



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

Amplificação, clonagem, superexpressão e purificação da enzima citidina
deaminase (Cdd, E.C. 3.5.4.5) de *Mycobacterium tuberculosis*

Autor

Zilpa Adriana Sánchez Quitian

Orientador

Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Co-orientador

Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre

Fevereiro 2009



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

Amplificação, clonagem, superexpressão e purificação da enzima citidina
deaminase (Cdd, E.C. 3.5.4.5) de *Mycobacterium tuberculosis*

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

Autor

Zilpa Adriana Sánchez Quitian

Orientador

Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos

Co-orientador

Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre

Fevereiro 2009

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Diógenes Santiago Santos pela oportunidade de ingressar no CPBMF e, especialmente, pela confiança em mim depositada e ajuda durante todo o mestrado.

Ao Prof. Luiz Augusto Basso pelos ensinamentos, correções e revisões, que possibilitaram a conclusão deste trabalho.

Ao Christopher Schneider, Rodrigo Ducati e Cláudia Nunes, pela colaboração nas correções, revisões, sugestões e pelo constante apoio e motivação.

Agradeço aos meus amigos de laboratório, pela ajuda na realização deste trabalho e por sempre me darem amor e força; eles estiveram sempre presentes, me aconselhando e incentivando com carinho e dedicação. Também sou grata pelas trocas que fizemos a respeito de música, samba, festas e alegria no Brasil e, principalmente, por sempre demonstrar interesse no meu bem-estar.

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

Ao CNPq pela bolsa fornecida durante o mestrado.

À família Horna Vargas que, desde o primeiro momento, me deu todo o apoio, colaboração e carinho, me acompanhando cada dia, durante estes anos.

Aos amigos que conheci em POA, pelos momentos divertidos que passamos juntos, pela energia positiva e pelo carinho e amizade que me ofereceram.

Agradeço profundamente a minha família, que apesar de não estar fisicamente presente, sempre buscou o meu bem-estar desde o meu país, a

Colômbia, e é evidente que, sem o esforço feito por eles, a minha pós-graduação não teria sido possível, especialmente à minha mãe, por suportar pacientemente uma filha distante da vida familiar. Para meus pais, Ruby e Cristobal, a minha irmã Moni, meus primos, Juanita, Mauro, Kathe e Marce, e meus tios, Zilpa, Manlio e Omar, que, apesar da distância, a moral, o apoio e a alegria me deram a força para continuar.

ÍNDICE

Agradecimentos	i
Lista de Abreviaturas	v
Resumo	viii
Abstract	viii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Tuberculose	1
1.2 Tuberculose e latência.....	3
1.3 Metabolismo de nucleotídeos	4
1.3.1 Síntese <i>de novo</i> das pirimidinas	5
1.3.2 Rota de salvamento das pirimidinas.....	6
1.4 Citidina deaminase	8
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. ARTIGO CIENTÍFICO	13
Abstract.....	16
Introduction	17
Materials and Methods.....	20
Results and Discussion.....	25
Acknowledgments.....	31
References	32
Figures and legends	37
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43

ANEXO 1. DESENVOLVIMENTO DA TUBERCULOSE	45
ANEXO 2. TESTES DE PURIFICAÇÃO DA CDA DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>	46
ANEXO 3. CRISTALIZAÇÃO DA CDA DE <i>M. TUBERCULOSIS</i>.....	47
ANEXO 4. CONFIRMAÇÃO DO ARTIGO SUBMETIDO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: síndrome de imunodeficiência adquirida

ATP: Adenosina trifosfato

BCG: Bacillus Calmette-Guérin

CDA: citidina deaminase

codA: citosina deaminase

CMP: citidina monofosfato

CP: carbamoilfosfato

CPSae: carbamoilfosfato sintetase

CTP: citidina trifosfato

D-CDA: citidina deaminase homodimérica

dCTP: desoxicitidina trifosfato

deoA: timina fosforilase

DHOase: dihidroorotato desidroorotase

DHOase: dihidroorotato desidrogenase DNA:Ácido desoxirribonucléico

dNTP: desoxirribonucleosídeo trifosfato

DOTS: tratamento supervisionado de curta duração (*directly observed treatment short-course*)

dTTP: desoxitimidina trifosfato

hCDA: citidina deaminase humana

HIV: vírus de imunodeficiência humana

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

IPTG: isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

LB: Luria–Bertani

MDR-TB: TB resistente a múltiplas drogas

NDP: nucleosídeo difosfato

NMP: nucleosídeo monofosfato

NTP: nucleosídeo trifosfato

OMP: orotidina 5'-monofosfato

PRPP: D-5-fosforibosil-1-fosfato

RNA: ácido ribonucléico

rNTP: ribonucleosídeo trifosfato

TB: tuberculose

T-CDA citidina deaminase homotetramérica

udk: uridina quinase

udp: uridina fosforilase

UDP: uridina difosfato

UMP: uridina monofosfato

UPRTase: uracil fosforibosiltransferase

UTP: uridina trifosfato

WHO: Organização mundial da Saúde (World Health Organization)

