

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

ZILPA ADRIANA SÁNCHEZ QUITIAN

**Análise bioquímica, estrutural e funcional da enzima citidina deaminase
(E.C. 3.5.4.5) de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

Porto Alegre

2014

ZILPA ADRIANA SÁNCHEZ QUITIAN

**Análise bioquímica, estrutural e funcional da enzima citidina deaminase
(E.C. 3.5.4.5) de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre

2014

ZILPA ADRIANA SÁNCHEZ QUITIAN

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de ____ .

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Carla Denise Bonan - PUCRS

Prof. Dr. Diogo Onofre de Souza - UFRGS

Prof. Dr. Mauricio Reis Bogo - PUCRS

Porto Alegre

2014

Dedico esta tese aos meus pais, Ruby Quitian
e Cristobal Sánchez, por todo o amor, apoio e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Professor Diógenes Santiago Santos, pela oportunidade de fazer parte do Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional/Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (CPBMF/INCT-TB) e pela confiança e o apoio ao longo destes anos;

Agradeço ao meu co-orientador, Professor Luiz Augusto Basso, pela disponibilidade constante em ajudar, pelos ensinamentos, as correções e revisões de resultados, que foram essenciais para minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho;

Agradeço a Luiz Fernando Saraiva Timmers, colaborador deste trabalho, por sempre se mostrar disposto em ajudar a resolver impasses que de outra forma teriam atrasado os resultados do trabalho;

Agradecimentos a CAPES pelo apoio recebido durante o meu período no CPBMF/INCT-TB

A Anne Drumond Villela e Valnês da Silva Rodrigues Junior, pela colaboração nas correções, revisões, pelo trabalho em equipe, pela paciência e carinho, mas principalmente pela amizade;

Aos meu queridos amigos: Bruno Abaddi, Diana Rostrolla, Daiana Renk, Cândida Deves, Mariane Rotta, Priscila Vitola, Priscila Wink e a Virginia Falcão, muito obrigada pelo carinho, amizade, e ajuda durante todos esses anos, pelas conversas, pelos desabafos, enfim, por tornarem a execução deste trabalho mais divertida;

Aos demais colegas e amigos do CPBMF e Quatro G, antigos e novos, pelos ensinamentos e pelo companheirismo do começo ao fim;

A meus amigos Dayana, Jaqueline e Fabricio pela amizade, carinho e apoio que me ofereceram sempre;

Ao Leandro, pela paciência, ajuda e compreensão durante todos estes anos, e pelo apoio nos momentos difíceis;

A minha família, que foi fundamental para o término desta etapa, já que sem o apoio, amor e carinho deles não teria sido possível chegar até aqui.

RESUMO

O agente causador da tuberculose (TB), *Mycobacterium tuberculosis*, infecta um terço da população mundial. A Organização Mundial da Saúde estima que 8,6 milhões de novos casos de tuberculose ocorreram em 2012, resultando em 1,3 milhões de mortes no mundo. Assim, existe uma necessidade contínua de encontrar alvos moleculares promissores para o desenvolvimento de agentes anti-tuberculose e identificar determinantes de virulência associados com a patogênese de *M. tuberculosis*, visando a obtenção de cepas mutantes atenuadas como candidatas a novas vacinas contra a tuberculose. As enzimas envolvidas na biosíntese de purina e pirimidina têm papéis importantes no metabolismo celular, uma vez que proporcionam nucleótidos, os quais são componentes essenciais de um grande número de biomoléculas. A enzima Citidina deaminase (CDA) catalisa a desaminação hidrolítica da citidina a uridina, e faz parte da via de salvamento das pirimidinas. A CDA de *M. tuberculosis* (*MtCDA*) devido a sua não essencialidade pode ser um alvo interessante para a obtenção de cepas atenuadas para o desenvolvimento de vacinas auxotróficas contra a tuberculose, já que pode estar envolvido nos mecanismos de invasão e latência. No presente trabalho são apresentadas as estruturas cristalográficas da *MtCDA* em complexo com uridina (2,4 Å de resolução) e deoxiuridina (1,9 Å de resolução). Simulação da Dinâmica Molecular (MD) foi realizada com o propósito de analisar os movimentos fisicamente relevantes envolvidos no processo do reconhecimento proteína-ligante, e mostra que a flexibilidade estrutural de algumas regiões da proteína são importantes para a ligação do produto. Além disso, simulações MD permitiram a análise da estabilidade da estrutura tetramérica da *MtCDA*. O papel do resíduo conservado glutamato 47 (E47) foi avaliado mediante a construção de cinco proteínas mutantes (E47A, E47D, E47L, E47H, e E47Q). Os mutantes E47A e E47H foram expressos na fração insolúvel, enquanto E47D, E47L e E47Q foram expressas na fração solúvel e purificadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os mutantes E47D, E47L e E47Q continham 1 mol de Zn^{2+} por mol de subunidade de proteína. Estas mutações não tiveram efeito sobre o estado de oligomerização da *MtCDA*. Resultados cinéticos em estado estacionário mostraram que os valores de K_M para os mutantes E47D e E47Q não foram alterados significativamente, enquanto houve

uma redução nos valores de k_{cat} de 37 vezes para E47D e 19 vezes para a mutante E47Q. Não foi detectada qualquer atividade para a mutante E47L. A estrutura cristalográfica do mutante E47D foi resolvida por cristalografia de raios-X o que nos permitiu propor um papel catalítico para o grupo γ -carboxila do resíduo E47, sugerindo o envolvimento de um próton na catálise. Por outro lado, uma parte essencial para o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas, é a identificação de produtos de genes que são fundamentais para o crescimento e a sobrevivência bacteriana *in vitro* e *in vivo*. Desta forma, foi realizado o nocaute do gene *cdd* a fim de avaliar a importância deste gene para o crescimento do bacilo em vida livre e em condições de estresse (vida intracelular). Nossos resultados sugerem que o gene *cdd* não é um gene essencial para o crescimento do bacilo *in vitro* sob as condições experimentais utilizadas. Experimentos de infecção em camundongos com a cepa nocaute do gene *cdd* mostraram uma significativa redução nas UFC's determinadas no pulmão e baço dos animais infectados. Com tudo, experimentos de crescimento *in vitro* e infecção em camundongos estão sendo realizados a fim de confirmar os resultados obtidos. Os resultados da caracterização enzimática e substituição gênica são o ponto de partida para o melhor entendimento sobre o papel da enzima no metabolismo de nucleotídeos em *M. tuberculosis*, além de abrirem a possibilidade para o desenho racional de uma cepa atenuada, útil para o futuro desenvolvimento de uma nova candidata a vacina contra a tuberculose humana.

Palavras chave: *Mycobacterium tuberculosis*, Citidina deaminase, Cristalografia, Dinâmica Molecular, Mutagênese sítio-dirigida, Mecanismo Catalítico, Nocaute gênico.

ABSTRACT

The causative agent of tuberculosis (TB), *Mycobacterium tuberculosis*, infects one-third of the world population. The World Health Organization estimates that 8.6 million new TB cases occurred in 2012, resulting in 1.3 million deaths worldwide. Thus, there is a continuous need to find promising molecular targets for the development of anti-TB agents and to identify pathogenic determinants associated with *M. tuberculosis* virulence aiming the development of attenuated mutant strains as new vaccine candidates against TB. Enzymes involved in purine and pyrimidine biosynthesis have important roles in cellular metabolism, as they provide nucleotides that are essential components of a number of essential biomolecules. Cytidine deaminase (CDA) catalyzes the hydrolytic deamination of cytidine to uridine, and belongs to the pyrimidine salvage pathway. The CDA from *M. tuberculosis* (*MtCDA*) is a target for the development of attenuated strains of *M. tuberculosis* because it may be involved in mechanisms of pathogenicity such as latency. This work presents the crystal structures of *MtCDA* in complex with uridine (2.4 Å resolution) and deoxyuridine (1.9 Å resolution). Molecular dynamics (MD) simulation was performed to analyze the physically relevant motions involved in the protein–ligand recognition process, showing that structural flexibility of some residues are important to product binding. In addition, MD simulations allowed the analysis of the stability of tetrameric *MtCDA* structure. The role of the conserved glutamate-47 (E47) residue was evaluated by construction of five mutant proteins (E47A, E47D, E47L, E47H, and E47Q). Mutants E47A and E47H were expressed in insoluble fraction, whereas E47D, E47L and E47Q were soluble and purified by HPLC. The E47D, E47L and E47Q mutants contained 1 mol of Zn²⁺ per mol of protein subunit. These mutations had no effect on oligomerization state of *MtCDA*. Steady-state kinetic results showed that K_M values for the E47D and E47Q mutants were not significantly altered, whereas there was a decrease in k_{cat} values of 37-fold for E47D and 19-fold for E47Q mutant. No activity could be detected for E47L mutant. The crystal structure of the E47D mutant was solved by X-rays diffraction, using synchrotron light. An essential role was proposed for the γ -carboxyl group of E47, and its involvement in the catalytic process. On the other hand, an important part of drug and vaccine development is

the identification of gene products that are critical for bacterial growth and survival. In this way the knockout of the *cdd* gene was performed in order to evaluate the importance of the *cdd* gene for mycobacteria growth *in vitro* and *in vivo*. Our results suggest that *cdd* gene is not an essential gene for *in vitro* growth under the employed experimental conditions. Infection in mice with the knockout strain of *cdd* gene has shown a significant reduction in the CFU's in lungs and spleen of the infected animals. Further experiments are under way to confirm such findings.

Finally, results from enzymatic characterization, site directed mutagenesis and gene replacement may be the starting point for a better understanding about the role of cytidine deaminase in *M. tuberculosis* metabolism and open up the possibility for a rational design of attenuated strain, that may be useful for future development of a new vaccine candidate against human TB.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Cytidine deaminase, Crystallographic, Molecular dynamics, Site-directed mutagenesis, Catalytic mechanism, Gene Knockout.

Lista de Abreviaturas e Siglas

add: adenosina deaminase

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

ATP: Adenosina trifosfato

B.A.A.R: Bacilos Álcool Ácido Resistentes

BCG: *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin

Can^R: resistência à canamicina

CDA: citidina deaminase

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

cDNA: DNA cópia

CEUA: comissão de ética no uso de animais

CFU: Unidade formadora de colônia

codA: citosina deaminase

CPSasell: carbamoilfosfato sintetase II

CTP: citidina trifosfato

D-CDA: CDA homodimérica

DCO: *double crossing-over*

deoA: pirimidina fosforilase

DHOase: dihidroorotato dihidroorotase

DHOase: dihidroorotato desidrogenase

DNA: ácido deoxiribonucleico

dNTPs: deoxiribonucleosídeos trifosfatados

DOTS: *Directly Observed Treatment Short Course Strategy*

ETB: etambutol

HIV: vírus causador da síndrome da imunodeficiência adquirida

HPLC: cromatografia líquida de alto desempenho

INH: isoniazida

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo

LB: Luria-Bertani

MD: Dinâmica Molecular

MDR-TB: Tuberculose resistente a múltiplos fármacos

MTB: *Mycobacterium tuberculosis*

MtCDA: CDA de *M. tuberculosis*

NDPs: nucleosídeos difosfatados

NMPs: nucleosídeos monofosfatados

NTPs: nucleosídeos trifosfatados

OADC: complexo contendo ácido oleico, albumina, dextrose e catalase

OMP: orotidina 5`-monofosfato

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPRT: orotato fosforibosil transferase

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase

PMN: polimorfonucleares

PRPP: α -D-5-fosforibosil-1-fosfato

pyrH: uridine monofosfato quinase

PZA: pirazinamida

RF: rifampicina

RNA: ácido ribonucléico

rNTP: ribonucleosídeos trifosfato

SCO: *single crossing-over*

SM: estreptomicina

TB: *terrific broth*

TB: tuberculose

TBL: tuberculose latente

T-CDA: CDA homotetramérica

TDR-TB: Tuberculose totalmente resistente a fármacos

udk: uridina quinase

UDP: uridina difosfato

UMP: uridina monofosfato

UPRTase: uracil fosforibosiltransferase

UTP: uridina trifosfato

WHO: Organização mundial da Saúde (World Health Organization)

XDR-TB: Tuberculose extensivamente resistente a fármacos

X-gal: reagente 5-bromo-4cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

Δcdd :Can: gene *cdd* interrompido pelo cassete contendo o gene que confere resistência à canamicina.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estimativa da prevalência HIV em novos casos de TB em 2012.	20
Figura 2. Estimativa da ocorrência de novos casos de TB em 2012 no mundo.	21
Figura 3. Fármacos anti-TB de primeira e segunda linha.	24
Figura 4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26
Figura 5. Estrutura da parede celular da <i>M. tuberculosis</i>	27
Figura 6. Estrutura e constituintes celulares do granuloma formado após a infecção com <i>M. tuberculosis</i>	29
Figura 7. Estados do desenvolvimento da tuberculose.	31
Figura 8. Síntese <i>de novo</i> das pirimidinas.	34
Figura 9. Rota de salvamento de pirimidinas.	36
Figura 10. Reação enzimática catalisada pela citidina deaminase.	37
Figura 11. Ciclo catalítico proposto para a CDA.	39
Figura 12. Estrutura quaternária da CDA.	40
Figura 13. Estrutura tetramérica da MtCDA.	41
Figura 14. Subunidade da MtCDA.	42
Figura 15. Sítio ativo da MtCDA.	43
Figura 16. Operon add-cdd.	94
Figura 17. Fragmento de DNA contendo o gene <i>cdd</i> e regiões flanqueadoras amplificado a partir do DNA genômico de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	95
Figura 18. Fragmento de DNA contendo o gene <i>cdd</i> interrompido pela inserção de um cassete contendo gene de resistência a canamicina e regiões flanqueadoras. ...	96
Figura 19. Seleção de colônias recombinantes após transformação de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv com o plasmídio pPR27xyIE <i>cdd::can</i> incubados a 32 °C.	97
Figura 20. Seleção de clones mutantes para o gene <i>cdd</i> em placas contendo meio de cultivo Middlebrook 7H10 OADC 10% contendo canamicina 25 µg mL ⁻¹ e sacarose 2% incubadas a 39 °C.	98
Figura 21. Triagem das cepas de <i>M. tuberculosis</i> mutantes para o gene <i>cdd</i>	99
Figura 22. Expressão de RNA dos genes <i>cdd</i> , <i>deoA</i> e <i>add</i>	100
Figura 23. Fragmento amplificado a partir do DNA genômico de <i>M. smegmatis</i>	101
Figura 24. Infecção em camundongos, tamanho dos baços e contagem de UFCs.	105

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	17
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Tuberculose	18
1.1.1 O agente etiológico	25
1.1.2 Infecção	28
1.1.3 Tuberculose e latência	30
1.2 Metabolismo de nucleotídeos	32
1.2.1 Síntese de novo das pirimidinas	33
1.2.2 Rota de salvamento das pirimidinas	34
1.3 Citidina deaminase	37
2 JUSTIFICATIVA	45
3. OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos	47
Capítulo 2	49
Manuscrito publicado no periódico <i>Archives of Biochemistry and Biophysics</i>	
Crystal structure determination and dynamic studies of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Cytidine deaminase in complex with products	49
CAPÍTULO 3	58
Manuscrito submetido no periódico <i>Archives of Biochemistry and Biophysics</i>	
Functional and structural evidence for the catalytic role played by glutamate-47 residue in the mode of action of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> cytidine deaminase	58
CAPÍTULO 4	90
4. Estudo da essencialidade da sequência de DNA correspondente ao gene <i>cdd</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv através do nocaute gênico	90
4.1 Localização do gene <i>cdd</i> no DNA genômico de <i>M. tuberculosis</i>	93

4.2 Construção da cepa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv mutante para o gene <i>cdd</i>	94
4.3 Construção da cepa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv mutante para o gene <i>cdd</i> complementada com uma cópia extra do gene <i>cdd</i>	101
4.4 Modelo de infecção em camundongos.....	102
4.4.1 Animais	102
4.4.2 Distribuição dos grupos	103
4.4.3 Infecção com <i>M. tuberculosis</i>	103
4.4.4 Eutanásia.....	104
4.4.5 Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)	104
CAPÍTULO 5	107
5.Considerações finais	107
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
REFERÊNCIAS.....	113
ANEXO A.....	119
Carta de submissão do manuscrito: Functional and structural evidence for the catalytic role played by glutamate-47 residue in the mode of action of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> cytidine deaminase.....	119
ANEXO B.....	121
Carta de aprovação da Comissão de ética no uso de animais (CEUA-PUCRS)	121
ANEXO C.....	123
Pyrimidine Salvage Pathway in <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	123
ANEXO D.....	125
Combining molecular dynamics and docking simulations of the cytidine deaminase from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	125
ANEXO E	127
Biochemical characterization of recombinant nucleoside hydrolase from <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	127

CAPÍTULO 1

1 Introdução

1.1 Tuberculose

1.1.1 Agente etiológico

1.1.2 Infecção

1.1.3 Tuberculose e latência

1.2 Metabolismo de Nucleotídeos

1.2.1 Síntese *de novo* de pirimidinas

1.2.2 Rota de salvamento das pirimidinas

1.3 Citidina deaminase de *M. tuberculosis*

2 Justificativa

3 Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

3.2 Objetivos Específicos

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose

“...a dread disease, in which death and life are so strangely blended, that death takes the glow and hue of life, and life the gaunt and grisly form of death...” (Charles Dickens. Nicholas Nickleby, Cap. XLIX, Oxford University Press, 1990)

A tuberculose (TB), doença infecciosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, desempenhou um papel importante na história da Medicina, como por exemplo a percussão e a invenção do estetoscópio. Pesquisas realizadas durante os séculos XVIII, XIX e XX se tornaram importantes ferramentas para o diagnóstico, tratamento, controle e prevenção da TB. Acredita-se que esta doença vem infectando humanos há pelo menos 70 mil anos e acompanhou o homem nas grandes migrações da África para os outros continentes (1).

A primeira referência à natureza infecciosa da TB apareceu só no século XVI, quando Girolamo Fracastoro, médico, poeta, filósofo e professor da Universidade de Pádua descreveu no seu livro *De Contagione* como a tísica (*phthisis*) como a doença era chamada então, era transmitida por partículas invisíveis, chamadas *seminaria* que poderiam sobreviver fora do corpo humano por vários anos e ainda assim serem infecciosas (2). Devido à variedade de seus sintomas, a TB não era identificada como uma única doença até 1820. Em 1839 J. L. Schonlein em Zurich sugeriu que a palavra tuberculose deveria ser usada como o nome genérico de todas as manifestações da tísica, devido ao tubérculo ser a unidade patológica fundamental (3)

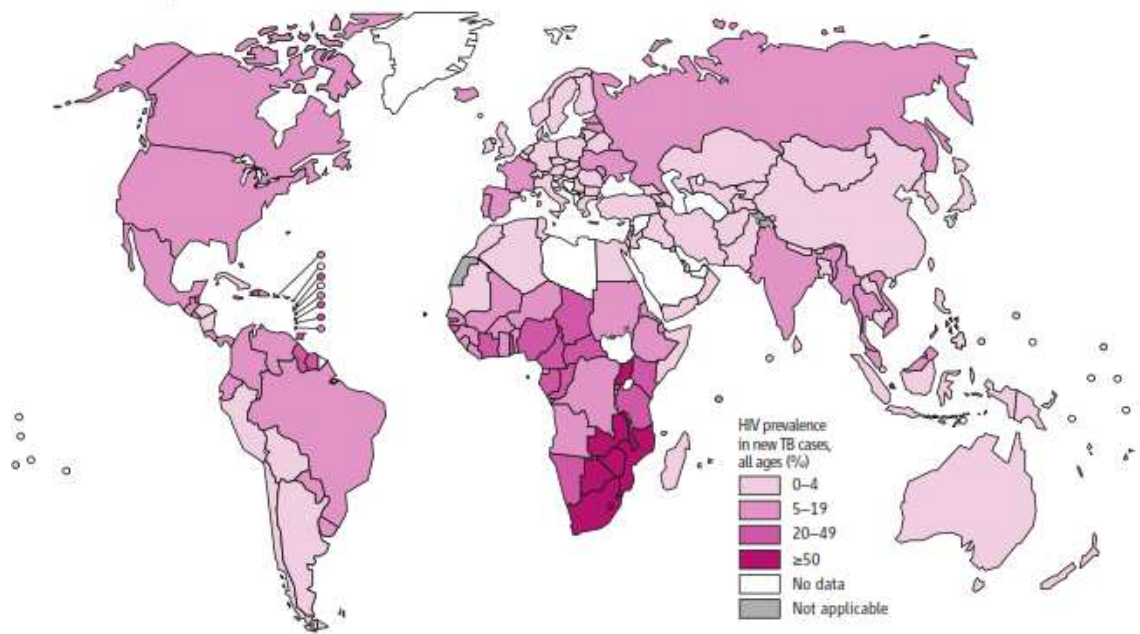
A identificação do *M. tuberculosis* por Robert Koch, em 1882, como o agente etiológico da TB foi um marco fundamental para o conhecimento da doença e significou também uma importante contribuição para o fortalecimento da teoria da transmissibilidade das doenças infecto-contagiosas, assim como estabeleceu alguns postulados aplicados não só a tuberculose como a todas as

doenças infecto-contagiosas, conhecidos como Postulados de Koch. Esta descoberta estimulou novas tentativas na direção do controle e tratamento específico da TB, que se tornou possível na década de 1940 com a introdução da estreptomicina que trouxe esperanças para o controle da doença (2).

A estreptomicina, purificada por Selman Waksman a partir de cultivos de fungos do Gênero *Streptomyces*, foi administrada a um paciente, e os resultados foram impressionantes. A doença imediatamente cessou a sua progressão, a bactéria desapareceu do escarro do paciente, e ele se recuperou totalmente. Apesar de ter ocorrido inicialmente uma queda acentuada dos índices de mortalidade da doença, o uso da estreptomicina trouxe um resultado indesejado, surgimento de bacilos resistentes ao fármaco (2). No entanto, com a introdução de outros fármacos a partir da década de cinquenta, sobretudo a isoniazida, ácido para-amino-salicílico, etionamida, pirazinamida, etambutol e rifampicina, abandonou-se a monoterapia e passou-se a utilizar uma combinação de fármacos e os níveis da doença decresceu sensivelmente, sobretudo nos países industrializados (2).

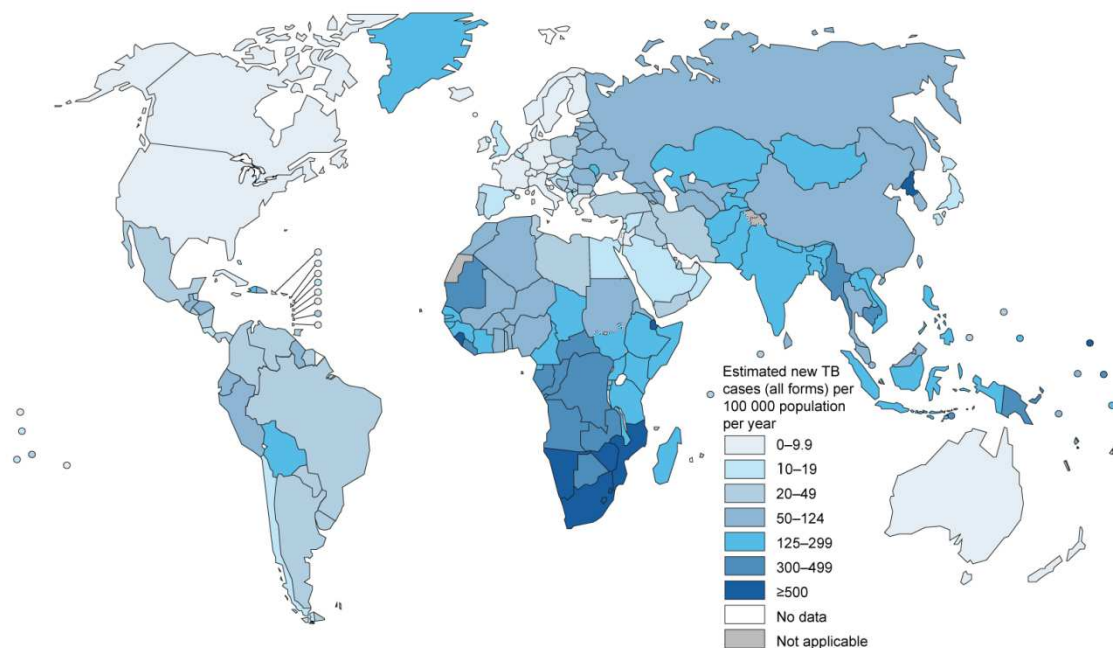
Apesar de todos os medicamentos disponíveis atualmente, a TB ainda é um problema de saúde pública mundial, como declarado pela OMS no começo da década de noventa. De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) (4), em 2012 foram reportados 8,6 milhões de novos casos de TB e 1,3 milhões de óbitos, incluindo 300.000 co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Destes 8,6 milhões de casos estima-se que 1,1 milhões (13%) corresponde a pessoas infectadas com o HIV (Figura 1). O continente africano é o que apresenta maior número de casos de coinfeção tuberculose/HIV (75%) (4, 5).

Figura 1. Estimativa da prevalência de HIV em novos casos de TB em 2012.



Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2013 (4).

Estudos indicam que a incidência global da TB em 2012 era de 122 casos por 100.000 habitantes, apresentando uma diminuição de 37% desde 1990. A maior parte do número estimado de casos ocorreu na Ásia com 58%, seguido da Região Africana com 27%. Enquanto que na Região Mediterrânea Oriental (8%); Região Européia (4%); e Região das Américas (3%) foi estimada uma menor proporção de casos ocorridos. Os cinco países com o maior número de incidência de casos em 2012 foram Índia (2,0 – 2,4 milhões), China (0,9 – 1,1 milhões), África do Sul (0,4 – 0,6 milhões), Indonésia (0,4 – 0,5 milhões) e Paquistão (0,3 – 0,5 milhões), sendo que a Índia e a China representam 26% e 12% dos casos globais, respectivamente (Figura 2) (4).

Figura 2. Estimativa da ocorrência de novos casos de TB em 2012 no mundo.

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2013 (4).

Segundo o relatório da OMS, de uma relação de 22 países considerados “de alta carga”, com os maiores números absolutos de casos de TB, que contabilizam 82% de todos os casos estimados, o Brasil ocupa 17º lugar. Nestes 22 países, estima-se que, anualmente, ocorrem 92.000 novos casos positivos de TB, com uma incidência de 46 casos (incluindo todas as formas de TB), por 100.000 habitantes (4). No Brasil, a TB representa a 4ª causa de morte por doenças infecciosas e a primeira causa de morte por doenças identificadas entre pacientes HIV positivos (6).

Mesmo com um número alarmante de novos casos de TB, observa-se uma redução da carga da TB, apresentando menor taxa de incidência, prevalência e mortalidade. Na última década, a taxa de incidência da doença apresentou importante tendência de queda. Em 2012, foram registrados 46 casos por 100 mil habitantes, enquanto que no ano 2001 era de 64, uma redução de 28% (4, 7). Em 2012, o Brasil de acordo com dados do Ministério da Saúde, registrou-se 71.230 casos novos de TB, número 9,4% menor do que o em 2003 – com 78.606. Em 2012, a taxa de incidência da doença foi de

36,7/100 mil habitantes, enquanto em 2003 era de 44,4/100 – o que representa uma queda de 17,3% no período (4, 7).

Apesar do número de casos de TB indicarem uma tendência de queda nos anos recentes, a doença se mantém como um sério problema de saúde pública e, por isso, a OMS reforça a implementação de um plano de eliminação da TB a nível mundial para o período de 2011-2015, cujo principal objetivo é eliminar a tuberculose como um problema de saúde pública, estimulando os países a realizarem investimentos para pesquisa e controle que permitam atingir esta meta (8).

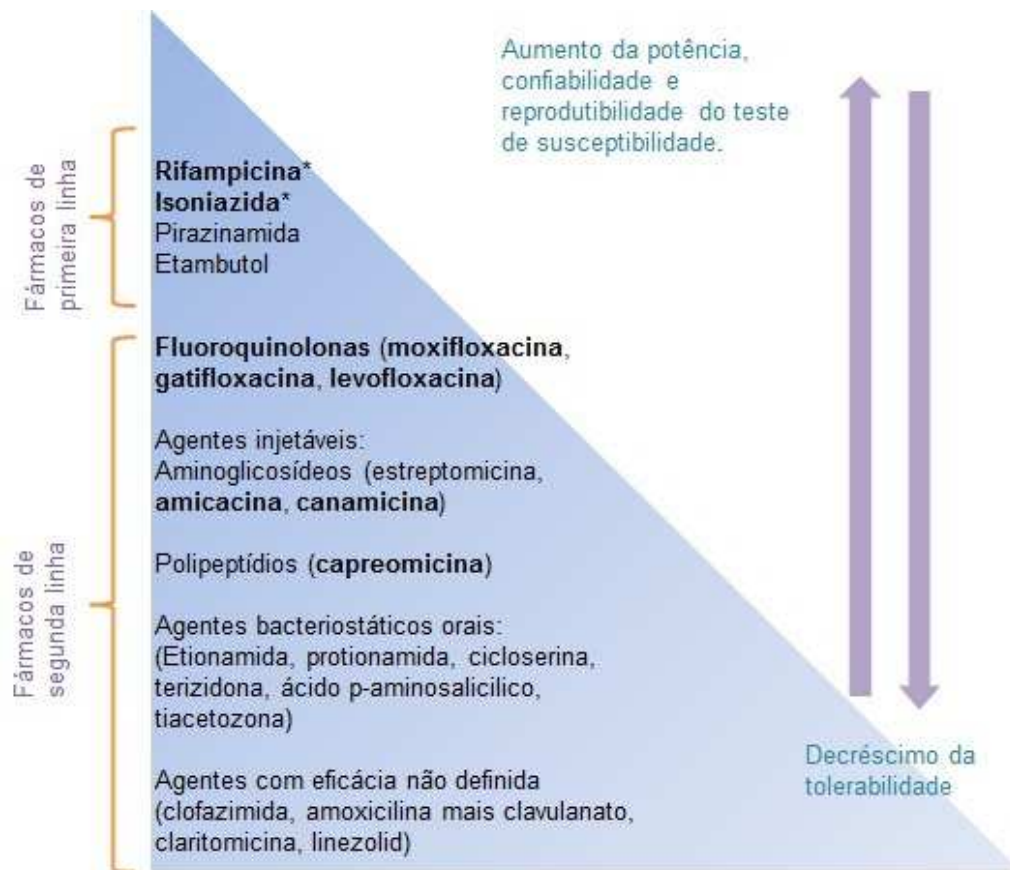
Desde 2001, o tratamento supervisionado de curta duração DOTS (*directly observed treatment short-course*) estabelecido pela OMS se converteu na estratégia da OMS para o controle da TB, sendo um procedimento padronizado para garantir o uso correto dos fármacos (isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida e Etambutol, por dois meses e Isoniazida e Rifampicina, por mais quatro meses) Neste programa, os agentes de saúde acompanham todo o tratamento do paciente, monitorando periodicamente o uso correto dos medicamentos, a fim de impedir o abandono da quimioterapia e, assim, evitar a recidiva da doença com cepas multirresistentes (9, 8).

O surgimento de cepas resistentes e multirresistentes constituem outro sério problema para o controle e erradicação da TB; diversos relatórios mostram o surgimento de cepas multirresistentes em pacientes infectados com HIV nos quais se observou um índice de mortalidade superior a 80% (4, 10). Não obstante a implementação do tratamento do DOTS como estratégia para o controle da TB, o surgimento de novas cepas resistentes a múltiplos fármacos é a principal causa de preocupação para o controle da doença. A cada ano são relatados cerca de 450.000 novos casos de tuberculose resistente a múltiplos fármacos (MDR-TB) (4, 11).

Em todo o mundo, cerca de 3% dos novos casos e 20% de casos previamente tratados de TB são causados por cepas resistentes a múltiplos fármacos. Nestes casos, o tratamento requer a administração de medicamentos de segunda linha (PAS, Etionamida, Cicloserina, Capreomicina, Fluoroquinolonas, Amicacina, Kanamicina), que são menos efetivos, geram

efeitos adversos maiores, aumentando custos (cerca de 100 vezes) quando comparado com os fármacos de primeira geração (4, 12).

O tratamento efetivo da MDR-TB requer o uso prolongado de uma combinação de fármacos, incluindo os de segunda linha que são geralmente mais tóxicos que os da primeira linha (Figura 3). Uma consequência do mau uso dos fármacos é o surgimento de cepas extensivamente resistentes, tais como as cepas MDR-TB em XDR-TB (*extensively drug-resistant-TB*). XDR-TB foi reportada pela OMS em setembro de 2006, e é definida como casos de TB resistente a dois fármacos de primeira linha (isoniazida e rifampicina), além da resistência a fluoroquinolonas e no mínimo uma das drogas injetáveis capreomicina, canamicina e amicacina (4, 13). Tanto as cepas MDR quanto as XDR levam ao uso de drogas de segunda linha, o que aumenta os efeitos colaterais, o custo e o tempo do tratamento, além de requerer maior tecnologia para o diagnóstico preciso das cepas de *M. tuberculosis*, a qual não está disponível em muitos países afetados pela doença.

Figura 3. Fármacos anti-TB de primeira e segunda linha.

Fonte: Adaptado de Dorman *et. al.*, 2007 (14).

Legenda: MDR-TB é definida como resistente (asteriscos) à isoniazida e rifampicina. XDR-TB é definida como resistente (negrito) à isoniazida e rifampicina, além de fluoroquinolonas e no mínimo um dos fármacos injetáveis.

