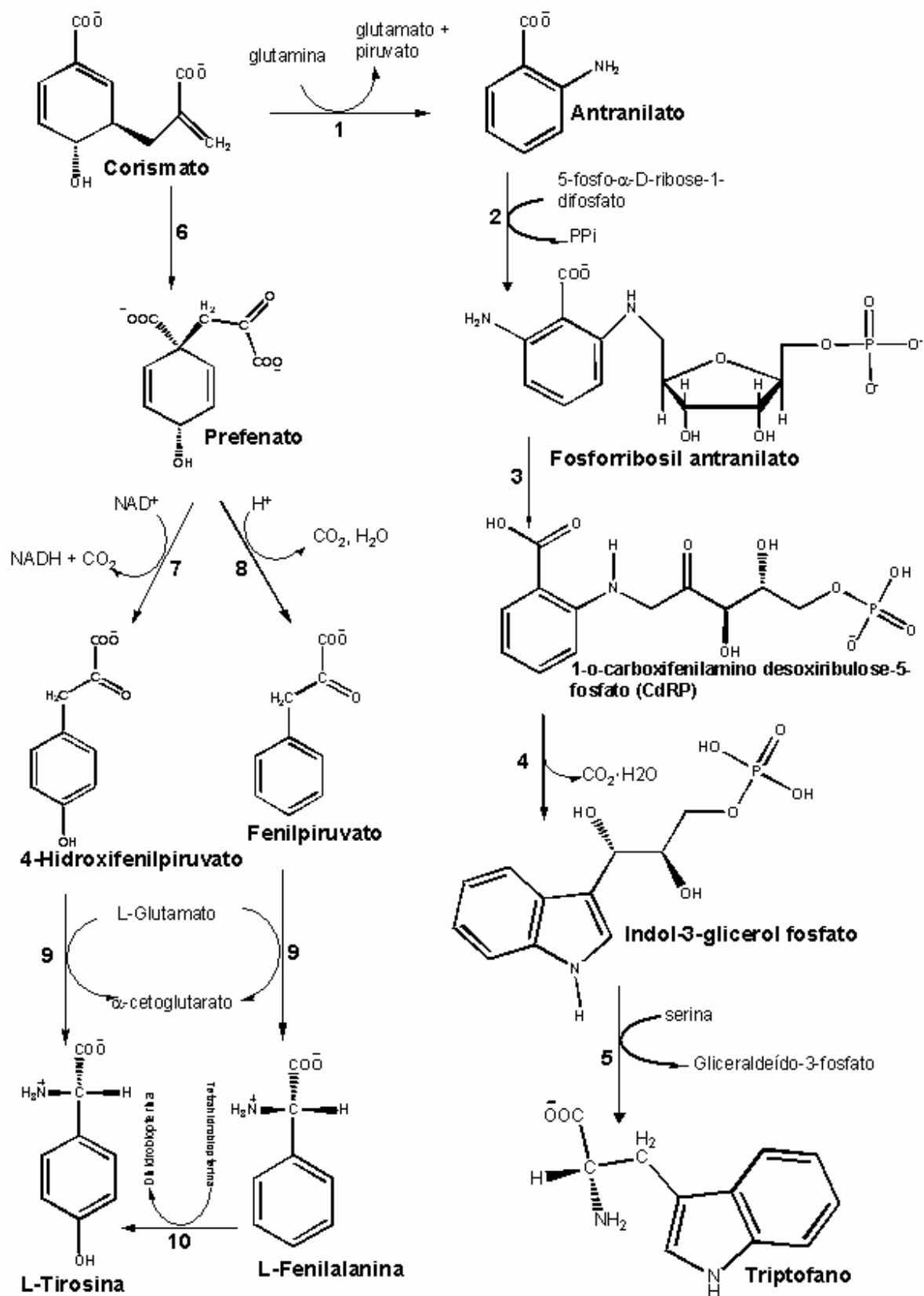
O seqüenciamento completo do genoma do *M. tuberculosis* (Cole *et. al*, 1998), possibilitou identificar ORFs importantes para o crescimento e virulência do bacilo. O acesso a esta informação facilitou o estudo de vários genes e proteínas de interesse, assim como comparar a expressão e funcionalidade de diversas proteínas *in vitro* e *in vivo*. Assim, alguns trabalhos realizados com camundongos infectados com *M. tuberculosis* mutantes que eram incapazes de sintetizar certos nutrientes, como aminoácidos, purinas e pantotenato, demonstraram que estas bactérias mutantes eram menos virulentas, e em alguns casos avirulentas, em camundongos (Boshoff e Barry, 2005; Sampson *et. al*, 2004). Para o presente trabalho, é particularmente relevante um estudo (Smith *et. al*, 2001) que demonstrou que camundongos infectados com cepas de *M. tuberculosis* nocauteadas para o gene *trpD* (que codifica a enzima PRAT, da via de biossíntese do triptofano) não desenvolveram a doença. Este estudo foi extremamente importante, já que anteriormente existia um impasse acerca de quão essencial para o bacilo, *in vivo*, seriam alguns aminoácidos, já que o próprio macrófago infectado poderia fornecê-los para o *M. tuberculosis*. Com este estudo, ficou evidente que, apesar da existência de concentrações basais de certos nutrientes no fagossoma, a via de biossíntese do triptofano era essencial para a virulência do bacilo. Até a data, esta via biossintética foi alvo de poucos estudos e não se sabe ainda o porquê desta importância para a virulência.

## **Biossíntese de aminoácidos aromáticos**

A via de biossíntese de aminoácidos aromáticos está presente em plantas, fungos, bactérias e organismos do filo apicomplexa, estando ausente em mamíferos. Assim, humanos necessitam ingerir os aminoácidos triptofano e fenilalanina para que possam obtê-los e utilizá-los para a síntese protéica. A biossíntese destes aminoácidos tem início com o precursor corismato, que é então convertido ou a prefenato (para iniciar a biossíntese de fenilalanina e tirosina) ou a antranilato (para que o triptofano seja sintetizado). (FIGURA 1)

### **Biossíntese do triptofano**

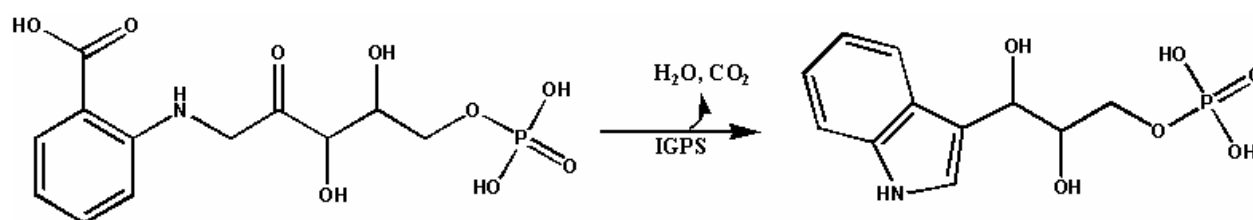
A via de biossíntese do triptofano converte o precursor corismato em triptofano através de cinco passos enzimáticos. Existem poucos estudos disponíveis sobre as enzimas desta via enzimática, principalmente devido ao fato de que a maioria das enzimas só é ativa quando faz parte de complexos com outras proteínas. Outra dificuldade para o estudo desta via é a indisponibilidade comercial dos substratos das reações. O único composto disponível no mercado é o antranilato, de modo que todos os outros intermediários da via necessitam ser sintetizados química ou enzimaticamente. Assim, quase todos os trabalhos realizados até a data sobre estas enzimas são estruturais, já que, para realizá-los, não é necessário ter as enzimas em sua forma cataliticamente ativa.



**Figura 1:** Via de biossíntese dos aminoácidos aromáticos. O precursor comum corismato é convertido a pefenato para dar origem aos aminoácidos tirosina e fenilalanina ou a antranilato, dando origem ao triptofano. Modificada a partir de Pittard, 1996. 1, Antranilato sintase; 2, Fosforibosil antranilato transferase; 3, Fosforibosil antranilato isomerase; 4, Indol-3-glicerol fosfato sintase; 5, Triptofano sintase; 6, Corismato mutase; 7, Pefenato desidrogenase; 8, Pefenato desidratase; 9, Transaminase; 10, Fenilalanina hidroxilase.

Indol-3-glicerol fosfato sintase (IGPS)

A quarta reação da via de biossíntese do triptofano é catalisada pela enzima IGPS (Creighton e Yanofsky, 1966).



**Figura 2:** Reação catalisada pela enzima IGPS.

Esta reação consiste de uma condensação intramolecular, liberando água e gás carbônico, originando a porção pirrólica do triptofano. Em *M. tuberculosis*, esta proteína é codificada pelo gene *trpC*, com 819 pb, no operon do triptofano, que codifica apenas a cadeia polipeptídica da IGPS, com 272 aminoácidos por subunidade, diferentemente do que ocorre em outros organismos. Por exemplo, em *Escherichia coli*, o gene *trpC* codifica as cadeias polipeptídicas das enzimas PRAI e IGPS; em *Archaeoglobus fulgidus*, a proteína IGPS e a proteína PRAT são codificadas pelo mesmo gene; em *Aspergillus niger*,

o gene *trpC* codifica as proteínas glutamina amidotransferase (componente 2 da antranilato sintase), IGPS e PRAI.

O substrato da IGPS, 1-o-carboxifenilamino desoxiribulose 5-fosfato (CdRP), apesar de sintetizado quimicamente por diversos grupos de pesquisa (Smith e Yanofsky, 1960; Smith e Yanofsky, 1962; Doy, 1966; Kirschner *et. al*, 1987), não foi ainda caracterizado. A única informação disponível é seu espectro de absorção (Kirschner *et. al*, 1987). Porém, os protocolos sintéticos disponíveis possuem um rendimento relativamente baixo (10 % - 60 %), e a estabilidade do CdRP é bastante reduzida, o que dificulta ensaios enzimáticos.

Uma breve caracterização cinética aparente desta enzima foi recentemente publicada, porém utilizando CdRP não purificado (Yang *et. al*, 2006). Além disto, os estudos relatados por Yang *et al.* (2006) não possuem a profundidade experimental e análise criteriosa apresentada nesta dissertação. Neste trabalho, uma caracterização cinética mais ampla da IGPS de *M. tuberculosis* é descrita, bem como a identificação de um intermediário reacional. Os resultados aqui descritos contribuem para a ampliação do conhecimento desta via biossintética e, de forma mais ampla, a cerca da biologia do bacilo, um passo importante para entender e conter a TB.

## Objetivos

Os principais objetivos do presente trabalho dizem respeito a ampliar o conhecimento existente sobre a enzima IGPS, que faz parte de uma via metabólica pouco estudada em micobactérias, importante para a virulência do patógeno. A clonagem do gene *trpC* de *M. tuberculosis* H37Rv e sua expressão em células de *E. coli* foram realizadas durante meu trabalho de conclusão do curso de bacharel em Ciências Biológicas. Os objetivos específicos deste trabalho consistem na purificação da enzima na sua forma ativa, a determinação do  $K_M$  e  $k_{cat}$  da enzima, na obtenção de perfis de pH e temperatura, na análise de efeitos isotópicos de solvente e identificação de possíveis intermediários da reação.

Para que fosse possível realizar este trabalho com a enzima IGPS, seu substrato, CdRP, foi sintetizado e caracterizado espectrometricamente e espectroscopicamente. Foram utilizadas técnicas de UV-vis, espectrofluorimetria, titulação ácido-base, espectrometria de massas, infravermelho e ressonância magnética nuclear para caracterizar o composto.

## **PARTE II**



## Capítulo I

Kinetic characterization of indole-3-glycerol phosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*

Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Biochemistry* em 2008.

**Kinetic characterization of indole-3-glycerol phosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis***

Clarissa M. Czekster<sup>a,b</sup>, Brenno A. D. Neto<sup>c</sup>, Alexandre A. M. Lapis<sup>c</sup>, Jairton Dupont<sup>c</sup>, Diogenes S. Santos<sup>a</sup>, Luiz A. Basso<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Faculdade de Biociências e Faculdade de Farmácia, Instituto de Pesquisas Biomédicas, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup>Laboratory of Molecular Catalysis - Institute of Chemistry - UFRGS.