XDR-TB: TB extremamente resistente a drogas (*extensively drug-resistant TB*)

RESUMO

A tuberculose (TB) é considerada uma ameaça à saúde pública mundial; segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de dois milhões de pessoas morrem anualmente em consequência desta doença. Uma das características mais importantes do patógeno causador da TB é a sua capacidade de persistir nos tecidos do hospedeiro por um longo período em um estado de latência, também conhecido como persistência. A importância do estado de latência à sobrevivência do bacilo tem sido um atrativo fator para o desenvolvimento de trabalhos que caracterizem com maior profundidade esta fase da infecção por *M. tuberculosis*. O entendimento do modo de ação e o papel das enzimas da rota de salvamento de pirimidinas em *M. tuberculosis* poderia revelar novos alvos para o desenho racional de agentes anti-TB potentes e seletivos capazes de, se possível, prevenir a progressão e a reativação da doença. A citidina deaminase (CDA, EC 3.5.4.5), uma enzima evolutivamente conservada da rota de salvamento das pirimidinas, catalisa a deaminação hidrolítica de citidina e 2'-desoxicitidina para formar uridina e 2'-desoxiuridina, respectivamente. O provável gene da CDA (cdd, Rv3315c) de *M. tuberculosis* foi clonado, seqüenciado e expresso em células de *Escherichia coli* BL21(DE3). O protocolo de purificação da CDA recombinante de *M. tuberculosis* (MtCDA) produziu 35 mg de proteína homogênea a partir de 10 g de células. A análise de espectrometria de massas, seqüenciamento N-terminal e cromatografia por gel filtração confirmaram a massa molecular prevista, a identidade e o estado oligomérico de MtCDA, que foi estimada em 52,99 kDa. Estes resultados e os de alinhamento múltiplo de seqüências sugere que MtCDA é um homotetrâmero em solução. Medidas de cinética em estado estacionário da CDA geraram os seguintes parâmetros: valores de K_M e k_{cat} de, respectivamente, 1004 μM e 4,8 s^{-1} para citidina, e 1059 μM e 3,5 s^{-1} para 2'-desoxicitidina. A dependência dos valores de k_{cat} e k_{cat}/K_M em função do pH para citidina indicam que a protonação de um único grupo ionizável com valor de pKa de 4,3 elimina a atividade, e a protonação de um grupo com pKa de 4,7 reduz a ligação ao substrato. Foram obtidos cristais de CDA utilizando o método de difusão de vapor em gota pendente. A demonstração de que o locus Rv3315c codifica uma proteína com atividade CDA em *M. tuberculosis* é o primeiro passo para entender o papel do produto deste gene e deverá ajudar no desenho de agentes anti-TB e vacinas.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; rota de salvamento de pirimidinas; Citidina deaminase; purificação protéica; cinética enzimática; alvo protéico.

ABSTRACT

The Tuberculosis (TB) is considered a threat to global public health; according to the World Health Organization, nearly two million people die annually due to this disease. One of the most important features of this pathogen is its ability to persist in host tissues for a long period in a state of latency, also known as persistence. The importance of the state of latency to the bacillus survival has been an attractive factor towards the development of works to characterize in greater detail this phase of infection by *M. tuberculosis*. An understanding of the mode of action and the role of pyrimidine salvage pathway enzymes in *M. tuberculosis* could reveal new targets for the rational design of potent and selective anti-TB agents capable of, hopefully, preventing progression and reactivation of the disease. Cytidine deaminase (CDA; EC 3.5.4.5), an evolutionarily conserved enzyme of the pyrimidine salvage pathway, catalyzes the hydrolytic deamination of cytidine and 2'-deoxycytidine to form uridine and 2'-deoxyuridine, respectively. The probable CDA gene (*cdd*, Rv3315c) from *M. tuberculosis* H37Rv was cloned, sequenced, and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells. The purification protocol of recombinant *M. tuberculosis* CDA (MtCDA) yielded 35 mg of homogeneous protein from 10 g of cells. Mass spectrometry, N-terminal amino acid sequencing, and gel filtration chromatography confirmed the predicted molecular mass, identity, and oligomeric state of MtCDA, which was estimated to be 52.99 kDa. These results and the ones for multiple sequence alignment suggest that MtCDA is a homotetramer in solution. Steady-state kinetic measurements yielded the following parameters: K_M and k_{cat} values of, respectively, 1004 μM and 4.8 s^{-1} for cytidine, and 1059 μM and 3.5 s^{-1} for 2'-deoxycytidine. The pH dependence of k_{cat} and k_{cat}/K_M for cytidine indicates that the protonation of a single ionizable group with pKa value of 4.3 abolishes activity, and protonation of a group with pKa value of 4.7 reduces substrate binding. Crystals of CDA were obtained using the hanging-drop vapour-diffusion method. The demonstration that the Rv3315c locus encodes a protein having CDA activity in *M. tuberculosis* is the first step to understand the role of this gene product and should help the design of anti-TB agents and vaccines.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; pyrimidine salvage pathway; cytidine deaminase; protein purification; enzyme kinetics; drug target.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose

A tuberculose (TB), doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, é considerada uma ameaça à saúde pública mundial, visto que, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, cerca de dois milhões de pessoas morrem anualmente em consequência desta enfermidade [25, 26]. Estudos indicam que a incidência global da TB é de 137 casos por 100.000 habitantes, sendo menor nas Américas (onde se apresentam 46 casos de TB por 100.000 habitantes) e maior na África (com 290 casos de TB por 100.000 habitantes). Este último dado está correlacionado com a alta prevalência da infecção por HIV que afeta esta região, além da extrema pobreza e falta de medicamentos [7].

Segundo o relatório da Organização Mundial da Saúde, na América do Sul, países como Bolívia, Peru e Equador apresentam o maior índice de casos de TB, com uma incidência de 211, 172 e 131 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (ver Tabela 1). Já no Brasil estima-se que, anualmente, ocorrem 161.800 novos casos positivos de TB, com uma incidência de 60 casos (incluindo todas as formas de TB), por 100.000 habitantes. Além disso, apresenta-se uma taxa de 0.9% de novos casos de TB resistente a múltiplas drogas [26].

Dados epidemiológicos mostram a evolução crescente dos casos de TB em todo o mundo, e, caso o controle da doença não seja reforçado, estima-se que, de hoje até 2020, mais de um bilhão de pessoas serão infectadas, cerca de 200 milhões desenvolverão TB ativa, e 70 milhões morrerão [19]. Um exemplo dos esforços para combater a TB é o plano de eliminação da tuberculose em

nível mundial para o ano 2015, realizando diferentes investimentos para pesquisas e programas de controle que permitam atingir esta meta. Este plano está sendo implementado pela Organização Mundial da Saúde (World Health Organization) [26].

Tabela 1. Incidência, prevalência e mortalidade da tuberculose na América do Sul

Indicadores	Incidência (todos os casos/100.0000 hb/ano)	Prevalência (todos os casos/100.0000 hb/ano)	Mortalidade (todos os casos/100.0000 hb/ano)
Países			
Argentina	41	51	5.5
Bolívia	211	280	31
Brasil	60	76	8.1
Chile	15	16	1
Colômbia	45	66	7.0
Equador	131	202	27
Paraguai	68	100	12
Peru	172	206	20
Uruguai	28	33	3
Venezuela	42	52	5

Retirado de WHO report 2007 Global tuberculose control

Em todo o mundo, cerca de 3.2% dos novos casos de TB são causados por cepas resistentes a múltiplas drogas. Nestes casos, o tratamento requer a administração de medicamentos de segunda linha, que geram efeitos adversos maiores e aumento dos custos (cerca de 100 vezes) em comparação com as drogas de primeira geração [17]. 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% [11].

A cada ano, cerca de 400.000 novos casos de TB resistente a múltiplas drogas (MDR-TB) são relatados. Assim, como medida de controle, a Organização Mundial da Saúde implementou um procedimento padronizado para garantir o uso correto das drogas que compõem o tratamento da TB, o qual é conhecido como DOTS (tratamento supervisionado de curta duração, do inglês *directly observed treatment short-course*), no qual agentes de saúde acompanham todo o tratamento do paciente com TB, monitorando periodicamente o uso correto dos medicamentos, a fim de impedir o abandono da quimioterapia e o possível surgimento de cepas multirresistentes [11, 26]. Outro tipo de cepa multirresistente de *M. tuberculosis* foi relatado pela Organização Mundial da Saúde em setembro de 2006, denominada XDR-TB (*extensively drug-resistant-TB*), a qual é definida como casos de TB resistentes a 2 drogas de primeira linha (isoniazida e rifampicina) e no mínimo 3 das 6 principais classes de drogas de segunda linha [27]. 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. Estes fatos evidenciam que tanto o surgimento como o aumento do número de cepas de *M. tuberculosis* resistentes às drogas antimicobacterianas convencionais representam um risco para o controle da TB. Conseqüentemente, a vigilância do tratamento e pesquisas avançadas para o desenvolvimento de novas drogas tornaram-se uma prioridade na luta contra a TB.

1.2 Tuberculose e latência

Uma das características mais importantes do patógeno causador da TB é a sua capacidade de persistir no hospedeiro humano por longos períodos em estado de latência, quando não se apresentam manifestações clínicas que permitam sua identificação. Nesta fase da infecção, também conhecida como persistência, o bacilo da TB diminui drasticamente seu metabolismo e praticamente não se multiplica, como consequência da resposta imune celular que o hospedeiro monta para tentar erradicar a infecção [8].