A emergência de cepas TDR (totally drug-resistant) ou *super* XDR identificadas em pacientes iranianos e mais recentemente em chineses, indianos e italianos que apresentavam MDR-TB (15, 16, 17). As cepas TDR foram definidas como resistentes a todos os fármacos de primeira linha (isoniazida (INH), rifampicina (RF), estreptomicina (SM), etambutol (ETB) e pirazinamida (PZA)) e aos fármacos de segunda linha, testados para as cepas isoladas, como aminoglicosídeos, tioamidas, análogos de serina e derivados de ácido salicílico (4).

Estes fatos evidenciam que tanto o surgimento como o aumento do número de cepas de *M. tuberculosis* resistentes às drogas antimicobacterianas não só constitui uma ameaça elevada para os portadores de TB, mas também

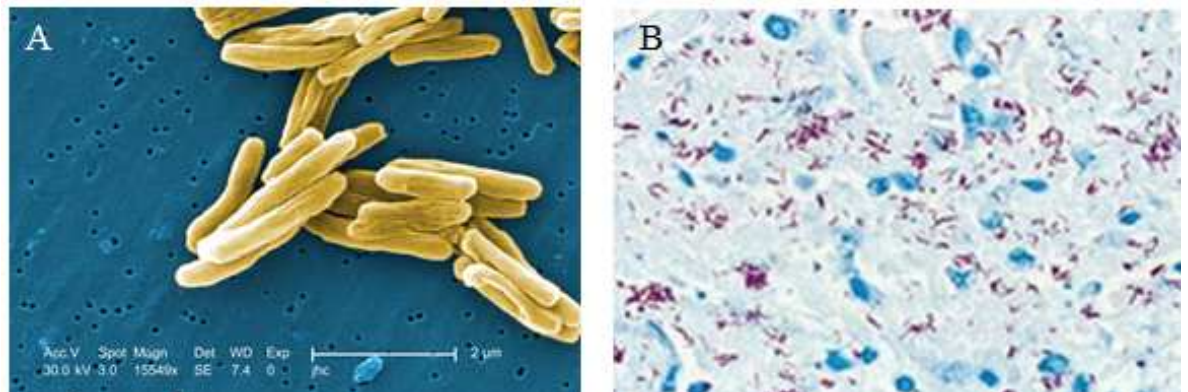
dificultam o controle da doença. Conseqüentemente, a vigilância do tratamento e pesquisas avançadas para o desenvolvimento de novos fármacos e cepas atenuadas torna-se uma prioridade na luta contra a TB.

1.1.1 O agente etiológico

Mycobacterium tuberculosis, conhecido também como bacilo de Koch, é o agente etiológico da TB. O *M. tuberculosis* pertence ao gênero *Mycobacterium*, família das micobactérias (Mycobacteriaceae) e ordem dos actinomicetos (Actinomycetales). *M. tuberculosis* pertence ao complexo *M. tuberculosis* que inclui sete espécies e subespécies — *M. tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium caprae* e *Mycobacterium bovis* — todas elas com patologias similares em vários hospedeiros mamíferos (18, 19). Estes microrganismos caracterizam-se por serem bastonetes, não esporulados, não capsulados, sem flagelos com largura que varia de 0,3 a 0,6 μm e uma espessura, de 1 a 4 μm (Figura 4A).

As bactérias do complexo *M. tuberculosis* são classificadas como micobactérias de crescimento lento, com um tempo de geração de 12 a 24 horas, já que além de serem exigentes nutricionalmente, possuem uma complexa parede celular, podendo ser necessárias cerca de 3 a 8 semanas de incubação para o isolamento do microrganismo. As micobactérias caracterizam-se por serem bacilos com propriedades de coloração que os denominam Bacilos Álcool – Ácido Resistentes (B.A.A.R.). Esta propriedade vem da composição de seu envelope celular com lipídios de alto peso molecular, como os ácidos micólicos complexados com açúcares. O método de Zihel-Neelsen utiliza este princípio para identificar o *M. tuberculosis* na baciloscopia. Após corar a lâmina com carbol-fucsina, esta é aquecida e descorada com ácido e álcool, e, em seguida, acrescenta-se o azul de metileno para corar o fundo. Os bacilos de Koch (*M. tuberculosis*) aparecem como pequenos bastonetes avermelhados medindo 2-4 μm , levemente curvos, contrastando com o fundo azul (Figura 4B).

Figura 4. *Mycobacterium tuberculosis*.



Fonte: Extraído do *Center of Disease Control* (20).

Legenda: A) Microfotografia do bacilo B) Coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen.

Um componente do envelope do *M. tuberculosis*, o lipoarabinomanam (LAM) é o fator de virulência mais importante desta bactéria. O envelope celular contém um peptidoglicano (parede celular), diferente do presente nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, associado a lipídios complexos, os quais compõem cerca de 60% da estrutura total do envelope. Três dos componentes principais são; ácidos micólicos, fator corda e cera-D (Figura 5) (21).

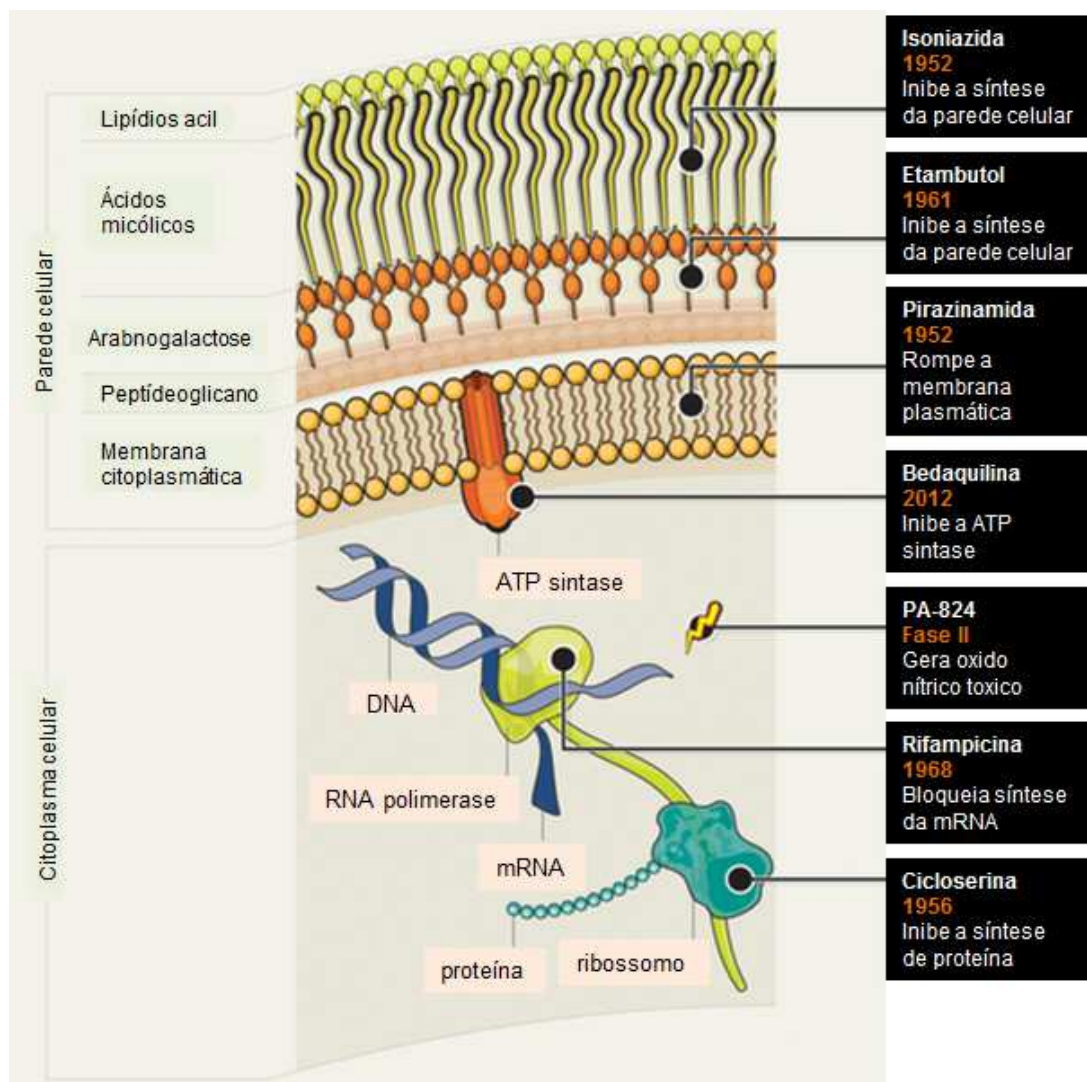
Os ácidos micólicos são ácidos graxos de cadeia longa compostos de uma cadeia beta-hidróxi mais curta com uma cadeia lateral alfa-álquil mais longa. Cada molécula contém entre 60 e 90 átomos de carbono. Os ácidos micólicos criam uma camada protetora, que protege o bacilo contra as proteínas catiônicas, lisozima, e os radicais peróxido durante a fagocitose, e também são os responsáveis da ácido-resistência (21).

O dimicolato de trealose, conhecido como fator corda, é um componente lipídico tóxico, capaz de inibir a migração de polimorfonucleares (PMN), correlacionado à virulência do bacilo. Este fator confere ao bacilo crescimento em um padrão característico, similar a uma corda com aspecto de serpentina (21), (22).

A cera-D é um glicolípido que tem um papel importante na produção da hipersensibilidade tardia e é um componente importante na reação de Manteaux. (21).

A característica hidrofóbica do envelope de *M. tuberculosis* lhe dá a capacidade de sobreviver por muito tempo de exposição a substâncias tais como ácidos, detergentes, e principalmente antibióticos. Por isso muitas pesquisas para o desenvolvimento racional de fármacos escolhem componentes do envelope celular como alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos ativos contra a TB. (Figura 5).

Figura 5. Estrutura da parede celular da *M. tuberculosis*.



Fonte: Adaptado de Maxmen A. 2013 (23)

Nota: Estrutura do envelope celular da *M. tuberculosis*, e a sua importância como alvo molecular para o desenvolvimento de fármacos. Alguns fármacos já utilizados para o tratamento da TB e outros em fase de desenvolvimento possuem seus mecanismos de ação relacionados à estrutura da parede celular.

1.1.2 Infecção

A infecção se inicia por meio da inalação de aerossóis contendo *M. tuberculosis*, que ocorre quando uma pessoa infectada e com tuberculose pulmonar ativa tosse ou espirra. Estes pacientes constituem a principal fonte de disseminação do organismo para novos hospedeiros. Sabe-se que uma pessoa com TB ativa pode infectar, em média, entre 10 e 15 pessoas por ano devido principalmente a um baixo número de bacilos necessários à infecção (< 10 bacilos) (2).

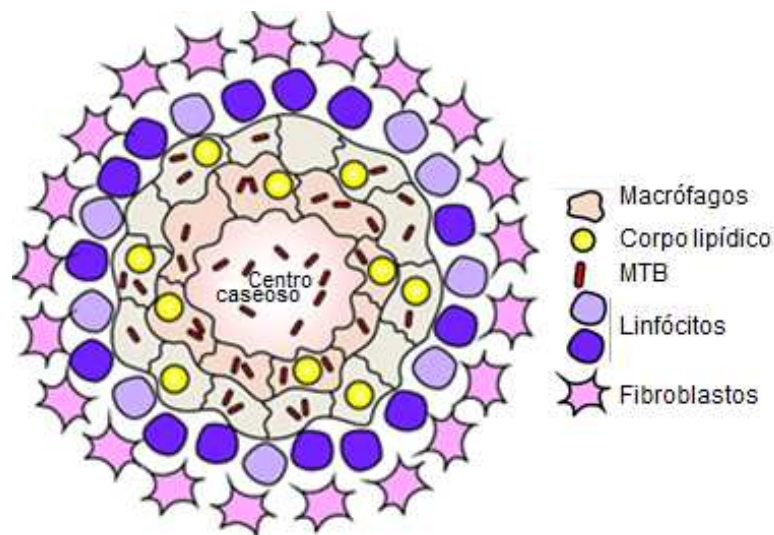
No primeiro estágio da doença, o bacilo, alcança os alvéolos pulmonares, entra em contato com macrófagos e células dendríticas, dando início à infecção (24). Uma vez no interior do macrófago, o bacilo inicia um processo lento de multiplicação, devido à inibição da formação do fagolisossoma. Os macrófagos infectados são detectados por linfócitos T que recrutam e ativam outros macrófagos que migram para o local da infecção dando origem ao granuloma (25). O granuloma ou tubérculo é a característica patológica clássica da TB, e funciona tanto como um nicho no qual o bacilo pode crescer ou persistir quanto em um microambiente imunológico em que as células com funções antimicobacterianas interagem para controlar e prevenir a disseminação da infecção. A formação do granuloma é o principal mecanismo utilizado pelo hospedeiro para conter a disseminação do bacilo a outros órgãos.

O granuloma consiste em um núcleo de macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, cercados por macrófagos, células gigantes derivadas de macrófagos e uma camada de linfócitos na periferia (Figura 6) (26), (24). Inicialmente, apenas células T CD4+ e CD8+ ocorrem no granuloma, mas, à medida que a resposta imune celular se desenvolve, outros tipos de linfócitos também são recrutados (27). Por vezes, a resposta celular falha e o granuloma

se rompe disseminando a doença para outros órgãos (tuberculose miliar). No caso da resposta imune adaptativa ser eficiente, a replicação bacteriana diminui drasticamente, mas as bactérias viáveis permanecem no hospedeiro de forma latente, podendo ser reativada meses, anos e décadas após a infecção primária. (28).

Os macrófagos infectados, contidos pela formação do granuloma sofrem necrose, deixando os granulomas com centros necróticos caseosos (Figura 6) (28).

Figura 6. Estrutura e constituintes celulares do granuloma formado após a infecção com *M. tuberculosis*.



Fonte: Adaptado de Huynh K. 2011 (28)

Um dos estágios da progressão da infecção é modulado pelo sistema imune do hospedeiro, o qual proporciona um ambiente hostil como baixa disponibilidade de oxigênio dentro dos granulomas, altos níveis de dióxido de carbono e ativação de macrófagos e outras células efetoras do sistema imune ao redor do granuloma. Assim, neste ambiente adverso, os bacilos permanecem em estado de latência durante longos períodos, o que é conhecido como TB latente, onde o indivíduo é assintomático e não transmissor (2).

No último estágio, a doença desenvolve-se tardiamente e pode ser causada tanto pela reativação de bacilos latentes da infecção inicial como pela impossibilidade de controlar uma reinfecção subsequente. No caso de indivíduos com TB latente, células viáveis de *M. tuberculosis* saem dos granulomas e se espalham pelos pulmões (TB pulmonar) e também para outros órgãos do corpo via sistema linfático e circulação sanguínea (TB extrapulmonar). Com a formação das cavernas pulmonares, o indivíduo se torna transmissor e passa a apresentar os sintomas típicos da TB ativa (tosse persistente, febre, sudorese noturna e emagrecimento (2)).

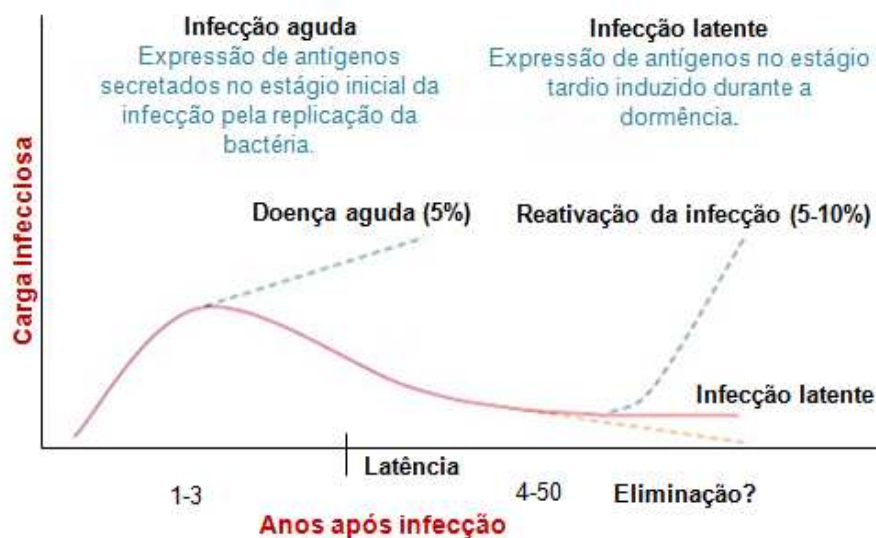
Embora os eventos moleculares que atuam em cada etapa ainda não sejam totalmente conhecidos, o sequenciamento do genoma do bacilo causador da TB levou adiante nas duas última décadas experimentos de expressão gênica que vem sendo usados com a finalidade de caracterizar genes, proteínas e rotas bioquímicas que permitam conhecer as nuances metabólicas do bacilo.

1.1.3 Tuberculose e latência

Como mencionado anteriormente, uma das características mais importantes do patógeno causador da TB é sua capacidade de persistir no hospedeiro humano por longos períodos (décadas, em alguns casos) em estado de latência, quando não se apresentam manifestações clínicas que permitem sua identificação. Nesta fase da infecção, também conhecida como persistência, o bacilo da TB diminui drasticamente seu metabolismo e multiplicação, como consequência da resposta imune celular que o hospedeiro monta para tentar frear a infecção (1). O bacilo apresenta uma taxa de crescimento lenta, que diminui ainda mais durante períodos de latência. O tempo requerido pelo *M. tuberculosis* para realizar um ciclo de replicação, em condições ótimas, é de 16-18 horas (29, 30). Sendo assim, a diminuição da taxa de crescimento é definida como um ciclo de replicação superior a 18 horas.

No contexto de infecção causada por *M. tuberculosis*, a integridade do sistema imune do hospedeiro é crucial. Em indivíduos imunocompetentes, a maioria dos infectados por *M. tuberculosis* desenvolve uma resposta celular efetiva e a replicação do bacilo é contida, sendo a maior parte deles eliminada (Figura 7). A doença ativa se manifesta em apenas 5-10% dos indivíduos expostos ao contágio com o bacilo, e, nestes, a resposta imune desencadeada não é suficiente para conter a infecção, culminando com o estabelecimento da doença (30). Nos demais indivíduos infectados (90-95%), uma parte dos bacilos consegue persistir, estabelecendo a doença latente (TBL). Dentre estes indivíduos, somente alguns irão desenvolver TB ativa, o que é diretamente associado à imunidade do hospedeiro (Figura 7). Pesquisas feitas utilizando o teste intradérmico da tuberculina, (Reação de Mantoux) que permite a constatação da TBL, estimam que um terço da população mundial esteja infectado com *M. tuberculosis*, o que representa um reservatório importante para o surgimento de novos casos. Estes reservatórios, dos quais podem surgir a doença ativa, são incrementados em doentes infectados com o HIV, o que gera um obstáculo importante para o controle da TB. Dados revelam que o risco de progressão da infecção do estado latente para o ativo é de 5-10% por ano (4, 5).

Figura 7. Estados do desenvolvimento da tuberculose.



Fonte: Adaptado de Andersen P. 2007 (31)

Uma importante característica da TBL é a formação de granulomas, típicos deste estado da doença, que fazem com que o patógeno seja isolado e sua replicação controlada, mas sem chegar a erradicá-lo. Esta forma isolada do bacilo pode viver por décadas em um estado de dormência, em que ocorre uma mínima replicação e expressão diferencial de genes que lhe permitem sobreviver. A ativação da TB ocorre quando o sistema imune do hospedeiro se encontra debilitado, resultando em grande replicação do bacilo e reativação da TB, sendo neste ponto transmissível a outras pessoas (30, 31).

A atual vacina contra a TB, desenvolvida a partir do *Mycobacterium bovis*, Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), foi introduzida em 1925 e é utilizada em muitos países. Esta vacina protege contra a manifestação da forma grave da doença em crianças, mas não impede a reativação pulmonar em adultos ou o estabelecimento da forma latente do bacilo (31). Contudo, um dos alvos importantes para o desenvolvimento de vacinas contra a TB é o estado de latência e os genes que são diferencialmente expressos quando o bacilo passa do estado ativo ao de latência, em resposta ao sistema imune do hospedeiro. Desta maneira, genes que são fundamentais para a sobrevivência do bacilo na fase de latência se mostram, agora, pontos de interesse para o estudo no desenvolvimento de vacinas (32, 33).

1.2 Metabolismo de nucleotídeos

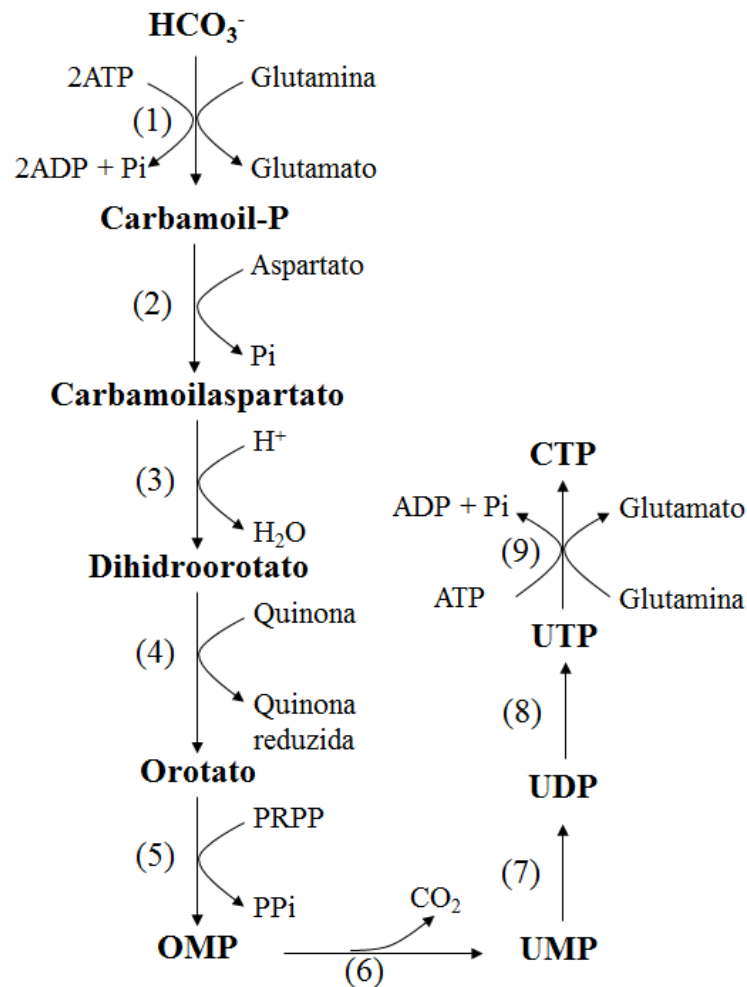
Os nucleotídeos são compostos que fazem parte de um grande número de processos bioquímicos nas diferentes formas de vida. A importância dos nucleotídeos no metabolismo celular é evidenciada pelo fato de que a maioria dos seres vivos podem sintetizá-los, tanto *de novo* a partir de compostos simples, como a partir dos produtos de degradação dos ácidos nucleicos, o que é denominado salvamento ou recuperação (34).

Mais de 95% dos nucleotídeos são encontrados na fração ácido-insolúvel das células, assim como nos ácidos nucleicos. A fração solúvel consiste de nucleosídeos mono, di, e trifosfatos (NMPs, NDPs e NTPs).

Nucleosídeos trifosfato são precursores de ácidos nucléicos e coenzimas. O nucleotídeo que atua como componente de coenzimas, assim como pequenas frações de ácidos nucléicos sofrem uma alta conversão, produzindo NMPs e NDPs como produto. Para uma síntese estável de RNA e DNA são requeridos ribonucleosídeos trifosfato (rNTP) e deoxiribonucleosídeos trifosfato (dNTPs), na ausência destes, são fornecidos através da biossíntese *de novo* (35).

1.2.1 Síntese de novo das pirimidinas

A síntese *de novo* das pirimidinas é iniciada com a síntese de carbamoilfosfato a partir de glutamina, bicarbonato e duas moléculas de ATP, reação catalisada pela carbamoilfosfato sintetase II (CPSasell). A condensação do carbamoilfosfato com aspartato pela aspartato transcarbamilase produz N-carbamoilaspartato formando-se o anel da pirimidina, através de ciclização e oxidação, o qual é transformado a dihidroorotato pela dihidroorotase (DHOase). Posteriormente ocorre a oxidação do dihidroorotato a orotato pela dihidroorotato desidrogenase (DHODH). O orotato é convertido ao nucleotídeo correspondente pela orotato fosforibosil transferase (OPRT) em presença de α -D-5-fosforibosil-1-fosfato (PRPP), formando orotidina 5`-monofosfato (OMP), a qual é subsequentemente decarboxilada dando origem á uridina monofosfato (UMP). A conversão de UMP ao trifosfato correspondente ocorre pela fosforilação de UMP a uridina difosfato (UDP) e depois à uridina trifosfato (UTP). Finalmente, UTP é aminado e convertido a citidina trifosfato (CTP) pela CTP sintetase (Figura 8) (35, 36).

Figura 8. Síntese *de novo* das pirimidinas.

Fonte: Adaptado de Neidhart 1996 (35)

Legenda: As enzimas mostradas nesta rota são (1): carbamoilfosfato sintetase II (CPSasell), (2): aspartato transcaramoilase, (3): dihidroorotase, (4): dihidroorotato desidrogenase, (5): orotato fosforibosiltransferase, (6): OMP descarboxilase, (7): UMP quinase, (8): nucleosídeo difosfato quinase, (9): CTP sintetase.

1.2.2 Rota de salvamento das pirimidinas

A rota de salvamento de pirimidinas apresenta três funções fisiológicas. A primeira é a assimilação de bases livres e nucleosídeos. A segunda função é

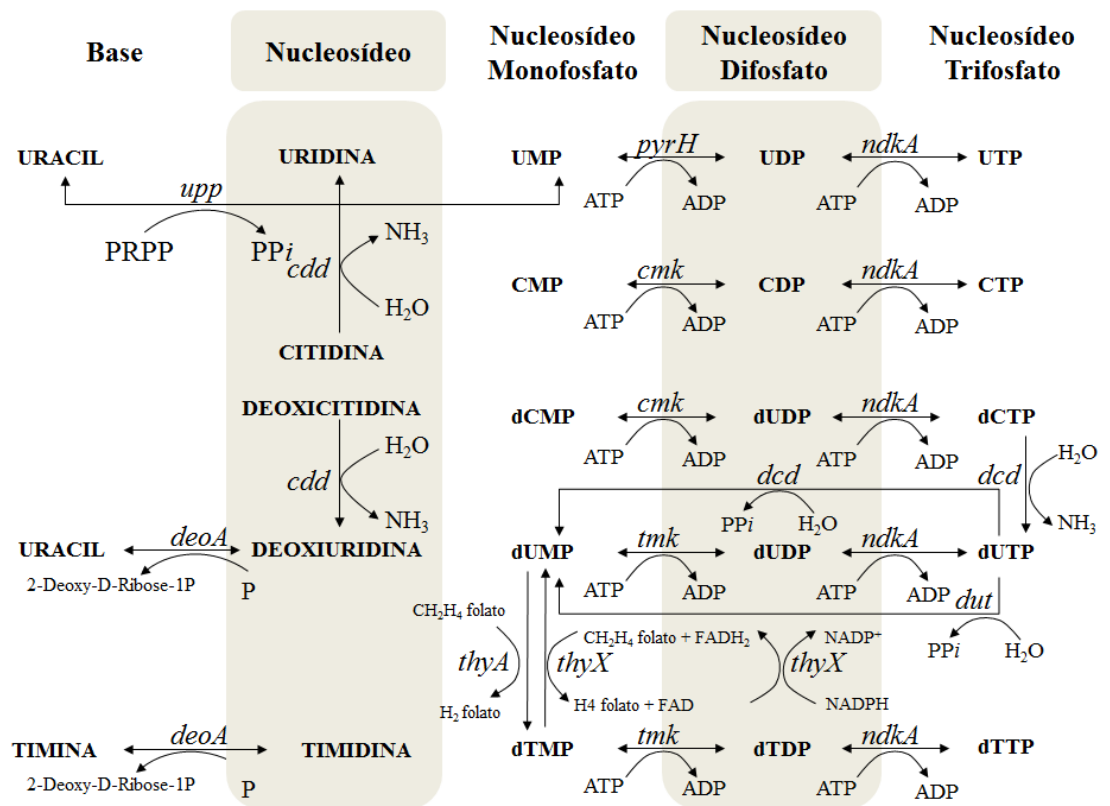
o fornecimento da pentose dos nucleosídeos exógenos como fonte de carbono e energia, e como fonte de nitrogênio, o grupo amino dos compostos com citosina. A terceira função é a reutilização de bases livres e nucleosídeos produzidos intracelularmente pelo catabolismo dos nucleotídeos. Os nucleosídeos são predominantemente metabolizados a bases livres antes de serem utilizados na síntese de nucleotídeos. Quantidades significativas de ribonucleotídeos são degradadas durante o crescimento normal e a reutilização destas bases e nucleosídeos livres requerem enzimas da rota de salvamento. A reciclagem de bases pirimídicas pela rota de salvamento é preferencialmente utilizada, pois demanda menos energia do que a síntese *de novo* (37).

Como mostrado na Figura 9, para a utilização de bases pirimidínicas livres, como o uracil, é necessária a atividade da enzima uracil fosforibosiltransferase (UPRTase), gene *upp*, a qual converte uracil a UMP em uma etapa de reação. No entanto, o catabolismo da citosina ocorre através da deaminação pela citosina deaminase (codA) em uracil e amônia.

Uridina, um dos nucleosídeos das pirimidinas, é convertida a UMP mediante fosforilação pela uridina quinase (udk) ou pela clivagem a uracil e ribose 1-fosfato através da uridina fosforilase (*deoA*) e posterior conversão do uracil a UMP pela UPRTase.

A rota pela utilização de citidina e deoxicitidina ocorre através da deaminação, a uridina e deoxiuridina respectivamente, catalizada pela citidina deaminase (CDA), gene *cdd*. O produto, uridina, é diretamente convertido a UMP pela uridina quinase.

A deoxiuridina e a timidina podem ser utilizadas por duas rotas diferentes. Na primeira, a timidina quinase, codificada pelo gene *tdk*, fosforila estes componentes até monofosfatos. Na segunda rota, a timidina fosforilase (*deoA*) cliva estes nucleosídeos originando a deoxiribose 1-fosfato e a base livre correspondente (36, 35, 34).

Figura 9. Rota de salvamento de pirimidinas.

Fonte: Adaptado de Villela *et al.*, 2010 (38).

Legenda: As enzimas envolvidas nesta rota são identificadas por seus genes: dCTP deaminase (*dcd*), dUTPase (*dut*), timidilate sintase (*thyA*), dTMP cinase (*tmk*), NDK (*ndkA*), UPRTase (*upp*), UMP quinase (*pyrH*), CMP cinase (*cmk*), CDA (*cdd*), e PyNP (*deoA*).

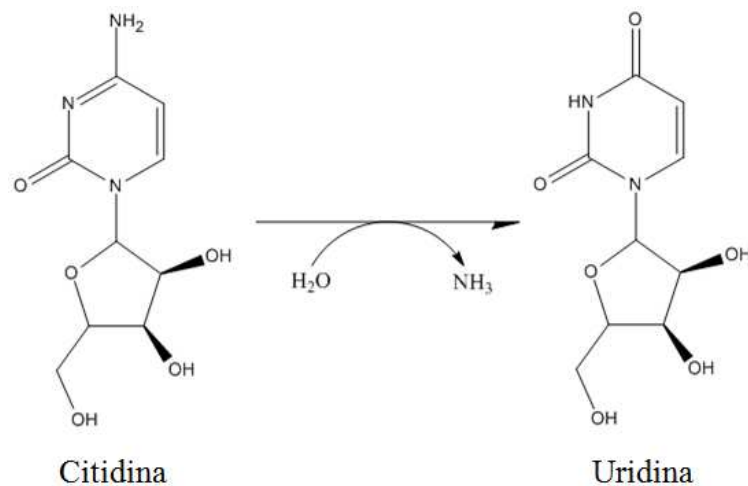
Diferentes estudos demonstram que organismos tão divergentes como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e o *Homo sapiens* possuem rotas similares para a biosíntese de nucleotídeos pirimidínicos, o que não é diferente em micobactérias, onde se tem estabelecido, apesar de pouca informação a respeito, que o metabolismo de pirimidinas é similar ao de humanos e outros organismos, através da identificação de genes por similaridade de sequências. Estudos mostram que mutantes de enzimas desta rota metabólica poderiam afetar o crescimento e vários estados fisiológicos deste patógeno na fase de latência do bacilo (39, 40).

Pouco se conhece sobre a função e preferência de substratos destas enzimas, cuja função se atribui ao metabolismo de nucleotídeos, sendo necessário ampliar o conhecimento com a realização de estudos que melhor caracterizem estas enzimas.

1.3 Citidina deaminase

A Citidina deaminase (CDA) (EC 3.5.4.5) é uma enzima que catalisa a deaminação hidrolítica irreversível de citidina e deoxicitidina a uridina e deoxiuridina respectivamente (Figura 10) (41, 42).

Figura 10. Reação enzimática catalisada pela citidina deaminase.



Fonte: Adaptado de Sánchez-Quitian 2011 (43).