**Short title:** Indole-3-glycerol phosphate synthase from *M. tuberculosis*

**Corresponding authors:** Luiz A. Basso or Diógenes S. Santos, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 6681/92-A Av. Ipiranga, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone/Fax: +55 51 33203629. E-mails: [luiz.basso@pucrs.br](mailto:luiz.basso@pucrs.br) or [diogenes@pucrs.br](mailto:diogenes@pucrs.br)

## Abstract

Indol-3-glycerol phosphate synthase (IGPS) catalyzes the irreversible ring closure of 1-(*o*-carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose 5-phosphate (CdRP), through decarboxylation and dehydration steps, releasing indol-3-glycerol phosphate (IGP), the fourth step in the biosynthesis of tryptophan. Here we describe the cloning, expression, purification, and kinetic characterization of IGPS from *Mycobacterium tuberculosis*. To perform kinetic studies, CdRP was chemically synthesized, purified, and spectroscopically and spectrometrically characterized. CdRP fluorescence was pH-dependent, probably owing to excited-state intramolecular proton transfer. The activation energy was calculated, and solvent isotope effects and proton inventory studies were performed. pH-rate profiles were carried out to probe for acid/base catalysis, showing that a deprotonated residue is necessary for CdRP binding and conversion to IGP. A glutamate conserved in all IGPS characterized so far was proposed to play a role as a general base. A model is proposed to explain the excited-state intramolecular proton transfer, and a kinetic sequence is suggested based on the pH-rate profiles.

**Keywords:** Indole-3-glycerol phosphate synthase, kinetic characterization, 1-(*o*-carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose 5-phosphate, excited-state intramolecular proton transfer, pH-rate profiles, solvent-kinetic isotope effects.

## Introduction

*Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of tuberculosis (TB)<sup>1</sup>, is the most lethal pathogen among all bacteria [1]. It is estimated that TB kills a person every 16 seconds around the world. Although significant progress has been made to fight all types of bacterial diseases, TB remains a challenge. For example, we still employ a one-hundred-year-old diagnostic test, a vaccine invented 80 years ago, and drugs that are unspecific and remain unchanged for the past 40 years [2]. Even developed countries are now facing the threat of TB [3]. Our knowledge about TB's biochemical pathways need to be expanded so we can consider novel approaches to halt the growing spreading of this disease.

The complete genome sequence determination of *M. tuberculosis* H37Rv (Cole et al., 1998) allowed the identification by sequence homology of genes involved in metabolic pathways of the pathogen. Accordingly, a number of pathways are being studied as promising new targets for TB drugs and vaccines. More specifically, Smith *et al.* [4] demonstrated that the tryptophan biosynthesis pathway is essential for the virulence of *M. tuberculosis*. Unfortunately, only a few studies on the *M. tuberculosis* tryptophan biosynthesis pathway have been reported [5-7]. The biosynthesis of tryptophan begins with chorismate, a common metabolic precursor, and, after five steps, generates tryptophan. This work focuses on the fourth step of this pathway, catalyzed by the enzyme indol-3-glycerol phosphate synthase (IGPS). IGPS catalyzes the irreversible ring closure of 1-(*o*-carboxyphenylamino)-deoxyribulose 5-phosphate (CdRP), through decarboxylation and dehydration steps, releasing indol-3-glycerol phosphate (IGP), which contains the indolic ring of tryptophan (Fig. 1) [8].

In this article, we describe the cloning, expression and purification of *trpC*-encoded *Mt*IGPS. In addition, we describe a modified protocol for the chemical synthesis and purification of CdRP,

and its characterization employing mass spectrometry, infra-red and  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, UV-vis and spectrofluorimetry. The *MtIGPS*-catalyzed reaction was characterized by initial velocity experiments, pH-rate profiles, temperature effects, solvent kinetic isotope effects, and proton inventory. It is hoped that the data presented here will contribute to further the knowledge on the tryptophan biosynthesis pathway in *M. tuberculosis*.

## Materials and Methods

*Materials* - All chemicals were of analytical or reagent grade and were used without further purification. Deuterium oxide (99.9 atom % D) was purchased from Cambridge Isotope Laboratories. *Pfu* DNA Polymerase was purchased from Stratagene. Restriction enzymes and T4 DNA ligase were purchased from Invitrogen.

*Cloning, Expression, and Purification of MtIGPS* - The forward primer sequence for amplification of the *trpC* coding region was 5'-**CACATATGAGTCCGGCAACCGTGCTCGACTC**-3', having an *NdeI* restriction site (bold) at the N-terminal end. The reverse primer sequence was 5'-**TGGATCCTCAGCGAGCCGGTTTCGGACAG**-3', which introduced a *BamHI* restriction site (bold) at the C-terminal end. All PCR reactions were carried out using *pfu* DNA polymerase (Stratagene), using conditions recommended by the manufacturer, and were supplemented by the addition of 10% (v/v) DMSO. The resultant PCR product, corresponding to 819 bp, was ligated into the pCR<sup>®</sup>-Blunt (Invitrogen) vector, and transformed into *E. coli* DH10B. The recombinant plasmid purified from these cells was cleaved with *NdeI* and *BamHI* restriction enzymes, and the resulting fragment subcloned into the pET-23a(+) vector (Novagen) previously digested with the same restriction enzymes. The plasmid was then transformed by electroporation into *E. coli* BL21(DE3)

STAR host cells (Novagen). Cells were grown in 4YT containing  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  carbenicillin, at  $37^\circ\text{C}$  and after the  $\text{OD}_{600}$  reached 0.4-0.6, cells were allowed to grow for additional 9 hours and harvested by centrifugation at  $20,800g$  for 30 min. All purification procedures were carried out at  $4^\circ\text{C}$ . Cells were resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.3 containing 200 mM NaCl, 1mM EDTA and 0.1 mM DTT (buffer A), incubated with  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  lysozyme, disrupted by sonication, and centrifuged at  $48,000g$  for 30 min to remove cell debris. The supernatant was incubated with 20% (v/v) of streptomycin sulphate for 30 min and centrifuged at  $48,000g$  for 30 min. After dialysis against buffer A, a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.3, 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1 mM DTT and 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (buffer B) was used to bring the  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  concentration to 1 M, required for the first chromatographic purification step. The resulting preparation was loaded on a Phenyl Sepharose High Sub FF column (GE Healthcare) previously equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.3 containing 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1 mM DTT and 1 M of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . (buffer C). The column was washed with 10 column volumes of buffer C, and the adsorbed material was removed with a linear gradient of 0-100% of buffer A. The fractions containing *MtIGPS* were pooled and concentrated in an Amicon ultrafiltration membrane [molecular weight cutoff (MWCO) of 10,000 Da], and loaded on a Sephacryl S-100 column (GE Healthcare) pre-equilibrated with buffer A. The fractions containing *MtIGPS* were pooled and precipitated with buffer B (50% v/v). The pellet (homogeneous *MtIGPS*) was removed by centrifugation at  $48,000g$  for 30 min and resuspended in buffer A. To remove any residual traces of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , homogeneous *MtIGPS* was dialyzed against buffer A prior to storage at  $-20^\circ\text{C}$ . Protein concentrations were determined by the method of Bradford *et al.* [9] using the Bio-Rad protein assay kit and bovine serum albumin as standard.

*Oligomeric state determination* - The molecular mass of purified *MtIGPS* was estimated by gel-filtration chromatography employing a Superdex 200 HR column ( $1.0 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$ ) (GE

Healthcare). All runs were at  $0.4 \text{ mL min}^{-1}$  in buffer A, and the eluate was monitored at 215, 254 and 280 nm. Molecular mass standards (GE Healthcare) were used for a calibration curve [ribonuclease A (13,700 Da) from bovine pancreas, chymotrypsinogen (25,000 Da) from bovine pancreas, ovalbumin (43,000 Da) from hen egg, albumin (67,000 Da) from bovine serum, aldolase (158,000 Da) from rabbit muscle, catalase (232,000 Da) from bovine liver, and ferritin (440,000 Da) from equine spleen]. Blue Dextran 2000 was used to calculate the void volume ( $V_0$ ).

*Chemical Synthesis, purification, spectrometric and spectrophotometric characterization of CdRP* - Modifications to previously reported chemical synthesis protocols [10-13] were made, and the protocol employed for CdRP synthesis is as follows: 2.11 mmols of anthranilic acid (AA) (Sigma) were dissolved in 264  $\mu\text{L}$  isopropanol (Merck) and mixed with 1.06 mmols of ribose-5-phosphate (R5P) (Acros Organics) dissolved in 1.32 mL of water plus 2.64 mL of isopropanol. The reaction mixture was kept in the dark, at room temperature overnight. Reaction was then cooled (4 °C) for 10 minutes, after which two layers were formed. The aqueous phase, containing unreacted AA and R5P, was removed, and the remnant dark yellow oil washed with isopropanol and ethyl acetate. After the addition of 4 mmols of barium acetate (from a 2 M solution), CdRP precipitated as a barium salt, being isolated by centrifugation. This precipitate was washed with water, isopropanol and ethyl acetate. After desiccation, CdRP was kept at -20 °C, protected from light. The stability of the compound was estimated by UV-visible spectra measured at different times after the solubilization of CdRP in water pH 4.8 [13], observing the maximum absorption peaks of CdRP (350 and 254 nm) as compared with the absorption peaks of AA (maxima at 323 and 240 nm). For these measurements, CdRP was kept on ice up to 4 hours, and spectra were evaluated at 30-min intervals. Owing to CdRP barium salt low solubility in  $\text{D}_2\text{O}$ , a solution of  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  was added to exchange the CdRP counterion from barium to sodium, which renders the compound a higher

solubility in D<sub>2</sub>O. <sup>1</sup>H NMR spectrum was recorded on a Varian Inova 300 MHz. Infrared spectrum (KBr) was registered on a Bomem B-102 spectrometer. Electrospray mass and tandem mass spectra were recorded on a Q-Tof mass spectrometer (Micromass) with a scanning quadrupole (Q), an hexapole collision-cell and a high-resolution orthogonal time of flight (*o*-TOF) analyzer. Spectrofluorimetric titration using water at different pHs (0.5 pH units of difference between each pH, from 1.0 to 7.5) employed excitation wavelength of 350 nm and a slit of 1.5 nm. The emission spectra were recorded from 380-600 nm, with a slit of 3 nm.

*Enzymatic Assay for MtIGPS* - Assays were performed under initial rate conditions at 25 °C and 100 mM PIPES pH(D) 7.5, unless stated otherwise, and measurements were at least in triplicate. The reaction was started with the addition of 36 mmols of *MtIGPS*, and the increase in absorbance due to IGP formation was measured at 278 nm, at 25° for 1 min. A molar extinction coefficient value of 5,500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> was used for IGP [13].

*Initial Velocity* - For  $K_M$  and  $k_{cat}$  determination, initial rate measurements were carried out with CdRP concentrations ranging from 10 to 400 μM.

*Temperature effects* - To assess the activation energy of the reaction, initial velocities were measured in the presence of varying concentrations of CdRP, in the temperature range of 15-35 °C. *MtIGPS* was incubated for several minutes in all the temperatures tested and assayed under standard conditions to ensure enzyme stability under all conditions.

*pH-Rate Profiles* - To determine the pH-dependence of the kinetic parameters, we measured initial velocities at varying concentrations of CdRP at different pH values employing a mixed buffer system [14] with 100 mM Citrate and 100 mM HEPES with pH values in the range 4.5-8.0. Each buffer was adjusted to the desired pH with either NaOH or HCl. The stability of the enzyme at different pH values was previously determined, by dialyzing the enzyme against a buffer in the desired pH and performing the standard reaction assay.



*Solvent kinetic isotope effects and proton inventory* - Solvent kinetic isotope effects were determined by measuring initial velocities with varying CdRP concentrations in either H<sub>2</sub>O or 87 atom% D<sub>2</sub>O. Solvent kinetic isotope effects were performed at pH(D) 8.0 because of the pH plateau found in the pH-rate profiles, preventing the occurrence of any variations in velocity due to pH fluctuations. To determine the number of protons responsible for the observed solvent kinetic isotope effect, we conducted proton inventory studies with 0, 20, 40, 60 and 87 atom% D<sub>2</sub>O.

*Data analysis* - All data were fitted to the appropriate equations using the nonlinear regression function of SigmaPlot 2000 (SPSS, Inc).

For the oligomeric state determination, the  $K_{av}$  value was calculated for each protein using eq 1

$$K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0) \quad (1)$$

where  $V_e$  is the elution volume for the protein,  $V_t$  is the total bed volume.  $K_{av}$  was plotted against the logarithm of standard molecular weights.

Initial velocity kinetic data for the hyperbolic increase upon substrate concentration was fitted to eq 2.

$$v = VA / K + A \quad (2)$$

The data for temperature effects were fitted to eq 3, where  $k$  is the maximal reaction rate,  $E_a$  is the energy of activation,  $T$  is the temperature in Kelvin,  $R$  is the gas constant (1.98 cal mol<sup>-1</sup>), and  $A$  is a pre-exponential factor that correlates collision frequency and the probability of the reaction occurring when reactant molecules collide.

$$\log k = (-E_a / 2.3R)(1/T) + \log A \quad (3)$$

pH-rate profiles were fitted to eq 4, where  $y$  is the kinetic parameter,  $C$  is the pH-independent value of  $y$ ,  $H$  is the proton concentration, and  $K_a$  is the apparent acid dissociation constants for ionizing groups.

$$\log y = \log[C/(1+H/K_a)] \quad (4)$$

The kinetic isotope effect data were fitted to eq 5, which describes the effects on both  $V/K$  and on  $V$ .  $F_i$  represents the fraction of isotopic label, and  $E_{V/K}$  and  $E_V$  are the isotope effects minus one on  $V/K$  and on  $V$ , respectively.

$$v = VA/[K(1+F_iE_{V/K}) + A(1+F_iE_V)] \quad (5)$$

For eqs 2 and 5,  $A$  is the concentration of CdRP,  $K$  is the Michaelis constant for CdRP, and  $V$  is the maximum velocity. The notation utilized to express isotope effects is that of Northrop [15].