Pesquisas feitas utilizando a prova intradérmica de tuberculina estimam que um terço da população mundial esteja infectada com *M. tuberculosis*, o que representa um reservatório importante para o surgimento de novos casos [7]. Estes reservatórios dos quais pode surgir a doença ativa são incrementados pela pandemia de AIDS em doentes infectados com o HIV, o que gera um obstáculo a mais para o controle da TB. Dados revelam que o risco de progressão da infecção do estado latente para o ativo é de 8-10% por ano [7].

A formação de granulomas, característicos deste estado da doença, faz 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 decai, resultando em uma massiva replicação do bacilo e reativação da TB (ver anexo 1), sendo neste ponto transmissível a outras pessoas [1].

A atual vacina contra a TB, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG), foi introduzida há mais de 60 anos e é utilizada amplamente no mundo. Esta vacina protege contra a manifestação severa em crianças, mas não

impede a reativação pulmonar em adultos ou o estabelecimento da forma latente do bacilo [1]. 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 em pontos de interesse para estudo no desenvolvimento de vacinas [12].

1.3 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 suportada pelo fato de que quase todas as células podem sintetizá-los tanto *de novo* como a partir dos produtos de degradação dos ácidos nucléicos, o que se denomina salvamento ou recuperação [2,24].

Mais do 95% dos nucleotídeos são encontrados na fração ácido-insolúvel das células como nos ácidos nucléicos. A fração solúvel do ácido consiste de nucleosídeos mono, di, e trifosfatos (NMPs, NDPs e NTPs) e nucleotídeos como componentes de coenzimas. Nucleosídeos trifosfato são precursores de ácidos nucléicos e coenzimas. Os nucleotídeos que atuam 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 requer-se constante administração de ribonucleosídeos

trifosfato (rNTP) e deoxiribonucleosídeos trifosfato (dNTPs), que na ausência destes, devem ser fornecidos através da biosíntese de novo [15]

1.3.1 Síntese de novo das pirimidinas

A síntese de novo das pirimidinas é iniciada com a síntese de carbamoilfosfato desde glutamina, bicarbonato e ATP, reação catalisada pela carbamoilfosfato sintetase (CPSase). A condensação do carbamoilfosfato com aspartato pela aspartato transcarbamilase produz N-carbamilaspartato formando-se o anel da pirimidina, através de ciclização e oxidação, o qual é transformado a dihidroorotato pela dihidroorotato dihidroorotase (DHOase). Posteriormente, ocorre a oxidação do dihidroorotato a orotato pela dihidroorotato deshidrogenase (DHOase). O orotato é convertido ao nucleotídeo correspondente pela α -D-5-fosforibosil-1-fosfato (PRPP), formando orotidina 5`-monofosfato (OMP), a qual é subsequentemente descarboxilado a uridina monofosfato (UMP). A conversão de UMP ao trifosfato ocorre pela fosforilação de UMP a uridina difosfato (UDP) e depois à uridina trifosfato (UTP) pela ação da UMP quinase e UDP quinase (nucleosídeo de fosfato quinase). Finalmente, UTP é aminado a citidina trifosfato (CTP) pela CTP sintetase (fig. 1) [15, 16].

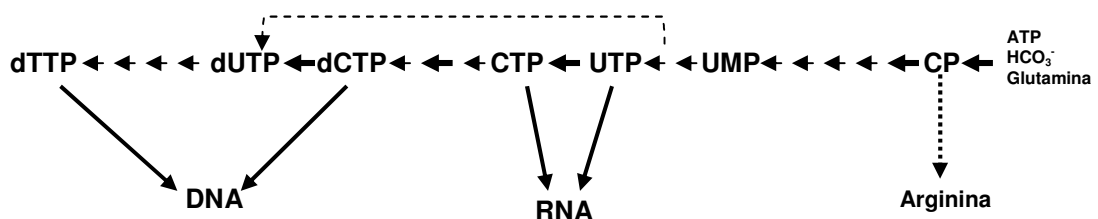


Figura 1. Síntese de novo das Pirimidinas. Abreviações: carbamoilfosfato (CP), uridina monofosfato (UMP), uridina trifosfato (UTP), citidina trifosfato(CTP), desoxicitidina trifosfato (dCTP), desoxiuridina trifosfato (dUTP) e desoxitimidina trifosfato (dTTP).

1.3.2 Rota de salvamento das pirimidinas

A rota de salvamento de pirimidinas apresenta três funções fisiológicas. A primeira é a assimilação de bases exógenas livres e nucleosídeos; os nucleosídeos são predominantemente metabolizados a bases livres antes de serem usados para síntese de nucleotídeos. A segunda função é a fabricação da pentose dos nucleosídeos exógenos utilizando esta como origem de carbono e energia; e o grupo amino dos compostos com citosina como origem de nitrogênio. A terceira função é a reutilização de bases livres e nucleosídeos produzidos intracelularmente desde a reciclagem dos nucleotídeos.

Para a utilização de bases pirimidínicas, como o uracil, é necessário a uracil fosforibosiltransferase (UPRTase), a qual converte o uracil a UMP. No entanto, o metabolismo da citosina ocorre através da deaminação pela citosina deaminase (codA) a uracil e amônia.