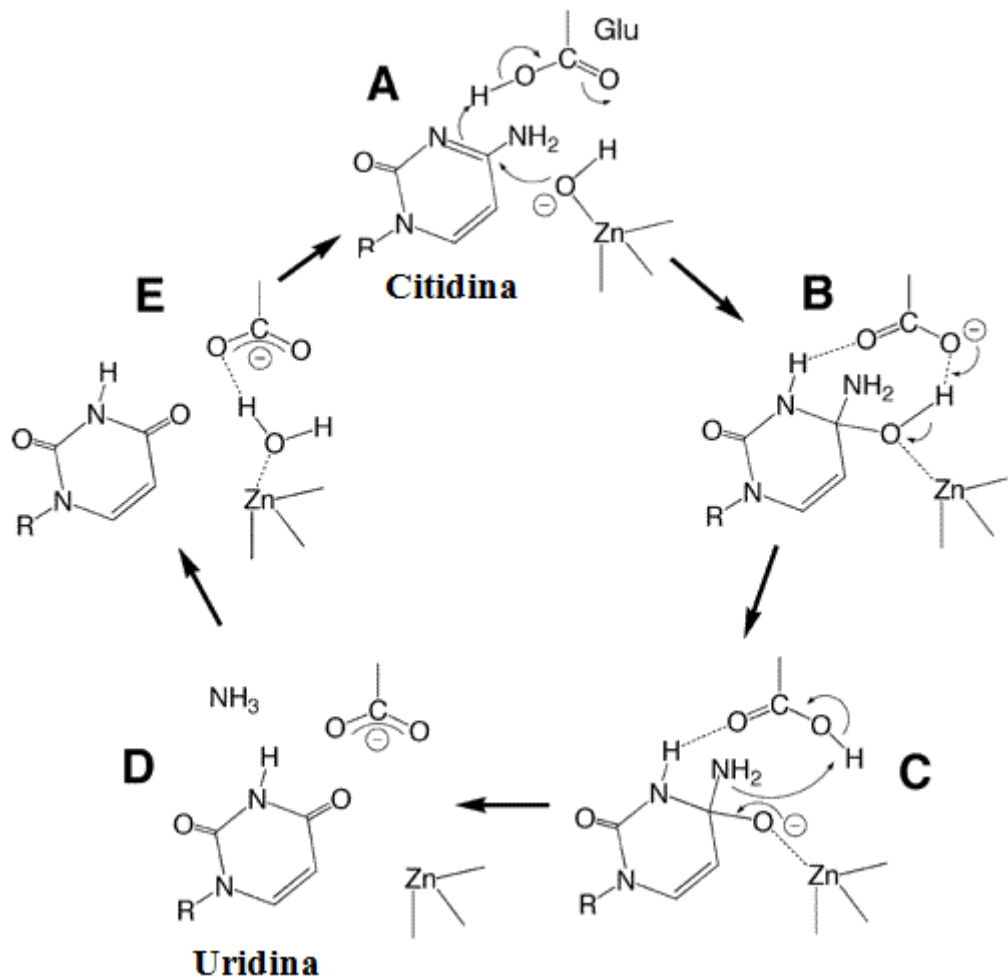
A superfamília da citidina deaminase inclui enzimas que atuam *in situ*, deaminando tanto polinucleotídeos (RNA e DNA), como mononucleotídeos ou nucleotídeos livres. Estas enzimas são principalmente envolvidas com o salvamento de purina e pirimidinas, em bactérias, eucariotas e fagos (44, 45).

A superfamília CDA contém citosina, guanina e citidina deaminases. Esta superfamília tem sido dividida em duas classes, segundo os resíduos do

sítio ativo, e é representada por três famílias. A primeira classe utiliza um resíduo de histidina e dois de cisteína para a coordenação do zinco, enquanto a segunda classe utiliza três resíduos de cisteína. Estas classes consistem de um domínio com uma estrutura de três camadas $\alpha/\beta/\alpha$. Comparações estruturais têm demonstrado que a folha beta central e a hélice que está ao redor são estruturalmente conservadas.

As três famílias da superfamília CDA são nomeadas como AICARDFT, que é uma família de enzimas bifuncionais que catalisam no mínimo dois passos na síntese *de novo* das purinas. A família APOBEC que é responsável pela geração de diversidade de proteínas, a través do mecanismo da edição do mRNA, e pela diversidade gênica pelo mecanismo de edição de DNA de cadeia simples. A família dCMP_cyt_deam1 é constituída por enzimas que catalisam a hidrólise da citidina a uridina e se caracterizam por requererem zinco para a atividade catalítica (46, 44, 45).

A enzima citidina deaminase (CDA) já foi caracterizada em *E. Coli*, *Bacillus subtilis*, humanos e recentemente em *M. tuberculosis* (43, 47, 48, 49). Estudos bioquímicos e estruturais da CDA em *E. coli* propõem o mecanismo catalítico apresentado na Figura 11. Onde em um primeiro passo, **E** \rightarrow **A**, ocorre uma dissociação heterolítica da água. A molécula de água que entra é primeiramente ligada ao sítio vazio do zinco. Na sequência, a ligação O–H da molécula de água é clivada e o hidrogênio é considerado como um próton pelo –COOH do ácido glutâmico. Posteriormente, o ânion hidroxila formado sob o átomo de zinco ataca o C4 da citidina, e o hidrogênio do –COOH do ácido glutâmico é simultaneamente transferido ao átomo N3 da citidina (**A** \rightarrow **B**), resultando na formação do intermediário tetraédrico (**B**). O hidrogênio do –OH observado no intermediário tetraédrico (**B**), migra para o grupo –NH₂ formando –NH₃ e uridina, o produto da reação (**B** \rightarrow **C** \rightarrow **D**) (41, 47, 50).

Figura 11. Ciclo catalítico proposto para a CDA.

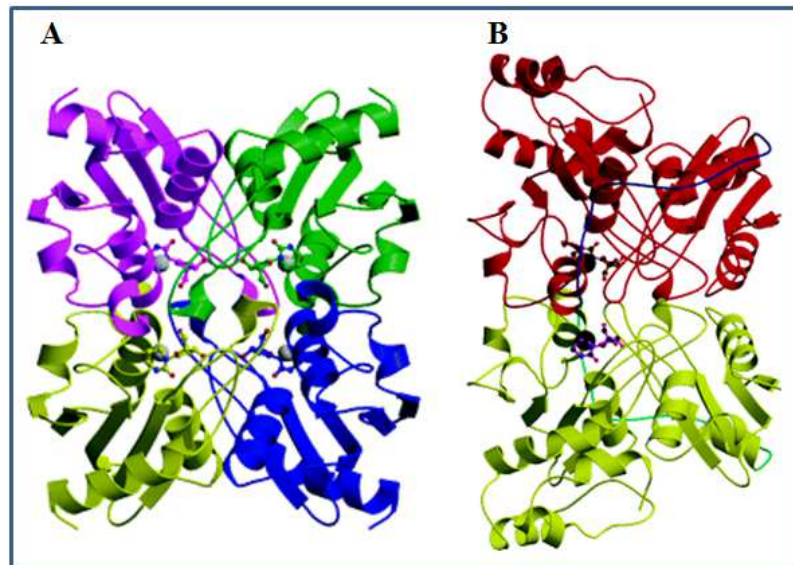
Fonte: Adaptado de Matsubara T. 2006 (50).

Dois tipos de CDA foram identificadas na natureza: uma homodimérica (D-CDA) com uma subunidade que apresenta massa molecular igual a 32kDa, e uma homotetramérica (T-CDA) com massa molecular aproximada de 15 kDa. D-CDAs são encontradas em bactérias Gram-negativas, tais como *E. coli*, e em plantas, enquanto que T-CDAs são encontradas em bactérias Gram-positivas, como *Bacillus subtilis*, e muitos outros organismos eucariotos, incluindo mamíferos. Cada monômero apresenta um peso molecular de 14 kDa para CDA humana e de *B. subtilis* e 13,9 kDa para MtCDA (47, 48).

A subunidade da enzima de *E. coli* tem dois domínios com as mesmas características estruturais presentes na subunidade das T-CDAs, resultando em centros estruturais similares (Figura 12). Porém, apenas um dos domínios

da D-CDA em cada subunidade é ligado ao zinco, e existem dois sítios ativos por molécula de enzima diferente dos quatro sítios, presentes na T-CDA. Os sítios ativos da T-CDA são compostos por resíduos das quatro subunidades que compõem o tetrâmero (47, 48).

Figura 12. Estrutura quaternária da CDA.



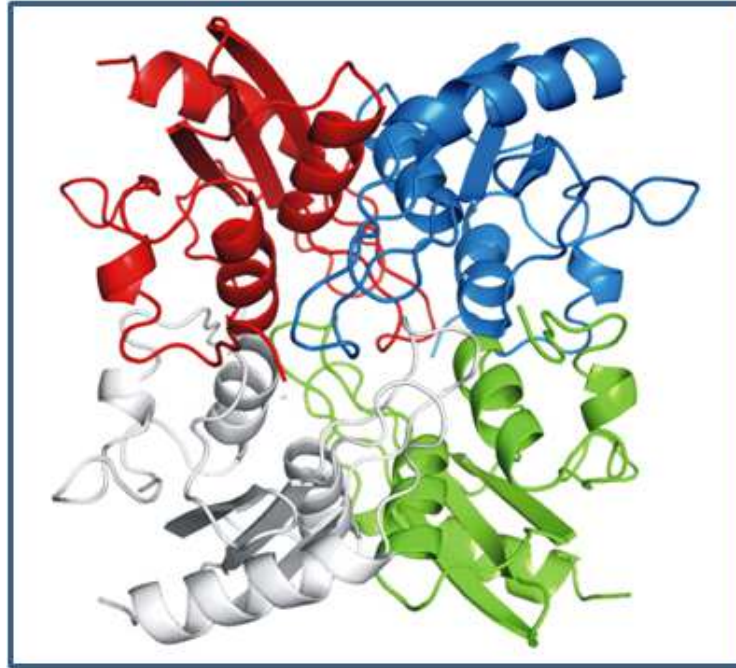
Fonte: Tomado de Johansson *et. al.* 2004 (48).

Legenda: Estrutura de (A) T-CDA de *B. subtilis* (PDB:1JTK) e (B) D-CDA de *E. coli* (PDB:1CTT). As subunidades de T-CDA são mostradas em roxo, verde e azul respectivamente. As subunidades de D-CDA são mostradas em vermelho e verde claro com as ligações respectivas entre o sítio catalítico e o domínio C-terminal em azul e ciano. Os íons de zinco são mostrados em modelo de palitos.

A enzima CDA de *M. tuberculosis* foi caracterizada como uma enzima homotetramérica dependente de zinco e estudos de alinhamento múltiplo mostram que os resíduos conservados entre CDAs de diferentes organismos estão envolvidos na interação com o substrato, ligação do zinco e interações entre as subunidades do tetrâmero. Neste último, é importante destacar que, assim como o observado na estrutura cristalográfica da *MtCDA*, em T-CDAs de diferentes organismos foram encontrados resíduos de tirosina, os quais não

estão presentes em nenhuma seqüência de D-CDA, confirmando assim a natureza tetramérica da *MtCDA* (Figura 13) (43, 51).

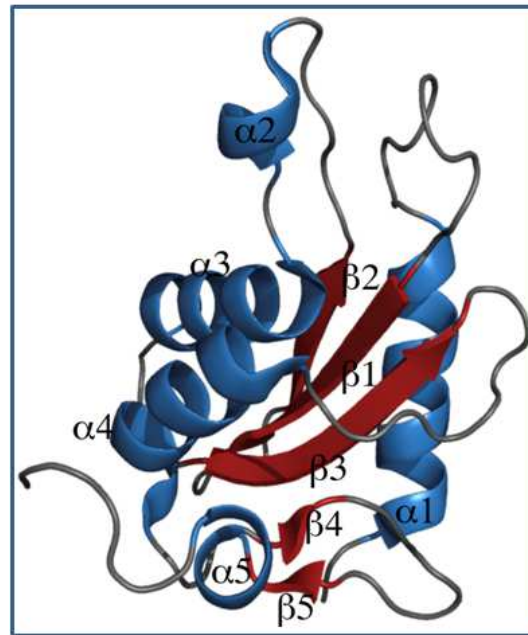
Figura 13. Estrutura tetramérica da *MtCDA*.



Fonte: Tomado de Sánchez-Quitian *et. al.* 2011 (52).

Nota: A proteína é apresentada na forma tetramérica e cada monômero (A-vermelho, B-azul, C-cinza, and D-verde) é apresentado em diferentes cores.

A enzima homotetrámerica *MtCDA* é composta de quatro subunidades idênticas e contem um sítio ativo por cada subunidade (13,9 kDa). Cada monômero possui cinco fitas- β e cinco hélices- α (Fig. 14). O monômero da *MtCDA* compreende um único domínio e os elementos estruturais secundários são organizados em um núcleo de três camadas ($\alpha/\beta/\alpha$) com uma mistura de cinco folhas beta. As cinco cadeias de folha beta apresentam no mínimo duas cadeias formando uma alça em uma região altamente flexível (43).

Figura 14. Subunidade da *MtCDA*.

Fonte: Produção do próprio autor do trabalho

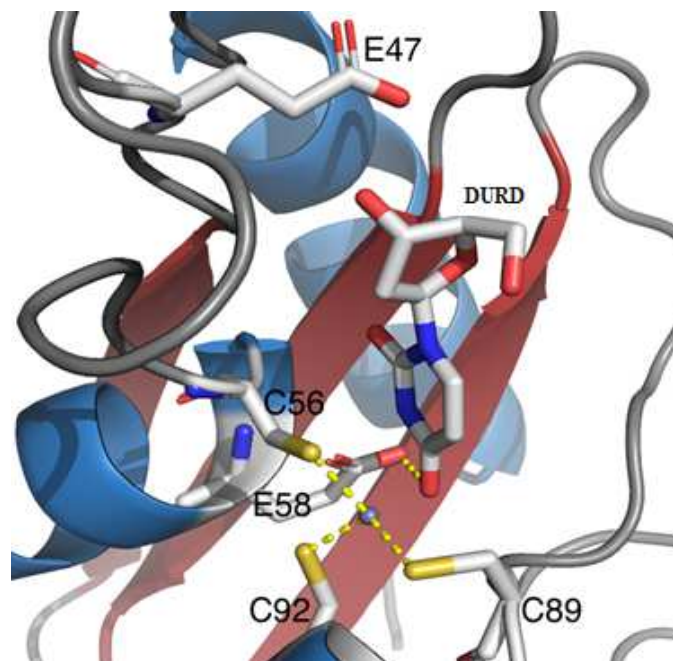
Nota: A proteína é apresentada em *ribbon*, mostrando a organização das cinco fitas-β e cinco hélices-α.

Estudos estruturais da *MtCDA* complexada com os produtos (uridina e deoxiuridina) mostram três principais regiões relacionadas com o sítio ativo. A primeira região é localizada na interface do monômero e é associada à estabilização da estrutura quaternária. Esta região compreende os resíduos V22 – F27. A segunda compreende os resíduos T42 – C56 e contribui à estabilidade dos ligantes no sítio ativo. A terceira região é localizada próxima ao sítio ativo (V110 – F123) e contribui na ligação do ligante (43).

Estes resíduos têm sido caracterizados como regiões conservadas em CDAs de diferentes organismos. Por exemplo, para a CDA humana (hCDA), a região envolvida com a ligação ao substrato contem os resíduos $_{32}\text{PYSHF}_{36}$, e $_{56}\text{ENACYP}_{61}$, similar ao descrito para a CDA de *B. subtilis* ($_{20}\text{PYSKF}_{27}$, $_{44}\text{ENAAYS}_{49}$) e *MtCDA* ($_{23}\text{PYSRF}_{27}$, $_{47}\text{ENVSYG}_{52}$). Enquanto a interação entre subunidades, $_{65}\text{CAERTA}_{70}$, é a região descrita para hCDA e *B.subtilis* CDA ($_{53}\text{CAERTA}_{58}$), e $_{56}\text{CAECAV}_{61}$ foi descrita para *MtCDA* (52, 53).

Estudos de perfil de pH realizados por nosso grupo demonstraram o decréscimo da atividade enzimática em pHs baixos, com um valor de pK_a de 4,7 o que sugere a protonação de um único grupo ionizável. Este valor de pK_a é consistente com o grupo γ -carboxila do aminoácido glutamato ou aspartato, os dois presentes na sequência da *MtCDA*, o que sugere que os resíduos de glutamato na posição 47 e 58 desempenham um importante papel na ligação e/ou catálise do substrato, já que, como observamos na figura 15, estão presentes no sítio ativo da *MtCDA* (43). Devido à proximidade do resíduo E58 com o zinco e ao relatado para outras CDAs, acreditasse que este resíduo possa ter um papel fundamental na catalise da reação. Já o resíduo E47 encontra-se afastado do zinco e não tem sido reportado nenhum estudo envolvendo este resíduo, sendo necessária a determinação do papel, se apresentar algum, na ligação ao substrato ou na catalise da reação.

Figura 15. Sítio ativo da *MtCDA*.



Fonte: Produção do próprio autor do trabalho.

Nota: Ligações de hidrogênio são mostradas em linhas pontilhadas.

A CDA de humanos (hCDA) tem se mostrado interessante pelo importante papel no metabolismo de nucleosídeos antitumorais e antivirais análogos de citidina, levando à inativação farmacológica, apresentando efeitos secundários indesejáveis. Um exemplo é a perda da atividade antineoplásica

da citosina arabinosa, após deaminação pela hCDA. A citosina arabinosa é um agente quimioterápico utilizado no tratamento contra o câncer (54).

Considerando as importantes funções biológicas desempenhadas pela rota bioquímica de salvamento de pirimidinas e, também, o possível papel da enzima CDA de *M. tuberculosis* neste contexto, o objetivo deste trabalho foi a caracterização bioquímica, estrutural da CDA de *M. tuberculosis* e a determinação da sua função biológica. Os nossos resultados podem servir como base para estudos futuros visando o desenvolvimento de novas estratégias para o desenvolvimento de amostras atenuadas para o controle e prevenção da TB humana.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, a vigilância do tratamento e pesquisas avançadas para o desenvolvimento de novas vacinas se tornou uma prioridade na luta contra a TB. Uma das características mais importantes do patógeno causador da TB é sua capacidade de persistir no hospedeiro humano por longos períodos em estado de latência, quando não se apresentam manifestações clínicas que permitam sua identificação. O bacilo, portanto, não é eliminado, permanecendo viável no hospedeiro humano por anos ou décadas.

A atual vacina contra a TB protege contra a manifestação severa da TB em crianças, mas não impede a reativação pulmonar em adultos ou o estabelecimento da forma latente do bacilo.

A fim de encontrar pontos-chave para impedir o crescimento da bactéria, já foram realizados diferentes trabalhos para melhor caracterizar rotas bioquímicas essenciais de *M. tuberculosis*, e o metabolismo das pirimidinas é uma rota bioquímica fundamental à viabilidade do bacilo. Estudos mostram que mutantes de enzimas desta rota metabólica poderiam afetar o crescimento e vários estados fisiológicos na fase de latência do bacilo da TB (55).

Na tentativa de auxiliar os esforços para o descobrimento e validação de novos alvos, o nosso grupo estuda as enzimas da rota das pirimidinas, a fim de determinar a sua importância na viabilidade do bacilo. Nesta linha de pesquisa, já foi demonstrado experimentalmente que o gene Rv3315c de *M. tuberculosis*, de fato, codifica uma enzima citidina deaminase (CDA) funcional, que efetua preferencialmente a deaminação de citidina e deoxicitidina e que a enzima é um tetrâmero que utiliza Zn^{2+} para sua atividade (metaloenzima) (43). Adicionalmente, os nossos estudos de perfil de pH e alinhamento de sequências de aminoácidos permitiram estabelecer para a MtCDA os possíveis resíduos envolvidos na catálise e ligação ao substrato, destacando a provável importância do glutamato 47 (E47) na catálise e/ou ligação ao substrato.

Deste modo, fica evidente a necessidade de aprofundar os conhecimentos estruturais e funcionais desta proteína envolvida em processos metabólicos do patógeno. Estes resultados poderão servir como base para a validação de cepas atenuadas do bacilo que possam ser testadas como possíveis amostras vacinais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- O objetivo geral deste trabalho foi a caracterização bioquímica e estrutural da enzima citidina deaminase (CDA) de *M. tuberculosis*, mediante a determinação da estrutura da CDA complexada com ligantes, a construção e caracterização de enzimas mutantes substituindo o resíduo glutamato 47, e a construção de uma cepa de *M. tuberculosis* nocaute para o gene codificante da CDA a fim de investigar a importância desta enzima para o metabolismo do bacilo.

3.2 Objetivos Específicos

1. Caracterização estrutural da enzima CDA de *Mycobacterium tuberculosis* complexada com os produtos da reação (uridina e deoxiuridina);
2. Realização de mutagênese sítio-direcionada no gene *cdd* a fim de determinar o papel do resíduo glutamato 47 (E47) da *MtCDA*;
3. Caracterização das enzimas CDA de *M. tuberculosis* mutantes, através de clonagem, expressão, purificação e determinação das constantes cinéticas.
4. Obtenção de cristais das enzimas *MtCDA* mutantes e caracterização estrutural;
5. Avaliação da essencialidade da enzima *MtCDA* na rota de salvamento de pirimidinas e no metabolismo do *M. tuberculosis* pelo nocaute do gene *cdd*.

Os resultados obtidos em cada etapa de trabalho estão organizados da seguinte forma:

O **Capítulo 2** consiste em um artigo publicado que descreve a caracterização estrutural da *MtCDA* complexada aos produtos da reação catalisada, obtenção de cristais da enzima adequados para a difração de raios X, determinação da estrutura tridimensional e refinamento e caracterização do sítio ativo da enzima CDA (**Objetivo Específico 1**).

O **Capítulo 3** apresenta a obtenção dos mutantes no resíduo glutamato 47 mediante mutagênese sítio-direcionada (**Objetivo Específico 2**), clonagem em vetor de expressão procariótico; sequenciamento e expressão das enzimas mutantes em cepas de *E. coli* a fim de obtê-las na sua forma solúvel; purificação da proteína recombinante por cromatografia líquida de alta performance (HPLC); quantificação de proteína; determinação do estado oligomérico; quantificações do metal zinco presente no sítio ativo; análise da pureza e identidade da proteína recombinante homogênea por espectrometria de massa e sequenciamento de aminoácidos; testes de atividade enzimática e determinação das constantes cinéticas (**Objetivo Específico 3**), e caracterização estrutural mediante análise da estrutura cristalográfica (**Objetivo Específico 4**).

O **Capítulo 4** apresenta os resultados obtidos na construção da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv nocauteada no gene *cdd*. Para isto, são apresentados a amplificação das regiões flangeadoras *upstream* e *upstream downstream* do gene *cdd* utilizando o vetor suicida pPR27*xyIE*, e a construção da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv nocaute para o gene *cdd* e complementada com uma cópia extra do gene *cdd* utilizando o vetor pNIP40 (**Objetivo Específico 5**).

O **Capítulo 5** apresenta as considerações finais.

Capítulo 2

Crystal structure determination and dynamic studies of *Mycobacterium tuberculosis* Cytidine deaminase in complex with products

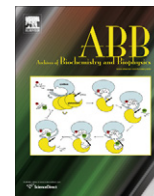
Z.A. Sánchez-Quitian, L.F.S.M. Timmers, R.A. Caceres, J. Rehm, C.E. Thompson, L.A. Basso, W.F. de Azevedo Jr., D.S. Santos

Archives of Biochemistry and Biophysics, 2011, 509, 108–115



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabbi

Crystal structure determination and dynamic studies of *Mycobacterium tuberculosis* Cytidine deaminase in complex with products

Zilpa A. Sánchez-Quitian^{a,b}, Luís F.S.M. Timmers^{b,c}, Rafael A. Caceres^{c,d}, Jacqueline G. Rehm^a, Claudia E. Thompson^c, Luiz A. Basso^a, Walter F. de Azevedo Jr.^{b,c,*}, Diógenes S. Santos^{a,*}

^a Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB),

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

^b Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Faculdade de Biociências, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Laboratório de Bioquímica Estrutural (LaBioQuest),

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

^d Programa de Pós Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 December 2010

and in revised form 27 January 2011

Available online 2 February 2011

Keywords:

Tuberculosis

Cytidine deaminase

Crystallography

Molecular dynamics

ABSTRACT

Cytidine deaminase (CDA) is a key enzyme in the pyrimidine salvage pathway. It is involved in the hydrolytic deamination of cytidine or 2'-deoxycytidine to uridine or 2'-deoxyuridine, respectively. Here we report the crystal structures of *Mycobacterium tuberculosis* CDA (MtCDA) in complex with uridine (2.4 Å resolution) and deoxyuridine (1.9 Å resolution). Molecular dynamics (MD) simulation was performed to analyze the physically relevant motions involved in the protein–ligand recognition process, showing that structural flexibility of some protein regions are important to product binding. In addition, MD simulations allowed the analysis of the stability of tetrameric MtCDA structure. These findings open up the possibility to use MtCDA as a target in future studies aiming to the rational design of new inhibitor of MtCDA-catalyzed chemical reaction with potential anti-proliferative activity on cell growth of *M. tuberculosis*, the major causative agent of tuberculosis.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Cytidine deaminase (CDA¹, EC 3.5.4.5, systematic name: cytidine aminohydrolase), which is also known as cytidine nucleoside deaminase, catalyzes the hydrolytic deamination of cytidine or 2'-deoxycytidine to, respectively, uridine or 2'-deoxyuridine (Fig. 1) [1,2]. The *cdt*-encoded CDA plays an important role in the pyrimidine salvage pathway. The latter serves two different functions: (1) scavenge pyrimidine compounds for nucleotide synthesis, and (2) degradation of pyrimidine compounds leading to generation of compounds that serve as carbon and nitrogen sources [3]. In addition, CDA is found in the metabolism of a number of analogues of cytosine nucleoside used as antitumoral and antiviral agents, leading to their pharmacological inactivation [3].

Biochemical and structural studies of CDAs from different organisms have led to the understanding of the enzyme reaction mechanism. CDA contains an active site zinc ion that is essential

* Corresponding authors. Address: Av. Ipiranga 6681, TecnoPUC, Prédio 92A, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil. Fax: +55 51 33203629.

E-mail addresses: walter@azevedolab.net, wfdaj@uol.com.br (W.F. de Azevedo Jr), diogenes@pucrs.br (D.S. Santos).

¹ Abbreviations used: CDA, cytidine deaminase; URD, uridine; dURD, deoxyuridine; dCYT, deoxycytidine; PCA, principal component analysis; TB, tuberculosis; MTB, *Mycobacterium tuberculosis*.

for catalysis, which is coordinated to a nucleophilic water/hydroxide [4]. Different oligomeric states were observed among CDAs from diverse species. Two groups can be identified, the homodimeric CDAs, such as in *Escherichia coli* [5], and the homotetrameric CDAs, such as in *Saccharomyces cerevisiae* [6], human [2] *Bacillus subtilis* [7] and *Mycobacterium tuberculosis* [8].

The three-dimensional structure of *M. tuberculosis* CDA has been previously solved at 2.0 Å resolution and shown to be composed of four identical subunits, each monomer comprising a single domain with five β-strands and five α-helices [8]. Secondary structural elements are arranged in a three-layer core α–β–α domain with mixed β-sheet of five strands, the last two strands of this structure form a β-wing flexible region.

Sequence alignment of CDAs from different organisms has shown relationships among residues that mediate substrate binding and are conserved in all sequences, in agreement with results obtained from crystal structure determination. For instance MtCDA contained one zinc atom per subunit coordinated by three cysteines (Cys56, Cys89, and Cys92), one glutamate (Glu58) and a water molecule [8]. The same pattern was observed in *B. subtilis* CDA [9].

As the first step toward structural and functional MtCDA characterization, we have previously determined the crystal structure of tetrameric *M. tuberculosis* CDA in the absence of substrate/product ligands [8]. Here we describe two refined crystal structures of

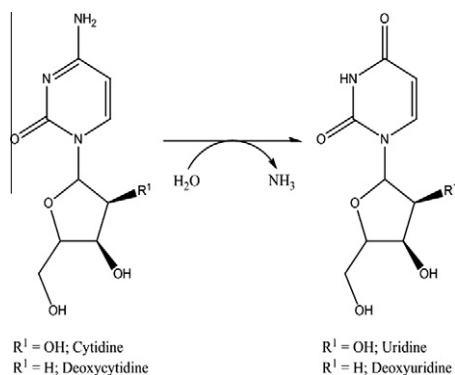


Fig. 1. Chemical reaction catalyzed by MtCDA.

MtCDA in complex with products. These data provide new structural information on the mechanism of active site closure upon ligand binding, and highlight the residues essential for catalysis. Furthermore, molecular dynamics (MD) simulation was performed to analyze the physically relevant molecular motions involved in protein–ligand binary complex formation.

Materials and methods

Crystallization and X-ray data collection

MtCDA was concentrated to 12 mg/mL in sample buffer (20 mM Tris–HCl pH 7.5). Crystals of MtCDA were obtained using the vapor-diffusion hanging-drop method at 298.15 K using 24-well tissue-culture plates. Hanging drops were prepared by mixing 2 μL protein solution and 2 μL reservoir solution and placed over 400 μL reservoir solution containing 0.1 M Hepes pH 7.5 and 4.3 M sodium chloride. The ligands uridine (URD) and deoxyuridine (dURD) were added by soaking method.

The crystals were flash frozen at 100 K and cryoprotected with 20% of glycerol. X-ray diffraction data were collected at wavelength 1.431 Å using Synchrotron Radiation Source (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas, SP, Brazil) and CCD detector (MARCCD) with an exposure time of 1.6 s per image at a crystal to detector distance of 140 mm. X-ray diffraction data were processed using MOSFLM and scaled using SCALA [10].

Structure resolution and refinement

The crystal structures of MtCDA:URD and MtCDA:dURD were solved by molecular replacement with AMoRe package using the atomic coordinates of the structure 3IJF [8] as the search model. All waters molecules were removed from the search model and one monomer was employed in the molecular replacement. For structural refinement, the models were refined using REFMAC5 [10] to give the final $R_{\text{factor}} = 0.223$ and $R_{\text{free}} = 0.2905$ to MtCDA: URD and $R_{\text{factor}} = 0.227$ and $R_{\text{free}} = 0.257$ to MtCDA:dURD. The MOLPROBITY web server [11] was used to generate the Ramachandran plots, and the percentage of residues in favored, allowed, and disallowed for MtCDA:URD are, 90.2%, 97.5%, and 2.5%, and for MtCDA:dURD are 96.7%, 97.5%, and 2.5%, respectively. All main chain angles, for all structures, are found in the most favorable or generally allowed regions.

Molecular dynamics simulation setup

All molecular dynamics (MD) simulations were carried out using the GROMACS 4.0.5 package [12] with the 53a6 GROMOS force field. We performed MD simulations for the enzyme in free

form (PDB access code: 3IJF), and with the products (URD and dURD – PDB access code: 3LQP and 3LQT, respectively), in order to investigate the plasticity of the active site, and the interactions between the protein–ligand complex, and water molecules during the MD simulation.

The MD simulations were carried out using particle mesh Ewald method [13] for the electrostatic interactions. The van der Waals and Coulomb cutoff were 14 Å, and 10 Å, respectively. The integration time step was 2.0 fs, with the neighbor list being updated every 10 steps by using the grid option and a cutoff distance of 12 Å. The simple point charge extended (SPC/E) [14] water model was used. Periodic boundary condition has been used with constant number of particles, pressure, and temperature (NPT) in the system. The V-rescale thermostat was applied using a coupling time of 0.1 ps to maintain the systems at a constant temperature of 298.15 K. The Berendsen barostat was used to maintain the systems at pressure of 1 bar, and values of the isothermal compressibility set to $4.5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$ for water simulations. The temperature of the systems were increased from 50 to 300 K in five steps (50–100 K, 100–150 K, 150–200 K, 200–250 K, and 250–300 K), and the velocities at each step were reassigned according to the Maxwell–Boltzmann distribution at that temperature and equilibrated for 10 ps, except the last part of thermalization phase, which was of 40 ps. The systems were subjected to a steepest descent followed by conjugated gradient energy minimizations until a tolerance of 1000 kJ/mol. MD simulation with position restraints was carried for a period of 20 ps in order to allow the accommodation of the water molecules in the system. Finally, 10 ns MD simulations were performed to all systems. The topologies files and other force field parameters except the charges of ligands were generated using the PRODRG program [15]. The partial atomic charges to the ligands were calculated using the Gaussian 03W package [16], which were submitted to single-point *ab initio* calculations at DFT/B3LYP/6-311G (2d, p) level in order to obtain ESP charges. In order to clarify the importance of the tetrameric structure of the MtCDA, MD simulations were carried out with the monomeric state, using the same protocol previously described.

Principal component analysis (PCA)

Essential dynamics (ED), also known as principal component analysis (PCA), is a method for identification of the main conformational changes, which often have importance in biological process, for a protein during an MD simulation.

In the ED analysis, a variance/covariance matrix was constructed from the trajectories after removal of the rotational and translational movements. Diagonalizing the matrix identified a set of eigenvectors and eigenvalues. The eigenvalues represented the amplitude of the eigenvectors along the multidimensional space, and the displacements of atoms along each eigenvector showed the concerted motions of protein along each direction. An assumption of ED analysis is that the correlated motions for the function of the protein are described by eigenvectors with large eigenvalues. The movements of protein in the essential subspace were identified by projecting the Cartesian trajectory coordinates along the most important eigenvectors from the analysis [17].