## Results and Discussion

*Cloning, expression, purification and biophysical characterization of MtIGPS* - A fragment of the expected length for the *trpC* gene was amplified and successfully cloned into pET-23a(+). Sequencing of the coding region of *trpC* proved the identity of the cloned fragment and that no mutations were introduced by the amplification steps. *MtIGPS* was expressed in BL21(DE3) STAR, after 9 hours of growth at 37 °C without IPTG induction. Homogeneously purified *MtIGPS* was obtained in three purification steps, yielding 5 mg of protein from 25 g of cell paste. The *MtIGPS* obtained here lacks a His-tag, distinguishing it from the one previously reported [7]. N-terminal sequencing confirmed the identity of purified *MtIGPS*, showing that the initial methionine was not removed. A value of approximately 30,000 Da was estimated by gel-filtration, thereby showing that *MtIGPS* is a monomer in solution, as all other monofunctional IGPS characterized up to date [16-18].

*Chemical Synthesis, purification, spectrometric and spectroscopic properties of CdRP* - The chemical synthesis yielded 76 % CdRP, the best reported so far. To improve CdRP yield, we focused on solving the instability of CdRP and the incomplete reaction of R5P. To achieve this goal, AA in excess was used, since the limiting reagent is R5P. Also, only the amount of water needed to solubilize R5P in the reaction mixture was utilized, since water was a too reactive medium for CdRP prior to the formation of its barium salt. Instead of ethanol [13], isopropanol was used to solubilize AA. As described by Doy [12], the stability of CdRP is increased when a CdRP barium salt is formed. The formation of the barium salt is also the most effective form of purifying CdRP, since AA and R5P do not precipitate in the presence of barium acetate, and the longer the compound remains in aqueous solution the more it hydrolyzes generating contaminants, consequently lowering the yield of the reaction. Washings with three different solvents were employed to remove remaining

contaminants in the precipitate. When stored at -20 °C, in the dark, CdRP showed no decomposition for at least one year (tested by UV-vis scannings), attesting the stability of the barium salt. In addition, spectrophotometric scannings showed that no significant decomposition up to 3 hours of CdRP solubilized in water at pH 4.8 was observed, demonstrating that this chemical compound can be employed during this time frame. Solutions of CdRP that were not used up to 3 hours were discarded and fresh solutions were prepared.

Spectrometric studies using electrospray ionization tandem mass at pH 5 (HCl solution) showed that  $[\text{CdRP}\cdot\text{H}]^+$  has a molecular mass of 350.0796, in agreement with the predicted molecular mass of 349.0563 for CdRP, with characteristic fragmentation pattern of  $m/z$  of 234, 216, 198, 172, 150, 132. Solid state infrared spectrum showed a large band at  $3412\text{ cm}^{-1}$ , owing to hydroxyl groups present in the molecule, and a very weak band at  $1714\text{ cm}^{-1}$ , indicating that the more abundant tautomeric form in solid state is the enol rather than the keto form. This finding was corroborated by the  $^1\text{H}$  NMR spectrum recorded in  $\text{D}_2\text{O}$ , which shows higher values of integration to signs related to enol form. Hence, the enol tautomer might be considered the major isomeric form of CdRP in solution under the tested conditions ( $\text{D}_2\text{O}$ ). The presence of an electronic delocalization among the C-C double bond of the enol, the lone electron pair on the nitrogen and the benzoic ring may account for this increased stability as compared with the keto tautomer, which has only the benzoic ring under electronic delocalization (Fig. 2).

A previous work suggested that the CdRP undergoes an enzyme independent tautomerization from the enol form to the more stable keto form, and this was the foundation for a proposed kinetic sequence of *E. coli* phosphoribosyl anthranilate isomerase (PRAI) [19]. Those data should thus be interpreted with caution, since the results presented here indicate that the enol form is favored in solution.

To expand our knowledge on CdRP properties, spectrofluorimetric experiments were carried out. Scannings of CdRP in water at different pH values (1.0 - 8.0) demonstrate that CdRP exhibits a pH-dependent fluorescence change (Fig. 3). Not only the intensity of fluorescence varied, but also its maximum wavelength emission showed a small hypsochromic shift. CdRP displayed an increasing fluorescence intensity from pH 1.0 to 2.5 with  $\lambda_{\text{max}} = 434$  (Fig. 3A), and reached a plateau from pH 2.5 to 3.5. At pH values larger than 4.0 the fluorescence intensity decreased with a hypsochromic shift, showing a  $\lambda_{\text{max}} = 422$  nm (Fig. 3B). Suspecting that this behavior of CdRP could be explained by a change in intramolecular hydrogen bond among the carboxyl group and the hydrogen of the secondary amine, we investigated the behavior of AA moiety of CdRP, conducting the same spectrofluorimetric experiment with AA. According to these experiments, AA presented an increase in fluorescence emission from pH 1.0 to 5.0, at which the fluorescence signal reached a plateau. Southern *et al.* [20] demonstrated that AA exhibits excited state intramolecular proton transfer (ESIPT), which could account for the change in fluorescence emission. Molecules that have acidic and basic groups in close proximity (usually five and six members) and with a suitable geometry may undergo ESIPT from the acidic moiety to the basic one as a result of a modification on the acidity/basicity acquired by these groups in excited states [21, 22]. It is thus tempting to suggest that the ESIPT observed occurs in the AA moiety of CdRP. Fig. 4 proposes a mechanism for CdRP ESIPT. In more acidic pH (1.0 - 3.5),  $E_0$  (fundamental state) is excited to  $E_1$  (excited state 1), which undergoes ESIPT generating  $E_2$  (excited state 2), emitting fluorescence and returning to  $E_0$ , which tautomerizes to generate the ESIPT-sensitive molecule. In  $E_1$ , the acidic character of nitrogen and the basic character of carboxyl increase, facilitating the proton transfer that characterizes ESIPT process. In more basic pH ( $> 3.5$ ), protons are donated to the medium, leading to  $E_0^*$  (a new ground state), and ESIPT no longer takes place. The primary amine on the ortho position of AA, on the

other hand, does not donate its protons to the medium under the pH range analyzed, so the ESIPT persists. Indeed, it is a common sense that the hydrogen of the secondary amine of CdRP displays an acid character much higher than the related ones of the primary amine of AA.

*Kinetic parameters* - Fitting initial velocity data to eq 2 yielded a  $K_M = 55.3 \pm 9 \mu\text{M}$ , 10 times lower than the value previously obtained for *MtIGPS* [7]. This significant difference in the  $K_M$  value can be attributed to the fact that, in the previous study, CdRP was not purified prior to enzymatic assays, and the preparation may have been contaminated with enzyme inhibitors. The latter may be derived either from unreacted substrates from the chemical synthesis or from hydrolysis of CdRP, resulting in a larger apparent  $K_M$  value for *MtIGPS*. *E.coli* IGPS (*EcIGPS*) has a  $K_M = 1.2 \mu\text{M}$  [13], 45 times lower than the  $K_M$  determined here for *MtIGPS*. In spite of the fact that *E. coli* IGPS is covalently bound to the previous enzyme in the pathway, PRAI, subunit interaction was not observed for neither of these enzymes [23], which shows that the low  $K_M$  value cannot be explained by known quaternary structure features. In agreement, *Sulfolobus solfataricus* IGPS (*SsIGPS*), which is a monofunctional enzyme, has an even lower  $K_M$  value of  $0.05 \mu\text{M}$  [24].

The  $k_{\text{cat}}$  found for *MtIGPS* was  $0.16 \pm 0.008 \text{ s}^{-1}$ , the lower value determined for IGPS as compared with the values for the enzymes from *E. coli* ( $3.6 \text{ s}^{-1}$ ) [23], and *S. solfataricus* ( $0.98 \text{ s}^{-1}$  at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , the *SsIGPS* optimum temperature,  $0.03 \text{ s}^{-1}$  at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ) [24]. In addition, the *MtIGPS*  $k_{\text{cat}}/K_M$  value of  $2.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  is significantly smaller than those for *EcIGPS* ( $3.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) and *SsIGPS* enzymes ( $19.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  at  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  and  $6.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

*Temperature effects* - The temperature dependence of  $k_{\text{cat}}$  was evaluated, and fitting data to equation 3 yielded an activation energy value of  $8.4 \text{ kcal mol}^{-1}$ . Also, the linearity of the Arrhenius plot demonstrated that there was no change in the rate-limiting step in the temperature range employed ( $15\text{-}35^\circ\text{C}$ ) (Fig. 5).

*Solvent kinetic isotope effects and proton inventory* - In order to probe for the rate limiting nature of proton transfer in the *MtIGPS*-catalyzed reaction, solvent kinetic isotope effect analysis was carried out (Fig. 6). The  $^{D_2O}V/K_{CdRP} = 1.1 \pm 0.1$  is insignificant within experimental error, while the value of  $^{D_2O}V_{CdRP} = 1.6 \pm 0.1$  is significant, though small. The apparent classical limit for primary deuterium kinetic isotope effects on the maximal velocity is around 8, although, in a less rigorous practice, values as low as 2 have sometimes been accepted as evidence of a rate-determining step. The value obtained here suggests that any proton transfer occurring in the reaction course is only modestly rate-limiting, since the  $^{D_2O}V_{CdRP}$  is smaller than 2 [15]. In addition, once  $^{D_2O}V/K_{CdRP}$  is unit, any modestly rate-limiting protonation must be reporting on steps that follow *MtIGPS*-CdRP complex formation, which include the chemical steps, possible isomerizations, and product release. To gather information on the number of protons giving rise to the observed solvent isotope effect, a proton inventory on the maximum velocity was performed. The linear shape of the plot (Fig. 6) indicates that only one proton transfer accounts for the observed  $^{D_2O}V_{CdRP}$ .

The small solvent kinetic isotope effect observed here is in agreement with a proposed mechanism for the *IGPS* reaction [17], which requires aromaticity loss in one of the chemical steps, thought to be more rate limiting than a single proton transfer, not to mention the possible isotope-independent steps such as enzyme conformational changes and product release. Furthermore, it should be pointed out that the observed solvent isotope effect may have contributions from additional secondary isotope effects, since hydrogens may be replaced by deuterons in acidic positions of CdRP [14].

*pH-Rate profiles* - To probe for the role of general acid/base catalysis in the *MtIGPS* catalyzed reaction, we investigated the pH-dependence of  $k_{cat}$  and  $k_{cat}/K_M$  in the pH range of 5.5 -

8.5. Both pH-dependent parameters displayed a similar profile, with a decrease at the acidic limb (Fig. 7). Fitting the data to eq 4 yielded an apparent  $pK_a$  of  $6.0 \pm 0.3$  for  $k_{cat}$  (Fig. 7a) and  $6.8 \pm 0.6$  for  $k_{cat}/K_M$  (Fig. 7b), with a slope of 1 for both curves indicating that a single group in each profile needs to be deprotonated in order to render the enzyme with full activity and binding capacities. The close apparent  $pK_a$  values suggest that the same group may have been reported in both profiles. Nonetheless, the apparent  $pK_a$  found for the  $k_{cat}/K_M$  profile is close to the value expected for the phosphate moiety of CdRP [25]. It is unlikely that the apparent  $pK_a$  found in the  $k_{cat}$  profile be reporting on the deprotonation of the phosphate moiety of the substrate, since the phosphate group of CdRP is not thought to play any role in the chemical mechanism of this reaction [17, 26].

Mutagenesis studies [27] carried out with *Ec*IGPS identified amino acid residues essential for catalysis, and crystal structure determination of *Ec*IGPS and *Ss*IGPS [16, 17] identified the residues positioned to contact CdRP. One of these residues is Glu163 [27], which is also conserved in *Ss*IGPS (Glu159) and *Mt*IGPS (Glu168). The deprotonated side chain of this glutamate residue has been proposed to act as a general base in *Ss*IGPS both for CdRP binding and its conversion to IGP [17]. According to Argyrou and Blanchard [28], the presence of some groups, such as carboxylate groups, in close proximity may result in an increase of their  $pK_a$  values. Thus, even though the calculated apparent  $pK_a$  value found in the  $k_{cat}$  profile (6.0) do not lie in the normal range for ionization of glutamic acids in the active sites of many enzymes [29], it is tempting to suggest that the pH-rate profiles presented here might be reflecting the ionization of Glu168 in *Mt*IGPS. Still, more experiments are required to unambiguously assign which amino acid plays the general base role in the *Mt*IGPS catalyzed reaction.