A uridina, é convertida a UMP mediante fosforilação pela uridina quinase (udk) ou pela clivagem a uracil e ribose 1-fosfato através da uridina fosforilase (udp) e posterior conversão do uracil ao UMP pela UPRTase.

A rota para utilização de citidina e desoxicitidina ocorre através da deaminação, a uridina e desoxiuridina, respectivamente, catalisada pela citidina deaminase (CDA). O produto, uridina, é diretamente convertido a CMP pela uridina quinase.

A desoxiuridina e a timina podem ser utilizadas por duas rotas diferentes. Na primeira, a timina quinase, a qual é codificada pelo gene *tdk*, fosforila estes componentes até monofosfatos. Na segunda rota, a timina fosforilase (deoA) cliva estes nucleosídeos a deoxiribose 1-fosfato e a base livre correspondente (fig.2) [15, 16, 20, 24].

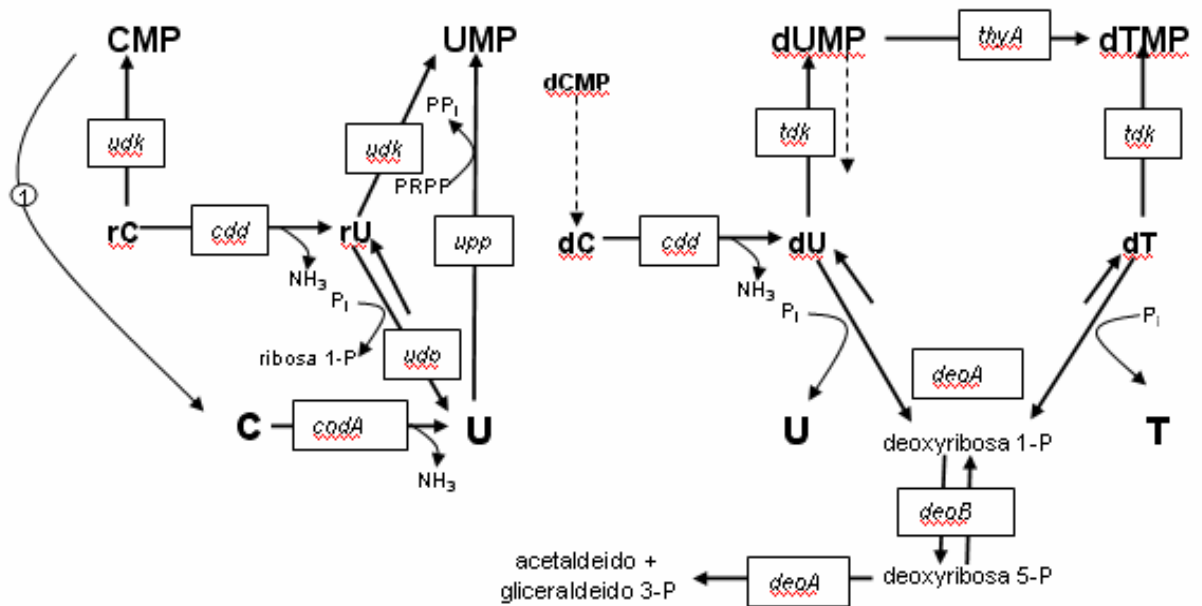


Figura 2. Rota de salvamento de pirimidinas. As enzimas envolvidas nesta rota são identificadas pelo símbolo de seu gene: *cdd*, citidina (desoxicitidina) deaminase; *codA*, citosina deaminase; *deoA*, timina (desoxiuridina) fosforilase; *deoB*, fosfopentomutase; *deoC*, deoxiriboaldose; *tdk*, timidina (desoxiuridina) quinase; *thyA*, TSase; *udk*, uridina (citidina) quinase; *udp*, uridina fosforilase; *upp*, UPRTase; 1, CMP glicosilase [15].

Diferentes estudos demonstram que organismos tão divergentes como *Escherichia coli*, leveduras e humanos 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. 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 [9, 23].

Pouco se conhece sobre a função e preferência de substratos destas enzimas, sendo necessário ampliar o conhecimento com a realização de estudos que melhor caracterizam estas enzimas.

1.4 Citidina deaminase

Citidina deaminase (CDA) (E.C.3.5.4.5) é uma enzima que catalisa a deaminação hidrolítica irreversível de citidina e desoxicitidina a uridina e desoxiuridina, respectivamente [6,28].



Estudos bioquímicos e estruturais da CDA em bactérias sugerem o mecanismo de reação apresentado na figura 3. Esta enzima tem sido caracterizada em *E. coli*, *Bacillus subtilis* e humanos [3, 5, 10], e contém um átomo de zinco no sítio ativo que polariza uma molécula de água que ataca nucleofilicamente o C4 do anel da citidina pela protonação do adjacente na posição N3. O intermediário tetraédrico resultante decompõe-se pela eliminação de amônia, o que produz uridina [5].