Results and discussion

Quaternary structure description

The final models (URD, dURD) were refined to, respectively, 2.4 and 1.9 Å resolution. The active site electron densities for complexes MtCDA:URD and MtCDA:dURD are presented in Fig. 2. Data collection and refinement statistics for all structures are given in

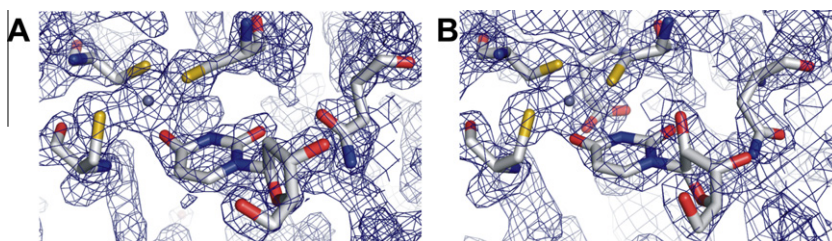


Fig. 2. Active site electron densities ($2F_{obs} - F_{calc}$) map for complexes MtCDA:dURD (A) and MtCDA:URD (B). The URD, dURD, and the residues are presented as sticks.

Table 1

Data collection and refinement statistics. Values in parentheses refer to the highest resolution shell.

Data collection and refinement statistics ^a	MtCDA:URD	MtCDA:dURD
X-ray wavelength (Å)	1.427	1.427
Temperature (K)	100	100
Resolution range (Å)	39.16 (2.40)	37.216 (1.90)
Space group	C222	C222
Matthews coefficient (Å ³ Da ⁻¹)	2.60	2.63
<i>Unit-cell parameters</i>		
<i>a</i> (Å)	65.92	65.41
<i>b</i> (Å)	78.33	77.59
<i>c</i> (Å)	56.73	55.68
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90.00	90.00
Highest resolution shell (Å)	2.40	1.90
Data completeness (%)	99.90	92.9
R_{merge} (%) ^a	7.3	7.7
Resolution range used in refinement (Å)	28.41–2.40	28.20–1.90
R_{factor} (%) ^b	22.33	22.70
R_{free} (%) ^c	29.05	25.70
<i>Observed RMSD from the ideal geometry</i>		
Bond lengths (Å)	0.041	0.023
Bond angles (°)	3.548	2.435
<i>B</i> values (Å) ² ^d	24.065	25.524
Residues in most favored regions of the Ramachandran plot (%)	90.2	97
Residues in additionally allowed regions of the Ramachandran plot (%)	7.3	2
Residues in generously allowed regions of the Ramachandran plot (%)	2.5	1
Residues in disallowed regions of the Ramachandran plot (%)	0	0
Number of ligands	1	1
Number of water molecules	93	50

^a $R_{merge} = \sum_i \sum_j |I(h)_i - I(h)_j| / \sum_i \sum_j I(h)_i$, where $I(h)$ is the intensity of reflection h , \sum_i is the sum over all reflections and \sum_j is the sum over i measurements.

^b $R_{factor} = 100 \times \sum |F_{obs} - F_{calc}| / \sum F_{obs}$, the sums being taken over all reflections with $F/\sigma(F) > 2$ cutoff.

^c $R_{free} = R_{factor}$ for 10% of the data, which were not included during crystallographic refinement.

^d *B* values = average *B* values for all non-hydrogen atoms.

* Values in parenthesis refer to the highest resolution shell.

Table 1. The MtCDA monomer in complex with the products, follow the same arrangement α - β - α with a mixed β -sheet of five strands. These structures were crystallized in the space group C222. Examining the differences between MtCDA in free form and MtCDA complexed with products was observed that there are no major differences. The only changes are restricted to amino-acid side chains, which compose the active site. The RMSD value between apo structure and URD complex is 0.4 Å, and between apo structure and dURD complex is 0.2 Å. Analysis of the interfaces reveals intermolecular contacts involving residues Tyr21–Glu98, Tyr24–Glu98, and Gln94–Asn48 of the adjacent subunits (A–C and B–D) (Fig. 3). In addition, analysis based on the web server PDBE PISA (Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies) [18], reveals 23 hydrophobic interactions, and eight intermolecular hydro-

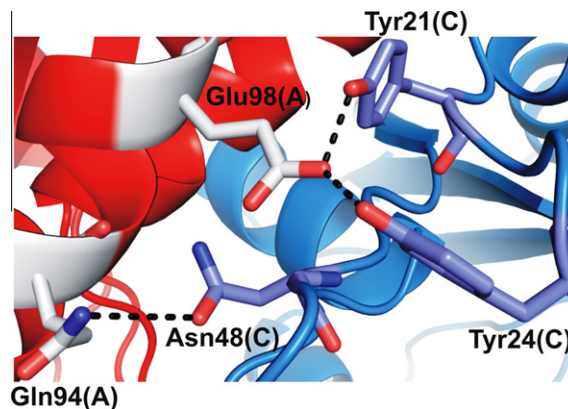


Fig. 3. Interface of the subunits A and C, showing the interactions between Glu98(A) with Tyr21(C), Tyr24(C), and Gln94(A) with Asn48(C). The protein is presented as cartoon and the residues as sticks.

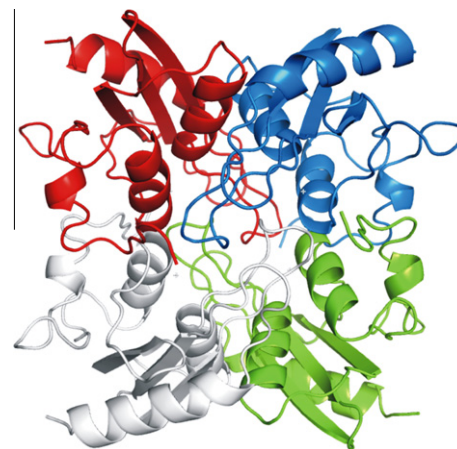


Fig. 4. Schematic drawing of tetrameric MtCDA. The protein is presented as cartoon and each monomer (A-red, B-blue, C-light grey, and D-green) is presented in different colors. This figure was generated using Chimera program [25]. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

gen bonds between the adjacent subunits, and brought to light what seems to be a stable MtCDA quaternary structure (Fig. 4). Analyzing the contact areas between subunits of MtCDA:URD and MtCDA:dURD complexes, we suggest that the monomers can interact in three different ways. These different forms can be exemplified by the monomers A:B, A:C, and B:C, which are presented in the Fig. 5. Examining the interactions between A:B it was observed six hydrogen bonds and 17 hydrophobic contacts involving 23 residues, and the total area was 757.1 Å². The total area for A:C was 1128.4 Å², in addition 14 hydrogen bonds and

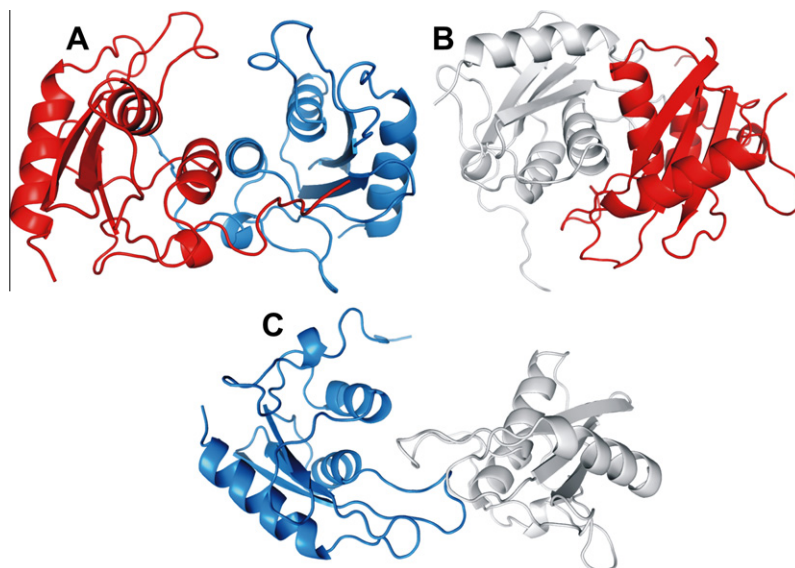


Fig. 5. The three interfaces contacts area, which are found to MtCDA:URD and MtCDA:dURD complexes. (A) Present A (red):B (blue); (B) A:C (light grey); and (C) B–C interfaces. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

17 hydrophobic contacts involving 31 residues were observed. Finally, the region between B:C presents a total area of 412.1 Å², which is composed by two hydrogen bonds and 10 hydrophobic contacts. Furthermore, in order to verify if these conformations are in agreement with CDA of different organism previously published, we analyzed other 13 CDA structures (PDB access codes: 3IJF, 3MPZ, 1MQ0, 3DMO, 1UX1, 2D30, 1UX0, 1UWZ, 1JTK, 2FR5, 1ZAB, 2FR6, and 3B8F) [19,20], which revealed the same packing presented by MtCDA.

Characterization of the product-binding pocket

The hydrogen bonding networks in the active site were determined from interactions between MtCDA and URD (MtCDA:URD) and dURD (MtCDA:dURD) products. Analysis of hydrogen bonds between URD and MtCDA reveals seven hydrogen bonds: six hydrogen bonds between the pyrimidine moiety and Cys89 (2.9 and 3.1 Å), Glu58 (3.4 and 3.2 Å), Cys92 (3.2 Å) and Ala57 (3.3 Å) residues, and one between the ribose moiety and Asn45 (3.2 Å) residue (Fig. 6). Additionally the complexes show two non-ligand residues, Phe27 and Cys56 which could be important in stabilizing hydrophobic interactions between the ligand and the enzyme and thereby facilitate the catalytic process, as reported for human CDA [21]. All of these interactions are located in the subunit A.

In contrast, some differences were found in the active site between MtCDA:dURD binary complex and apo MtCDA, which involve subunits A and D. This complex reveals seven hydrogen bonds, three with pyrimidine Cys89 (2.9 Å), Glu58 (2.9 Å), Ala57 (3.3 Å) and four with ribose involving residue Asn45 (2.7 Å), Glu47 (2.8 Å), Tyr51(D) (3.1 Å), and Val49(D) (2.9 Å).

Three cysteine residues (Cys56, Cys89, and Cys92) are involved in zinc metal binding. However, only Cys56 is involved in hydrophobic contacts, as previously mentioned. The properties of the Cys56 (Cys65 human CDA numbering) suggested it is required for the enzymatic activity but not for the maintenance of zinc in the active site, whereas Cys65 (human CDA) plays a role in placing the zinc ion in the correct position and orientation within the active site [22]. Table S1 summarizes the interaction between MtCDA:URD and dURD. Analyzing the three main regions, which are described to all tetrameric CDAs, we observed some differences that could be a guide to future rational drug design studies aiming

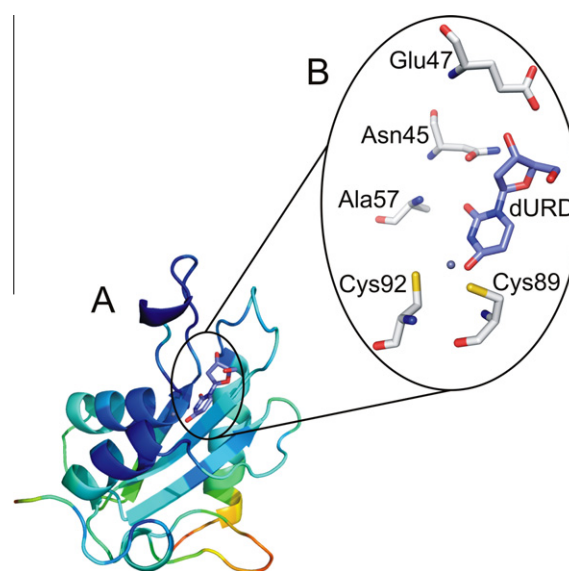


Fig. 6. Classical binding site of the MtCDA:dURD anchored by the residues Asn45, Glu47, Ala57, Cys89, and Cys92, which are important residues of the binding pocket. The protein is presented as cartoon and the binding site residues as sticks.

to find selective inhibitors to MtCDA. In the first region, close to the active site, which comprises ₃₂PYSHF₃₆ (human CDA) and ₂₃PYSRF₂₇ (MtCDA), the replacement of a histidine by an arginine does not imply physical chemistry changes. However, considering torsion angles, arginine presents increased entropy, which could influence ligand recognition. It should be pointed that Tyr33, already characterized as a pivotal residue involved in the quaternary structure organization in human CDA [23], is conserved in both sequences, and could be playing the same role in MtCDA. The second region comprises the residues ₅₇NACYP₆₁ (human CDA) and ₄₈NVSYG₅₂ (MtCDA). Three replacements are observed in this sequence. The first, an alanine residue was changed by a valine did not imply major structural difference, although valine presents one more torsion angle when compared to alanine. The replacement of a cysteine by a serine, involves of a thiol (Cys) and hydroxyl groups (Ser). However, both residues can participate

in hydrogen bonding. The last change in this sequence is the presence of a proline in human CDA and a glycine in MtCDA. Finally, the last analyzed region, conserved in all T-CDAs, comprises the residues $_{65}\text{CAERTA}_{70}$ in human CDA and $_{56}\text{CAECAV}_{61}$ in MtCDA. We observed that Arg68, described as an important residue in the catalytic event in the human CDA [24], compensating the negative

charges of the cysteines, corresponds to a cysteine in MtCDA. Nevertheless, analyzing the MtCDA structure, it could be suggested that the residue responsible for counterbalancing the charges of the cysteines is Arg91, which is not conserved in the human CDA, where it corresponds to Ala101. Taking these differences in consideration, MtCDA presents peculiarities close to the active site, when compared to human CDA, which could be involved in the ligand recognition process and can provide some clues to rational drug design initiatives.

Dynamics simulation and essential dynamics

In order to understand the stability of the MtCDA in solution during the simulation, the C- α root mean square deviation (RMSD) was calculated (Fig. 7). The MtCDA in the apo form and in complex with either URD or dURD achieved a plateau within 2500 and 2000 ps, respectively, suggesting that ~ 10 ns is sufficient for stabilizing fully relaxed models. As shown in Fig. 7, the RMSD values in the MtCDA:URD and dURD remain less 3.0 Å, whereas in the apo form was less than 5.0 Å. These results suggest that the MtCDA when in complex with products presents a more stable system than the structure in absence of these ligands in the binding pocket. To analyze the physically relevant motions of the simulations, the principal components (PC) were calculated by diagonalizing the covariance matrix generated from timescale

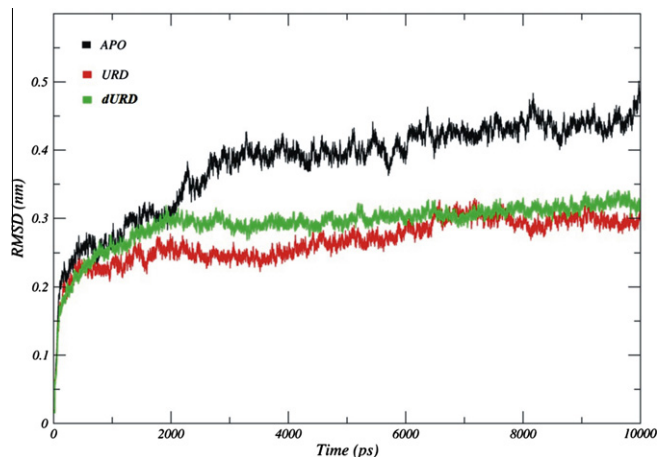


Fig. 7. Graphical representation of RMSD of each MtCDA structure from starting structure of tetramers as a function of time, over 10 ns of simulation.

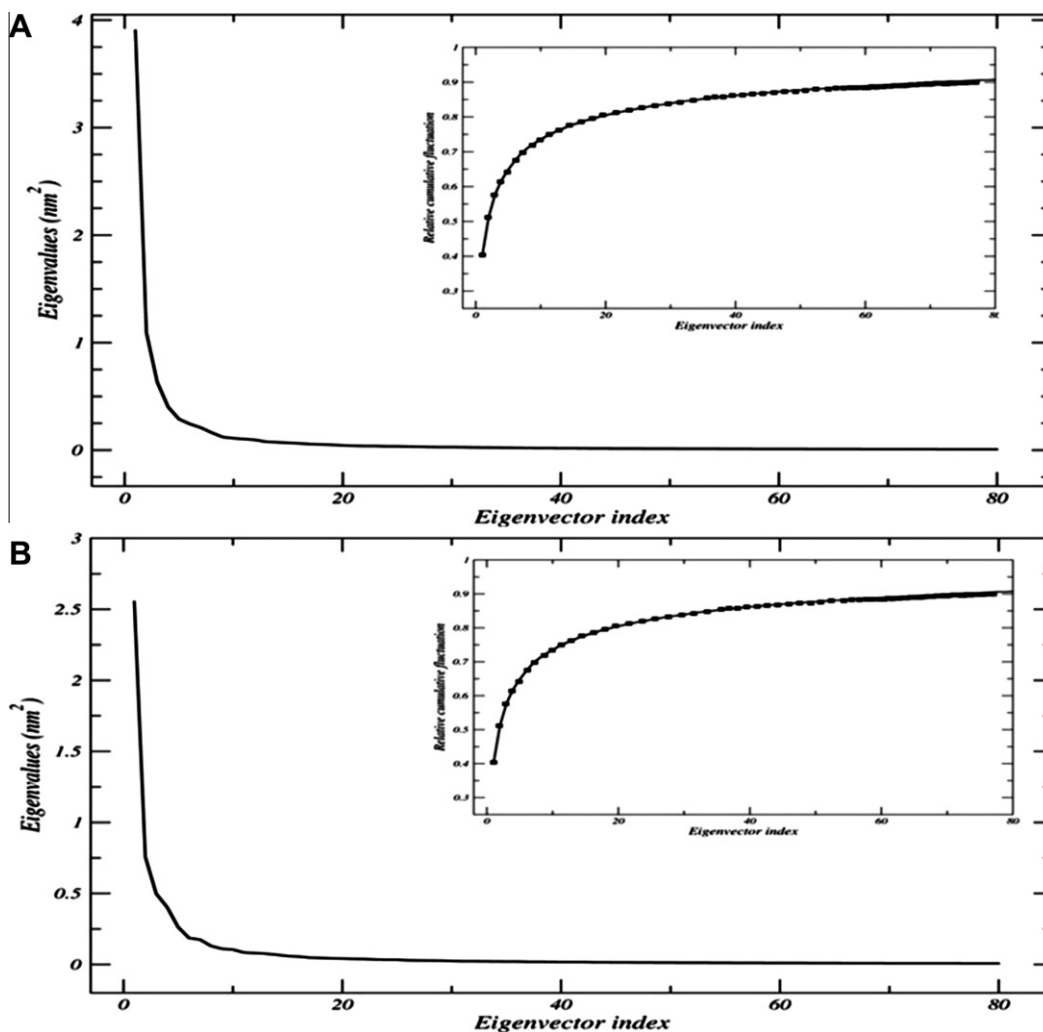


Fig. 8. Eigenvalues of the covariance matrix resulting from the simulations of the MtCDA:dURD (A) and MtCDA:URD (B) complexes.

(10 ns) explicit solvent MD simulation. The anharmonic and large-scale motions of the protein are isolated from the mostly harmonic and small-scale motion. Knowing that the large-scale anharmonic motions in the essential subspace are often correlated to the pivotal functions of the protein, we have only focused on these movements. The analysis of the first 50 eigenvectors describes 87.71% (dURD) and 85.33% (URD) of the fluctuations during the simulation, and the first eigenvector of each simulation correspond of ~40% of the total of 1488 eigenvectors (Fig. 8).

Flexibility of the product-binding pocket

In this section, we analyzed the main fluctuations of the MtCDA in complex with its products in comparison with the structure in apo form. Fig. 9 presents the most relevant fluctuations, obtained from the first eigenvector, of the monomer A during the simulation. Based on these results, it could be highlighted three principal regions that will be denominated R1, R2, and R3. The R1 region, that comprises residues Val22–Phe27, is located in the monomer interface, being crucial for the stabilization of the quaternary structure. Furthermore, it was observed the approximation of Tyr24 to Glu98 of the adjacent subunit, corroborating with the analysis previously published [9]. As an understanding of product binding to, and release from, the enzyme active site is pivotal to elucidate the MtCDA mode of action, the R2 region was analyzed. R2 comprises residues Thr42–Cys56. Analyzing the active site of the monomer A, one can observe three main interactions, made by Asn45, Glu47, and Cys56 contributing for the stability of the ligands into the binding cavity. In addition, it was also observed that Val49 and Tyr51 belong to the binding site of the monomer D. The R3 region is composed by Val110–Phe123 and is located close to the adjacent binding site (A–B and C–D). In this region we also detect π - π stacking interactions involving the pyrimidine moiety of the products and Phe123, contributing to ligand binding.

Tetramer vs monomer: the ligand stability based on dihedral analysis

In order to access the importance of the quaternary structure to the ligand stability into the binding pocket, we carried out MD simulations with the MtCDA in monomeric form. To analyze the stability of ligand in these two scenarios (tetramer and monomer) we monitored dihedral angle of the products (C6:N1:C1*:O4*) and the electrostatic interaction (*Coulomb – Short Range*) between protein–ligand complexes for the period of the simulation. Fig. S1 presents the dihedral angle that was evaluated, and Figs. S2 (URD) and S3 (dURD) show the dihedral angle and energy interaction during the simulations. The total number of transitions, considering the dihedral angle, was 97 for the monomeric structure (URD and dURD), 11 for tetramer complexed with URD and 39 when associated with dURD. In addition, the transitions of the dihedral angle in the tetramer have a direct influence in the electrostatic interactions, suggesting that, for a proper stabilization of the ligand into the binding site, the quaternary structure is required. When the average of the electrostatic interactions in the tetrameric and monomeric structures in complex with the products were compared, it was clear that the structure that enabled the most stable form of the ligand was the tetramer. Table S2 summarizes these findings.

The dynamics motions of the ligands (URD and dURD) were analyzed via characterization of the phase space behavior. Fig. 10 present the trajectory of the first two principal components (PC1 and PC2), taking into account the motions of the ligands in the phase space. As shown in Fig. 10A and B, we can identify three clusters of stable states for the ligands when in complex with monomeric structures. In contrast, Fig. 10C and D present only one cluster, defining only one stable state for the ligands. These results could be related with the stability of the ligand in the binding site, and justify the use of the quaternary structure for future studies of potential inhibitors to MtCDA. Furthermore, as described above, these results corroborate the importance of the adjacent subunits

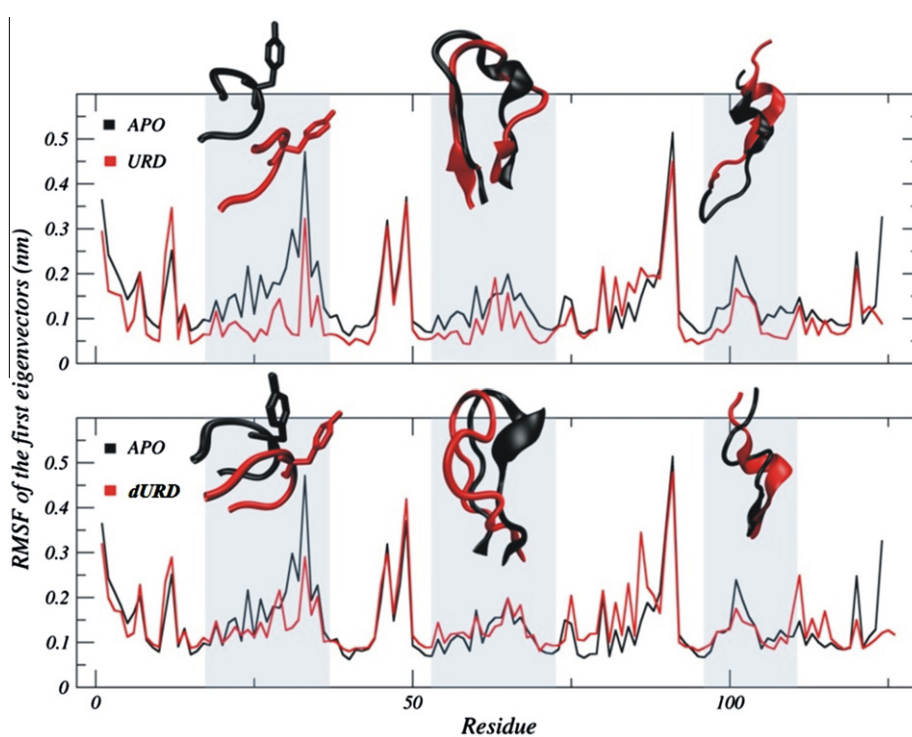


Fig. 9. Displacement of the components of the first eigenvectors for tetrameric structures of unbound MtCDA, MtCDA:URD and MtCDA:dURD complexes. The main fluctuations are presented for the regions R1 (Val22–Phe27), R2 (Thr42–Cys56) and R3 (Val110–Phe123). The main residues, which composed the regions described above, are presented as cartoon in order to facilitate the interpretation.

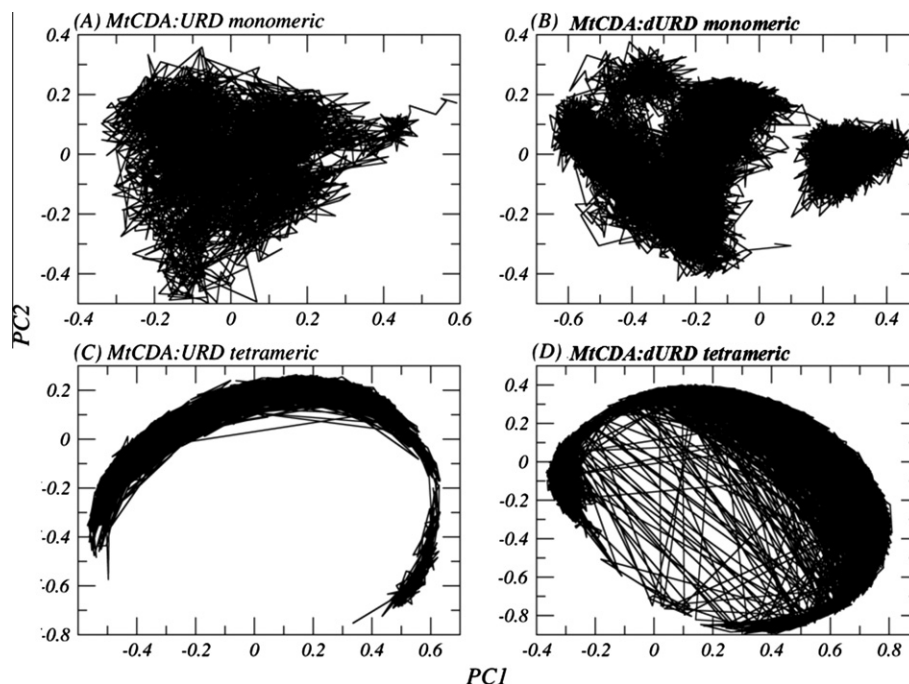


Fig. 10. Dynamics motions of the ligands (URD and dURD) were analyzed via characterization of the phase space behavior when in complex with either a tetrameric or a monomeric structure. (A and B) Trajectory of the first two principal components to URD and dURD, respectively, when associated with MtCDA monomeric form; (C and D) trajectory of the first two principal components to URD and dURD, respectively, when associated with MtCDA tetrameric form.

residues Val49 (monomer D), Tyr51 (monomer D), and Phe123 (monomer B) for stability of the ligand into the binding pocket, since in absence of these residues, the MtCDA reaction product does not remain in the active site during MD simulations.

Conclusions

The present study provided, for the first time, structural insight into the product binding patterns for MtCDA, elucidating the main residues involved in proper binding of products. In addition, our results highlight that the MtCDA quaternary structure follows the same packaging, which is observed in others CDAs from different organisms. Analysis of the active site revealed that the Asn45, Glu47, Ala57, Cys89, and Cys92 amino acid residues are pivotal to product recognition by MtCDA. The MD simulations corroborated with the proposed packing, showing that residues Tyr51, Val49, and Phe123 present an important role in the active site of the adjacent subunits (A–D and B–C). Simulations of the tetrameric and monomeric MtCDA structures suggest that the oligomeric state is essential for stabilization of the ligand into the enzyme-binding site, lending support to the importance of protein–protein interactions. In summary, these findings open-up the possibility to use MtCDA as a target in future studies aiming to the rational design of new inhibitor of MtCDA-catalyzed chemical reaction with potential anti-proliferative activity on cell growth of *M. tuberculosis*, the major causative agent of tuberculosis.

Deposit

The atomic coordinates have been deposited in the PDB (complexes MtCDA:URD and MtCDA:dURD – PDB access codes: 3LQP and 3LQT, respectively).

Acknowledgments

This work was supported by National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-

CAPES). D.S.S. (304051/1975-06), L.A.B. (520182/99-5), and W.F.A. Jr. (300851/98-7) are research career awardees of the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq). R.A.C. acknowledge a scholarship awarded by CNPq. L.F.S.M.T. and Z.A.S.Q. acknowledges a scholarship awarded by CAPES.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.abb.2011.01.022.

References

- [1] R. Cohen, R. Wolfenden, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 7561–7565.
- [2] D.F. Wentworth, R. Wolfenden, *Methods Enzymol.* 51 (1978) 401–407.
- [3] A. Somasekaram, A. Jarmuz, A. How, J. Scott, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 28405–28412.
- [4] S.J. Chung, C. Fomme, G. Verdine, *J. Med. Chem.* 48 (2005) 658–660.
- [5] E. Johansson, N. Mejlhede, S. Larsen, *Biochemistry* 41 (2002) 2563–2570.
- [6] P. Itapa, G. Cercignani, E. Balestreri, *Biochemistry* 9 (1970) 3390–3395.
- [7] L. Betts, S. Xiang, S.A. Short, R. Wolfenden, C.W. Carter, *J. Mol. Biol.* 235 (1994) 635–656.
- [8] Z.A. Sánchez-Quitian, C.Z. Schneider, R.G. Ducati, W.F. de Azevedo Jr., C. Bloch, L.A. Basso, D.S. Santos, *J. Struct. Biol.* 169 (2010) 413–423.
- [9] D. Carlow, C. Carter, N. Mejlhede, R. Wolfenden, *Biochemistry* 38 (1999) 12258–12265.
- [10] CCP4, Collaborative Computational Project Number 4, *Acta Cryst. D.* 50 (1994) 760–763.
- [11] I.W. Davis, L.W. Murray, J.S. Richardson, D.C. Richardson, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) W615–W619.
- [12] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, H.J.C. Berendsen, *J. Comput. Chem.* 26 (2005) 1701–1718.
- [13] T. Darden, D. York, L. Pedersen, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 10089–10092.
- [14] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. van Gunsteren, J. Hermans, *Interaction models for water in relation to protein hydration*, in: B. Pullman (Ed.), *Intermolecular Forces*, D. Reidel Publishing Company, Netherlands, 1981.
- [15] D.M.F. van Aalten, B. Bywater, J.B.C. Findlay, M. Hendlich, R.W.W. Hooft, G.J. Vriend, *J. Comput. Aided Mol. Des.* 10 (1996) 255–262.
- [16] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.J. Zakrzewski, J.A. Montgomery, R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Dapprich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K.

- Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.B. Ortiz, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, C. Gonzalez, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B.G. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, M. Head-Gordon, E.S. Replogle, J.A. Pople, Gaussian 03, Gaussian, Wallingford, CT, 2003.
- [17] A. Amadei, A.B.M. Linszen, H.J.C. Berendsen, *Proteins* 17 (1993) 412–425.
- [18] E. Krissinel, K. Henrick, *J. Mol. Biol.* 372 (2007) 774–797.
- [19] E. Johansson, J. Neuhard, M. Willemoes, S. Larsen, *Biochemistry* 43 (2004) 6020–6029.
- [20] A.-H. The, M. Kimura, M. Yamamoto, N. Tanaka, I. Yamaguchi, T. Kumasaka, *Biochemistry* 45 (2006) 7825–7833.
- [21] S. Vincenzetti, G. De Sanctis, S. Costanzi, G. Cristalli, P. Mariani, G. Mei, J. Neuhard, P. Natalini, V. Polzonetti, A. Vita, *Protein Eng.* 16 (2003) 1055–1061.
- [22] A. Cambi, S. Vincenzetti, J. Neuhard, S. Costanzi, P. Natalini, A. Vita, *Protein Eng.* 11 (1998) 59–63.
- [23] D. Micozzi, S. Pucciarelli, F.M. Carpi, S. Costanzi, G. De Sanctis, V. Polzonetti, P. Natalini, I.F. Santarelli, A. Vita, S. Vincenzetti, *Int. J. Biol. Macromol.* 47 (2010) 471–482.
- [24] S. Vincenzetti, B. Quadrini, P. Mariani, G. De Sanctis, N. Cammertoni, V. Polzonetti, S. Pucciarelli, P. Natalini, A. Vita, *Proteins* 70 (2008) 144–156.
- [25] E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin, *J. Comput. Chem.* 25 (2004) 1605–1612.

CAPÍTULO 3

Functional and structural evidence for the catalytic role played by glutamate-47 residue in the mode of action of *Mycobacterium tuberculosis* cytidine deaminase.

Zilpa Adriana Sánchez-Quitian, Valnês Rodrigues-Junior, Jacqueline Gonçalves Rehm, Rafael A. Caceres, Paula Eichler, Cristiano Valim Bizarro, Walter F. de Azevedo Jr, Osmar Norberto de Souza, Luiz Augusto Basso and Diógenes Santiago Santos.