A model is proposed to describe a kinetic sequence for *Mt*IGPS (Fig. 8), based on both experimental data presented here and theoretical assumptions by Cook and Cleland [14], with  $K_1 = 1.65 \times 10^{-7}$  M, representing the acid dissociation constant for E-H, and  $k_1$ CdRP and  $k_3$  representing



the pH-dependent association and catalytic rates, respectively, where  $k_1 = 2.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $k_3 = 0.16 \text{ s}^{-1}$  for *MtIGPS* in the steady-state conditions employed here.

*Summary* - In the present work, we described a more efficient chemical synthesis of CdRP, as well as its spectroscopic and spectrometric characterization. Also, a model for ESIPT was proposed to explain the pH-dependent fluorescence behavior of CdRP.  $K_M$  and  $k_{\text{cat}}$  values were determined for *MtIGPS*, and its substrate specificity was calculated. Solvent kinetic isotope effects and proton inventory suggested that transfer of a single proton is modestly rate limiting. Accordingly, other chemical steps, possible conformational changes or product release must account for the energy barrier of  $8.4 \text{ kcal mol}^{-1}$  determined by the Arrhenius plot. In addition, the existence of acid-base catalysis was probed by pH-rate profiles on *MtIGPS*  $k_{\text{cat}}$  and  $k_{\text{cat}}/K_M$ , which suggested Glu168 as a general base that must be deprotonated for binding and catalysis. A model to describe a steady-state kinetic sequence for *MtIGPS* was presented. These results are expected to contribute to the understanding of the role of the tryptophan biosynthesis pathway in the metabolism and biology of *M. tuberculosis*.

## **Acknowledgements**

This work was supported by Millennium Initiative Program MCT-CNPq, Ministry of Health – Secretary of Science, Technology and Strategic Materials (SCTIE/DECIT), PRONEX/FAPERGS/CNPq (Brazil) to DSS and LAB. DSS (304051/1975-06) and LAB (520182/99-5) are Research Career Awardees from CNPq. CMC is an MSc fellow from CNPq. We are grateful to Dr. Cristopher Z. Schneider for providing us with genomic DNA of *M. tuberculosis* H37Rv, Dr. Gunter Ebeling for his help with CdRP synthesis, Rafael G. Silva, Isabel O. Fonseca and Marcelo M. Pedroso for insightful contributions.

## References

- [1] World Health organization, Surveillance, planning, financing, *WHO Report*, Geneva, Switzerland, (2005) WHO/HTM/TB/2005.349.
- [2] S. Gagneux, P.M Small, *Lancet Infect. Dis.* 7 (2007) 328–337.
- [3] D. Butler, *Nature* 449 (2007) 158-159.
- [4] D.A. Smith, T. Parish, N.G. Stoker, G.J. Bancroft, *Infect. Immun.* 69 (2001) 1142-1150.
- [5] M.V. Dias, F. Canduri, N.J. da Silveira, C.M. Czekster, L.A. Basso, M.S. Palma, D.S. Santos, W.F. Jr. de Azevedo, *Cell Biochem. Biophys.* 44 (2006), 375-384.
- [6] C.E. Lee, C. Goodfellow, F. Javid-Majd, E.N. Baker, L.J. Shaun, *J. Mol. Biol.* 355 (2006), 784-797.
- [7] Y. Yang, M. Zhang, H. Zhang, J. Lei, R. Jin, S. Xu, J. Bao, L. Zhang, H. Wang, *Biochemistry (Mosc)* 71 (2006), 38-43.
- [8] T.E. Creighton, C. Yanofsky, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 4616-4624.
- [9] M.M. Bradford, R.A. McRorie, W.L. Williams, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [10] O.H. Smith, C. Yanofsky, *J. Biol. Chem.* 235 (1960) 2051-2057.
- [11] O.H. Smith, C. Yanofsky, *Methods Enzymol.* 5 (1962) 794-806.
- [12] C. H. Doy, *Nature* 211 (1966) 736-737.
- [13] K. Kirschner, H. Szadkowski, T.S. Jardetzky, V. Hager, *Methods Enzymol.* 142 (1987) 386-397.
- [14] P.F. Cook, W.W. Cleland, in: *Enzyme kinetics and mechanism*. Taylor and Francis Group, New York, 2007, pp. 325-366.
- [15] D.B. Northrop, *Biochemistry* 14 (1975) 2644-2651.
- [16] J.P. Priestle, M.G. Grutter, J.L. White, M.G. Vincent, M. Kania, E. Wilson, T.S. Jardetzky, K. Kirschner, J.N. Jansonius, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 84 (1987) 5690-5694.
- [17] M. Hennig, B.D. Darimont, J.N. Jansonius, K. Kirschner, *J. Mol. Biol.* 319 (2002) 757-766.

- [18] T. Knochel, A. Pappenberger, J.N. Jansonius, K. Kirschner, *J. Biol. Chem.* 277 (2001) 8626-8634.
- [19] U. Hommel, M. Eberhard, K. Kirschner, *Biochemistry* 34 (1995) 5429-5439.
- [20] C.A. Southern, D.H. Levy, G.M. Florio, A. Longarte, T. Zwier, *J. Phys. Chem.* 107 (2003) 4032-4040.
- [21] E.M. Kosower, D. Huppert, *Ann. Rev. Phys. Chem.* 37 (1986), 127-156.
- [22] P. Chowdhury, S. Panja, A. Chatterjee, P. Bhattacharya, S. Chakravorti, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem* 173 (2005) 106-113.
- [23] M. Eberhard, M. Tsai-Pflugfelder, K. Bolewska, U. Hommel, K. Kirschner, *Biochemistry* 34 (1995) 5419-5428.
- [24] A. Merz, M.C. Yee, H. Szadkowski, G. Pappenberger, A. Cramer, W.P. Stemmer, C. Yanofsky, K. Kirschner, *Biochemistry* 39 (2000) 880-889.
- [25] R.S. Petrucci, W.S. Harwood, in: *General Chemistry*, 7th Edition, Prentice-Hall, 1993, pp. 580-621.
- [26] D. Mazumder-Shivakumar, T.C. Bruice, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 (2004) 14379-14384.
- [27] B. Darimont, C. Stehlin, H. Szadkowski, K. Kirschner, *Protein Sci.* 7 (1998) 1221-1232.
- [28] A. Argyrou, J.S. Blanchard, *Biochemistry* 43 (2004) 4375-4384.
- [29] P.C. Engel, in: *Enzyme Kinetics: The Steady-state Approach. Outline Studies in Biology.* New York, 1977, pp. 37-44.

## Figure legends

Fig. 1. *Mtb*IGPS-catalyzed reaction

Fig. 2. Tautomerization of CdRP.

Fig. 3. pH-dependent fluorescence of CdRP. (A) CdRP was solubilized in water from pH 1.0-3.5. (B) CdRP was solubilized in water from pH 4.0-7.5. All samples had 480  $\mu\text{M}$  of CdRP and were excited at 350 nm.

Fig. 4. Proposed ESIPT mechanism for CdRP.

Fig. 5. Temperature-dependence of  $\log k_{\text{cat}}$ . Varying concentrations of CdRP were employed to determine  $k_{\text{cat}}$  at each temperature. The line is a fit to equation 3.

Fig. 6. : Solvent isotope effects for *Mt*IGPS. Reaction mix contained either 0 (●) or 87 (■) atom %  $\text{D}_2\text{O}$ . Inset represents the proton inventory measured with CdRP at saturating concentrations.

Fig. 7. Dependence of kinetic parameters on pH. (A) pH-dependence of  $\log k_{\text{cat}}$  (B) pH-dependence of  $\log k_{\text{cat}}/K_m$ ; both lines are fits to equation 4.

Fig. 8. Proposed kinetic sequence for *Mt*IGPS

<sup>1</sup>**Abbreviations:** TB, tuberculosis; MDR-TB, multi-drug resistant tuberculosis; *Mt*IGPS, indole-3-glycerol phosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv; CdRP, 1-(*o*-carboxyphenylamino)-1-deoxyribulose 5-phosphate; IGP, indole-3-glycerol phosphate; AA, anthranilic acid; R5P, Ribose-5-phosphate; *Ec*IGPS, *E.coli* IGPS; *Ss*IGPS, *Sulfolobus solfataricus*

IGPS; ESI-MS, electrospray-ionization mass spectrometry; ESIPT, excited-state intramolecular proton transfer; NMR, nuclear magnetic resonance.

## Capítulo II

The Catalytic Mechanism of Indole-3-Glycerol Phosphate Synthase (IGPS) Investigated by  
Electrospray Ionization (Tandem) Mass Spectrometry

Artigo submetido para publicação no periódico *Chemical communications* em 2007.

## Tryptophan biosynthesis: mechanism of indole ring closure promoted by indole-3-glycerol phosphate synthase (IGPS) enzyme

Clarissa M. Czekster,<sup>a</sup> Alexandre A. M. Lapis,<sup>\*a,b</sup> Gustavo H. M. F. Souza,<sup>c</sup> Marcos N. Eberlin,<sup>c</sup> Luiz A. Basso,<sup>a</sup> Diógenes S. Santos,<sup>a</sup> Jaírton Dupont<sup>b</sup> and Brenno A. D. Neto<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Pesquisas em Biotecnologia Molecular e Funcional, Tecnopuc – Pharmacy Department and Pós-graduação em Medicina (Farmacologia Bioquímica e Molecular) PUCRS – Porto Alegre, RS, Brazil, <sup>b</sup> Laboratory of Molecular Catalysis, IQ-UFRGS – Porto Alegre, RS, Brazil <sup>c</sup> ThoMSON Mass Spectrometry Laboratory, IQ-UNICAMP – Campinas, SP, Brazil.

**Summary.** An enzymatic reaction mechanism has been monitored by on-line direct infusion electrospray ionization (tandem) mass spectrometry. Using this fast and sensitive technique, a key and transient intermediate of *Mycobacterium tuberculosis* indole-3-glycerol phosphate synthase (IGPS)-catalyzed reaction has been trapped. The reaction catalyzed by indole-3-glycerol phosphate synthase is part of the tryptophan biosynthetic pathway, and is not present in mammals, including humans. This peculiarity renders this enzyme a potential target for the development of biospecific agents with potential anti-TB activity. Besides, the results indicate the presence of two intermediates instead of one.

**Keywords.** IGPS, tryptophan, biosynthesis, enzyme, ESI

### Introduction

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, is the most lethal disease caused by a bacterium, being a major threat to human health worldwide.<sup>i</sup> Actually, is the most lethal pathogen among all bacteria.<sup>ii</sup> This bacillus leads to near two million deaths and over eight million cases of tuberculosis per year.<sup>iii,iv</sup> The only current administered vaccine, BCG, is unable to reduce the transmission of TB and the protection conferred is in many cases ineffective.<sup>v</sup> TB chemotherapy is also long-term and has several side-effects.<sup>vi</sup> The understanding of *M. tuberculosis* key metabolism by assessing the kinetic and chemical mechanism of specific enzymatic reactions is therefore important to decipher the mechanisms of virulence and resistance of TB, and to develop new rational strategies to kill or halt the bacillus.<sup>vii</sup> Enzymes involved in the biosynthetic pathways of the bacillus, those not used by mammals and whose function is relevant for the pathogen's life or for their ability to cause disease, may be excellent targets to new anti-TB agents.<sup>viii</sup>

The tryptophan biosynthetic pathway was shown to be essential to the virulence of the pathogen.<sup>iii</sup> The current work investigates the mechanism of the reaction catalyzed by indole-3-glycerol phosphate synthase (IGPS), the fifth committed step in the biosynthesis of tryptophan in *M.*

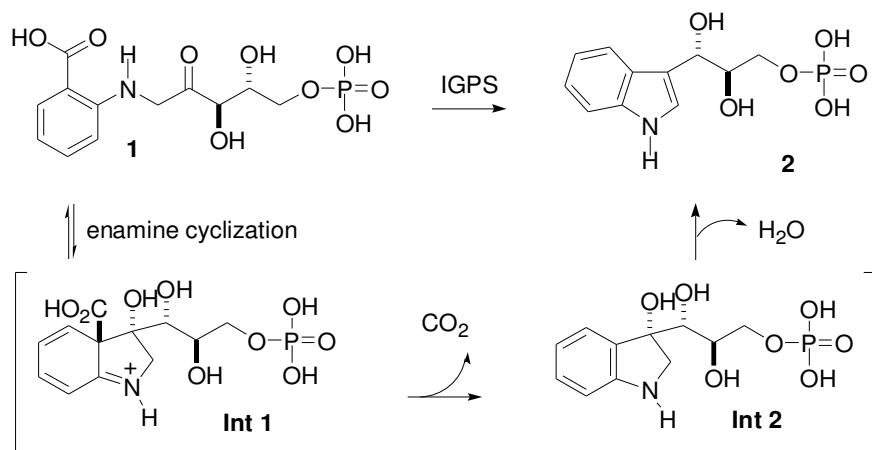
---

\* Corresponding author. Tel.: 55 51 3320 3512; fax: 55 51 3320 3612; e-mail: brenno.ipi@gmail.com or brenno.neto@pucrs.br.