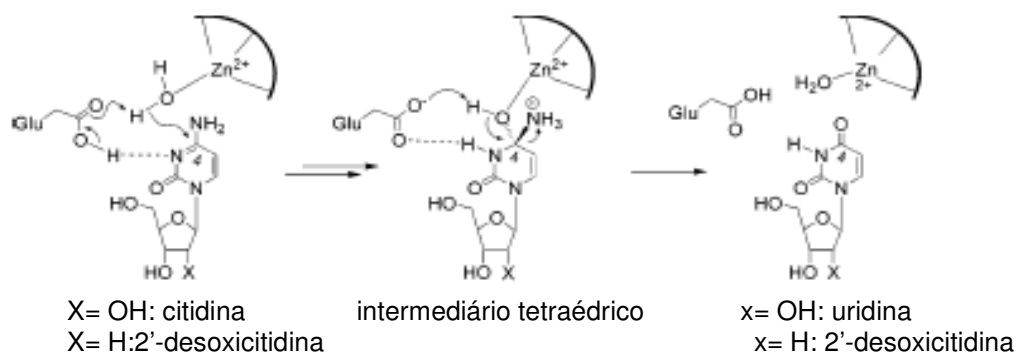


Figura 3. Mecanismo de reação proposto para CDA

O átomo de zinco que a enzima contém é essencial para a catálise. Dois tipos de CDA têm sido identificadas na natureza: uma homodimérica (D-CDA), com uma subunidade que apresenta uma massa molecular de 32kDa, e uma homotetramérica (T-CDA), com uma massa molecular aproximada de 15 kDa. D-CDAs são encontradas em bactérias Gram-negativas, tais como *Escherichia coli* e plantas, enquanto que T-CDAs são encontradas em bactérias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* e muitos outros organismos eucariotos, incluindo mamíferos [10].

A estrutura obtida a partir dos cristais de organismos como *B. subtilis* [10] e *E. coli* [3] tem sido determinada. Ambas as classes de CDAs contêm uma forte ligação por subunidade, catalisada pelo íon de zinco. A subunidade da enzima de *E. coli* tem dois domínios com as mesmas características que a subunidade T-CDA, resultando em centros estruturais similares da D-CDA e T-CDA (Figura 1).

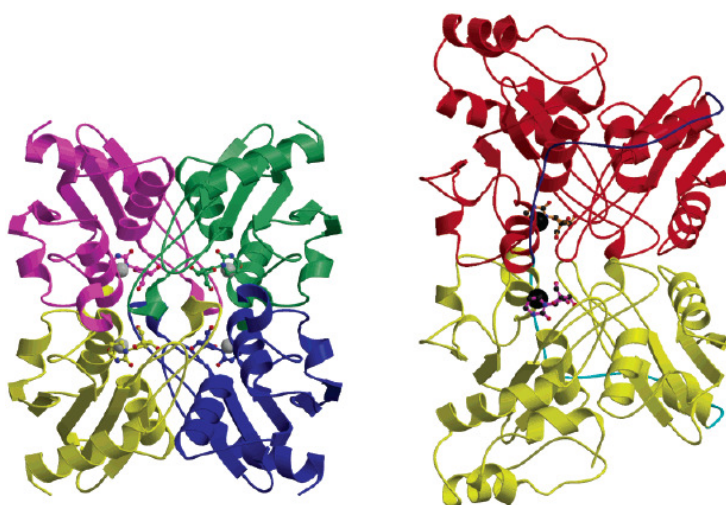


Figura 4: Estrutura de (a) T-CDA de *B. subtilis* e (b) D-CDA de *E. coli*. As subunidades de T-CDA são mostradas em magenta, verde e azul respectivamente. As subunidades de D-CDA são mostradas em vermelho e amarelo com as ligações respectivas entre o sítio catalítico e o domínio C-terminal em azul e ciano. Os íons de zinco e inibidores são mostrados em modelo de palitos [13]

Porém, apenas um dos domínios da D-CDA em cada subunidade é ligado ao zinco, sendo só dois sítios ativos por molécula de enzima em contraste com quatro na T-CDA. Os sítios ativos da T-CDA são compostos por resíduos de três das quatro subunidades para o tetrâmero.

Estudos de alinhamento entre diferentes organismos revelam a presença de resíduos de tirosina nas T-CDA que não foram encontrados em nenhuma seqüência de D-CDA. CDA de *M. tuberculosis* apresenta estes resíduos, o que sugere uma estrutura tetramérica para esta enzima [4].

A CDA de humanos (hCDA) tem se mostrado interessante pelo importante papel que tem no metabolismo de nucleosídeos antitumorais e antivirais análogos de citidina, levando à inativação farmacológica, e efeitos secundários indesejáveis. Um exemplo é a perda da atividade antineoplásica da citosina-arabinosídeo, um agente quimioterapêutico utilizado no tratamento contra o câncer [21].