Artigo submetido para a revista *Archives of Biochemistry and Biophysics*

Functional and structural evidence for the catalytic role played by glutamate-47 residue in the mode of action of *Mycobacterium tuberculosis* cytidine deaminase.

Zilpa Adriana Sánchez-Quitian^{a,b}, Valnês Rodrigues-Junior^{a,b,c}, Jacqueline Gonçalves Rehm^a, Rafael A. Caceres^{d,e}, Paula Eichler^a, Cristiano Valim Bizarro^{a,b}, Walter F. de Azevedo Jr.^{b,f}, Osmar Norberto de Souza^{b,d}, Luiz Augusto Basso^{a,b,c,*} and Diógenes Santiago Santos^{a,b,*}

^aCentro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 6681/92A. Av. Ipiranga, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

^dLaboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas (LABIO), Faculdade de Informática, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

^eUniversidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre, RS, Brasil

^fLaboratório de Bioquímica Estrutural (LaBioQuest), Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

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

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

Running title: Site-directed mutagenesis of *Mycobacterium tuberculosis* cytidine deaminase.

ABSTRACT

Strategies to combat tuberculosis (TB) are needed to kill drug-resistant strains and be effective against latent *Mycobacterium tuberculosis*, the causative agent of TB. Cytidine deaminase (CDA) catalyzes the hydrolytic deamination of cytidine to uridine, and belongs to the pyrimidine salvage pathway. The CDA from *M. tuberculosis* (*MtCDA*) is a target for the development of drugs against TB because it may be involved in latency mechanisms. The role of the conserved glutamate-47 (E47) residue was evaluated by construction of five mutant proteins (E47A, E47D, E47L, E47H, and E47Q). Mutants E47A and E47H were expressed in insoluble fraction, whereas E47D, E47L and E47Q were soluble and purified. The E47D, E47L and E47Q mutants contained 1 mol of Zn^{2+} per mol of protein subunit. These mutations had no effect on oligomerization state of *MtCDA*. Steady-state kinetic results showed that K_M values for the E47D and E47Q mutants were not significantly altered, whereas there was a decrease in k_{cat} values of 37-fold for E47D and 19-fold for E47Q mutant. No activity could be detected for E47L mutant. The crystal structure of the E47D mutant was solved. A catalytic role was proposed for the γ -carboxyl group of E47, and its involvement in proton shuttling suggested.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; cytidine deaminase; site-directed mutagenesis; enzyme kinetics; crystallography; catalytic mechanism.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB¹) continues to be a leading cause of death in the world due to a single infectious pathogen. It is estimated that one third of the entire human population is latently TB infected (LTBI). People with LTBI do not have symptoms of TB and are not infecting, but they are at risk of developing active disease and becoming an infecting person. For both latent and active TB new drugs are urgently required to shorten the duration of therapy, eradicate multiple drug-resistant strains, and target latent, nonreplicating bacilli [1,2].

Current antitubercular drugs have reduced or no effect against nonreplicating bacilli [3]. This reduced effect may reflect the decreased activity of the various target enzymes under *in vivo* or nonreplicating conditions. Pyrimidine bases and nucleotides serve as nitrogen and carbon sources and are major energy carriers involved in nucleotide synthesis. There are two main routes for the synthesis of nucleotides: *de novo* and salvage pathways. The pathway for *de novo* synthesis of pyrimidine nucleotides leads to formation of uridine monophosphate (UMP) from simple precursors (ATP, HCO₃⁻, H₂O, glutamine). On the other hand, the pyrimidine salvage pathway reutilize nucleosides and pyrimidine bases derived from preformed nucleotides being preferentially utilized by bacteria under restricted energy availability, because it demands less energy than the *de novo* biosynthesis [4,5]. Some metabolic pathways are presumed to be important for maintenance of viability under nonreplicating conditions [6]. Accordingly, the pyrimidine salvage pathway enzymes are interesting targets due to

¹ *Abbreviations used:* A, upstream forward flanking primer; B, reverse mutagenic primer; BSA, bovine serum albumin; C, forward mutagenic primer; CDA, cytidine deaminase; D, downstream forward flanking primer; D-CDA, homodimeric form of cytidine deaminase; dCMP, deoxycytidilate monophosphate deaminase; DMSO, dimethyl sulphoxide; DNA, deoxyribonucleic acid; dNTPs, deoxynucleotides triphosphates; GuaD, guanine deaminase; HPLC, high performance liquid chromatography; ICP-OES, Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy; IF, insoluble fraction; LB, Luria-Bertani; LTBI, latently TB infected; MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; MtCDA, *cdd*-encoding cytidine deaminase from *M. tuberculosis*; N-PAGE, native-PAGE; OE-PCR, overlap extension-PCR; PCR, polymerase chain reaction; pI, isoelectric point; SDS-PAGE, dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SF, soluble fraction; TB, terrific broth; TB, tuberculosis; T-CDA, homotetrameric form of cytidine deaminase; UMP, uridine monophosphate; wtCDA, wild type cytidine deaminase.

low energy demand to synthesize nucleotides. Since deamination is an important step in the pyrimidine salvage pathways, the deamination enzymes play a key role in the pyrimidine metabolism. Cytidine deaminase enzyme (CDA, cytidine/2'-deoxycytidine aminohydrolase; EC 3.5.4.5) catalyzes the deamination of cytidine/2'-deoxycytidine to form uridine/2'-deoxyuridine [7].

The proposed mechanism of catalysis for *Escherichia coli* CDA includes a zinc atom in the active site that activates a water molecule to form a hydroxide ion and H^+ by heterolytic bond cleavage [8,9]. The proton and the hydroxyl anion add to, respectively, the N3 and the C4 atoms of the N3=C4 double bond of cytidine to form a tetrahedral intermediate in the first step. In the second step, uridine is produced with the release of ammonia [8,9]. Hydrogen bonding plays an important role in transition state stabilization for *E. coli* CDA, and the carboxymethyl group of Glu104 appears to minimize the activation barrier for deamination, not only by stabilizing the altered substrate in the transition state but also by destabilizing the enzyme-substrate and enzyme-product complexes [10,11,12]

The cytidine deaminase superfamily includes enzymes that act on the *in situ* deamination of bases in both RNA and DNA, which are involved in gene diversity and in anti-virus defense, and enzymes that catalyze reactions of free nucleotides or bases such as cytidine deaminases (CDD/CDA), deoxycytidylate monophosphate deaminases (dCMP), and guanine deaminase (GuaD). These enzymes are primarily involved in the salvage of pyrimidines and purines, or in their catabolism in bacteria, eukaryotes and phages [13,14]. The mononucleotide family includes a homodimeric form (D-CDA) of cytidine deaminase, such as *E. coli* and *Arabidopsis thaliana* [15,16] and a related, homotetrameric form (T-CDA) with a much smaller subunit which is found in most mammals, such as human, and bacteria such as *Bacillus subtilis* and *Mycobacterium tuberculosis* [17,18,19]. D-CDA consists of two symmetrical subunits, each monomer containing three domains: a small N-terminal domain, a catalytic domain containing a zinc atom, and a C-terminal domain, that contains a cavity described as “broken active site” [9]. T-CDA consists of four identical monomers with one active site per monomer. Each monomer has a molecular weight of 14.9 kDa for human CDA and *B. subtilis*, and 13.9 kDa for *M. tuberculosis* CDA (*MtCDA*), and is structurally similar to the catalytic domain of the *E. coli* D-CDA [9]. D-CDA and T-CDA have a zinc atom in the active site [8].

The homotetrameric *MtCDA* is composed of four identical subunits of 13.9 kDa with one active site per subunit [19]. Each monomer has five β -strands and five α -helices. Secondary structural elements are arranged in a three-layer core α - β - α domain with mixed β -sheet of five strands, the last two strands of this structure form a β -wing flexible region. Structural studies of *MtCDA* complexed with products (uridine and deoxyuridine) show three principal regions related to product binding pocket [20]. The first region is located in the monomer interface and is related to the stabilization of the quaternary structure; this region comprises residues V22–F27. The second region comprises residues T42–C56 and contributes to stability of the ligands into the binding cavity. The third region is located adjacent to the binding site and is comprised by V110–F123, contributing to ligand binding [20]. These residues have been characterized as conserved regions in CDAs from different organisms. For example, the human CDA region involved with substrate-binding contains the residues $_{32}\text{PYSHF}_{36}$, and $_{56}\text{ENACYP}_{61}$, similar to those described for *B. subtilis* CDA ($_{20}\text{PYSKF}_{27}$, $_{44}\text{ENAAYS}_{49}$) and for *MtCDA* ($_{23}\text{PYSRF}_{27}$, $_{47}\text{ENVSYG}_{52}$) [18,19,21]. For interaction subunits, $_{65}\text{CAERTA}_{70}$, is region described for human CDA, and *B.subtilis* CDA ($_{53}\text{CAERTA}_{58}$), and $_{56}\text{CAECAV}_{61}$ for *MtCDA* [18,19,21].

In previous pH-rate profile studies of *MtCDA*, it was demonstrated decreased activity upon protonation of a single ionizable group with an apparent $\text{p}K_a$ value of 4.7 [19], which is consistent with the $\text{p}K_a$ value for the γ -carboxyl of glutamate or β -carboxyl of aspartate in CDA. The glutamic acid residues (E47 and E58) have been shown to be conserved in D-CDAs and T-CDAs and were implicated in substrate binding [15].

The goal of this study was to evaluate the role, if any, of glutamate 47 (E47) residue of *MtCDA* in substrate binding and/or catalysis, protein oligomerization and coordination of zinc atom. In order to test these predictions, we employed site-directed mutagenesis methodology to produce five mutants for the same residue. Characterization of these mutants, together with information obtained from kinetics and crystallographic studies, allowed us to determine the role of E47 and obtain details of the catalytic mechanism for *MtCDA* enzyme.

MATERIALS AND METHODS

Residue selection and primer design

pH Rate profile studies and multiple sequence alignment suggested that the conserved amino acid Glutamate in the position 47 (E47) from *MtCDA* is involved in catalysis and/or substrate binding [19]. Site-directed mutagenesis was thus carried out, and E47 was replaced with either alanine (E47A), aspartate (E47D), histidine (E47H), leucine (E47L), and glutamine (E47Q).

Primers were designed with the aid of Primer3Plus and were based on the *CDA M. tuberculosis* H37Rv genome sequence. The mutagenesis procedure required four oligonucleotides: two flanking primers, which were positioned upstream (A) and downstream (D) of the mutation site; and two mutagenic primers, Forward mutagenic (C) and, Reverse mutagenic (B) with at least a 15 bp overlap between adjacent fragments. The mutation site was located in the middle of the mutagenic primers. Forward and reverse flanking primers containing restriction sites for *NdeI* (CATATG) and *HindIII* (AAGCTT) for cloning into PCR-Blunt vector and subcloning into pET23a (+) expression vector were also designed. Primers used in the polymerase chain reaction (PCR) are given in Table 1.

Site-directed mutagenesis method

Site-directed mutagenesis was carried out using a two-step PCR procedure to replace the GAA codon using an overlap extension-PCR method (OE-PCR) (Fig. 1) [22]. In short, in the first step; two simultaneous PCR reactions were performed. One reaction was performed with a primer pair that included the A primer and the B primer; the other reaction contained the D primer and the C primer. The PCR reaction were carried out using 50 ng of *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA, 0.2mM dNTPs, 10pmol of each primer, 2.5 U of PFU DNA polymerase and 1x reaction buffer in a 50 μ L reaction volume. For amplifications, an MJ Research PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) was used with the following parameters: 5 min at 98 °C followed by 30 cycles of 45 s at 95 °C, 45 s at 60 °C and 45 s at 72 °C and a final extension of 10 min at 72 °C. PCR products were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and gel band was purified using the QIAquick Gel Extraction kit according to the manufacturer's instruction (QIAGEN). The second PCR was performed to obtain full-length mutated fragments; the two products were mixed and used as templates, with the A and D

primers. The reaction was performed using the same conditions as the first round of PCR amplification. This overlap extension-PCR yielded a full-length DNA fragment, which was gel purified before cloning.

Cloning and sequencing of mutated genes

The full-length mutated PCR product was ligated into the pCR-Blunt cloning vector and subcloned into the pET-23a (+) expression vector (Novagen) using T4 DNA ligase. *E. coli* DH10B (Novagen) electro-competent cell were transformed and recombinant clones were identified by digestion with *Nde*I and *Hind*III. The sequences of the mutants of *cdd* gene were verified to both confirm the insertion of the desired mutation and to ensure that no unwanted mutations were introduced by the PCR steps, using the ABI-Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Expression of recombinant proteins

After confirming the presence of the mutated codon in the five substitutions (E47A, E47D, E47H, E47L and E47Q), the recombinant plasmids were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) competent cells, following the protocol previously reported for wild type *MtCDA* [19]. Since the E47L mutant enzyme was a partially soluble protein it was necessary to use chemical chaperones to increase the solubility of this mutant. Cultures (50 mL) of *E. coli* BL21 (DE3) harboring pET23a (+)::E47L were grown at 37 °C in terrific broth (TB), supplemented with 100 µg mL⁻¹ ampicillin, in presence of a chemical chaperone (dimethyl sulphoxide, DMSO 6.0%). The negative control consisted of the same culture described above in the absence of DMSO 6.0%. Bacterial cultures were grown for 6h at 37 °C and 180 rpm to an optical density (OD_{600 nm}) of 0.4–0.6. Cells were harvested by centrifugation at 24,400×g for 30 min, resuspended in buffer A (50mM Tris-HCl pH 7.5), and lysed by sonic disruption.

Purification of MtCDA mutants

Cultures (500 mL) of *E. coli* BL21 (DE3) harboring the mutant plasmids were grown at 37°C in LB broth, supplemented with 100 µg mL⁻¹ ampicillin. After 6 h of vigorous shaking at 37°C, cells were harvested by centrifugation at 24,400×g for 30 min, resuspended in buffer A (50mM Tris-HCl pH 7.5), and lysed by sonic disruption. After centrifugation at 24,400×g for 30 min, the supernatant was loaded on a QFF (column volume 47 mL) anionic exchange chromatography column equilibrated with

buffer A and eluted by a linear gradient of buffer B (50mM Tris-HCl pH 7.5, 1M NaCl). Fractions containing the enzyme were pooled and concentrated by ultrafiltration on PM-3 membrane (Spectrum LAB) and loaded onto a gel filtration Sephacryl 200 HR 26/60 equilibrated with buffer A. The mutant *MtCDA* fractions eluted from gel filtration were incubated with ammonium sulphate to a final concentration of 1M and loaded on a Butyl Sepharose High Performance Hiload 16/10 (GE Healthcare) equilibrated with buffer C (50mM Tris-HCl pH 7.5, 1M ammonium sulphate). The column was washed with seven column volumes of buffer C and the adsorbed proteins were fractionated with a 20 column volume linear gradient from 1 to 0 M ammonium sulphate. The fractions obtained from the hydrophobic interaction chromatography were pooled and stored at -80 °C. Since the E47L mutant could not be purified using the protocol describe above, a different purification protocol had to be established. The supernatant, obtained by centrifugation 24,400×g for 30 min, was treated with 1.5 M ammonium sulfate and the resulting precipitate was suspended in 9 mL of buffer A (crude extract). The crude extract was loaded on a Superdex 200 size exclusion column (GE Healthcare) previously equilibrated with buffer A. Fractions containing mutant E47L were pooled, loaded on DEAE CL6B anionic exchange chromatography equilibrated with buffer A, and eluted by a linear gradient of buffer B. The fractions containing homogeneous enzyme were pooled, dialyzed against 20mM Tris-HCl pH 7.5 buffer, concentrated, and stored at -80°C. A High performance liquid chromatography (HPLC) system (ÄktaPurifier) was employed for protein purification, and all purification steps were performed at 4 °C. Protein fractions were analyzed by 15% SDS-PAGE stained with Coomassie Brilliant Blue [23]. Protein concentration was determined by the method of Bradford [24], and confirmed by absorbance spectroscopy [25] using a calculated molar absorption coefficient (ϵ) value of 9,750 M⁻¹cm⁻¹.

Molecular mass determination by mass spectrometry (MS)

Intact protein analysis was performed by direct injection of samples (reconstituted in acetonitrile 50%: water 49%: formic acid 1%) into an IonMax electrospray ion source. We applied 4.5 kV in positive ion mode, 250 °C of capillary temperature, 48 V of capillary and 170 V of tube lens voltage. Spectra with isotopic resolution (600-2000 m/z range for wild-type *MtCDA* and E47D mutant or a 800-1600 m/z range for E47Q and E47L mutants) were collected in FTMS mode using a Thermo Orbitrap Discovery XL (Thermo Electron Corp., San Jose, CA) at a nominal resolution

of 30 000 at 400 m/z. Charge state deconvolutions of averaged data from 100 to 1238 spectra were performed, depending on the protein sample, using the software Xtract (Thermo Electron Corp., San Jose, CA).

Protein identification by LC-MS/MS peptide mapping experiments

Purified *MtCDA* samples (1nmol) of wild-type and E47D, E47Q and E47L *MtCDA*s were trypsin digested using a protocol adapted from Klammer & MacCoss [26]. The resulting peptide mixtures were subjected to nanochromatography (nanoLC Ultra 1D plus - Eksigent, USA) using a packed in-home capillary column [27] (15 cm in length, 150 μm i.d., Kinetex C18 core-shell particles – Phenomenex, Inc.). The eluted peptides were detected using an LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer. MS/MS fragmentation was performed using collision-induced dissociation (CID) with an activation Q of 0.250, an activation time of 30.0 ms, and an isolation width of 1.0 Da. The searches were performed against the *M. tuberculosis* proteome including the sequences of *MtCDA* containing the substitutions in position 47 (E47D, E47L, E47Q). We allowed a tolerance of 10 ppm, a fragment tolerance of 0.8 Da, static carbamidomethylation on cysteines, and dynamic oxidation on methionine residues.

Native polyacrylamide gel electrophoresis

Native-PAGE (N-PAGE) was carried out as described by Schagger and Gallagher [28,29]. Acrylamide 4–15% linear gradient was used for gel electrophoresis. Prior to electrophoresis, proteins at 0.7 mg mL⁻¹ concentrations were prepared in a non-denaturing sample buffer (0.5M Tris-HCl, pH 6.8, glycerol 87%, 1 mg bromophenol blue), samples were not heated, and run in Mini-PROTEAN[®] 3 system (BioRad), by applying a constant milliamps at 18 mA for 3h at 4 °C. Apparent molecular mass of bands was determined by using standard proteins with the following proteins with known molecular masses: bovine serum albumin (BSA) (monomeric form 66 kDa and dimeric form 132 kDa) and ovalbumin (monomeric form 45 kDa), these standards proteins were prepared in the same manner as the sample. Gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

Zinc Analysis

Samples of recombinant mutants and wild-type *MtCDA* ($\sim 2 \text{ mg mL}^{-1}$) were analyzed for zinc content by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES); using a ICP-OES PerkinElmer Optima 4300 DV (PerkinElmer Sciex, Canada).

Enzyme assays

The E47D mutant activity assay was performed as previously described for the wild-type *MtCDA* [19]. In short, the time-dependent decrease in absorbance at 282 nm upon conversion of cytidine ($\epsilon_{\text{cytidine}} = 3.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) into uridine or deoxyuridine was continuously monitored by a UV-2550 UV/visible spectrophotometer (Shimadzu) at 25 °C. The E47D enzyme velocity was evaluated for cytidine concentrations ranging from 100 to 800 μM .

Reverse-phase HPLC had to be used to monitor the slow conversion of cytidine to uridine by the E47Q mutant enzyme. Mixtures containing Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, mutant enzyme (0.24 mg mL^{-1}), and cytidine (50 μM to 1800 μM) were incubated at 25 °C. At six timed intervals, aliquots (200 μL) were boiled for 3 min to stop reaction and centrifuged at 10,600 $\times g$ for 3 min. The supernatant (100 μL) was injected onto a reverse-phase C-18 HPLC column (0.46 \times 25 cm, Amersham Bioscience) and eluted with water (0.5 mL min^{-1}). Cytidine and uridine were separated with good resolution, having retention times of 14.7 and 27.6 min, respectively. Elution of substrate and product was monitored at 260 nm, and the integrated peak area of the product was compared with standard solutions of both cytidine and uridine [30].

One enzyme unit is defined as the amount of enzyme which catalysis the deamination of 1 μmol of cytidine per minute at 25 °C.

The initial velocity method was used to calculate the apparent steady-state kinetic parameters. The initial velocity (v_o) of each reaction was calculated by the linear regression of substrate concentration versus time. Hyperbolic saturation curves were fitted by nonlinear regression analysis to the Michaelis-Menten equation (Eq. 1), in which v_o is the initial velocity, V_{max} is the maximal rate, $[S]$ is the substrate concentration, and K_M is the Michaelis-Menten constant. The values for the apparent kinetic constants were determined by non-linear regression using Sigma Plot version 11.0 software (Systat Software, Inc., San Jose California USA).

$$v_o = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}$$

Eq. (1)

The value for the catalytic rate constant (k_{cat}) was determined from Eq. 2, in which $[E]_0$ represents the total concentration of enzyme subunits (as there is one binding site per subunit).

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{[E]_0}$$

Eq. (2)

Crystallization and X-ray data collection

Crystallization assays were performed in 24-well plates using the vapor-diffusion hanging-drop method. Mutants of *MtCDA* were concentrated to 5 mg mL⁻¹ in sample buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5). The drop ratio was 2:2, with a total drop volume of 4 µl and placed over 400 µL reservoir solution. All plates were stored at 20 °C and the formation of crystals was monitored [19]. The X-ray diffraction data for wild-type *MtCDA* crystal was collected at a wavelength of 1.437 Å using synchrotron radiation source (Station MX-1, LNLS, Campinas, Brazil) and a CCD detector (MAR CCD). Crystals were flash-cooled with cryoprotectant containing 20% glycerol. Data collection was performed at -170 °C in a cold nitrogen stream generated and maintained with Oxford Cryosystem. The oscillation range employed was 1.0°, the crystal to detector distance was 90 mm and the exposure time 80 sec. A data set containing 130 frames was collected and processed to 2.38 Å resolution using the program MOSFLM and scaled with AIMLESS [31].

RESULTS AND DISCUSSION

Amplification and cloning

MtCDA coding sequence was obtained from *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA. Two separate PCR reactions were carried out, and two fragments of a target sequence were amplified by using, for each reaction, one flanking and one mutagenic primer. The two intermediate products with terminal complementary form a new

template DNA by duplexing in a second reaction or overlap extension-PCR, in which the two fragments were joined using two outmost flanking primers. Figure 2 shows the product from two PCR reactions for mutated gene. Cloning of the mutated PCR products was performed using the CATATG and AAGCTT restriction sites in the pET-23a (+) expression vector. *E. coli* DH10B electro-competent cells were transformed and recombinant clones were identified by restriction enzyme digestion. Mutagenesis was confirmed by nucleotide sequencing and all recombinant clones contained the expected mutated codons, E47A (GAA→GCG), E47D (GAA→GAT), E47H (GAA→CAC), E47L (GAA→CTG), and E47Q (GAA→CAG).

Expression of recombinant proteins

Each recombinant plasmid was purified and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) as described for wild-type *MtCDA* [19]. Recombinant protein expression was analyzed by SDS-PAGE. Two (E47D and E47Q) of five mutant proteins were expressed in the soluble fraction (SF) and exhibited the expected molecular mass of ~13.9 kDa and were expressed at similar levels to the wild-type protein (Fig. 3A). One recombinant protein (E47L) showed low levels of expression in soluble form, and required the use of low molecular weight compounds (chemical chaperones) in the culture medium to, purportedly, stabilize proteins in their native conformations, as described under materials and methods section. The results indicated that the presence of DMSO 6% in the TB culture medium increased the expression of the E47L mutant *MtCDA* protein (Fig. 3B).

Two constructs failed to express the expected recombinant proteins (E47A and E47H) in the soluble fraction. There are a number of factors that could influence and impair folding leading to formation of inclusion bodies [32]. Expression of these constructs was evaluated in alternative *E. coli* strains (BL21 (NH), C41, Rosetta, Rosetta-gami), and both supernatants and pellets of cell lysates were screened for the presence of recombinant proteins. Unfortunately, E47A and E47H were expressed in insoluble form for all host cells tested (data no show). Although inclusion body formation can greatly simplify protein purification, there is no guarantee that the *in vitro* refolding will yield large amounts of biologically active product. Moreover, inclusion body purification schemes present a number of problems such as: use of denaturants that can cause irreversible modifications of protein structure that will elude all of the

most sophisticated analytical tests, refolding usually must be done in very dilute solution and the protein reconcentrated, and refolding encourages protein isomerization, leading to precipitation during storage [33]. Since one of the goals of the present work is to assess the role of E47 residue in *MtCDA*-catalyzed chemical reaction, we deemed appropriate not to try unfolding and refolding protocols.

Purification of soluble mutant proteins

Purification of the recombinant E47D and E47Q mutants was performed according to the methodology described in materials and methods session. The eluted fractions, after three chromatographic steps, were analyzed. According to analysis on SDS-PAGE, the purification protocol yielded 9.1 mg and 4.5 mg of, respectively, E47D and E47Q homogeneous soluble protein from 10 g of wet cells. To avoid cross contamination between the different mutant enzymes it was necessary to use a set of columns for each protein.

The E47L recombinant protein was expressed in low levels and its purification was not successful using the same protocol. An alternative purification protocol was thus developed and is in the Materials and Methods section. The E47L was obtained partially homogeneous in solution according to analysis by 15% SDA-PAGE. The purification yielded 1.4 mg of E47L from 4 g of wet cells. Mutant proteins were stored at -80°C . Figure 4 shows the results from SDS-PAGE analysis of three recombinant mutant proteins purified by chromatography.

Molecular mass determination by mass spectrometry (MS)

In order to determine the wild-type *MtCDA*, E47D, E47L, and E47Q molecular masses, intact protein analysis was performed using an Orbitrap analyzer (see Materials and Methods). The average spectra from 100 scans for wild-type *MtCDA* and E47D proteins, 1000 scans for E47L, and 1238 scans for E47Q with charge states spanning from 7+ to 18+ were detected with isotopic resolution (Fig. 5, and Figs. S1-S3).

The high-resolution FTMS spectra contained isotopic envelopes for each charge state (see Fig. 5B for the isotopic envelope of charge state 14+ of wild-type *MtCDA* as an example) which allowed us to obtain the monoisotopic molecular mass for each CDA form. In Table 2 we show the theoretical (N-terminal methionine removed) and experimentally obtained molecular masses for wild-type and mutant *MtCDA* forms, differences in mass between expected and experimental measurements, and also the

parts-per-million (ppm) accuracy of measurements based on the expected theoretical values. Our data strongly indicate that the N-terminal methionine was removed in all CDA forms studied. Moreover, the molecular mass of wild-type *MtCDA* was determined with sub-ppm accuracy (0.079 ppm - 0.0011 Da) while we obtained a difference of 1.9 ppm (0.0265 Da) between expected and experimentally obtained monoisotopic masses for E47D *MtCDA* mutant. However, the accuracies in measurements for both E47Q and E47L mutants were rather low (143.70 ppm and 287.42 ppm, respectively). If we consider the existence of disulfide bonds between cysteine residues (one disulfide bond for E47Q mutant and two for E47L mutant), the correspondence between expected and obtained values greatly improves reaching sub-ppm levels for E47Q (0.98 ppm - 0.0137 Da). Therefore, our MS data suggest that E47Q mutant is likely to contain one disulfide bond (-2.0156 Da) whereas E47L mutant is likely to contain two disulfide bonds (- 4.0313 Da).

Protein identification by LC-MS/MS peptide mapping experiments

LC-MS/MS peptide mapping experiments were performed and the MS/MS spectra of wild-type and mutant proteins were compared with the *M. tuberculosis* proteome including the wild-type form of *MtCDA* and the mutants. Peptides obtained covered the wild-type and the mutated sequences in 100% for wild-type *MtCDA* and E47D mutant, 92% and 74% for E47Q and E47L mutants, respectively.

Determination of oligomeric state of mutant proteins

To establish whether the mutant proteins have the same oligomeric state of wild-type *MtCDA*, N-PAGE was performed. Under nondenaturing conditions, in which protein activity, native charge, and conformation are maintained, electrophoretic separation showed that E47D and E47L mutant proteins have an apparent molecular mass of approximately 55 kDa (Fig. 6), which suggest a homotetrameric state as the subunit molecular mass value is 13.9 kDa. This is in agreement with the oligomeric state of wild-type *MtCDA* [18].

A lower migration rate was observed for E47Q as compared to E47D and E47L mutants (Fig. 6). Interestingly, the E47Q mutant is prone to precipitation at larger protein concentrations (observed in crystallization trials) and is less stable than wild-type *MtCDA*. As mass spectrometry showed that the E47Q protein has the expected

subunit molecular mass, this mutation could cause alterations on protein conformational states. However, further studies should be pursued to provide experimental evidence for this proposal.

Metal analysis by ICP-OES

Determination of metal concentration and identity by ICP-OES yielded the following results for Zn^{2+} concentrations: E47D = $7.3 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$, E47L = $1.8 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$, and E47Q = $8.2 \pm 0.6 \text{ mg L}^{-1}$. These results indicate the presence of one mol of Zn^{2+} (E47D 111 μM , E47L 27 μM and E47Q 125 μM) per mol of enzyme subunit (143 μM , 35 μM and 143 μM respectively), as observed for wild-type *MtCDA* [18]. These findings suggest that E47 residue plays no role in coordinating the zinc cation in *MtCDA* active site. These results are not surprising as structural studies of *MtCDA* revealed that Glu47 residue is involved in the ribose binding loop and is located away from the zinc atom [19]. The thiolate side chain of Cys56, Cys89, and Cys 92 and the carboxylate side chain of Glu58 residue have been implicated in the coordination of zinc atom for *MtCDA* [19], in agreement with the pattern reported by Carlow et al for *B. subtilis* CDA [15].

Kinetics properties

The effect of substitutions in the E47 position on the steady-state kinetics parameters for *MtCDA* enzyme was determined using both a continuous spectrophotometric assay and a discontinuous HPLC method. Enzyme velocity measurements for E47D mutant was performed as previously reported for wild-type *MtCDA* using cytidine as substrate [19]. For E47Q mutant *MtCDA*, reverse-phase HPLC was used to monitor the slow conversion of cytidine to uridine as described in Material and Methods section. The results for the E47D mutant (Fig. 7) were fitted to Eq. 1. The results for the E47Q mutant were first fitted to a linear equation (Fig. 8A) to obtain initial velocity values (v_0), and the latter were plotted as a function of increasing cytidine concentration (Fig. 8B). The hyperbolic increase in v_0 as a function of cytidine concentration was fitted to Eq. 1 to determine K_M and V_{max} (Fig. 8B). The values of k_{cat} for E47D and E47Q mutants were determined from Eq. 2. The K_M values for the E47D and E47Q mutants were not significantly altered compared to wild-type *MtCDA* (Table 3). On the other hand, there was a 37-fold decrease in the k_{cat} value for the E47D mutant, and a 19-fold decrease in k_{cat} for the E47Q mutant (Table 3). The results for the

E47D mutant demonstrate that shortening the carbon chain whereas preserving the carboxylic group impairs catalysis. The non-ionizable glutamine side-chain is an amide formed by replacing the hydroxyl group of glutamic acid with an amine, which eliminates the negative charge of the side chain whereas keeping its ability to form hydrogen bonds. Although the Michaelis-Menten constant (K_M) is not a true dissociation constant; it can be regarded as an apparent dissociation constant that may be treated as the overall dissociation constant of all enzyme-bound species [34]. The catalytic constant (k_{cat}) is a first-order rate constant that refers to the properties and reactions of the enzyme-substrate, enzyme-intermediate, and enzyme-product complexes, including the enzyme-catalyzed chemical reaction [34]. Accordingly, the results for the E47D and E47Q mutants provide experimental evidence for the catalytic role played by the negatively charged carboxyl group (likely electrostatic catalysis) and the importance of carbon chain length in the mode of action of *MtCDA*. The replacement of E47 with leucine produced an inactive mutant protein, as no activity could be detected using either a continuous spectrophotometric assay or a discontinuous HPLC method. Although the side chain of leucine has the same volume of the R group of glutamate, its aliphatic isobutyl chain cannot form hydrogen bonds and is not charged. As previously shown for the three-dimensional structure of wild-type *MtCDA* in complex with 2'-deoxyuridine [20], the E47 residue is located in the active site but does not interact directly with the zinc atom [21]. It, however, forms an important hydrogen bond to 3'-OH group of the pentose of 2'-deoxyuridine [21]. As the E47D, E47L, and E47Q mutant enzymes are homotetrameric and have a zinc atom bound per subunit, the differences in enzyme activity as compared to wild type *MtCDA* are thus due to the catalytic role of E47. These results are in agreement with the pH-rate profiles previously reported for *MtCDA* [19]. The corresponding E91 in *E. coli* CDA has been shown to form an H-bond with the 3'-OH group of substituent ribose, a substrate moiety that is not directly involved in chemical reaction [9]. Site-directed mutagenesis studies for the E91A mutant of *E. coli* CDA showed a 520-fold decrease in K_M and a 32-fold in k_{cat} using cytidine as substrate [35]. These results prompted the proposal that the E91 residue in *E. coli* CDA (corresponding to E47 in *MtCDA*) plays a role in transition state stabilization [35]. It should be pointed out that, as assumed by Richard Wolfenden and colleagues for *E. coli* CDA [10], we have considered k_{cat} to represent the rate constant for chemical transformation of the substrate at the enzyme's active site and K_M to describe the dissociation constant of *MtCDA*:substrate complex. Interestingly,

glutamate residues have been shown to be implicated in electrostatic stabilization of intermediate(s) or transition state and shown to play a prominent role in proton shuttling in the mode of action of a number of enzymes [36].