*tuberculosis*. IGPS is absent in mammals, including humans; hence, this enzyme constitutes a potential target to develop new agents against *M. tuberculosis*.

In the biotransformation, the ring closure promoted by IGPS involves an intramolecular enamine-like nucleophilic addition to the keto form of **1** (Scheme 1) leading to the IGP product **2**.

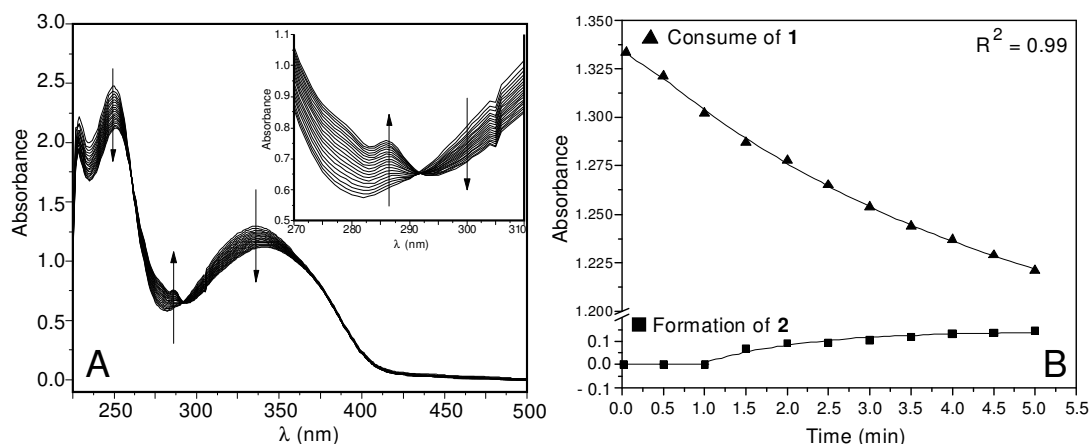


**Scheme 1.** Proposed biotransformation catalyzed by IGPS enzyme during indole ring formation.

Parry<sup>ix</sup> has proposed that the reaction proceeds via two logical intermediates (**Int1** and **Int2**). Bruce *et al.* have studied this biotransformation using molecular dynamics calculations.<sup>x</sup> Fersht and co-workers used the knowledge available for the biotransformation to mimic evolution strategy using the most common fold in enzymes in order to evolve phosphoribosylanthranilate isomerase activity from the scaffold of IGPS.<sup>xi</sup> The cost to form **Int1** is loss of aromaticity, which is further restored when **Int2** is formed by CO<sub>2</sub> loss. All reactants, products and proposed intermediates are considerably polar, which renders this reaction suitable for electrospray ionization (tandem) mass spectrometry investigation. Although ESI-MS(/MS) has been successfully used to intercept and characterize key intermediates of major chemical reactions,<sup>xii</sup> its use to study enzymatic reaction mechanism and their transient intermediates has not yet been demonstrated.<sup>xiii,xiv</sup> Therefore, the current manuscript describes the use of ESI-MS(/MS) monitoring a major enzymatic biotransformation.

## Discussion

First, the biotransformation of reactant **1** to the IGP product **2** (indole-3-glycerol-phosphate) was followed by UV-vis (Figure 1).

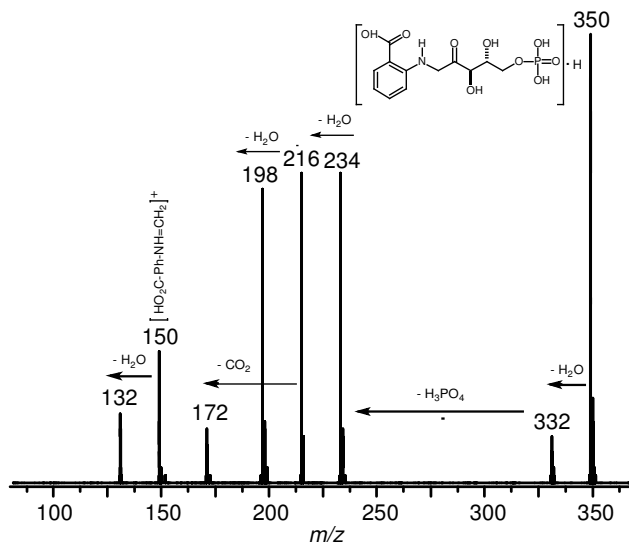


**Figure 1.** (A) UV-vis of the reaction of **1** leading to **2** catalyzed by IGPS enzyme over a period of 20 min. (B) Reaction rate for the formation of **2** (bottom) and consumption of **1** (top) after appropriate treatment.

Figure 1A shows that the absorption band at 335 nm decreases during the enzymatic experiment. This band corresponds to the lowest energy absorption of **1** was assigned to  $n-\pi^*$  (and/or  $\pi-\pi^*$ ) transition by virtue of their molar extinction coefficient ( $\epsilon = 3.28$ ). Concomitant with the reduction of the 335 nm band, a new band at 280 nm is detected at increasing intensity. This 280 nm band has been assigned to **2**.<sup>xv</sup> After the appropriated deconvolution of both Gaussians bands at 335 nm and 280 nm, the IGPS-catalyzed reaction evolution profile was obtained (Figure 1B). In the first minute (Figure 1B, top), a single exponential decay of the enzyme substrate **1** is observed (rate:  $A = A_0 + e^{-x/t}$ ) but no absorbance owing to **2** is noted (Figure 1B, bottom). After the first minute, however, a single exponential growth is noted for the absorbance of **2**. The lack of absorbance owing to **2** and the decrease of absorbance owing to **1** points firmly to the participation of a transient reaction intermediate (or intermediates) connecting **1** to **2**. Since **1** losses its aromaticity to form **Int1**, its formation could hardly be studied by UV-vis, especially because the absorption bands would suffer blue shift as a consequence of lack of conjugation in benzene ring. Diode array analysis would be the natural course, though compound **1** was not light sensitive. In fact, molecule **1** is a very unstable substrate<sup>xv</sup> and must be used freshly synthesized to allow trustable analysis.

In order to overcome all drawbacks associated with both substrate and enzyme, mass spectrometry was our hope, especially because UV analysis could just provide us with the idea of intermediate(s) participation(s). To guide ESI-MS monitoring, we first characterized the protonated enzyme

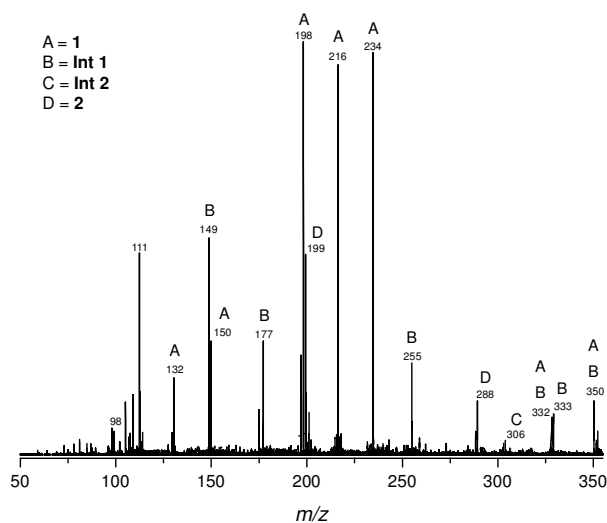
substrate **1** (pure and fresh synthesized compound)<sup>xv</sup> via ESI-MS/MS from an aqueous HCl solution at pH 5 (Figure 2).



**Figure 2.** ESI(+)-MS/MS of the protonated and pure fresh synthesized IGPS substrate  $[1+H]^+$ . Selected ion of  $m/z = 350$  from ESI(+)-MS experiment.

The tandem mass spectrum of  $[1+H]^+$  shows that the gaseous protonated molecule dissociates by sequential losses of  $H_2O$  ( $m/z$  332),  $H_3PO_4$  ( $m/z$  234),  $H_2O$  ( $m/z$  216) and a second  $H_2O$  ( $m/z$  198) whereas the fragment of  $m/z$  216 loses in turn  $CO_2$  to form the ion of  $m/z$  172. A fragment of  $m/z$  150 attributed to  $[HO_2C-Ph-NHCH_2]^+$  is also formed, which loses  $H_2O$  to form the fragment of  $m/z$  132.

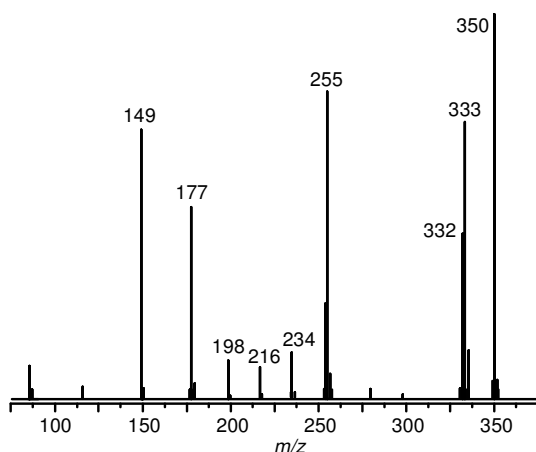
ESI(+)-MS monitoring of the chemically mimicked intramolecular cyclization process of **1** to **2** was then performed (Figure 3). The online monitoring shows that the reaction occurs rapidly at pH 1 (HCl addition), allowing us to try to intercept and characterize by ESI-MS the chemically promoted **Int1** (Figure 3, B), despite severe degradation that was observed at this drastic condition. Above pH 1, the acid promoted reaction fails to occur or was too slow to be monitored on-line by ESI-MS.



**Figure 3.** ESI(+)-MS of the chemically mimicked intramolecular cyclization process.

As labeled, the ESI-MS of the chemically mimicked reaction displays ions attributable to all four major reaction species. Note that **Int2** (Figure 3, C) was detected as a very minor ion of  $m/z$  306, and its ESI-MS/MS could therefore not be acquired, but such intermediate has been studied and characterized using different techniques.<sup>xvi</sup> It is worth noting that the ESI-MS/MS of **1** (Figure 3, A) gave the same fragmentation pattern as previously obtained at pH 5. Plus, additional signals could be noted and were attributed to **Int1**, which is an isomers of the same  $m/z$  350.

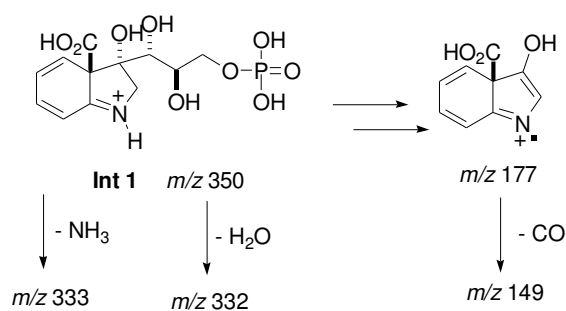
In the presence of IGPS catalyst, nevertheless, the biotransformation proceeds fairly rapid at pH 6 and, during the first minute of reaction, the ESI-MS/MS of the ion of  $m/z$  350 was collected (Figure 4). This ion could be either  $[1+H]^+$  or the protonated **Int1**, or both, since they are isomers of the same  $m/z$  350. We knew from the chemically promoted reaction, however, that their different structures would lead to distinct dissociation behaviors. The difference observed in the chemical simulation and the biotransformation was the relative intensity of the signals, but the observed fragmentation pattern is quiet similar. As pointed out before, **Int1** formation could hardly be studied by UV-vis. Nevertheless, its positive charge would allow for an on-line characterization by ESI-MS/MS to probe that in fact **Int1**, formed during the enzymatic biotransformation, can be structural characterized, despite the polarity of the molecules can turn the analyses more difficult.



**Figure 4.** ESI(+)-MS/MS of **Int1** during the enzymatic biotransformation promoted by IGPS enzyme at pH 6. Note that at this pH value no chemically mimicked intramolecular cyclization process take place.

Figure 4 shows the same set of fragments detected for  $[1+H]^+$ , that is, those of  $m/z$  332, 234, 216, 198 (as seen in Figure 2), but new fragment ions that are now predominate, mainly those of  $m/z$  333, 332, 255, 177 and 149. The chemically mimicked reaction showed the same predominant ions. This drastic change in ESI-MS/MS shows that a new isomeric species is now without doubt present in the reaction solution; that is, that **1** has been biotransformed, in the presence of IGPS enzyme (at pH 6), to an isomeric intermediate, most likely **Int1**. Other important aspect is the detection of substrate **1** now at pH 6, which indicates that the enzyme environment allows easy protonation and further detection.