Outro importante papel da CDA é a sua participação na deaminação de bases no RNA e DNA de simples e dupla fitas. A modificação destas bases gera no RNA um códon de parada, enquanto que, no DNA promove a diversidade de anticorpos [14].

A caracterização da CDA de *M. tuberculosis* poderia ser útil para aumentar nosso conhecimento desta enzima e também como tentativa para identificar potenciais alvos para o desenvolvimento de drogas e vacinas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo faz parte de um projeto desenvolvido no Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) com a finalidade de estudar enzimas utilizadas pelo bacilo *M. tuberculosis* durante a infecção. O objetivo geral na realização deste trabalho foi a caracterização da enzima citidina deaminase envolvida na via de salvamento de pirimidinas de *M. tuberculosis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desenho de *primers* e amplificação do gene *cdd* que codifica a proteína citidina deaminase;
2. Clonagem do gene amplificado no plasmídeo pCR-Blunt e posterior subclonagem no vetor de expressão pET-23a(+);
3. Realizar testes de expressão da proteína recombinante em diferentes linhagens de *E. coli* e condições de crescimento (temperatura, meio de cultura, adição de IPTG, etc), a fim de estabelecer um protocolo que permita a expressão da proteína em forma solúvel;
4. Estabelecer um protocolo de purificação que permita obter a proteína citidina deaminase altamente pura, utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
5. Determinar parâmetros cinéticos da proteína usando como substrato a adenosina;

6. Realizar a análise de espectrometria de massas e seqüenciamento total da proteína purificada.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Title of the article

The *Rv3315c* locus from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv codes for a functional cytidine deaminase that hydrolyses cytidine and 2'-deoxycytidine

Periodic chosen for submission

Protein expression and purification

The *Rv3315c* locus from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv codes for a functional cytidine deaminase that hydrolyses cytidine and 2'-deoxycytidine

Zilpa A. Sánchez Quitian^{a,b}, Christopher Z. Schneider^a, Rodrigo G. Ducati^{a,c}, Carlos Bloch Junior^d, Diógenes S. Santos^{a*}, and Luiz A. Basso^{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 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Laboratório de Espectrometria de Massas, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Recursos Genéticos e Biotecnologia, Estação Parque Biológico, Brasília, DF, Brazil

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Pyrimidine salvage pathway; Cytidine deaminase; Protein purification; Enzyme kinetics; Drug target.

Running title: Cytidine deaminase from *Mycobacterium tuberculosis*

*To whom correspondence may be addressed: Luiz A. Basso or Diógenes S. Santos

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

Phone/Fax: +55 51 33203629; E-mail addresses: luiz.basso@pucrs.br or

diogenes@pucrs.br.

Abbreviations used: CDA, cytidine deaminase; ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry; IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; MDR-TB, multidrug-resistant TB; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; TB, tuberculosis; XDR-TB, extensively drug-resistant TB.

Abstract

Human tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, remains a leading cause of mortality. The emergence of drug resistant strains of *M. tuberculosis* has exacerbated the treatment and control of TB. There is thus a continuous need to identify promising targets for the development of anti-TB agents. Cytidine deaminase (CDA) is a pyrimidine salvage pathway enzyme that recycles cytidine and 2'-deoxycytidine for uridine and 2'-deoxyuridine synthesis, respectively. A probable CDA gene (*cdd*, *Rv3315c*) from *M. tuberculosis* H37Rv was cloned, sequenced, and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells. The purification protocol of recombinant *M. tuberculosis* CDA (MtCDA) yielded 35 mg of homogeneous protein from 10 g of cells. Mass spectrometry, N-terminal amino acid sequencing, and gel filtration chromatography confirmed the predicted molecular mass, identity, and oligomeric state of MtCDA, which was estimated to be 52.99 kDa. These results and multiple sequence alignment suggest that MtCDA is a homotetramer in solution. Steady-state kinetic measurements yielded the following parameters: K_m and k_{cat} values of, respectively, 1004 μM and 4.8 s^{-1} for cytidine, and 1059 μM and 3.5 s^{-1} for 2'-deoxycytidine. The pH dependence of k_{cat} and k_{cat}/K_M for cytidine indicate that protonation of a single ionizable group with apparent pK_a value of 4.3 abolishes activity, and protonation of a group with pK_a value of 4.7 reduces binding. The demonstration that the *Rv3315c* locus encodes a protein having CDA activity in *M. tuberculosis* is the first step to understand the role of this gene product and should help the design of anti-TB agents and vaccines.