Crystallographic structure of E47D MtCDA

Crystallization trials were carried out to try to provide structural insights into enzyme catalysis for the E47D, E47Q and E47L mutant proteins. Two mutants formed crystals (E47D and E47Q), but only the E47D mutant protein yielded crystals appropriate for diffraction data collection. The data collected and refinement statistics for the E47D mutant are presented in Table 4. The X-ray crystal structure of E47D mutant reveals a homotetrameric enzyme (Fig. 9A) being formed by two asymmetric units, which is composed by a crystallographic dimer, consistent with the N-PAGE results here presented. The E47D monomer exhibits a central β -sheet with six antiparallel strands surrounded by four α -helices (Fig. 9B) as previously described for wild-type *MtCDA* [19]. Consistent with the zinc atom content determined from ICP-OES analysis, this mutation has no effect on zinc ion binding site (Fig. 9C). The latter is clearly shown in the electron density map being coordinated by three cysteines (C56, C89 and C92) and a water molecule (Fig. 9C). No large conformational changes are apparent for the E47D mutant (Fig. 9D) as compared to wild-type *MtCDA* [19]. The 37-fold decrease in k_{cat} value for the E47D mutant suggested a catalytic role played by the carboxyl group. As the K_{M} value is similar to wild-type *MtCDA*, the E47 residue appears to play no role in substrate binding. Unfortunately, attempts to obtain the crystal structure of E47D mutant in complex with (2'-deoxy)uridine have failed. As the E47 side chain is 10.6 Å distant from C4 of the base where the nucleophilic attack occurs [21], it is tempting to suggest that the carboxyl group plays a role in proton shuttling. The atomic coordinates and structure factors for the *MtCDA* mutant (E47D) structure have been deposited at the Protein Data Bank, access code:4OG0.

CONCLUSIONS

Production of mutant enzymes in which the conserved residue, E47 was replaced with Asp, Leu, and Gln residues. These substitutions had no effect on zinc content and oligomeric state. No activity could be measured for the E47L mutant. The E47D and E47Q mutations resulted in decreased k_{cat} and no effect on K_{M} for cytidine.

Accordingly, a catalytic role was proposed for the E47 side chain in *MtCDA*-catalyzed hydrolytic deamination. In addition, the results showed that the E47 residue is not involved in zinc ion coordination nor in oligomerization state of *MtCDA*. Crystallographic data on E47D mutant provides further support to a likely role of the carboxylic side chain in proton shuttling. Interestingly, although the residues E47 and/or E58 residues were proposed to play a role in catalysis and/or substrate binding to *MtCDA* [19], the results here presented show that E47 plays no role in substrate binding. Interestingly, crystal structure data for *MtCDA* in complex with product showed that the E47 side chain interacts with the ribose moiety of uridine [20]. This result would suggest a role for E47 in substrate/product binding, which is not borne out by the data here presented. At any rate, site-directed mutagenesis of the conserved E58 residue in *MtCDA* [19] will have to be pursued to evaluate whether or not this residues plays any role as it appears to be more appropriately positioned for catalysis (Fig. 8). As pointed out above, glutamate residues have been shown to play a fairly frequent role in proton shuttling [36,37]. The results here reported contribute to an increased understanding of the functional roles of amino acid side chains in enzyme catalysis, and also show that a functional role for an amino acid residue in the mode of action of a particular enzyme has to be demonstrated by biochemical data.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by funds awarded by Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPES to National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (INCT-TB) to D.S.S. and L.A.B. L.A.B. and D.S.S. also acknowledge financial support awarded by FAPERGS-CNPq-PRONEX-2009. L.A.B. (CNPq, 520182/99-5), D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06), W.F.A.Jr (300851/98-7) and O.N.S (CNPq, 559917/2010-4) are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). V.R.J acknowledges a scholarship awarded by FAPERGS-CAPES (DOCFIX, 05/2013). Z.A.S.Q. acknowledges a scholarship awarded by CAPES. We thank Luís Fernando Saraiva Macedo Timmers for his assistance and helpful discussion on crystal structure determination.

REFERENCES

- [1] World Health Organization, Global tuberculosis report 2013, WHO Press, Geneva, 2013.
- [2] E.L. Cobertt, C.J. Watt, N. Walker, D. Maher, B.G. Williams, M.C. Raviglione, C. DyE, *Arch. Intern. Med.*, 163 (2003) 1009-1021.
- [3] J.E. Gomez, J.D. McKinney, *Tuberculosis*, 89 (2004) 29-44.
- [4] G.A. O'Donovan, J. Neuhard, *Bacteriol. Rev.*, 34 (1970) 278-343.
- [5] B.A. Moffatta, H. Ashiharab, *The Arabidopsis Book*, 1 (2002) e0018.
- [6] J. Starck, G. Källenius, B. Marklund, D.I. Andersson, T. Akerlund, *Microbiology* 150 (2004) 3821-3829.
- [7] C.W. Carter, *Biochimie*, 77 (1995) 92-98.
- [8] S.J. Chung, C. Fomme, G. Verdine G, *J. Med. Chem.*, 48 (2005) 658-660.
- [9] L. Betts, S. Xiang, S.A. Short, R. Wolfenden, C.W. Carter, *J. Mol. Biol.*, 235 (1994) 635-656.
- [10] M.J. Snider, S. Guanitz, C. Ridway, S.A. Short, R. Wolfenden, *Biochemistry*, 39 (2000) 9746-9753.
- [11] D.C. Carlow, A.A. Smith, C.C. Yang, S.A. Short, *Biochemistry*, 34 (1995) 4220-4224.
- [12] M.J. Snider, L. Reinhardt, R. Wolfenden, W.W. Cleland, *Biochemistry*, 41 (2002) 415-421.
- [13] C.S. Harold, *RNA and DNA editing: Molecular mechanisms and their integration into biological systems*, 1 (2008) 232-238.
- [14] B. Weiss, *J. Bacteriol.*, 189 (2007) 7922-7926.
- [15] D.C. Carlow, *Biochemistry*, 38 (1999) 12258-12265.
- [16] S.E. Faivre-Nitschke, J.M. Grienberger, J.M. Gualberto, *Eur. J. Biochem.*, 3 (1999) 896-903.
- [17] S. Vincenzetti, A. Cambi, J. Neuhard, E. Garantini, A. Vita, *Protein. Express. Purif.*, 8 (1996) 247-253.
- [18] E. Johansson, N. Mehlhede, J. Neuhard, S. Larsen, *Biochemistry*, 41 (2002) 2563-2570.
- [19] Z.A. Sánchez-Quitian, C.Z. Schneider, R.G. Ducati, W.F. Jr. de Azevedo, C. Bloch, L.A. Basso, D.S. Santos, *J. Struct. Biol.*, 169 (2010) 413-423.

- [20] Z.A. Sánchez-Quitian, L.F. Timmers, R.A. Cáceres, J.G. Rehm, C.E. Thompson, L.A. Basso, W.F.Jr. de Azevedo, D.S. Santos, *Arch. Biochem. Biophys.*, 509 (2011) 108-115.
- [21] S. Vicenzetti, B. Quadrini, P. Mariani, G.D. Sanctis, N. Cammertoni, V. Polzonetti, S. Puciarelli, P. Natalini, A. Vita, *Proteins*, 70 (2008) 144-156.
- [22] S.N. Ho, H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen, L.R. Pease, *Gene*, 77 (1989) 51-59.
- [23] U.K. Laemmli, *Nature*, 227 (1970) 680-685.
- [24] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248-254.
- [25] G.R. Grimsley, C.N. Pace, *Curr. Protoc. Protein. Sci.*, (2003) units 3.1.1-3.1.9.
- [26] A.A. Klammer, M.J. MacCoss, *J. Proteom. Res.*, 5 (2006) 695-700.
- [27] R.L. Moritz, CSH Protocols, (2007) doi: 10.1101/pdb.prot4578.
- [28] H. Schägger, G. Von Jagow, *Anal. Biochem.*, 166 (1987) 368-379.
- [29] S.R. Gallagher, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, (2001) 5:6.5.1-6.5.11.
- [30] M.G. Williams, J. Palandra, E.M. Shobe, *Biomed. Chromatogr.*, 17 (2003) 215-218.
- [31] CCP4, Collaborative Computational Project Number 4, *Act Cryst. D.*, 50(1994) 760-763.
- [32] H.P. Sørensen, K.K. Mortensen, *J. Biotechnol.*, 115 (2005) 113-128.
- [33] M.L.B. Magalhães, C.P. Pereira, L.A. Basso, D.S. Santos, *Protein Expr. Purif.*, 26 (2002) 59-64.
- [34] R.A. Copeland, *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, Wiley-VCH, New York, 2000.
- [35] D.C. Carlow, S.A. Short, R. Wolfenden, *Biochemistry*, 37 (1998) 1199-1203.
- [36] G.L. Holliday, J.B.O. Mitchell, J.M. Thornton, *J. Mol. Biol.*, 390 (2009) 560-577.
- [37] G.J. Bartlett, C.T. Porter, N. Borkakoti, J.M. Thornton, *J. Mol. Biol.* 324 (2002) 105-121.

Figure legends

Figure 1: Schematic diagram of the overlap extension polymerase chain reaction (OE-PCR) method for site-directed mutagenesis. A nucleotide substitution (solid circle) was introduced into a template DNA (*cdd* gene) through two different steps of PCR reactions (P1 and P2). The first step (P1) was performed in a separate PCR reaction, two fragments of a target sequence (solid circle) was amplified by using forward flanking primers (A) and reverse mutagenic primers (B) for one reaction, and reverse flanking primers (D) and forward mutagenic primers (C), resulting in an amplification of the intermediate products AB and CA. Owing to their terminal complementarity, these products form a new template DNA by overlapping. Subsequently extension occurs in a second step (P2) with the help of two flanking primers (A and D). Finally, the recombinant PCR product can be cloned into *NdeI* and *HindIII* restriction sites.

Figure 2: Analysis of mutagenesis PCR products on a 1% agarose gel stained with GelRed™ stain. (A) Two simultaneous PCR reactions were performed to amplify each DNA fragment during the first step PCR. Lane 1, 1 kb plus DNA Ladder; Lanes 2-3, PCR product (139bp) obtained with the forward flanking primer (A) and a reverse mutagenic primer (B) for two substitutions (E47D and E47L respectively); Lanes 4-5, PCR product (263bp) obtained with a reverse flanking primer (D) and a forward mutagenic primer (C) for two substitutions (E47D and E47L respectively). (B) Synthesis of the full-length mutated PCR product using the gel purified DNA fragment from the first step PCR and the flanking primers. Lanes 1, 1 kb plus DNA Ladder; Lanes 2-6, full-length mutated of E47A, E47D, E47H, E47L and E47Q DNA fragments respectively.

Figure 3: 15% SDS-PAGE analysis of expression of mutant CDA proteins. SF is for soluble fraction and IF for insoluble fraction. (A) Expression of five mutants in LB medium after 6h grown at 37 °C. Lane 1, E47A (SF); Lane 2, E47A (IF); Lane 3, E47D (SF); Lane 4, E47D (IF); Lane 5, E47H (SF); Lane 6, E47H (IF); Lane 7, E47L (SF); Lane 8, E47L (IF); Lane 9, E47Q (SF); Lane 10, E47Q (IF); Lane 11, pET-23a (+) (SF); Lane 12, pET-23a (+) (IF); Lane 13, MW Bench marker (Invitrogen). (B) Expression of E47L mutant in TB medium plus 6% DMSO after 6h grown at 37 °C. Lane 1, MW

Bench marker (Invitrogen); Lane 2, E47L (SF); Lane 3, E47L (IF); Lane 4, pET-23a (+) (SF); Lane 5, pET-23a (+) (IF).

Figure 4: 15% SDS-PAGE of three recombinant proteins purified by liquid chromatography. Lane 1, MW Bench marker (Invitrogen); Lane: 2, E47D (13.91 kDa); Lane 3, E47L (13.92 kDa); Lane 3, E47Q (13.92 kDa); Lane 4, wild-type *MtCDA* (13.93 kDa).

Figure 5. Determination of wtCDA monoisotopic molecular mass by mass spectrometry analysis. (A) ESI-FTMS spectra of wild-type *MtCDA* spanning from charge state 7+ to 18+. (B) Isotopic envelope of charge state 14+. (C) Deconvoluted spectra of wild-type *MtCDA* resulted in a peak corresponding to a monoisotopic molecular mass of 13 931.9586 Da. This value matches the theoretical monoisotopic mass for wild-type *MtCDA* (13 931.9575 Da) with sub parts-per-million mass accuracy (0.0789 ppm).

Figure 6: Analysis of oligomeric state of wild type and mutant proteins. Lane 1, Native standard protein Ovalbumin (pI 4.5-4.9); Lane 2, Native standard protein BSA (pI 4.8); Lane 3, wild-type *MtCDA* (pI 5.72); Lane 4, E47D mutant; Lane 5, E47L mutant; Lane 6, E47Q mutant.

Figure 7: Determination of steady-state kinetic parameters for E47D mutant. The data for the hyperbolic cytidine saturation curve were fitted to Eq. 1.

Figure 8: Determination of kinetic parameters for E47Q mutant. (A) Product (uridine) formation versus time of substrate (cytidine) enzymatic hydrolysis at increasing concentrations estimated by HPLC. (B) Initial velocity, v_0 , plotted against increasing substrate concentrations for a reaction obeying the Michaelis-Menten kinetics. The data were fitted to Eq. 1.

Figure 9: The X-ray crystal structure of E47D *MtCDA* protein.

GRAPHICAL ABSTRACT

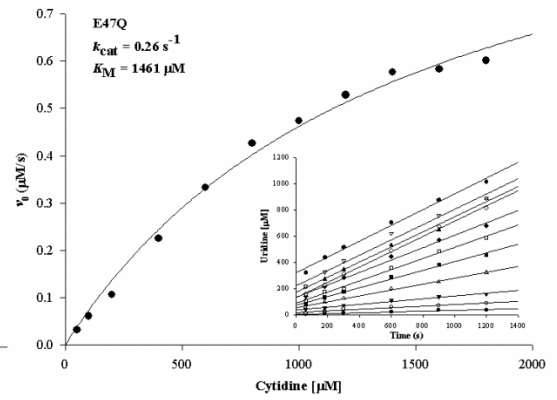
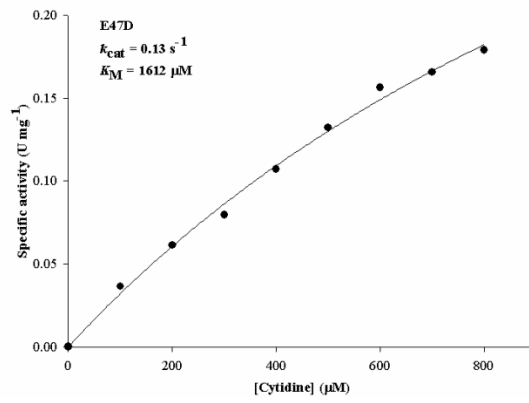


FIGURE 1.

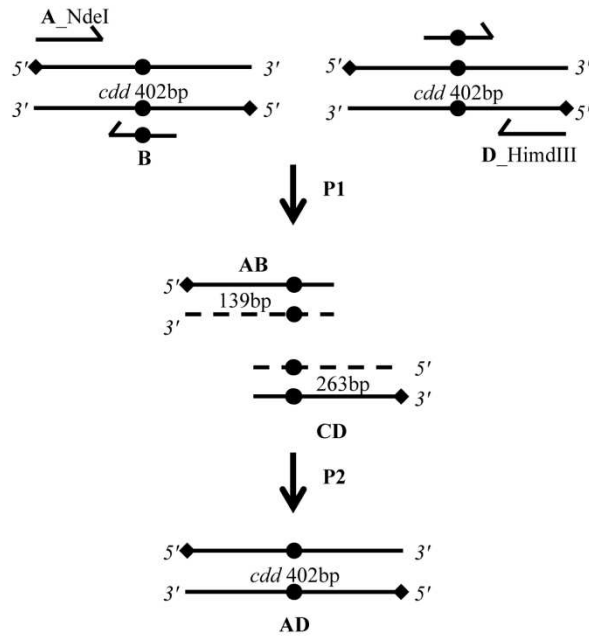


FIGURE 2.

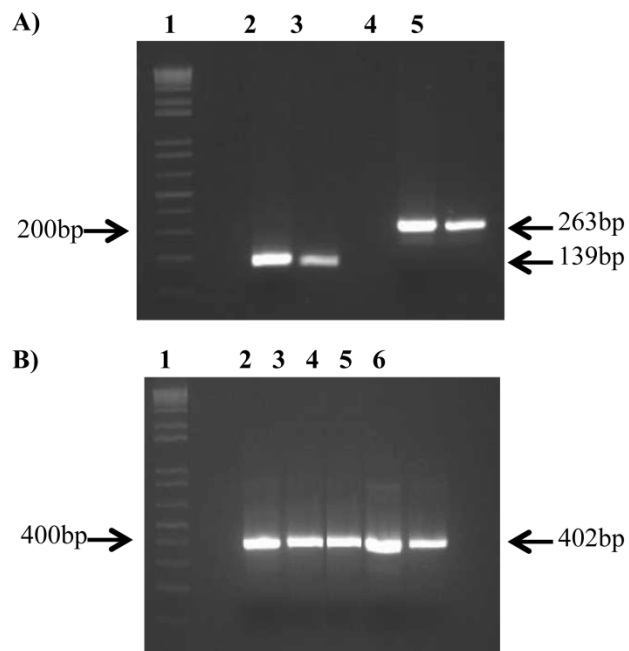


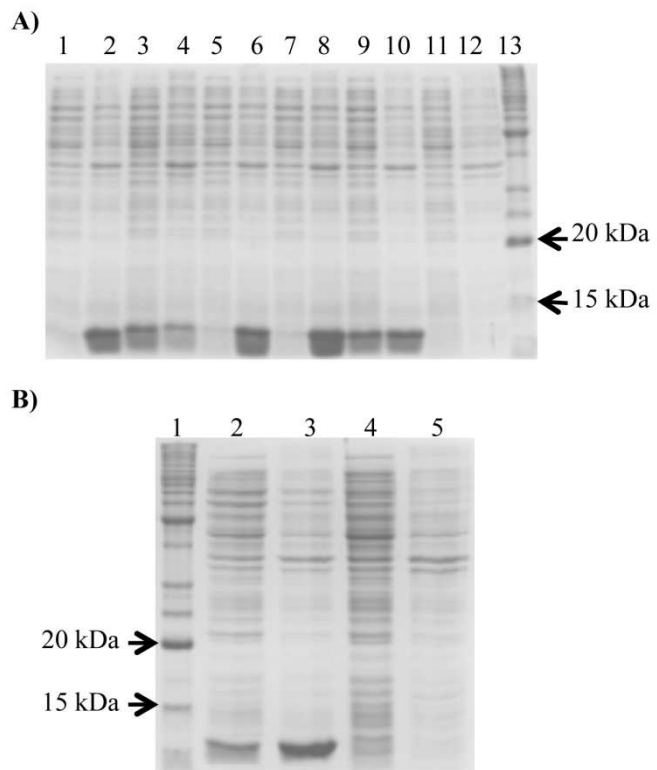
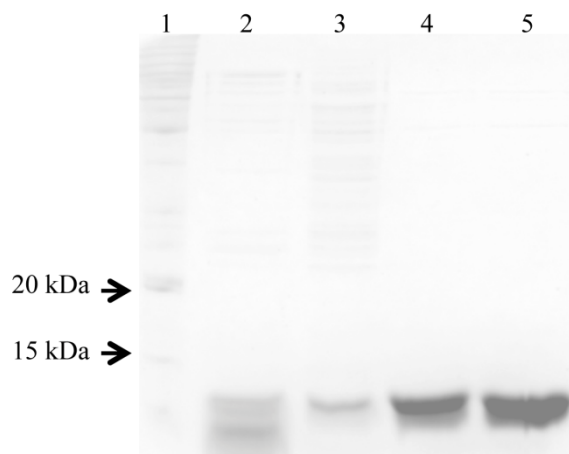
FIGURE 3.**FIGURE 4.**

FIGURE 5.

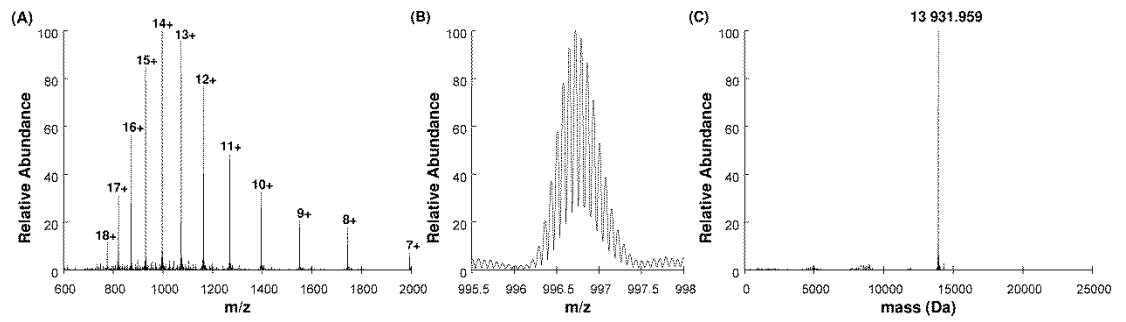


FIGURE 6.

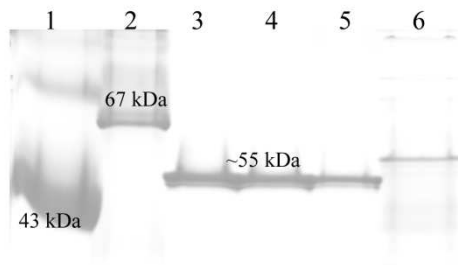


FIGURE 7.

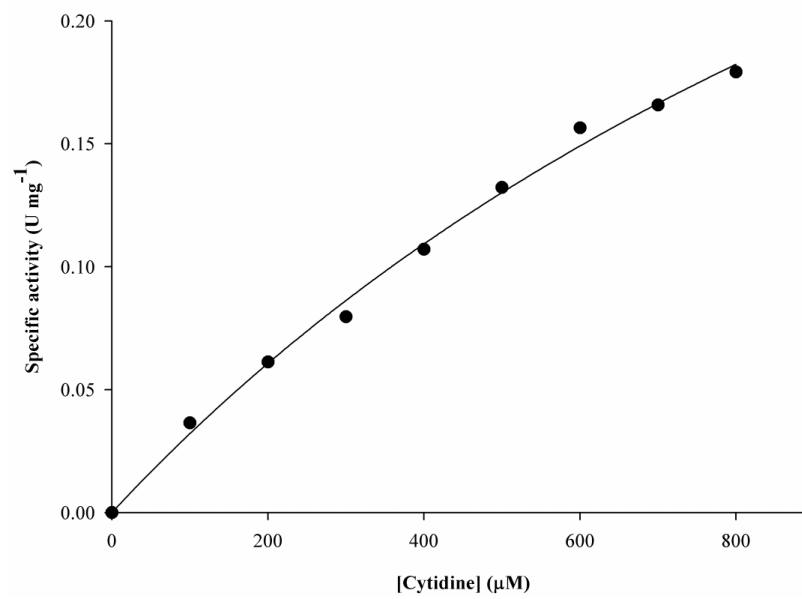


FIGURE 8.

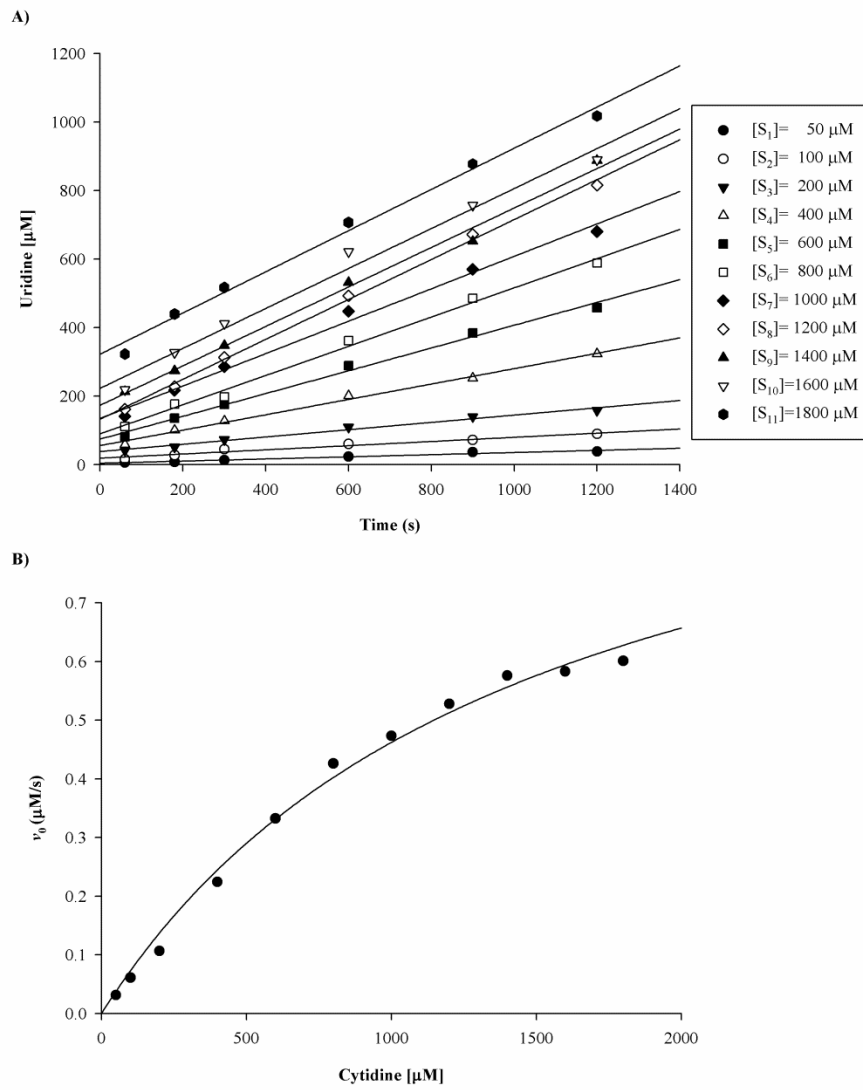


FIGURE 9.

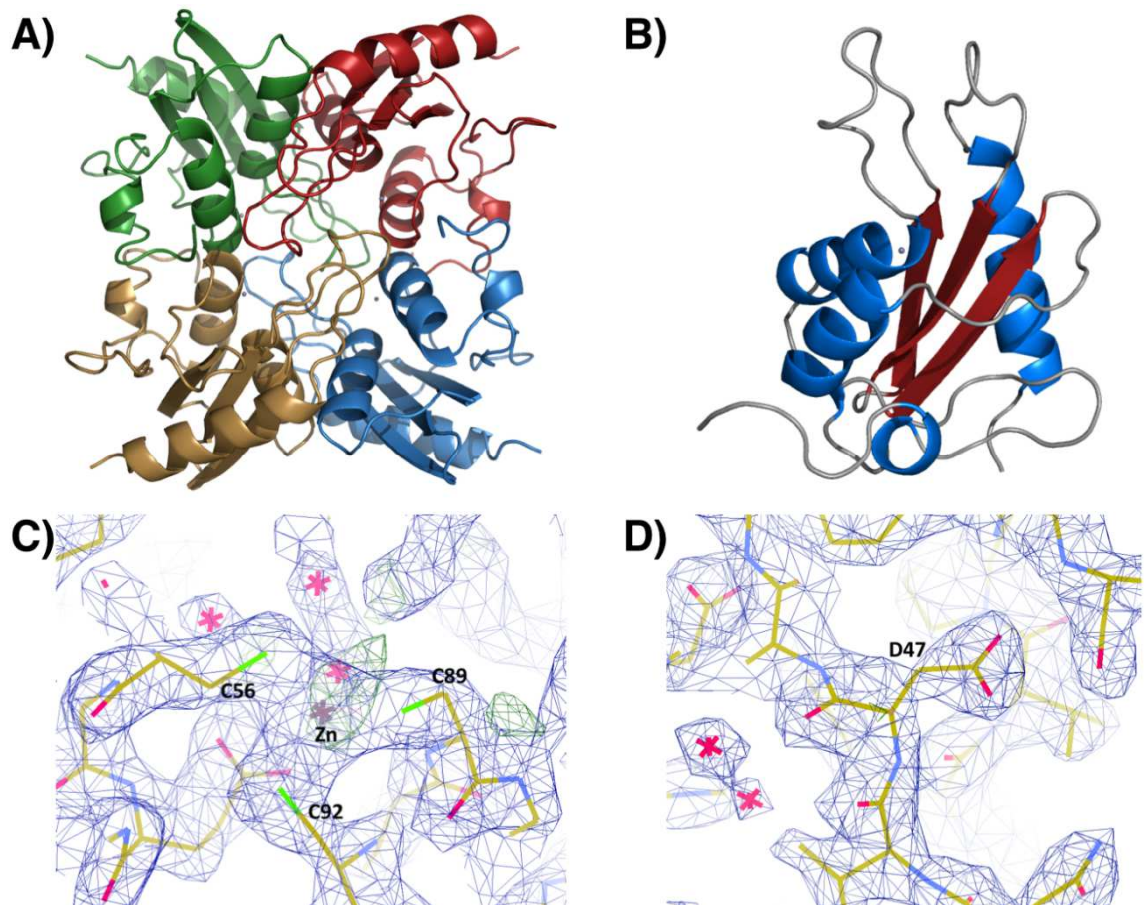


Table1

Mutagenic and flanking primers used for cloning the mutated genes into vectors.

Primers	Sequence (5' to 3') ^a	Length of overlapping sequence (bases)
MTB <i>bcd</i> For_U	GCCATATGCCTGATGTCGATTGGAATATGCTG	
MTB <i>bcd</i> Rev_D	GAAAGCTTTCACCGGCGTTCCCGGGGGAG	
MTB <i>bcd</i> E47A FM	GTGACCGGATGCAACGTG g gcAACGTCTCGTATGGCTTG	18
MTB <i>bcd</i> E47A RM	CAAGCCATACGAGACGTT g gcCACGTTGCATCCGGTCAC	
MTB <i>bcd</i> E47D FM	CCGGATGCAACGTG g atAACGTCTCGTATGGC	14
MTB <i>bcd</i> E47D RM	GCCATACGAGACGTT at cCACGTTGCATCCGG	
MTB <i>bcd</i> E47H FM	CCGGATGCAACGTG g acAACGTCTCGTATGGC	14
MTB <i>bcd</i> E47H RM	GCCATACGAGACGTT g tcCACGTTGCATCCGG	
MTB <i>bcd</i> E47L FM	GTGACCGGATGCAACGTG g tgAACGTCTCGTATGGCTTG	18
MTB <i>bcd</i> E47L RM	CAAGCCATACGAGACGTT g cagCACGTTGCATCCGGTCAC	
MTB <i>bcd</i> E47Q FM	GTGACCGGATGCAACGTG g caAACGTCTCGTATGGCTTG	18
MTB <i>bcd</i> E47Q RM	CAAGCCATACGAGACGTT g ctgCACGTTGCATCCGGTCAC	

^a Nucleotide substitution is showed in boldface and lower case; Underlined nucleotides represent cloning site; CATATG and AAGCTT restriction sites for *Nde*I and *Hind*III enzymes, respectively.

Table 2

Molecular masses of intact wild-type *Mt*CDA and mutant forms (E47D, E47L, and E47Q) of *Mt*CDA.

Protein	Theoretical monoisotopic mass (Da)	Experimental monoisotopic mass (Da)	Δ theor exp (Da)	Accuracy (ppm)
wtCD A	13931.9575	13931.9586	0.0011	0.0789
E47D	13917.9419	13917.9684	0.0265	1.9
E47Q	13930.9735	13928.9716	2.0019	143.70
E47Q*	13928.9579	13928.9716	0.0137	0.98
E47L	13915.9990	13911.9993	3.9997	287.42
E47L*	13911.9677	13911.9993	0.0316	2.3

*with a disulfide bond formed. **with two disulfide bonds formed.