The very contrasting set of fragment ions shows that a new isomeric species has been trapped. A lot of effort trying to rationalize main fragments, particularly that of  $m/z$  255, were performed and we could not find a reasonable explanation for this intractable ion. It might be a component of the enzyme preparation or reaction mixture component, however it remains elusive. A complete rationalization of the fragmentation chemistry of these species was not straightforward, but some key and very important fragment ions such as those of  $m/z$  177 and 149 clearly show the presence of the new formed indole ring (Scheme 2). The presence of the indole ring is a very consistence evidence of **Int1** formation during the biotransformation. The ion of  $m/z$  333 is not present in ESI-MS/MS of compound **1** (Figure 2), likewise  $NH_3$  loss is most likely in **Int1**.



**Scheme 2.** Major fragments of the trapped isomeric specie of  $m/z$  350 during the biotransformation promoted by IGPS. Note the presence of the indole ring fragment in Figure 4.

In summary, the drastic fragmentation change observed for the protonated molecules of  $m/z$  350 in the enzymatic experiment points firmly to the on-line interception of the putative enzymatic intermediate **Int1** or another unknown isomeric species that contains an indole ring. This evidence indicates that the enzymatic biotransformation occurs indeed via a two step mechanism as proposed herein (Scheme 1). For the first time, therefore, a key information for the mechanism of a major enzymatic bioreaction has been provided by on-line ESI-MS(/MS) monitoring. As exemplified herein, for anti-TB agents, the use of this fast and sensitive technique opens up a new avenue for investigating the mechanism of enzymes biotransformations and hence for the more rational design of new agents with higher biospecificity. Due to our interest in mass spectrometry<sup>xvii</sup> and biological systems,<sup>xviii</sup> further studies aiming the elucidation of the kinetic and mechanism of the IGPS biocatalysis are underway.

## Materials and Methods

ESI mass and tandem mass spectra in positive ion modes were acquired using a Micromass (Manchester – UK) QToF instrument of ESI-QqToF configuration with 7.000 mass resolving power in the TOF mass analyzer. The following typical operating conditions were used: 3kV capillary voltage, 20 V cone voltage, desolvation gas temperature of 100 °C. UV–vis absorption spectra were taken on a Shimadzu Model UV-1601PC.

## Acknowledgment

CNPq, FAPESP, CAPES for partial financial support. We also thank Prof. Roxane Sudo (USA) for the critical reading of the manuscript.

## References

- <sup>(1)</sup> Raviglione, M. C.; Smith, I. M. *New Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 656.
- <sup>(2)</sup> World Health organization (2005) Surveillance, planning, financing, *WHO Report*, Geneva, Switzerland, WHO/HTM/TB/2005.349.
- <sup>(3)</sup> Smith, D. A.; Parish, T.; Stoker, N. G.; Bancroft, G. J. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 1142.
- <sup>(4)</sup> Ducati, R. G.; Ruffino-Netto, A.; Basso, L. A.; Santos, D. S. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2006**, *101*, 697.
- <sup>(5)</sup> Maartens, G.; Wilkinson, R. J. *Lancet* **2007**, *370*, 2030.
- <sup>(6)</sup> Pablos-Mendez, A.; Raviglione, M. C.; Laszlo, A.; Binkin, N.; Rieder, H. L.; Bustreo, F.; Cohn, D. L.; Lambregts-van Weezenbeek, C. S. B.; Kim, S. J.; Chaulet, P.; Nunn, P. *New Engl. J. Med.* **1998**, *338*, 1641.
- <sup>(7)</sup> Deng, H.; Murkin, A. S.; Schramm, V. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7765.
- <sup>(8)</sup> Lee, C. E.; Goodfellow, C.; Javid-Majd, F.; Baker, E. N.; Lott, J. S. *J. Mol. Biol.* **2006**, *355*, 784.
- <sup>(9)</sup> Parry, R. J. in *Chemistry of Heterocyclic Compounds in Indoles*, Part II, ed. Houlihan, W. J. (Wiley-Interscience, New York), Vol. 25, pp. 1-64, 1972.
- <sup>(10)</sup> Shivakumar, D. M.; Bruice, T. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 14379.
- <sup>(11)</sup> Altamirano, M. M.; Blackburn, J. M.; Aguayo, C.; Fersht, A. R. *Nature*, **2000**, *403*, 617.
- <sup>(12)</sup> Eberlin, M. N. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2007**, *13*, 18.
- <sup>(13)</sup> Hsu, F. F.; Turk, J.; Owens, R. M.; Rhoades, E. R.; Russell, D. G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 466.
- <sup>(14)</sup> Knight, W. B.; Swiderek, K. M.; Sakuma, T.; Calaycay, J.; Shively, J. E.; Lee, T. D.; Covey, T. R.; Shushan, B.; Green, B. G.; Chabin, R.; Shah, S.; Mumford, R.; Dickinson, T. A.; Griffin, P. R. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2031.
- <sup>(15)</sup> Kirschner, K.; Szadkowski, H.; Jardetzky, T. S.; Hager, V. *Methods Enzymol.* **1987**, *142*, 386.
- <sup>(16)</sup> Hennig, M.; Darimont, B. D.; Jansonius, J. N.; Kirschner, K. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 757.
- <sup>(17)</sup> (a) Lapis, A. A. M., Neto, B. A. D.; Scholten, J. D.; Nachtigall, F. M.; Eberlin, M. N.; Dupont, J. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6775. (b) Santos, L. S.; Neto, B. A. D.; Consorti, C. S.; Pavam, C. H.; Almeida, W. P.; Coelho, F.; Eberlin M. N. Dupont, J. *J. Phys. Org. Chem.* **2006**, *19*, 731.
- <sup>(18)</sup> (a) Neto, B. A. D.; Lapis, A. A. M.; Mancilha, F. S.; Vasconcelos, I. B.; Thum, C.; Basso, L. A.; Santos, D. S.; Dupont, J. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4001. (b) Russowsky, D.; Neto, B. A. D. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2923. (c) Russowsky, D.; Neto, B. A. D. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 1437-1440.

## **PARTE III**



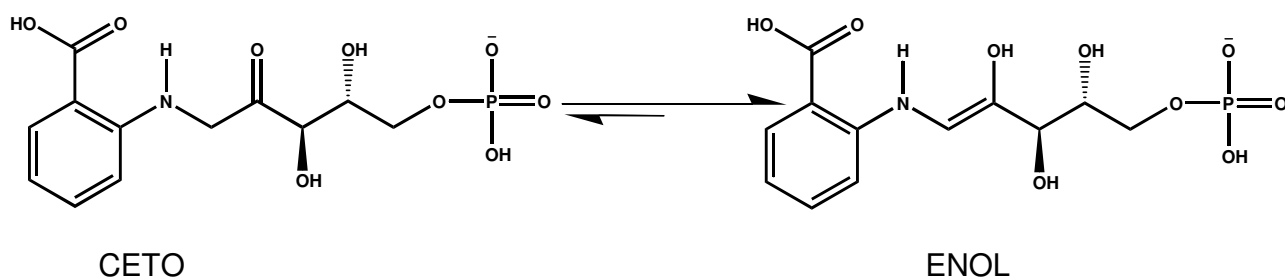
## **Discussão**

Os resultados discutidos a seguir são relativos ao Capítulo I, que tem o título “Kinetic characterization of indole-3-glycerol phosphate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*”, que trata principalmente da caracterização cinética da enzima IGPS e de seu substrato, o composto CdRP.

### **Síntese e caracterização do CdRP**

Conforme descrito na introdução, um outro grupo de pesquisa realizou uma breve caracterização da enzima em questão (Yang *et. al*, 2006), utilizando o composto CdRP sem prévia purificação. Desejando obter dados cinéticos com uma amostra mais estável e pura do substrato da enzima, iniciamos nosso trabalho pela síntese e purificação do substrato. Para tanto, analisamos os protocolos de síntese orgânica já publicados para este composto e fizemos uma nova combinação de procedimentos. Assim, a reação entre ácido antranílico e ribose-5-fosfato utilizou o mínimo de água possível, e o restante do meio reacional foi composto de isopropanol. Após resfriar a reação a 4 °C, o CdRP foi isolado em uma fase mais densa, que foi lavada com diferentes solventes para retirar possíveis contaminantes do meio reacional. Esta fração, após a lavagem, foi precipitada com acetato de bário já que, conforme descrito por Doy (1966), o sal de bário de CdRP possui uma estabilidade bastante elevada. Nossas análises espectrofotométricas do sal de bário de CdRP demonstraram que o composto apresenta uma estabilidade adequada para a realização de ensaios enzimáticos, posto que após três horas em solução não foi identificada uma decomposição significativa do CdRP.

Após a obtenção de um sal estável do composto, realizamos sua caracterização espectroscópica e espectrométrica. Utilizando o CdRP em pó, analisamos seu espectro de infravermelho, podendo concluir que o tautômero mais estável nestas condições é o enol (FIGURA 3).



**Figura 3:** Tautômeros do composto CdRP.

Para que pudéssemos obter o espectro de  $^1\text{H}$  RMN do CdRP, foi necessário torná-lo um sal de sódio, que possui uma solubilidade significativamente maior do que a do sal de bário, pois era necessário obter uma solução bastante concentrada de CdRP em  $\text{D}_2\text{O}$ . O espectro obtido também demonstrou que a forma tautomérica predominante em solução é o enol, evidenciado pela ausência de picos característicos de hidrogênios próximos a cetonas.

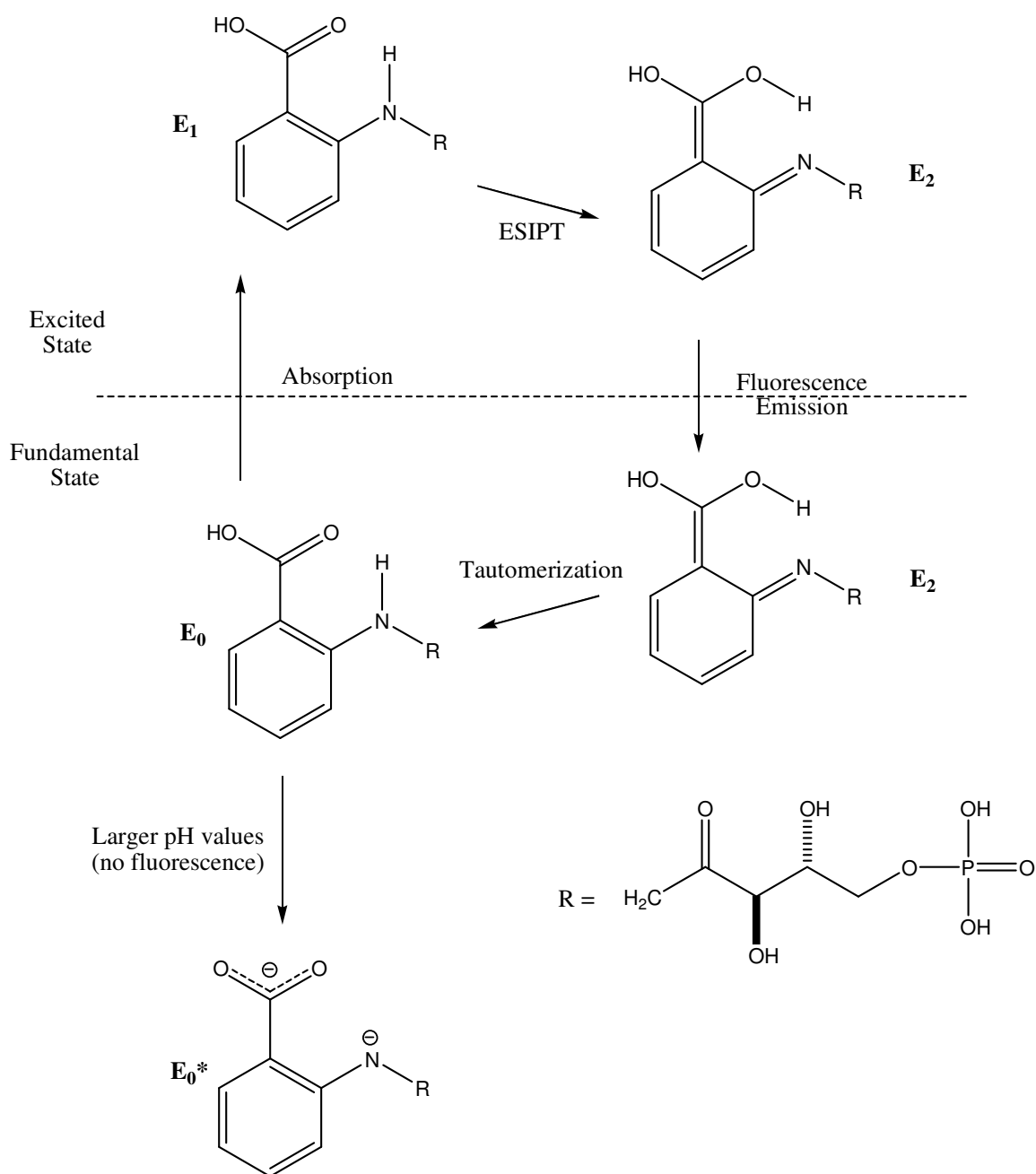
A maior estabilidade do enol já era esperada, tendo em vista que esta forma possui uma deslocalização eletrônica mais elevada, o que lhe confere maior estabilidade. No enol, temos um sistema  $\pi$  estendido mais significativo do que no tautômero ceto, pois o sistema de elétrons do benzeno está em ressonância com o par de elétrons não-ligantes do nitrogênio e com a ligação dupla  $\text{C}=\text{C}$  do enol. Na forma ceto, no entanto, só estão deslocalizados os elétrons do benzeno (Vollhardt e Schore, 2005).