Table 3Steady-state kinetics parameters of wild-type *MtCDA*, E47D and E47Q mutants

Substrate		wtMtCDA^a	E47D	E47Q
Cytidine	K_M (μM)	1004 ± 53	1612 ± 329	1461 ± 223
	V_{max} (U/mg)	20.7 ± 0.6	0.54 ± 0.08	1.13 ± 0.09
	k_{cat} (sec^{-1})	4.85 ± 0.14	0.13 ± 0.02	0.26 ± 0.02
	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	4830 ± 255	80 ± 16	178 ± 27

^aFrom Ref. [19]**Table 4**

Data collection and refinement statistics*	E47D
X-ray wavelenght (\AA)	1,427
Temperature (K)	100
Resolution range (\AA)	31.56 (2.38)
Space group	C2221
Matthews coefficient ($\text{\AA}^3 \text{Da}^{-1}$)	2,49
<i>Unit-cell parameters</i>	
a (\AA)	65,16
b (\AA)	76,49
c (\AA)	111,84
$\alpha = \beta = \gamma$ ($^\circ$)	90,00
Highest Resolution Shell (\AA)	2,38
Data completeness (%)	98,60
Multiplicity	4,90
R_{merge} (%) ^a	10,4
Resolution range used in refinement (\AA)	2.53 - 2.38
R_{factor} (%) ^b	18,86
R_{free} (%) ^c	23,61
Subunits in the a.u	2
<i>Observed RMSD from the ideal geometry</i>	
Bond lenghts (\AA)	0,037
Bond angles ($^\circ$)	6.641
Residues in most favored regions of the Ramachandran plot (%)	96
Residues in additionally allowed regions of the Ramachandran plot (%)	3
Residues in generously allowed regions of the Ramachandran plot (%)	1
Residues in disallowed regions of the Ramachandran plot (%)	0
Number of water molecules	108

^a $R_{\text{merge}} = \sum_h \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I(h)_i$, where $I(h)$ is the intensity of reflection h , \sum_h is the sum over all reflections and \sum_i is the sum over i measurements

^b $R_{\text{factor}} = 100 \times \Sigma |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \Sigma (F_{\text{obs}})$, the sums being taken over all reflections with $F / \sigma(F) > 2$ cutoff.

^c $R_{\text{free}} = R_{\text{factor}}$ for 10% of the data, which were not included during crystallographic refinement.

^d B values = average B values for all non-hydrogen atoms.

* Values in parenthesis refer to the highest resolution shell

CAPÍTULO 4

4. Estudo da essencialidade da sequência de DNA correspondente ao gene *cdd* de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a través do nocaute gênico

4. Estudo da essencialidade da sequência de DNA correspondente ao gene *cdd* de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a través do nocaute gênico

O uso de técnicas de biologia molecular aplicado a micobactérias começou em 1985, com a construção das primeiras bibliotecas genômicas de DNA micobacteriano em *E. coli*. Dois anos mais tarde, foi desenvolvido o primeiro vetor que permitia a introdução de DNA recombinante no bacilo (56). Desde então, numerosas e eficientes ferramentas genéticas que auxiliam na transformação e na seleção da micobactéria recombinante foram estabelecidas. No entanto, alguns fatores dificultam a manipulação genética de micobactérias, entre eles encontram-se: o crescimento lento do *Mycobacterium tuberculosis*; tendência das células a formar agregados; resistência da parede celular a lise enzimática e mecânica, dificultando a obtenção de ácidos nucleicos; baixa eficiência de transformação; e, principalmente, falta de sistemas de transferência genética natural (57).

Contudo, a manipulação genética de micobactérias se tornou possível com a utilização de métodos de mutagênese sítio-direcionada, tecnologia de microarranjos aliada ao sequenciamento completo do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Outro importante fato que auxiliou o avanço foi o desenvolvimento de vetores baseados em micobacteriófagos (vírus que infectam micobactérias) e em plasmídeos micobacterianos que ocorrem naturalmente (58).

A mutagênese sítio-direcionada por substituição gênica, troca alélica, também conhecida como nocaute gênico (elisão ou inativação de um ou mais genes), é uma técnica genética importante que permite a substituição específica de uma determinada sequência gênica por uma cópia contendo mutações definidas, possibilitando a avaliação da função gênica (59).

A substituição gênica por recombinação homóloga é uma ferramenta que auxilia no entendimento da biologia e na importância de genes específicos na virulência do *M. tuberculosis*, podendo resultar na obtenção de cepas atenuadas como candidatas a vacinas a fim de prevenir o estabelecimento da infecção inicial da tuberculose.

A troca alélica envolve a introdução de DNA não replicativo (plasmídeo suicida) ou replicativo condicional (replicação a 32°C e não replicação a 39°C) carregando uma cópia do gene alvo, que dependendo da técnica pode ser elisada ou interrompida por um determinante de resistência a antibiótico, no DNA genômico. Um único evento de recombinação (*single crossing-over*, SCO) entre os dois alelos pode resultar na integração de todo o plasmídeo gerando uma cepa que carrega tanto a cópia selvagem do gene quanto a mutante. Se ocorrer dois eventos de recombinação (*double crossing-over*, DCO) há uma troca do alelo selvagem pela cópia mutante. As cepas com SCO podem se transformar em DCO quando um segundo evento de recombinação acontece (59).

Altos níveis de recombinação ilegítima (não homóloga) e/ou baixa frequência de recombinação homologa (menos de 10^{-3} eventos por célula) são observados em *M. tuberculosis* o que dificulta a obtenção de mutantes específicos (60). Este problema pode ser contornado pelo uso de marcadores de seleção e contra seleção que facilitam a triagem de mutantes. Os tipos de marcadores de seleção mais utilizados são os que conferem resistência a antibióticos, os visualizáveis (*lacZ*) e os de contra seleção (*sacB*), que foram otimizados para a triagem de mutantes de micobactérias, empregando vetores suicida (2). Os marcadores de seleção que conferem resistência a antibióticos são usados na seleção de transformantes e para distinguir eventos produtivos de recombinação daqueles gerados por resistência espontânea a antibióticos (como o caso de *lacZ*) (61). Outro marcador de seleção é o gene repórter, e entre os mais usados está o gene *xyIE*, que codifica a enzima catecol-2-3-desidrogenase e apresenta colônias amarelas quando verificado com catecol (62). O marcador de contra seleção, é usado para selecionar a ausência deste nos mutantes. Estes marcadores são genes cuja expressão em condições específicas de crescimento, é letal à sobrevivência do microrganismo que os contêm (63). O mais utilizado em micobactérias é, o gene *sacB*, que codifica uma enzima responsável pela hidrólise de sacarose produzindo polímeros de frutose de alto peso molecular que se acumulam no espaço periplasmático tornando-se letais para o bacilo. O sistema empregado para este trabalho utiliza o vetor pPR27*xyIE* que contém as propriedades seletivas do gene *sacB*, *xyIE* e da origem de replicação micobactérianas termossensível, (onde a 32°C o

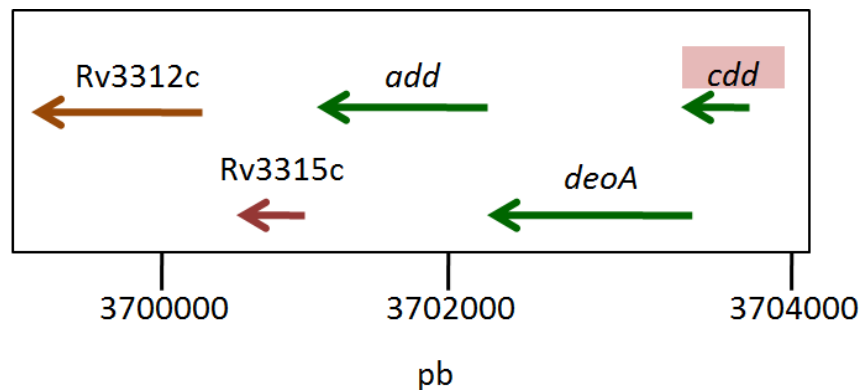
vetor replica e 39°C o vetor não replica), permitindo a seleção de mutantes contendo a inserção (62).

4.1 Localização do gene *cdd* no DNA genômico de *M. tuberculosis*

Vários genes do genoma bacteriano são ligados ou desligados por alterações no estado metabólico da célula. O mecanismo básico para esse controle da expressão gênica em bactérias foi descrito com o modelo do operon, proposto em 1961 por Francois Jacob e Jacques Monod (34).

O operon é descrito como um conjunto de genes, que se encontram funcionalmente relacionados, contíguos e que estão sob controle coordenado, sendo todos transcritos em uma molécula de RNA. Um óperon é constituído basicamente pelos genes estruturais e reguladores, que levam a informação para traduzir em proteínas; uma região promotora onde a RNA polimerase se liga ao DNA para começar a transcrição e uma região operadora contendo uma sequência de DNA que é reconhecida pela proteína reguladora, esta proteína é codificada pelo gene regulador. O indutor é um substrato ou composto cuja presença ou ausência induz a expressão de outros genes situados no operon. Ele pode agir ativando a expressão, ou gene ativador, ou reprimindo, através do gene repressor (34).

Assim como muitos genes que se encontram agrupados em operons, o gene *cdd* pertence ao operon *add-cdd* (figura 16) que consiste de três genes com orientação negativa.

Figura 16. Operon add-cdd

Fonte: Adaptado da TB database (64).

O primeiro gene do óperon é o gene *cdd* (Rv3315c) que codifica a enzima CDA com 133 aminoácidos. Possui 402 pares de bases (pb) e está localizado na posição 3703.865 pb no genoma de *M. tuberculosis*.

O segundo gene é *deoA* (Rv3314c) codifica a enzima timidina fosforilase com 427 aminoácidos. Possui 1284 pb e está localizado aos 3703.467 pb no genoma de *M. tuberculosis*.

O terceiro gene do óperon é o *add* (Rv3313c) que codifica a enzima adenosina deaminase com 365 aminoácidos. Possui 1098 pb e está localizado aos 3702184 pb no genoma de *M. tuberculosis*.

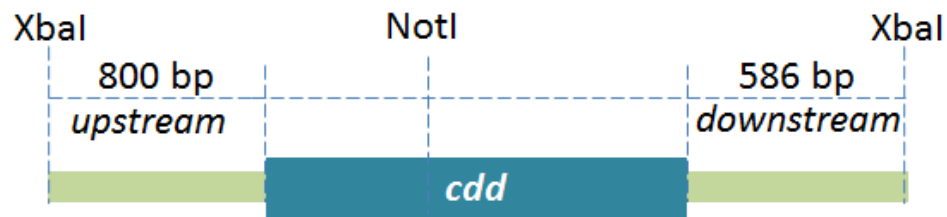
Estes genes estão envolvidos na rota de biossíntese de nucleotídeos, tanto de purinas (*add*) quanto pirimidinas (*cdd* e *deoA*).

4.2 Construção da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv nocaute para o gene *cdd*

O fragmento de DNA incluindo o gene *cdd* (402pb) e regiões flangeadoras *upstream* (800 pb) e *downstream* (586 pb) ao gene (tamanho total de 1788 pb) foi amplificado a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv utilizando dois oligonucleotídeos iniciadores (5'-TTTTTCTAGACCCAGCGTTGGGCAACGAAGT-3' e 5'-

TTTTTCTAGAGCACCCCTCAGCCAGCTTCTTG-3') complementares as porções 5' e 3' flanqueadoras do gene *cdd*, contendo sítios para a enzima de restrição *Xba*I (sublinhados) (Figura 17).

Figura 17. Fragmento de DNA contendo o gene *cdd* e regiões flanqueadoras amplificado a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv



Fonte: Produção do próprio autor do trabalho.

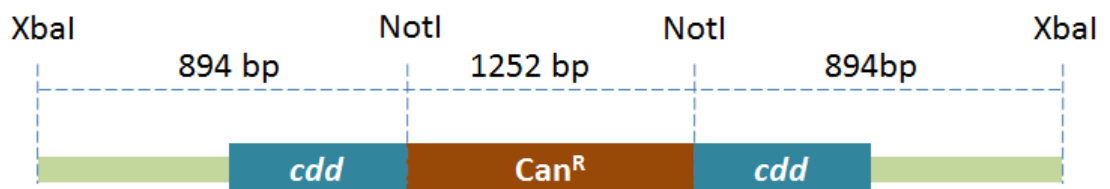
O fragmento de DNA amplificado foi clonado no vetor pUC19 utilizando o sítio de restrição *Xba*I. O vetor pUC19 possui características que permitem a obtenção e seleção de clones contendo o plasmídeo com inserto, entre elas: a alta taxa de replicação; a presença do gene *lacZ* no sítio múltiplo de clonagem do vetor, que codifica para a enzima β -galactosidase responsável por catalisar a clivagem da galactose e pode ter sua expressão induzida com IPTG. Quando não há inserção de fragmento de DNA, o gene *lacZ* é transcrito normalmente. O reagente 5-bromo-4cloro-3-indolil- β -D-galactosídio (X-gal), um análogo da galactose, é adicionado ao meio de cultivo e, depois de metabolizado pela enzima β -galactosidase, a colônia apresenta coloração azul. As bactérias contendo o plasmídeo com o inserto apresentam colônias brancas, uma vez que o gene *lacZ* não será transcrito e, conseqüentemente, o X-gal não será metabolizado (65), (66).

A ligação do plasmídeo pUC19 com o fragmento de DNA contendo o gene *cdd* e regiões flanqueadoras (pUC19::*cdd*) foi transformada em células eletrocompetentes de *E. coli* (DH10B) e semeada em meio de cultivo LB sólido contendo ampicilina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (antibiótico de resistência do vetor), X-gal $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ e IPTG $0,5 \text{ mM}$ com posterior propagação em meio LB líquido, utilizando o

mesmos antibiótico. O isolamento do DNA plasmidial das células transformadas foi realizado utilizando o kit de purificação (Qiaprep Spin Miniprep - Qiagen). A triagem dos clones que continham o inserto foi realizada utilizando a enzima de restrição *Xba*I e analisada por eletroforese em gel de agarose 1%. O sequenciamento de DNA confirmou a identidade e integridade do gene *cdd* e das regiões flanqueadoras e mostrou que nenhuma mutação ocorreu na etapa de amplificação.

Após a obtenção da construção pUC19::*cdd*, o gene *cdd* foi interrompido pela inserção de um cassete no sítio de restrição *Not*I que está presente naturalmente na sequência do gene em questão (pUC19 *cdd*::*can*) (Figura 18). Este cassete (1252 pb) contém um gene que confere resistência à canamicina (Can^R) e foi extraído previamente do vetor pUC4K, utilizando a enzima de restrição *Hin*CI.

Figura 18. Fragmento de DNA contendo o gene *cdd* interrompido pela inserção de um cassete contendo gene de resistência a canamicina e regiões flanqueadoras.



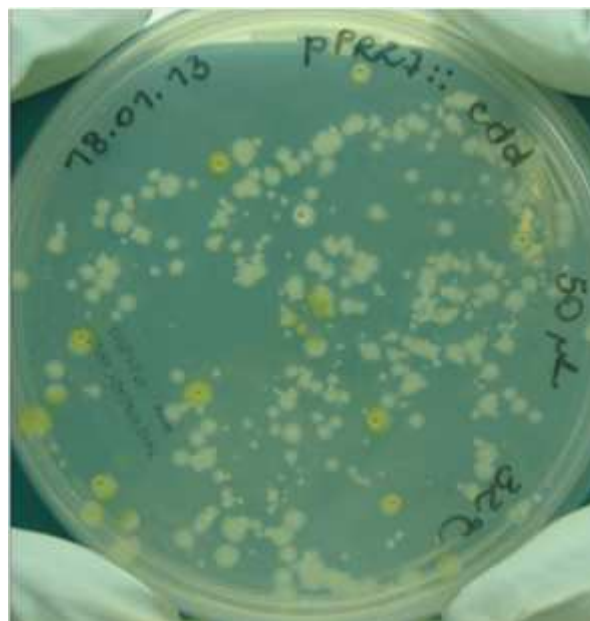
Fonte: Produção do próprio autor do trabalho.

A construção pUC19 *cdd*::*can* foi transformada em células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B, as células foram semeadas em meio LB sólido contendo canamicina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ e propagadas em meio LB líquido contendo o mesmo antibiótico. Posteriormente, o DNA plasmidial foi extraído e clivado com a enzima de restrição *Xba*I para a triagem dos clones e extração do inserto (*cdd can*) clonado no vetor pUC19. O inserto foi isolado e clonado no vetor pPR27*xy*I utilizando o sítio de restrição *Xba*I.

A construção pPR27*xy*I *cdd*::*can* foi transformada por eletroporação em *M. tuberculosis* H37Rv. As células foram recuperadas em 5 mL do meio de

cultura Middlebrook 7H9 Tween 80 0,05%, OADC 10% (complexo contendo ácido oleico, albumina, dextrose e catalase), por 48 horas a 32 °C, e foram semeadas em meio de cultura Middlebrook 7H10 OADC 10%, canamicina 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e incubadas a 32 °C. Após aproximadamente um mês de cultivo, colônias amarelas foram observadas pela adição de 1% de catecol as colônias (Figura 19).

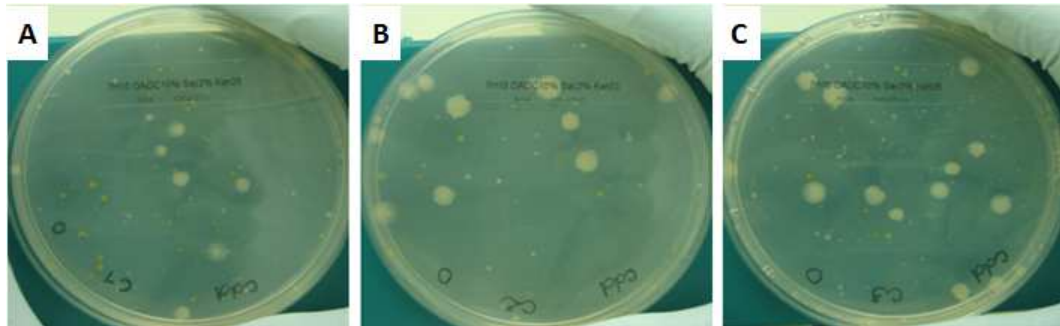
Figura 19. Seleção de colônias recombinantes após transformação de *M. tuberculosis* H37Rv com o plasmídio pPR27xyIE cdd::can incubados a 32 °C



Fonte: Produção do próprio autor do trabalho.

Três colônias amarelas (Can^R e xyIE^+) foram inoculadas em 5 mL do meio de cultivo Middlebrook 7H9 tween 80 0,05%, OADC 10%, canamicina 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 32°C e incubadas por aproximadamente um mês. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada (0, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) utilizando meio de cultura e 200 μL de cada diluição foram semeados em Middlebrook 7H10 OADC 10% contendo canamicina 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e sacarose 2%. As placas foram incubadas a 39 °C durante aproximadamente um mês e, então, as colônias foram selecionadas após a adição de 1% de catecol. Todas as colônias grandes apresentaram coloração branca (sac^R , can^R e xyIE) (Figura 20), sugerindo que a troca alélica ocorreu.

Figura 20. Seleção de clones mutantes para o gene *cdd* em placas contendo meio de cultivo Middlebrook 7H10 OADC 10% contendo canamicina $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e sacarose 2% incubadas a 39°C .



Fonte: Produção do próprio autor.

Legenda: A, B e C, clones 1, 2 e 3 receptivamente.

Nove colônias brancas foram inoculadas separadamente em 5 mL do meio de cultura Middlebrook 7H9 Tween 80 0,05%, OADC 10%, canamicina 25 mg mL^{-1} a 37°C e incubadas durante aproximadamente um mês. O DNA genômico dos nove clones foi extraído.

Para verificar a obtenção de mutantes, ou seja, eventos de DCO, dois *primers* (5'-GTGTCTTTGCGGCTGTAGTC-3' e 5'-GGGCAGTTCATCTCCGTCA-3') que anelam fora da região clonada no vetor pPR27*xyIE* foram utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR). Três diferentes eventos podem ter ocorrido (67):

1) *single crossing-over* (SCO): nenhum fragmento seria observado após PCR, uma vez que o fragmento a ser amplificado seria muito grande (aproximadamente 15.000 pb) devido à inserção do corpo do vetor pPR27*xyIE* no DNA genômico juntamente com a cópia do gene *cdd* interrompida e a cópia selvagem;

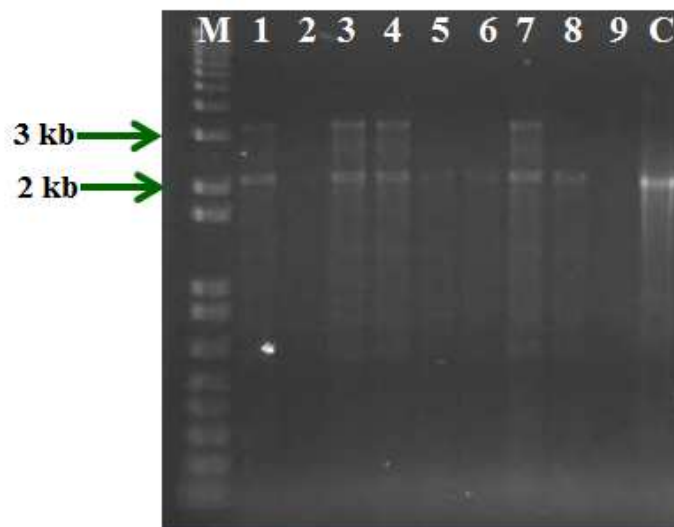
2) Recombinação ilegítima: um fragmento do tamanho de 1.788 pb seria observado, que é o tamanho referente à cópia selvagem do gene *cdd* e das regiões flanqueadoras, uma vez que a recombinação do pPR27*xyIE* *cdd*::*can* ocorreria de forma não homóloga entre qualquer parte do plasmídeo e do cromossomo, sendo inserido em qualquer região;

3) *double crossing-over* (DCO): um fragmento de 3.200 pb seria obtido devido à presença do cassete contendo o gene que confere resistência à canamicina interrompendo o gene *cdd*;

Nove clones foram analisados e conforme mostrado na figura 21, quatro clones possuíam o gene *cdd* interrompido pelo cassete de canamicina (DCO). Os clones 1 – 9 apresentaram uma banda de aproximadamente 2.000 pb que poderia ser relacionada com uma cópia selvagem do gene *cdd*, como observado no controle (cepa selvagem H37Rv) (Figura 21). O DNA referente a esta banda foi isolado e analisado por sequenciamento automático de DNA que mostrou que o fragmento de 2.000 pb é uma amplificação inespecífica da PCR que não corresponde a uma cópia selvagem do gene *cdd*.

Portanto, o gene *cdd* não é essencial para o crescimento de *M. tuberculosis* H37Rv nas condições empregadas no experimento.

Figura 21. Triagem das cepas de *M. tuberculosis* mutantes para o gene *cdd*.



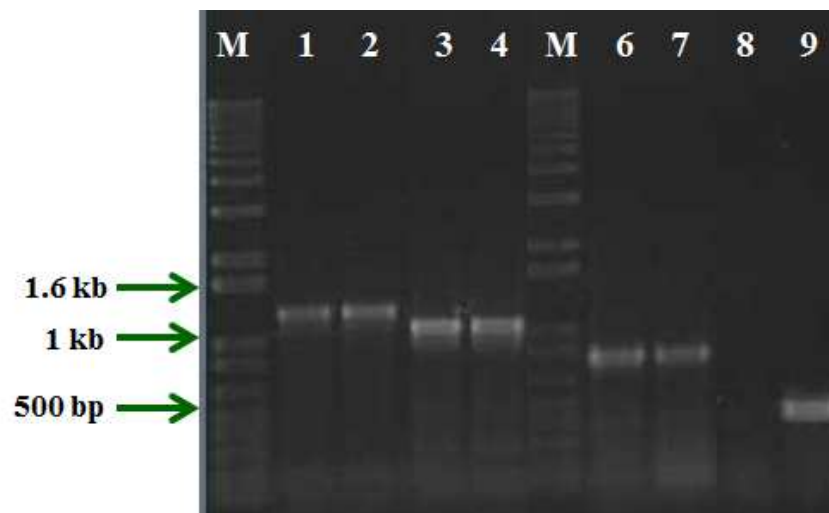
Fonte: Produção do próprio autor do trabalho.

Legenda: M: Marcador de DNA 1 kb plus, Linha 1 – 9: clones, C: controle (DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv).

A fim de determinar se a cepa mutante expressa os genes *cdd*, *deoA* e *add* a nível de RNA, o RNA da cepa selvagem e da cepa mutante foi extraído, e uma reação com a transcriptase reversa e PCR (RT-PCR) foi realizada a fim de obter DNA cópia (cDNA).

A partir do cDNA foi realizada a PCR para amplificar os três genes do operon *add-cdd* e o gene *pyrH* (codifica a enzima uridine monofosfato quinase) que foi utilizado como controle positivo para a amplificação de cDNA. Como observado na figura 22, o gene *cdd* foi amplificado apenas na cepa selvagem, enquanto os outros genes do operon (*deoA* e *add*) e o controle (*pyrH*) foram amplificados em ambas cepas. Estes resultados indicam que o gene *cdd* não está sendo transcrito na cepa mutante, confirmando a deleção gênica a nível transcricional. Além disso, os resultados obtidos mostram que a inserção do cassete no gene *cdd* não exerceu efeito polar na transcrição dos genes *deoA* e *add*.

Figura 22. Expressão de RNA dos genes *cdd*, *deoA* e *add*.



Fonte: Produção do próprio autor do trabalho.

Legenda: O RNA foi extraído da cepa mutante para o gene *cdd* (Linha 1, 3, 6 e 8), da cepa selvagem de *M. tuberculosis* H37Rv (Linhas 2, 4, 7 e 9). M: marcador de DNA 1 kb plus DNA Ladder, Linhas 1 e 2: amplificação do gene *deoA* a partir do cDNA (1248 pb), Linhas 3 e 4: amplificação do gene *add* a partir do cDNA (1098 pb), Linhas 6 e 7: amplificação do gene *pyrH* a partir do cDNA (786 pb) (controle positivo); Linhas 8 e 9: amplificação do gene *cdd* a partir do cDNA (402 pb).

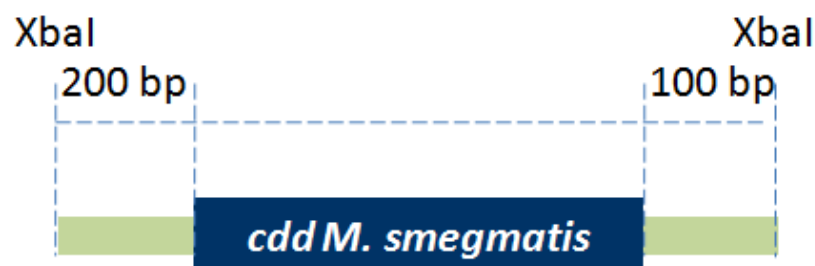
4.3 Construção da cepa de *M. tuberculosis* H37Rv nocaute para o gene *cdd* complementada com uma cópia extra do gene *cdd* de *M. smegmatis*

A cepa de *M. tuberculosis* H37Rv nocaute para o gene *cdd* foi complementada com uma cópia extra do gene *cdd*, para ser utilizada como controle nos experimentos subsequentes, mostrando que a estratégia de nocaute utilizada afetou apenas o gene em questão. Assim, a cepa de *M. tuberculosis* H37Rv mutante para o gene *cdd* foi complementada com o vetor pNIP40 contendo uma cópia extra do gene *cdd* de *Mycobacterium smegmatis* (Msmeg_1673, gene ortólogo ao gene *cdd* de *M. tuberculosis*).

O vetor pNIP40 é um vetor integrativo que contém o gene *hygB* que confere resistência a higromicina, e a região integrativa *attP* do micobacteriofago Ms6. Esta região permite a integração dentro do cromossoma bacteriano através de um evento de recombinação sítio específica, este processo envolve a presença de uma sequência comum no fago (*attP*) e na bactéria (*attB*), as quais são idênticas(59). Estas características permitiram a integração do gene *cdd* de *M. smegmatis* no DNA genômico da cepa, de *M. tuberculosis* H37Rv nocaute para o gene *cdd*.

Dois *primers* (5'-TTTTTCTAGAGGGGGACCGGTCTGTCTCGACTAGA-3' e 5'-TTTTTCTAGATGGCGCGTTCGATACCCGGATC-3') contendo sítios para a enzima de restrição *Xba*I (sublinhados) foram utilizados para amplificar o gene *cdd* de *M. smegmatis* flanqueado por 220 pb *upstream* e 100 pb *downstream* (tamanho total de 683 pb) (figura 23).

Figura 23. Fragmento amplificado a partir do DNA genômico de *M. smegmatis*



Fonte: Produção do próprio autor do trabalho.

Este fragmento de DNA foi clonado no vetor pNIP40 utilizando o sítio de restrição *Xba*I (pNIP40::*Ms_cdd*) e seguindo os mesmos passos de seleção de culturas e isolamento descritos acima, porém com o antibiótico de resistência específico para este vetor (higromicina). O sequenciamento automático de DNA confirmou a identidade e integridade do gene *cdd*, mostrando que nenhuma mutação ocorreu nas etapas de amplificação e clonagem.

4.4 Modelo de infecção em camundongos

Com a obtenção de colônias viáveis de *M. tuberculosis* H37Rv, demonstrou-se a não essencialidade do gene para o crescimento *in vitro* do bacilo. A seguir, com a finalidade de determinar se a mutação no gene *cdd* interfere na infecção e virulência do bacilo, foi realizada a infecção de camundongos com as cepas de *M. tuberculosis* H37Rv e nocaute para o gene *cdd*. A metodologia utilizada está descrita abaixo.

4.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* (machos) pesando entre 25 e 30 g, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL; Pelotas, RS). O N total de animais utilizado no presente estudo foi de oito camundongos. Os animais foram mantidos, até atingirem o peso desejado, no Vivário do Prédio 8, da PUCRS, em microisoladores, equipados com filtros de entrada e saída de ar (marca Alesco), com temperatura controlada (22 ± 1 °C) e ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 7 h; luzes apagadas às 19 h). Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas para roedores, preenchidas com maravalha de pinus (troca três vezes por semana), em número de quatro animais por gaiola. Os animais receberam ração peletizada (marca Nuvilab®) e água filtrada *ad libitum*. Nenhum procedimento experimental foi realizado no espaço destinado à manutenção dos animais, a fim de evitar a produção de qualquer tipo de estresse comportamental.

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Testes Pré-Clínicos, localizado no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Prédio 92A, do TecnoPUC. Durante os procedimentos experimentais, a temperatura do laboratório foi mantida em 22 ± 1 °C. Foi utilizado um tempo mínimo de adaptação ao novo ambiente de pelo menos 96 h, no qual os animais continuaram com livre acesso à água e à ração. Todos os experimentos foram realizados entre 8 h e 18 h.

Os procedimentos experimentais seguiram as recomendações para o cuidado com animais de laboratório e normas éticas para a experimentação em animais conscientes, do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do *National Institutes of Health* (NIH) dos Estados Unidos da América, que são adotadas pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Foram respeitados os preceitos apresentados na Lei Nº 11.794, de 9 de outubro de 2008 e todos os procedimentos foram submetidos à apreciação e aprovação do Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Anexo 2).

4.4.2 Distribuição dos grupos

Os animais foram divididos em dois grupos. Cada grupo composto por quatro animais:

- Quatro animais infectados com a cepa selvagem *M. tuberculosis* H37Rv
- Quatro animais infectados com a cepa nocaute *MtCDA* ($\Delta MtCDA$)

4.4.3 Infecção com *M. tuberculosis*

A infecção com as diferentes cepas de *M. tuberculosis* foi realizada de acordo com a técnica descrita por Chambers *et. al.* 2005 (68), com alguma adaptações. Para tanto, os animais foram anestesiados através da administração intraperitoneal de quetamina (100 mg/kg, i.p.) e xilazina (10

mg/kg, i.p.) e, após a confirmação do estado de anestesia, receberam uma injeção endovenosa, através do plexo venoso retro-orbital, de uma suspensão da cada cepa (H37Rv, $\Delta MtCDA$) de *M. tuberculosis* contendo aproximadamente 1×10^7 bacilos viáveis em 0,2 ml de solução salina estéril. Os procedimentos para a inoculação do bacilo foram realizados dentro de uma Cabine de Segurança Biológica com Nível de Segurança II, sendo respeitadas todas as normas técnicas necessárias para este tipo de procedimento.

4.4.4 Eutanásia

Vinte e oito dias após a infecção, a eutanásia foi realizada pela inalação de isoflurano. Todo o material biológico foi autoclavado antes do descarte (134°C, 30 min, autoclave de duas portas, Phoenix, São Paulo). Depois da esterilização em autoclave, os restos biológicos foram congelados em freezer -20°C, até o recolhimento por pessoal especializado (Prefeitura Universitária, PUCRS).

4.4.5 Quantificação de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

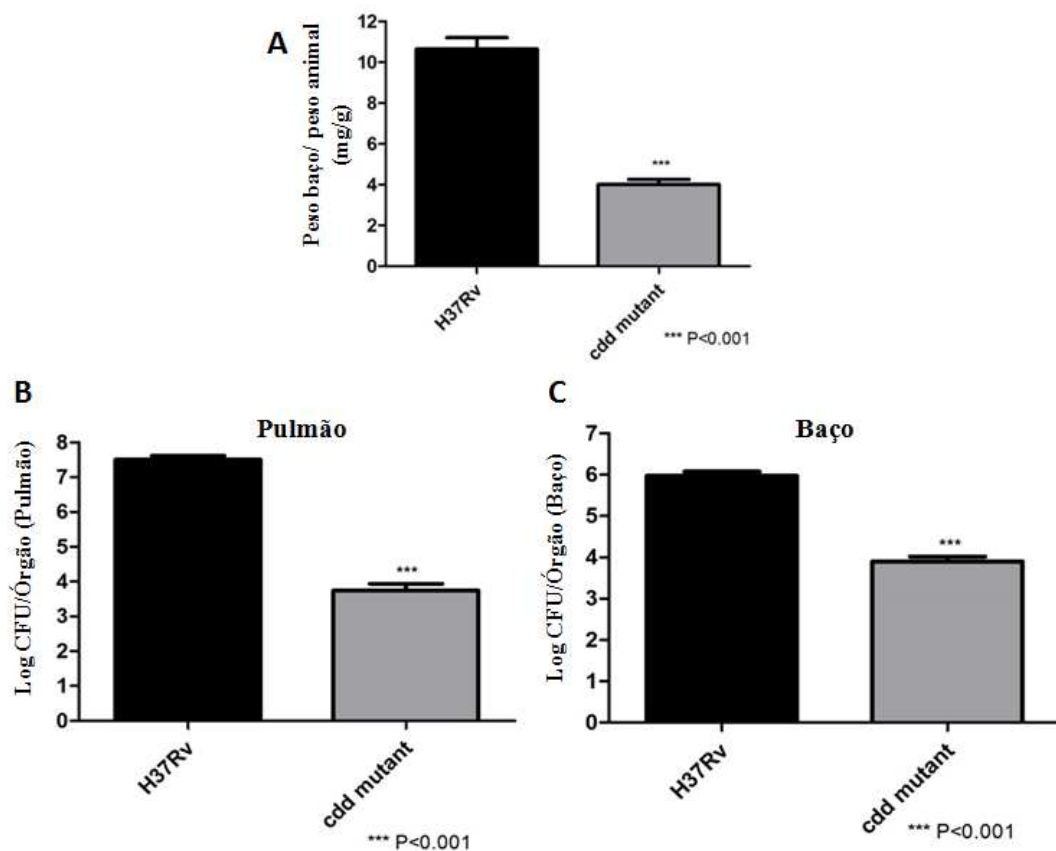
Os quatro animais de cada grupo foram eutanasiados ao completar 28 dias após a infecção. O baço e o pulmão esquerdo foram assepticamente removidos e homogeneizados em solução salina (3 ml). O material biológico homogeneizado (puro ou diluído 1:10, 1:100 ou 1:1000) foi semeado em meio Middlebrook Ágar 7H10, suplementado com 10% de OADC. Avaliou-se, no dia da eutanásia, o tamanho dos baços destes animais e observou-se que os animais infectados com a cepa selvagem H37Rv apresentaram o tamanho do baço estatisticamente maior, quando comparados ao grupo de animais infetados com a cepa mutante (Figura 24A). Experimentos realizados previamente por nosso grupo, a fim de padronizar o modelo de infecção por *M. tuberculosis* H37Rv em camundongos, mostrou que o grupo controle, não

infectado com *M. tuberculosis*, apresentou uma relação de tamanho do baço de 2,5 mg/g de peso do animal, o que representaria o tamanho normal do baço.

Após quatro semanas, foi feita a contagem de UFCs. Foi observado que a carga bacteriana foi estatisticamente maior nos animais infectados com a cepa selvagem H37Rv, quando comparado ao grupo de animais infectados com a cepa mutante do gene *cdd*, nos pulmões e nos baços (Figuras 24B e 24C respectivamente).

Contudo, é necessária a confirmação dos resultados obtidos, e para isto um próximo experimento será realizado incluindo um grupo adicional de animais, que será infectado com a cepa nocaute complementada, a qual espera-se que recupere o fenótipo selvagem. Assim, poderá ser confirmado que os efeitos observados são, de fato, devidos à deleção no gene *cdd* de *M. tuberculosis*.

Figura 24. Infecção em camundongos, tamanho dos baços e contagem de UFCs.



Fonte: Produção do próprio autor do trabalho.

Legenda: (A) tamanho dos baços, (B) CFUs nos pulmões; (C) CFUs nos baços.

CAPÍTULO 5

5.Considerações finais

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A TB é uma doença infecciosa causada principalmente pelo bacilo *M. tuberculosis*. Apesar da vacina BCG e todos os medicamentos disponíveis atualmente, a tuberculose ainda é um problema de saúde pública mundial. O surgimento de cepas resistentes, multirresistentes e totalmente resistentes (MDR, XDR e TDR) constituem outro sério problema para o controle e erradicação da TB principalmente em pacientes co-infectados com HIV. Portanto é necessário o desenvolvimento de novos compostos mais efetivos contra a TB que diminuam o período do tratamento. Uma das características mais importantes do patógeno causador da TB é sua capacidade de persistir no hospedeiro humano por longos períodos em estado de latência, esta forma latente agrava o controle da doença. Desta maneira, genes que são fundamentais para a sobrevivência do bacilo na fase de latência se mostram agora pontos de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos que possam impedir a sua reativação da forma ativa da TB.

Por outro lado, quando se pensa em controlar ou prevenir uma infecção inicial o desenvolvimento de novas e mais efetivas vacinas é fundamental. Portanto a obtenção de cepas de *M. tuberculosis* atenuadas pela deleção de genes importantes para a virulência do bacilo, pode ajudar ao encontrar novos candidatos a vacinas. Consequentemente, a vigilância do tratamento e pesquisas avançadas para o desenvolvimento de novas vacinas e fármacos tornam-se uma prioridade na luta contra a TB. Neste contexto, proteínas e rotas bioquímicas que nos permitam conhecer a adaptação metabólica do bacilo tem se tornado alvos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas.

A CDA faz parte da via de salvamento de pirimidinas que representa um menor gasto de energia para o bacilo quando comparada com a via de biossíntese *de novo*, podendo ser preferencialmente utilizada pelo bacilo na fase de latência. Estudos mostram que mutantes de enzimas desta rota metabólica poderiam afetar o crescimento e vários estados fisiológicos na fase de latência do bacilo o que faz das enzimas desta rota um alvo potencial para o

desenvolvimento de fármacos e vacinas visando o controle da disseminação da TB no mundo.

Já foi demonstrado experimentalmente que o gene Rv3315c de *M. tuberculosis* codifica uma CDA que catalisa preferencialmente a deaminação de citidina e deoxicidina. Experimentos de cristalografia possibilitaram a determinação da estrutura da enzima e mostraram que a CDA é um tetrâmero que utiliza Zn^{2+} para sua atividade (metaloenzima) (43).

Com a estrutura da forma apo da *MtCDA* já resolvida (Sánchez-Quitian *et. al.*, 2010) foi realizada a caracterização estrutural da *MtCDA* complexada com os produtos da reação (**Capítulo 2**). A caracterização estrutural dos padrões da ligação do produto a *MtCDA* foi determinada, elucidando os principais resíduos envolvidos na ligação dos produtos. Além disso, os resultados destacam que a estrutura quaternária *MtCDA* segue o mesmo dobramento observado em CDAs de diferente organismos. A análise do sítio ativo mostra que os resíduos Asn45, Glu47, Ala57, Cys89, Cys92 (**Figura 6 – Capítulo 2**) são essenciais para reconhecimento do produto pela *MtCDA*. As simulações de dinâmica molecular (MD) corroboraram com o empacotamento proposto, mostrando que os resíduos Tyr51, Val49 e Phe123 apresentam um papel importante no sítio ativo das subunidades adjacentes (A- D e B - C). As simulações realizadas com as estruturas tetramérica e monomérica da *MtCDA* sugerem que o estado oligomérico é essencial para a estabilização do ligante no sítio ativo da enzima, mostrando a importância da interação proteína-proteína.

Estes resultados possibilitaram o melhor entendimento da catálise e destacam a importância do tetrâmero na estabilidade da ligação. Os resultados obtidos foram reunidos em um manuscrito publicado na revista internacional *Archives of Biochemistry and Biophysics* (**Capítulo 2**).

Estudos de perfil de pH e alinhamento de sequências de aminoácidos permitiram estabelecer para *MtCDA* os possíveis resíduos envolvidos na catálise e ligação ao substrato (43), destacando a importância do glutamato 47 (E47) na catálise e/ou ligação ao substrato. Visando caracterizar o papel do resíduo glutamato 47 na ligação e /ou catálise do substrato, oligomerização da proteína e coordenação pelo zinco foi empregada a metodologia de mutagênese sítio-direcionada para produzir cinco mutantes do mesmo resíduo

(Capítulo 3). As substituições escolhidas foram; o resíduo glutamato 47 substituído pela alanina (E47A) que não possui a porção ácida, a histidina (E47H) aminoácido básico e que faz pontes de hidrogênio, a lisina (E47L) sem porção ácida, não forma pontes de hidrogênio, mas conserva o volume da cadeia de carbonos laterais do glutamato, ácido aspártico (E47D) conserva a propriedade ácida do glutamato, mas tem um encurtamento da cadeia lateral e o resíduo glutamina (E47Q) que não tem porção ácida, faz pontes de hidrogênio e continua hidrofílico .

As proteínas mutantes foram expressas na cepa de *E. coli* BL21(DE3), sendo que a E47A e E47H expressaram na fração insolúvel em todos os testes realizados, incluindo variações na temperatura e meio de cultivo (dados não apresentados) enquanto que para a E47L foi necessário o uso DMSO 6% no meio TB para otimizar a expressão na forma solúvel. As proteínas mutantes (E47D, E47L e E47Q) foram obtidas na sua forma homogênea a partir de um protocolo incluindo três etapas cromatográficas. A determinação da massa molecular intacta e o sequenciamento peptídico confirmaram a identidade das proteínas mutantes observando a mutação desejada na posição 47 (resíduo glutamato 47 substituído pela alanina (E47A), histidina (E47H), lisina (E47L), ácido aspártico (E47D) e glutamina (E47Q).

A determinação do estado oligomérico das proteínas mutantes confirmou a natureza tetramérica de todas elas sugerindo que a mutação não afeta a conformação da proteína. Além disso, foi possível identificar a presença do íon zinco por subunidade das enzimas mutantes, indicando que, assim como a proteína selvagem, as mutantes conservam o íon zinco que é fundamental para a catálise do substrato.

A determinação das constantes cinéticas para as mutantes E47D e E47Q (que apresentaram atividade) mostraram que os valores de K_M não foram significativamente alterados quando comparados com a enzima selvagem (wtCDA) o que sugere que o resíduo glutamato 47 não está envolvido na ligação ao substrato. No entanto, os valores obtidos para a constante catalítica (k_{cat}) apresentaram uma diminuição de 37 vezes para a E47D e 19 vezes para a E47Q. Estes resultados demonstram que mesmo preservando o grupo carboxil a diminuição da cadeia lateral de carbonos do aspartato (D) impede a catálise, enquanto que para o resíduo glutamina (Q), a eliminação da carga

negativa por conter uma amida na cadeia lateral que substitui a hidroxila do glutamato pode interferir na catálise.

A estrutura cristalográfica da *MtCDA* em complexo com o produto mostrou que a cadeia lateral do resíduo E47 interage com a ribose da uridina o que poderia estabilizar o produto para que aconteça a catálise. Portanto, as modificações que impeçam a correta interação podem vir a afetar a catálise.

Estes estudos contribuíram para o melhor entendimento do papel funcional das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise enzimática. Os resultados obtidos com os estudos bioquímicos das mutantes da *MtCDA*, apresentados no **capítulo 3**, foram reunidos em um manuscrito que foi submetido para a revista internacional *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Anexo 1).

A fim de determinar a importância da enzima CDA no metabolismo e na biologia do bacilo, o nocaute do gene *cdd* foi realizado, obtendo-se por recombinação homóloga a substituição do alelo tipo selvagem do gene pelo alelo mutado (**Capítulo 4**). Altos níveis de recombinação ilegítima (não homóloga) e/ou baixa frequência de recombinação homóloga são observados em *M. tuberculosis* o que dificulta a obtenção de mutantes para genes específicos. Visando contornar este obstáculo, o vetor pPR27xyIE foi utilizado, uma vez que suas propriedades seletivas evitam os problemas decorrentes da baixa eficiência de transformação e facilitam a seleção de transformantes. O protocolo empregado possibilitou a obtenção da cepa de *M. tuberculosis* mutante para o gene *cdd* e mostrou que o gene em questão não é essencial para o crescimento *in vitro* do bacilo nas condições experimentais utilizadas. Os resultados de nocaute gênico apresentados aqui corroboram com os dados obtidos em estudos de mutagênese utilizando transposons (69) e um modelo estatístico publicado recentemente (70).

A infecção em camundongos utilizando a cepa selvagem H37Rv e a cepa nocaute sugere que o gene *cdd* tem um papel na virulência do bacilo. Todos os experimentos envolvendo animais de experimentação contam com a aprovação da Comissão de ética no uso de animais (CEUA-PUCRS) (Anexo 2).

Os resultados obtidos proporcionaram um maior entendimento sobre o metabolismo de nucleotídeos em *M. tuberculosis* H37Rv, sugerindo o papel

biológico do gene *cdd* na micobactéria. Com tudo, experimentos envolvendo a infecção de macrófagos e camundongos com as cepas de *M. tuberculosis* mutante para o gene *cdd*, complementada e tipo selvagem deverão ser realizados para confirmar os dados iniciais e assim inferir a importância deste gene na infecção e virulência do *M. tuberculosis* H37Rv. Estes experimentos forneceram informações fundamentais que possibilitarão a avaliação da atenuação da cepa mutante como alvo para o desenvolvimento de uma nova vacina.

REFERÊNCIAS

1. Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption - a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(7):697-714.
2. Cole ST, Eisenach KD, N. MD, Jr. J. Tuberculosis and the Tubercle Bacillus, Washington, DC: ASM Press; 2005.
3. Dormandy T. The White Death: a history of tuberculosis, New York University Press; 1st edition, 2000.
4. World Health Organization, Global Tuberculosis Control: Report. 2013.
5. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, *et al*. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med*. 2003;163(9):1009-21.
6. Saúde Md. Teste rápido para diagnosticar tuberculose será oferecido pelo SUS2013. Endereço eletrônico: <http://www.brasil.gov.br/saude/2013/03/teste-rapido-para-diagnosticar-tuberculose-sera-oferecido-no-sus>. Acessado em 29 de janeiro de 2014.
7. World Health Organization, Global Tuberculosis Control: Report. 2003.
8. Organization WH. The Global Plan to Stop TB. 2011 - 2015.
9. Raviglione MC, Uplekar MW. WHO's new Stop TB Strategy. *Lancet*. 2006;367(9514):952-5.
10. Matteelli A, Migliori GB, Cirillo D, Centis R, Girard E, Raviglione M. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2007;5(5):857-71.
11. Lienhardt C, Davies G. Methodological issues in the design of clinical trials for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: challenges and opportunities. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2010;14(5):528-37.
12. Pablos-Mendez A, Gowda DK, Frieden TR. Controlling multidrug-resistant tuberculosis and access to expensive drugs: a rational framework. *Bull World Health Organ*. 2002;80(6):489-95.
13. Wise J. Southern Africa is moving swiftly to combat the threat of XDR-TB. *Bull World Health Organ*. 2006;84(12):924-5.

14. Dorman SE, Chaisson RE. From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nat Med*. 2007;13(3):295-8.
15. Migliori GB, De Iaco G, Besozzi G, Centis R, Cirillo DM. First tuberculosis cases in Italy resistant to all tested drugs. *Euro Surveill*. 2007;12(5):E070517.1.
16. Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, Tabarsi P, Ghanavi J, Ziazarifi AH, *et al*. Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in Iran. *Chest*. 2009;136(2):420-5.
17. Rowland K. Totally drug-resistant TB emerges in India. *Nature News*. 13 January 2012.
18. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, *et al*. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393(6685):537-44.
19. Gillespie SH. Tuberculosis: evolution in millennia and minutes. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(5):1317-20.
20. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Endereço eletrônico: (<http://phil.cdc.gov/phil/sessionexpired.asp>). Acessado em 15 de janeiro de 2014.
21. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2003;83(1-3):91-7.
22. Gao Q, Kripke K, Arinc Z, Voskuil M, Small P. Comparative expression studies of a complex phenotype: cord formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2004;84(3-4):188-96.
23. Maxmen A. Drug development: A combined effort. *Nature*. 2013;502(7470):S4-6.
24. Pieters J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe*. 2008;3(6):399-407.
25. Davis JM, Ramakrishnan L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell*. 2009;136(1):37-49.
26. Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(8):569-77.
27. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunol*. 2011;4(3):271-8.

28. Huynh KK, Joshi SA, Brown EJ. A delicate dance: host response to mycobacteria. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(4):464-72.
29. MADKOUR MM. *Tuberculosis*, 1st edn. Berlin: Springer; 2004.
30. Delogu G, Sali M, Fadda G. The Biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013;5(1):e2013070.
31. Andersen P. Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. *Trends Microbiol*. 2007;15(1):7-13.
32. Leyten EM, Lin MY, Franken KL, Friggen AH, Prins C, van Meijgaarden KE, et al. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*. 2006;8(8):2052-60.
33. Fang X, Wallqvist A, Reifman J. Modeling phenotypic metabolic adaptations of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv under hypoxia. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(9):e1002688.
34. Voet D, Voet J. *Biochemistry*. New Jersey: John Wiley & Sons; 3rd edition, 2006.
35. Neuhard J, Kelln RA. *Biosynthesis and conversion of pyrimidines*. 2nd ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology; 1996.
36. O'Donovan GA, Neuhard J. Pyrimidine metabolism in microorganisms. *Bacteriol Rev*. 1970;34(3):278-343.
37. Moffatt BA, Ashihara H. Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis Book*. 2002;1:e0018.
38. Villela AD, Sanchez-Quitian ZA, Ducati RG, Santos DS, Basso LA. Pyrimidine salvage pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Med Chem*. 2011;18:1286-98.
39. Jackson M, Berthet FX, Otal I, Rauzier J, Martin C, Gicquel B, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* purine biosynthetic pathway: isolation and characterization of the purC and purL genes. *Microbiology*. 1996;142 (9):2439-47.
40. Ulmer JE, Boum Y, Thouvenel CD, Myllykallio H, Sibley CH. Functional analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* FAD-dependent thymidylate synthase, ThyX, reveals new amino acid residues contributing to an extended ThyX motif. *J Bacteriol*. 2008;190(6):2056-64.

41. Cohen RM, Wolfenden R. Cytidine deaminase from *Escherichia coli*. Purification, properties and inhibition by the potential transition state analog 3,4,5,6-tetrahydrouridine. *J Biol Chem*. 1971;246(24):7561-5.
42. Wentworth DF, Wolfenden R. Cytidine deaminases (from *Escherichia coli* and human liver). *Methods Enzymol*. 1978;51:401-7.
43. Sanchez-Quitian ZA, Schneider CZ, Ducati RG, de Azevedo WF, Jr., Bloch C, Jr., Basso LA, et al. Structural and functional analyses of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3315c-encoded metal-dependent homotetrameric cytidine deaminase. *J Struct Biol*. 2010;169:413-23.
44. Weiss B. The deoxycytidine pathway for thymidylate synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2007;189(21):7922-6.
45. Smmith HC. RNA and DNA Editing: Molecular Mechanisms and their Integration into Biological Systems: John Wiley & Sons, Inc; 2008.
46. Liaw SH, Chang YJ, Lai CT, Chang HC, Chang GG. Crystal structure of *Bacillus subtilis* guanine deaminase: the first domain-swapped structure in the cytidine deaminase superfamily. *J Biol Chem*. 2004;279:35479-85.
47. Betts L, Xiang S, Short SA, Wolfenden R, Carter CW, Jr. Cytidine deaminase. The 2.3 Å crystal structure of an enzyme: transition-state analog complex. *J Mol Biol*. 1994;235:635-56.
48. Johansson E, Mejlhede N, Neuhard J, Larsen S. Crystal structure of the tetrameric cytidine deaminase from *Bacillus subtilis* at 2.0 Å resolution. *Biochemistry*. 2002;41:2563-70.
49. Chung SJ, Fromme JC, Verdine GL. Structure of human cytidine deaminase bound to a potent inhibitor. *J Med Chem*. 2005;48(3):658-60.
50. Matsubara T, Ishikura M, Aida M. A quantum chemical study of the catalysis for cytidine deaminase: contribution of the extra water molecule. *J Chem Inf Model*. 2006;46(3):1276-85.
51. Carlow DC, Carter CW, Mejlhede N, Neuhard J, Wolfenden R. Cytidine deaminases from *B. subtilis* and *E. coli*: compensating effects of changing zinc coordination and quaternary structure. *Biochemistry*. 1999;38(38):12258-65.
52. Sanchez-Quitian ZA, Timmers LF, Caceres RA, Rehm JG, Thompson CE, Basso LA, et al. Crystal structure determination and dynamic studies of *Mycobacterium tuberculosis* Cytidine deaminase in complex with products. *Arch Biochem Biophys*. 2011;509:108-15.

53. Vincenzetti S, Quadrini B, Mariani P, De Sanctis G, Cammertoni N, Polzonetti V, et al. Modulation of human cytidine deaminase by specific aminoacids involved in the intersubunit interactions. *Proteins*. 2008;70(1):144-56.
54. Somasekaram A, Jarmuz A, How A, Scott J, Navaratnam N. Intracellular localization of human cytidine deaminase. Identification of a functional nuclear localization signal. *J Biol Chem*. 1999;274(40):28405-12.
55. Smith R, Cattamanchi A, Steingart KR, Denking C, Dheda K, Winthrop KL, et al. Interferon-gamma release assays for diagnosis of latent tuberculosis infection: evidence in immune-mediated inflammatory disorders. *Curr Opin Rheumatol*. 2011.
56. Pelicic V, Reyrat JM, Gicquel B. Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol*. 1998;28(3):413-20.
57. Morsczech C. Strategies for mycobacterial genetics. *Int J Med Microbiol*. 2003;293(4):251-9.
58. Lewis JA, Hatfull GF. Identification and characterization of mycobacteriophage L5 excisionase. *Mol Microbiol*. 2000;35(2):350-60.
59. Parish T, Stoker NG. *Mycobacteria Protocols*: Humana Press; 1998.
60. McFadden J. Recombination in mycobacteria. *Mol Microbiol*. 1996;21(2):205-11.
61. Machowski EE, Dawes S, Mizrahi V. TB tools to tell the tale-molecular genetic methods for mycobacterial research. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(1):54-68.
62. Pelicic V, Jackson M, Reyrat JM, Jacobs WR, Gicquel B, Guilhot C. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(20):10955-60.
63. Reyrat JM, Pelicic V, Gicquel B, Rappuoli R. Counterselectable markers: untapped tools for bacterial genetics and pathogenesis. *Infect Immun*. 1998;66(9):4011-7.
64. Tb database an integrate plataform for tuberculosis research. 2010. Endereço eletrônico: (<http://genome.tdb.org/annotation/genome/tbdb/FeatureDetails.html?sp=S7000001348648594&sp=ROperon>).

65. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 1985;33(1):103-19.
66. Vieira J, Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*. 1982;19(3):259-68.
67. Jackson M, Camacho LR, Gicquel B, Guilhot C. *Mycobacterium Tuberculosis Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2001.
68. Chambers HF, Turner J, Schechter GF, Kawamura M, Hopewell PC. Imipenem for treatment of tuberculosis in mice and humans. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(7):2816-21.
69. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol*. 2003;48(1):77-84.
70. DeJesus MA, Zhang YJ, Sassetti CM, Rubin EJ, Sacchettini JC, Iyer TR. Bayesian analysis of gene essentiality based on sequencing of transposon insertion libraries. *Bioinformatics*. 2013;29(6):695-703.

ANEXO A

Carta de submissão do manuscrito:
Functional and structural evidence for the catalytic role played by glutamate-47 residue in the mode of action of *Mycobacterium tuberculosis* cytidine deaminase

Zilpa Adriana Sánchez-Quitian, Valnês Rodrigues-Junior, Jacqueline Gonçalves Rehm, Rafael A. Caceres, Paula Eichler, Cristiano Valim Bizarro, Walter F. de Azevedo Jr, Osmar Norberto de Souza, Luiz Augusto Basso, Diógenes Santiago Santos

Artigo submetido para:

Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014

Article title: Functional and structural evidence for the catalytic role played by

Manuscript number: ABBI-14-53

Authors: Zilpa Adriana Sánchez-Quitiana, Valnês Rodrigues-Junior, Jacqueline Gonçalves Rehm, Rafael A. Caceres, Paula Eichler, Cristiano Valim Bizarro, Walter F. de Azevedo Jr, Osmar Norberto de Souza, Luiz Augusto Basso and Diógenes Santiago Santos.

Journal: Archives of Biochemistry and Biophysics

Dear Dr Basso,

Your submission entitled "Functional and structural evidence for the catalytic role played by glutamate-47 residue in the mode of action of Mycobacterium tuberculosis cytidine deaminase" has been received for consideration in Archives of Biochemistry and Biophysics.

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

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

This manuscript will be processed with the understanding that it:

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

For further details, please refer to the Guide for Authors printed in each issue of the journal and available on the journal home page:

<http://www.elsevier.com/locate/yabbi>

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

Kind regards,

Journal Editorial Office
E-mail: ABB@elsevier.com

ANEXO B

Carta de aprovação da Comissão de ética no uso de animais (CEUA-PUCRS)

Protocolo de pesquisa intitulado “Produção de anticorpos monoclonais para as enzimas citidina deaminase e hidrolase de nucleosídeo purínicos de *M. tuberculosis* e determinação da capacidade de virulência em modelos in vivo de infecção”

Registro CEUA 13/00355



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 108/13 - CEUA

Porto Alegre, 21 de novembro de 2013.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 13/00355, intitulado **“Produção de anticorpos monoclonais para as enzimas citidina deaminase e hidrolase de nucleosídeo purínicos de Mycobacterium tuberculosis e determinação da capacidade de virulência das cepas nocaute em modelos in vivo de infecção”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Atenciosamente,

Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.

Prof. Diógenes Santiago Santos

INTOX

Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1511

CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS

Fone: (51) 3353-6365

E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO C

Pyrimidine Salvage Pathway in
Mycobacterium tuberculosis

Anne D. Villela, Zilpa A. Sánchez-
Quitian, Rodrigo G. Ducati, Diógenes S.
Santos, Luiz A. Basso

Artigo publicado

*Archives of Biochemistry and
Biophysics*, 2011, 18: 1286 - 1298



Current Medicinal Chemistry

ISSN (Print): 0929-8673
 ISSN (Online): 1875-533X
 VOLUME: 18
 ISSUE: 9
 DOI: 10.2174/092986711795029555

[Back](#) [Rights & Permissions](#) [Download](#)

Pyrimidine Salvage Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*[†]

A.D. Villela^{1,2}, Z.A. Sánchez-Quitian^{1,2}, R.G. Ducati¹, D.S. Santos^{*1,2} and L.A. Basso^{*1,2}

¹Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ²Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Abstract: The causative agent of tuberculosis (TB), *Mycobacterium tuberculosis*, infects one-third of the world population. TB remains the leading cause of mortality due to a single bacterial pathogen. The worldwide increase in incidence of *M. tuberculosis* has been attributed to the high proliferation rates of multi and extensively drug-resistant strains, and to co-infection with the human immunodeficiency virus. There is thus a continuous requirement for studies on mycobacterial metabolism to identify promising targets for the development of new agents to combat TB. Singular characteristics of this pathogen, such as functional and structural features of enzymes involved in fundamental metabolic pathways, can be evaluated to identify possible targets for drug development. Enzymes involved in the pyrimidine salvage pathway might be attractive targets for rational drug design against TB, since this pathway is vital for all bacterial cells, and is composed of enzymes considerably different from those present in humans. Moreover, the enzymes of the pyrimidine salvage pathway might have an important role in the mycobacterial latent state, since *M. tuberculosis* has to recycle bases and/or nucleosides to survive in the hostile environment imposed by the host. The present review describes the enzymes of *M. tuberculosis* pyrimidine salvage pathway as attractive targets for the development of new antimycobacterial agents. Enzyme functional and structural data have been included to provide a broader knowledge on which to base the search for compounds with selective biological activity.

Keywords: Enzyme functional features, enzyme structural features, *Mycobacterium tuberculosis*, pyrimidine salvage pathway, rational drug design, tuberculosis.

ANEXO D

Combining molecular dynamics and docking simulations of the cytidine deaminase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Luís Fernando Saraiva Macedo Timmers, Rodrigo Gay Ducati, Zilpa Adriana Sánchez-Quitian, Luiz Augusto Basso, Diógenes Santiago Santos, Walter Filgueira de Azevedo Jr.

Artigo publicado

Journal of Molecular Model 2012, 18: 467–479

Combining molecular dynamics and docking simulations of the cytidine deaminase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Luis Fernando Saraiva Macedo Timmers · Rodrigo Gay Ducati · Zilpa Adriana Sánchez-Quitian · Luiz Augusto Basso · Diógenes Santiago Santos · Walter Filgueira de Azevedo Jr.

Received: 22 December 2010 / Accepted: 16 March 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Cytidine Deaminase (CD) is an evolutionarily conserved enzyme that participates in the pyrimidine salvage pathway recycling cytidine and deoxycytidine into uridine and deoxyuridine, respectively. Here, our goal is to apply computational techniques in the pursuit of potential inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* CD (MtCDA) enzyme activity. Molecular docking simulation was applied to find the possible hit compounds. Molecular dynamics simulations were also carried out to investigate the physically relevant motions involved in the protein-ligand recognition process, aiming at providing estimates for free energy of binding. The proposed approach was capable of

identifying a potential inhibitor, which was experimentally confirmed by IC₅₀ evaluation. Our findings open up the possibility to extend this protocol to different databases in order to find new potential inhibitors for promising targets based on a rational drug design process.

Keywords Free energy of binding · IC₅₀ determination · Molecular docking simulation · Molecular dynamics simulation

Introduction

Mycobacterium tuberculosis (*Mt*), the causative agent of tuberculosis (TB), is one of the main causes of human death due to a single infectious agent. According to the World Health Organization (WHO) approximately two billion people (one third of the world population) are infected with *Mt*, and, based on the last WHO report, there was an estimation of 9.27 million new TB cases in 2007 [1–4]. TB is considered a neglected disease, as the majority of the cases are reported in emergent countries. However, since the 1980s, TB has returned to Europe and to the United States of America. The resurgence of TB in developed countries has been tightly related to the emergence of co-infection with the Human Immunodeficiency Virus (HIV/AIDS) [5]. Thereby, the TB/HIV synergism has become a challenge for pharmaceutical companies.

New anti-TB drugs should, ideally, present the following characteristics: lower toxicity, decrease the length of the treatment thereby improving patients' compliance, and be effective against the latent form of *Mt* allowing prevention of reactivation of the disease. These criteria have been used in structural bioinformatics approaches, mainly when the

L. F. S. M. Timmers · W. F. de Azevedo Jr.
Faculdade de Biociências, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Laboratório de Bioquímica Estrutural (LaBioQuest), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619–900, Brazil

L. F. S. M. Timmers · Z. A. Sánchez-Quitian · L. A. Basso · D. S. Santos (✉) · W. F. de Azevedo Jr. (✉)
Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
e-mail: diogenes@pucrs.br

W.F. Azevedo
e-mail: walter@azevedolab.net

R. G. Ducati · Z. A. Sánchez-Quitian · L. A. Basso · D. S. Santos
Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619–900, Brazil

ANEXO E

Biochemical characterization of recombinant nucleoside hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Priscila L. Wink, Zilpa A. Sanchez Quitian, Leonardo A. Rosado, Valnês Rodrigues-Junior, Guilherme Petersen, Daniel M. Lorenzini, Thiago Lipinski-Paes, Luís Fernando Saraiva Macedo Timmers, Osmar Norberto de Souza, Diógenes S. Santos, Luiz A. Basso

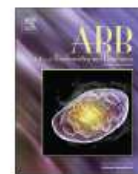
Artigo publicado

Archives of Biochemistry and Biophysics, 2013, 538: 80 – 94.



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Biochemistry and Biophysics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabbi

Biochemical characterization of recombinant nucleoside hydrolase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv



Priscila Lamb Wink^{a,b}, Zilpa Adriana Sanchez Quitian^{a,b}, Leonardo Astolfi Rosado^{a,b}, Valnes da Silva Rodrigues Júnior^a, Guilherme Oliveira Petersen^{a,b}, Daniel Macedo Lorenzini^a, Thiago Lipinski-Paes^c, Luis Fernando Saraiva Macedo Timmers^{a,c}, Osmar Norberto de Souza^{b,c}, Luiz Augusto Basso^{a,b,*}, Diogenes Santiago Santos^{a,b,*}

^aCentro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 6681/92-A Av. Ipiranga, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^bPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

^cLaboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas (LABIO), Faculdade de Informática, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2013
and in revised form 13 August 2013
Available online 26 August 2013

Keywords:

Mycobacterium tuberculosis
Nucleoside hydrolase
Substrate specificity
Thermodynamics
pH-rate profile
Spectrofluorimetry

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a major global health threat. There is a need for the development of more efficient drugs for the sterilization of the disease's causative agent, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). A more comprehensive understanding of the bacilli's nucleotide metabolic pathways could aid in the development of new anti-mycobacterial drugs. Here we describe expression and purification of recombinant *iunH*-encoded nucleoside hydrolase from MTB (*MtIAGU-NH*). Glutaraldehyde cross-linking results indicate that *MtIAGU-NH* predominates as a monomer, presenting varied oligomeric states depending upon binding of ligands. Steady-state kinetics results show that *MtIAGU-NH* has broad substrate specificity, accepting inosine, adenosine, guanosine, and uridine as substrates. Inosine and adenosine displayed positive homotropic cooperativity kinetics, whereas guanosine and uridine displayed hyperbolic saturation curves. Measurements of kinetics of ribose binding to *MtIAGU-NH* by fluorescence spectroscopy suggest two pre-existing forms of enzyme prior to ligand association. The intracellular concentrations of inosine, uridine, hypoxanthine, and uracil were determined and thermodynamic parameters estimated. Thermodynamic activation parameters (E_a , ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger) for *MtIAGU-NH*-catalyzed chemical reaction are presented. Results from mass spectrometry, isothermal titration calorimetry (ITC), pH-rate profile experiment, multiple sequence alignment, and molecular docking experiments are also presented. These data should contribute to our understanding of the biological role played by *MtIAGU-NH*.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.