A análise espectrométrica utilizando espectrometria de massas em tandem com ionização por *spray* de elétrons (*electrospray ionization tandem mass*), em pH 5 (ajustado com HCl) demonstrou que  $[\text{CdRP}\cdot\text{H}]^+$  possui um peso molecular de 350.0796, de acordo com a massa molécula prevista de 349.0563 do CdRP, com um padrão de fragmentações características.

Com a realização da titulação ácido-base do CdRP, identificamos um  $\text{pK}_a$  próximo a 6.4, que pode ser atribuído a um dos hidrogênios do grupamento fosfato do CdRP (Petrucci e Harwood, 1993).

Para expandir o conhecimento disponível sobre o substrato da IGPS, realizamos experimentos de espectrofluorimetria. Nossos resultados indicam que o CdRP possui uma fluorescência dependente do pH (Figura 1, artigo). Esta fluorescência foi atribuída à transferência de prótons no estado excitado, ESIPT (*excited state intramolecular proton transfer*) apresentada pela molécula em pH abaixo de 4.0. Quando o ESIPT ocorre, a molécula no estado fundamental ( $E_0$ ), absorve energia, gerando o primeiro estado excitado ( $E_1$ ).  $E_1$ , por sua vez, sofre o ESIPT gerando o segundo estado excitado ( $E_2$ ), que emite fluorescência.  $E_2$  sofre uma tautomerização e regenera  $E_1$ , para que o processo possa se repetir.

Em pH mais básicos do que 3.5, a ponte de hidrogênio intramolecular existente entre a carboxila e o hidrogênio da amina secundária deixa de existir, de modo que o ESIPT não mais ocorre ( $E_0^*$ ). A não ocorrência do ESIPT explica a alteração na intensidade e comprimento de onda de emissão máximo da molécula. O esquema 1 apresenta uma proposição de como o ESIPT pode afetar a emissão de fluorescência do CdRP.



**Esquema 1:** Mecanismo do ESIP sofrido por CdRP.  $E_0$ , estado fundamental;  $E_1$ , primeiro estado excitado;  $E_2$ , segundo estado excitado;  $E_0^*$  molécula no estado fundamental que não pode sofrer ESIP.

## **Purificação e caracterização biofísica da enzima**

O protocolo de purificação utilizado aqui difere daquele já publicado para esta enzima (Yang *et. al*, 2006), e a diferença de rendimento pode ser atribuída à ausência de cauda de histidina no presente estudo. A enzima purificada foi submetida ao seqüenciamento N-terminal, que demonstrou a identidade da proteína além de mostrar que a metionina inicial não havia sido removida.

A análise do estado oligomérico indicou que a *Mtl*GPS é um monômero em solução, nas condições empregadas, de forma análoga a todas as demais IGPS caracterizadas até a data.

## **Parâmetros cinéticos**

O valor de  $K_M$  encontrado neste trabalho (55  $\mu$ M) difere consideravelmente daquele disponível na literatura (500  $\mu$ M; Yang *et. al*, 2006), possivelmente devido ao fato de que, naquele estudo, o substrato da enzima foi utilizado sem prévia purificação e contaminantes presentes podem ter superestimado o valor do  $K_M$ .

O  $k_{cat}$  encontrado aqui também é menor do que o das outras enzimas caracterizadas até então; a constante de especificidade da *Mtl*GPS também foi menor em comparação a outras IGPS mostrando que a *Mtl*GPS é menos específica para o substrato CdRP do que estas enzimas.

## **Efeitos de temperatura**

Para determinar a energia de ativação da reação catalisada pela *Mtl*GPS, determinamos a dependência do  $k_{cat}$  em diferentes temperaturas. Após a elaboração de

um gráfico de Arrhenius (Figura 2 do artigo), foi possível calcular uma energia de ativação de  $8.4 \text{ kcal.mol}^{-1}$  e verificar que não houve mudança de etapa lenta da reação na faixa de temperatura investigada.

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

Para verificar se alguma etapa de transferência de prótons é limitante para a velocidade, estudos de efeitos isotópicos de solvente foram realizados. O inventário de prótons determinou quantos prótons estavam originando o efeito isotópico encontrado. Com estes estudos, verificamos que a transferência de um único próton do solvente é modestamente limitante nas etapas que se seguem à formação do complexo *Mtl*IGPS-CdRP, que incluem a etapa química, possíveis isomerizações e liberação dos produtos (Figura 3 do artigo).

### **Perfis de pH**

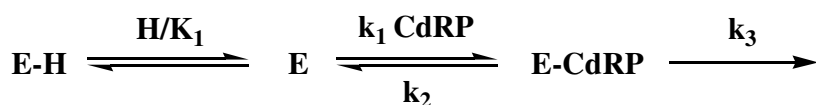
Desejando investigar a presença de catálise ácido-base na reação catalisada pela IGPS, analisamos os perfis de pH para a constante catalítica ( $k_{\text{cat}}$ ) e para a constante de especificidade ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ). Nossos resultados indicam que um único resíduo deve estar desprotonado tanto para que a formação do complexo CdRP-IGPS ( $\text{p}K_a$  encontrado no perfil de  $k_{\text{cat}}/K_M$ , Figura 4B do artigo), quanto para que a reação ocorra ( $\text{p}K_a$  encontrado no perfil de  $k_{\text{cat}}$ , Figura 4A do artigo). Como os  $\text{p}K_a$  aparentes encontrados em ambos os perfis são bastante próximos, nós sugerimos que eles sejam relativos ao mesmo resíduo de aminoácido da enzima.

Apesar do CdRP possuir um  $\text{p}K_a$  próximo ao encontrado por nós (6.4) para seu grupamento fosfato, é bastante improvável que nossos perfis de pH sejam relativos à

desprotonação do CdRP. Esta conclusão pode ser tirada se analisarmos o perfil de pH na constante catalítica, que reflete os eventos que ocorrem após a formação do complexo binário, até a primeira etapa irreversível (que pode ou não ser a liberação do produto, IGP). Os trabalhos até hoje descritos sobre a reação catalisada por esta enzima corroboram esta conclusão, pois não fazem nenhuma menção de que o grupamento fosfato possua qualquer importância catalítica. Assim, podemos concluir que um grupamento da enzima deva estar desprotonado para que a enzima possua total atividade e capacidade de ligação.

Reunindo os dados obtidos aqui com informações da literatura (Darimont *et.al*, 1998; Hennig *et.al*, 2002), sugerimos que o resíduo de aminoácido que deva estar desprotonado para que a enzima possua total atividade e capacidade de ligação possa ser o Glu168 da *MtIGPS*, já que em outros trabalhos este resíduo foi apontado como agindo como uma base geral, necessitando estar desprotonado tanto para a ligação do CdRP quanto para a ocorrência de catálise.

Propomos uma seqüência cinética (Esquema 2) baseada nos dados experimentais apresentados aqui e em proposições teóricas de Cook e Cleland (2007).

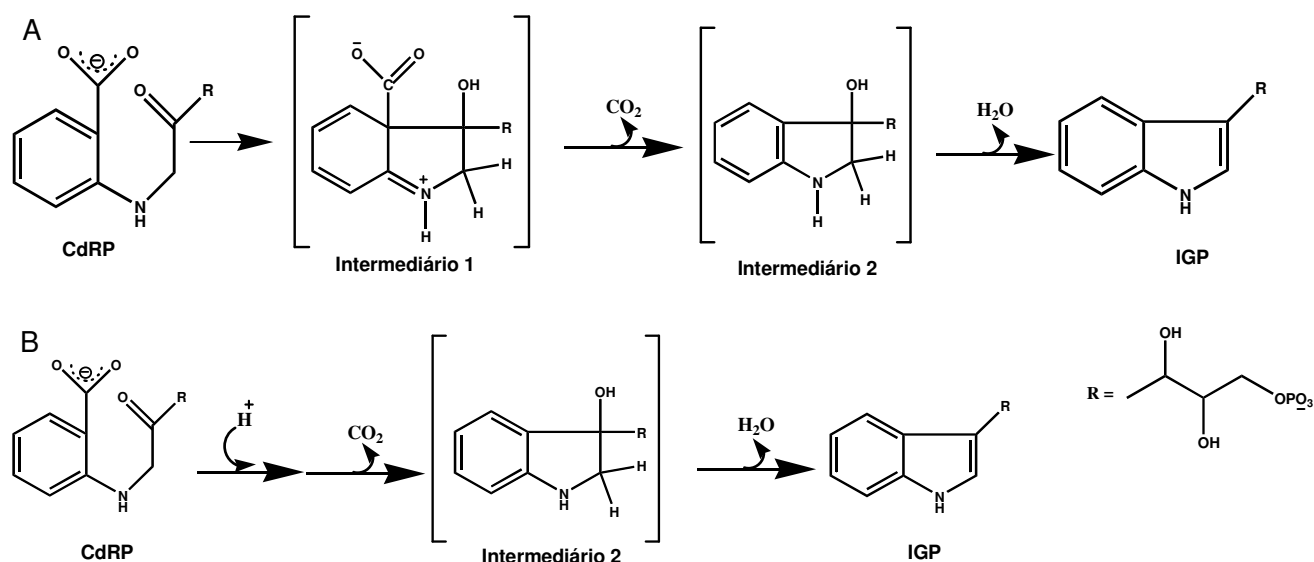


**Esquema 2:** Modelo proposto para descrever uma seqüência cinética plausível para *MtIGPS*, onde  $K_1 = 1.65 \times 10^{-7}$  M, representa a constante de dissociação ácida para EH, e  $k_1\text{CdRP}$  e  $k_3$  representam as taxas de associação e dissociação dependentes do pH, respectivamente.

Os resultados discutidos a seguir são relativos ao Capítulo II, que tem o título “The Catalytic Mechanism of Indole-3-Glycerol Phosphate Synthase (IGPS) Investigated by Electrospray Ionization (Tandem) Mass Spectrometry”, que trata da identificação de um intermediário na reação catalisada pela *Mt*IGPS.

### Mecanismo químico da IGPS

Os trabalhos cinéticos experimentais disponíveis sobre a reação catalisada pela IGPS foram realizados em *E. coli*. Valendo-se de dados estruturais, um mecanismo catalítico foi proposto para a IGPS de *Sulfolobus solfataricus* (Hennig *et.al*, 2002; Parry, 1972) propondo a existência de dois intermediários no mecanismo químico da reação (FIGURA 4 A). Um estudo *in silico* sugeriu a presença de apenas um intermediário para a reação (Mazumder-Shivakumar, Kahn e Bruice, 2004; FIGURA 4 B), de modo que estabeleceu-se um impasse sobre a natureza dos intermediários.



**Figura 4:** Intermediários propostos para a reação catalisada pela IGPS. (A) Conforme proposto por Hennig *et.al* (2002), a reação passa por dois intermediários, sendo que para



a formação do intermediário 1 é necessária a perda da aromaticidade da molécula (Intermediário 1), que é restituída com a saída do CO<sub>2</sub>. Porém, de acordo com Mazumder-Shivakumar e Bruice (B), as etapas que antecedem a perda do CO<sub>2</sub> ocorrem de forma concertada, originando apenas o Intermediário 2.

## **Experimentos de espectrofotometria**

Quando monitoramos a reação catalisada pela *Mt*IGPS realizando varreduras compreendendo a faixa de 230 – 500 nm, no espectrofotômetro, foi possível visualizar o consumo do substrato, CdRP e a formação do produto da reação, o IGP (Figura 1A, artigo). Porém, ao deconvoluirmos os picos, para relacionarmos o quanto de substrato estava sendo consumido e o quanto de IGP estava sendo formado, notou-se uma diferença entre as taxas (Figura 1B, artigo). Enquanto no primeiro minuto de reação o substrato estava sendo consumido a uma velocidade perceptível, não foi observada formação de produto. Isso nos permite sugerir que, neste intervalo de tempo, alguma estrutura que não o substrato nem o produto estaria se formando, e esta poderia ser identificada como um intermediário de reação. Porém, estes dados espectrofotométricos são apenas qualitativos, ou seja, eles indicam a existência de um intermediário reacional, mas não é possível inferir nenhuma estrutura a partir desses dados. Para que uma identificação estrutural deste possível intermediário ocorresse, outra técnica teve de ser utilizada: a espectrometria de massas.

## **Determinação de intermediários reacionais por espectrometria de massas**

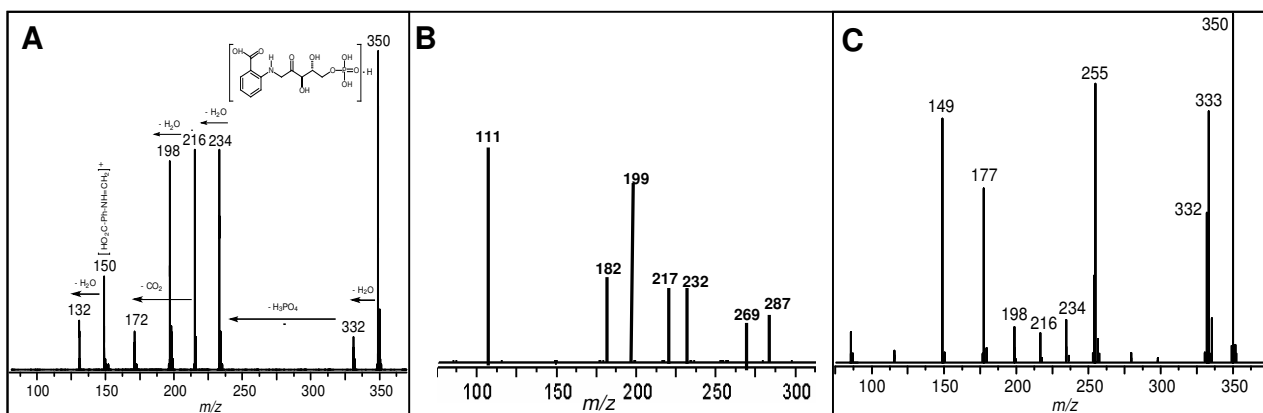
Inúmeros trabalhos sobre a identificação de intermediários reacionais por espectrometria de massas estão disponíveis na literatura (Eberlin, 2007). No entanto,

quando a reação envolve catálise enzimática, apenas um trabalho, realizado com a enzima EPSP sintase foi realizado (Paiva *et.al*, 1997).

Diversos obstáculos se apresentam quando a presença de uma enzima faz-se necessária. Por exemplo, é necessário que a reação seja realizada em água ou em um tampão volátil, situação nem sempre passível de realização. Além disso, a enzima deve ser estável o suficiente para permitir a realização dos ensaios, e não pode degradar-se antes de ser injetada no aparelho. Também os intermediários devem possuir algumas características, como serem carregados e estáveis o suficiente para permitirem sua identificação.

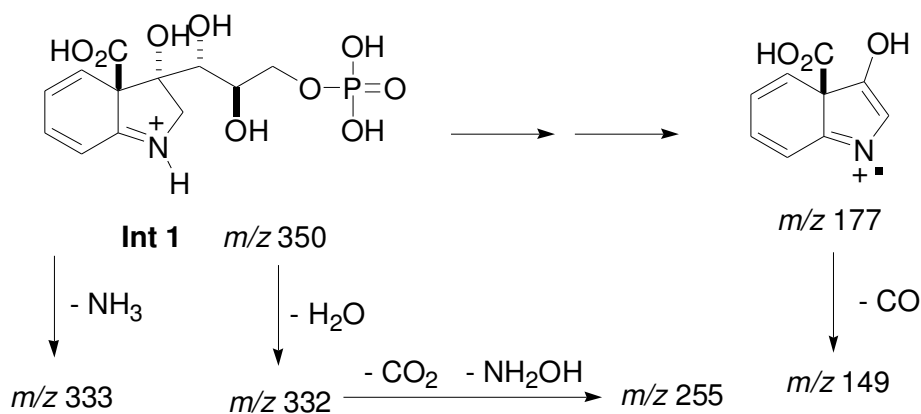
Assim, neste trabalho, fizemos uso da técnica de espectrometria de massas para interceptar um dos intermediários da reação catalisada pela *MtIGPS*. De acordo com nossa hipótese, se a reação seguisse o caminho proposto por Hennig *et.al* (2002, Figura 4A), seria possível identificar o intermediário 1, que é carregado e, apesar de possuir a mesma massa molecular do CdRP, possui padrões de fragmentação completamente diferentes, tendo em vista que o intermediário 1 é cíclico e não aromático, o que geraria fragmentos de *m/z* diferentes daqueles obtidos para o CdRP.

Observando a Figura 5, é possível comparar as diferenças entre os espectros obtidos para o substrato da reação (CdRP, A), o produto da reação (IGP, B), e o possível intermediário identificado (Int 1 C).



**Figura 5:** Espectros de ESI-MS/MS obtidos para (A) CdRP, (B) IGP, (C) Intermediário 1.

Tendo obtido estes resultados, foi possível identificar, na figura 5C, o sinal de  $m/z = 177$ , referente a uma fragmentação bastante característica do Intermediário 1. O esquema 3 indica como as fragmentações observadas tiveram origem, corroborando nossa conclusão de que ocorreu a formação do intermediário 1.



**Esquema 3:** Seqüência de fragmentações sofridas pelo Intermediário 1.

Com a realização deste experimento, foi possível concluir que a reação catalisada pela *MtIGPS* segue o mecanismo químico proposto por Parry (1972), que envolve a formação do Intermediário 1, identificado no presente trabalho.

Os resultados apresentados e interpretados aqui possibilitaram aumentar o conhecimento sobre a reação catalisada pela *MtIGPS*, seu mecanismo químico e catalítico, etapas fundamentais para um entendimento mais amplo a cerca da via de biossíntese do triptofano em *M. tuberculosis*. Estes resultados também representam um passo relevante para a compreensão da biologia deste bacilo e de uma de suas vias anapleróticas.

## Referências

- Boshoff, H.I.M; Barry, C.E. (2005) Tuberculosis – metabolism and respiration in the absence of growth. *Nat Rev Microbiol.* 3, 70-80.
- Brosch, R.; Gordon, S.V.; Marmiesse; Brodin, P.; Buchrieser, C.; Eiglmeier, K.; Garnier, T.; Gutierrez, C.; Hewinson, G.; Kremer, K.; Parsons, L.M.; Pym, A.S.; Samper, S.; van Soolingen, D.; Cole, S.T. (2002) A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* 99, 3684-89.
- Centers for Disease Control. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs—worldwide, 2000–2004. *MMWR* 2006; 55: 301-5.
- Cole S. T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S. V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C. E., Tekaiia 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. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544
- Creighton, T.E., Yanofsky, C. (1966) Indole-3-glycerol phosphate synthetase of *Escherichia coli*, an enzyme of the tryptophan operon, *J. Biol. Chem.* 241, 4616-24.

- Daniel, T.M. (2006) The history of tuberculosis. *Resp. Medicine* 100, 1862-1870.
- Darimont, B., Stehlin, C., Szadkowski, H., Kirschner, K. (1998) Mutational analysis of the active site of indoleglycerol phosphate synthase from *Escherichia coli*, *Protein Sci.* 7, 1221-32.
- Desai, S.A.; Krogstad, D.J.; McCleskey, E.W. (1993) A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Nature* 362, 643-6.
- Doy, C.H. (1966) Chemical synthesis of the tryptophan path intermediate 1-(o-carboxyphenylamino)-1-deoxy-D-ribulose 5-phosphate, *Nature* 211, 736-737.
- Eberlin, M.N. (2007) Electrospray ionization mass spectrometry: a major tool to investigate reaction mechanisms in both solution and the gas phase. *E.J.M.S.* 13, 19-28.
- Gómez, J.E.; McKinney, J.D. (2004) *M. tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. *Tuberculosis* (Edinb) 84, 29–44.
- Gutierrez, M.C.; Brisse, S.; Brosch, R.; Fabre, M.; Omais, B.; Marmiesse, M.; Supply, P.; Vincent, V. (2005) Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 1,e5.
- Hennig, M., Darimont, B.D., Jansonius, J.N., Kirschner, K. (2002) The catalytic mechanism of indole-3-glycerol phosphate synthase: crystal structures of complexes of the enzyme

from *Sulfolobus solfataricus* with substrate analogue, substrate, and product, *J. Mol. Biol.* 319, 757-66.

Keep NH, Ward JM, Cohen-Gonsaud M, Henderson B. (2006) Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. *Trends Microbiol.* 14:271-6.

Kirschner K, Szadkowski H, Jardetzky TS, Hager V.(1987) Phosphoribosylanthranilate isomerase-indoleglycerol-phosphate synthase from *Escherichia coli*, *Methods Enzymol.* 142, 386-397.

Marquet, S.; Schurr, E. (2001) Genetics of susceptibility to infectious diseases: tuberculosis and leprosy as examples. *Drug Metab Dispos* 29, 479–83.

Mazumder-Shivakumar, D.; Kahn, K.; Bruice, T.C. (2004) Computational Study of the Ground State of Thermophilic Indole Glycerol Phosphate Synthase: Structural Alterations at the Active Site with Temperature. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 5936-37.

Meya, D.B.; McAdam, K.P. (2007) The TB pandemic: an old problem seeking new solutions. *J Intern Med.* 261, 309-29.

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

Myers, J.N. (2007) Miliary, central nervous system, and genitourinary tuberculosis. *Dis Mon.* 53, 22-31.

- Nerlich, A.G.; Haas, C.J.; Zink, A.; Szeimies, U.; Hagedorn, H.G. (1997) Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *Lancet* 350,1404.
- Nicholas H.; Ward, J.M.; Cohen-Gonsaud, M.; Henderson, B. (2006) Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. *TRENDS in Microbiology* 14, 271-6.
- Paiva, A.A.; Tilton, R.F. Jr; Crooks, G.P.; Huang, L.Q.; Anderson, K.S. (1997) Detection and identification of transient enzyme intermediates using rapid mixing, pulsed-flow electrospray mass spectrometry. *Biochemistry*. 36, 15472-6.
- Parry, R. J. (1972). Biosynthesis of compounds containing an indole nucleus. Em *The Chemistry of Heterocyclic Compounds in Indoles* (Houlihan, W. J., ed.), Wiley-Interscience, New York.
- Cook, P.F.; Cleland, W.W. (2007) pH dependence of kinetic parameters and isotope effects, em *Enzyme kinetics and mechanism*. Taylor and Francis Group, LLC New Work.
- Petrucci, R.S.; Harwood, W.S. (1993) *General Chemistry*, 7th Edition, Prentice-Hall, capítulo 17.
- Pittard, A.J. , K.E. Biosynthesis of the Aromatic Amino Acids (1996) em *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, 2ª Ed., Neidhardt, F.C.; Ingraham, J.L. (eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Ralph S. Petrucci and William S. Harwood. (1993) Acids and bases, em *General Chemistry*, 7th Edition, Prentice-Hall.



- Rengarajan, J.; Bloom, B.R.; Rubin, E.J. (2005) Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102, 8327-32.
- Salo, W.L.; Aufderheide, A.C.; Buikstrat, J.; Holcomb, T.A. (1994) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2091-94
- Sampson, S.L.; Dascher, C.C.; Sambandamurthy, V.K.; Russell, R.G.; Jacobs, W.R. Jr; Bloom, B.R.; Hondalus, M.K. (2004) Protection elicited by a double leucine and pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* in guinea pigs. *Infect Immun.* 72, 3031-7.
- Smith, D.A., Parish, T., Stoker, N.G., Bancroft, G.J. (2001) Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates, *Infect Immun.* 69, 1142-50.
- Smith, O.H., Yanofsky, C. (1960) 1-(ortho-(carboxyphenylamino)-1- deoxyribulose 5-phosphate, a new intermediate in the biosynthesis of tryptophan, *J. Biol. Chem.* 235, 2051-57.
- Smith, O.H.; Yanofsky, C. (1962) Enzymes involved in the biosynthesis of tryptophan, *Methods Enzymol.* 5, 794-806.

Vollhardt, K.P.C.; Neil E. Schore, N.E. (2005) Delocalized Pi systems, em Organic Chemistry: Structure And Function. W. H. Freeman & Co.

Yang Y., Zhang, M., Zhang, H., Lei, J., Jin, R., Xu, S., Bao, J., Zhang, L., Wang, H. (2006) Purification and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* indole-3-glycerol phosphate synthase, *Biochemistry (Mosc)* 71, 38-43.

---