Introduction

Human tuberculosis (TB) is an infectious disease, caused primarily by *Mycobacterium tuberculosis*; that remains a major challenge to public health systems worldwide, specially in poor and developing nations. Over 9 million people develop TB and 2 million die annually [1]. Based on TB skin tests, the World Health Organization estimates that one-third of the world's population is currently infected with *M. tuberculosis* in a latent form and, therefore, at risk of developing the active disease [2]. The emergence of multidrug-resistant (MDR, resistant to at least isoniazid and rifampicin, the most potent anti-TB drugs) and extensively drug-resistant (XDR, resistant to first- and second-line anti-TB drugs) strains of *M. tuberculosis* have exacerbated the treatment and control of TB. Approximately 0.5 million cases of MDR-TB emerged in 2006; in addition, new cases of XDR-TB have been notified in 45 countries in all five continents [3, 4]. The ability of *M. tuberculosis* to persist in host tissues results in the requirement of prolonged administration of chemotherapeutic agents to achieve *in vivo* bactericidal effects [5]. More effective and less toxic anti-TB drugs acting on novel mycobacterial targets are needed to shorten the duration of current therapy, to improve the treatment of MDR- and XDR-TB cases, and to provide an efficient alternative to eliminate/eradicate latent *M. tuberculosis* infection.

Pyrimidine nucleotides are essential for DNA replication and RNA transcription, as well as many other cellular functions, such as phospholipid biosynthesis and regulation of enzyme activity by uridylylation. As fundamental components of critical cellular processes, their biochemical pathways constitute attractive targets for drug development. There are two major pathways for pyrimidine nucleotide synthesis: the *de novo* and the salvage pathway. While

the *de novo* pathway demands higher energy levels for pyrimidine biosynthesis from simple precursors, cells use the salvage pathway to reutilize pyrimidine bases and nucleosides derived from preformed nucleotides [6]. In addition, the pyrimidine salvage pathway enzymes enable organisms to acquire exogenously supplied pyrimidine bases and nucleosides, which may not be synthesized by certain species [7, 8]. Although *M. tuberculosis* pyrimidine salvage pathway appears to be similar to that of *Escherichia coli* and even mammalian cells, it is expected that *M. tuberculosis* will exhibit unique regulatory properties in correlation with its pathogenicity and slow growth [9].

As pertains to rational drug development, a promising target should be essential for survival of a pathogen and absent from its host. Alternatively, a promising target may play an important role in adaptation of the pathogen to a particular physiological state of the host. Since no transporters for bases, nucleosides or nucleotides of nucleic acids could be identified in *M. tuberculosis* [10], it is thus likely that *M. tuberculosis* has to recycle bases, nucleosides, and/or nucleotides to survive in the hostile environment offered by the host macrophages. In general, pyrimidine bases and nucleosides, which are the transportable precursors of the nucleotides, are not available as exogenous nutrients to most bacteria [7]. Accordingly, an understanding of the mode of action and role of *M. tuberculosis* pyrimidine salvage pathway enzymes could unveil new targets for the rational design of potent and selective antitubercular agents capable of, hopefully, preventing progression and reactivation of the disease.

Cytidine deaminase (CDA; EC 3.5.4.5), an evolutionarily conserved enzyme of the pyrimidine salvage pathway, catalyzes the hydrolytic

deamination of cytidine and 2'-deoxycytidine to form uridine and 2'-deoxyuridine, respectively [11]. The hydrolytic deamination of cytidine nucleosides catalyzed by CDA has been characterized in different organisms, including *E. coli* [12, 13], *Bacillus subtilis* [14], *Saccharomyces cerevisiae* [15], human liver [16], and others. The CDA protein family tends to form multi-subunit complexes. *E. coli* CDA occurs as a homodimer with two active sites formed by contributions from each monomer [17]. On the other hand, human CDA is a homotetramer having one active site in each 16.2 kDa subunit [18], whereas *B. subtilis* CDA is a homotetramer with subunit molecular mass of 14.9 kDa [14]. In *M. tuberculosis*, a putative *cdd* (*Rv3315c*) gene has been identified in the genome of the H37Rv strain by sequence similarity [19]. However, the first step to try to understand the role of this gene product should be demonstration that the *Rv3315c* locus indeed encodes a protein having CDA activity in *M. tuberculosis*.

In the present work, we report cloning, heterologous recombinant protein expression in *E. coli*, purification to homogeneity, N-terminal amino acid sequencing, electrospray ionization mass spectrometry analysis, and size exclusion chromatography of a functional *cdd*-encoded *M. tuberculosis* CDA (MtCDA). We also report determination of steady-state kinetic parameters and pH-rate profiles of MtCDA. These results provide a solid foundation on which to base gene replacement experiments aiming at understanding the role of CDA, if any, in survival and/or latency of the bacillus, which should pave the way for the design of new anti-TB agents and/or the development of new vaccines.

Materials and Methods

Bacterial strains, media, and growth conditions. *E. coli* DH10B and BL21(DE3) (Novagen) strains were grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB; Difco) medium at 180 rpm containing 50 µg mL⁻¹ ampicillin.

PCR amplification, cloning, and DNA sequencing of the cdd coding sequence. Based on the published genome sequence from *M. tuberculosis* H37Rv [19], two oligonucleotide primers, CDD1 (5'-gc **cat atg** cct gat gtc gat tgg aat atg ctg-3') and CDD2 (5'-ga **aag ctt** tca ccg gcg ttc ccg ggg gag-3'), complementary to the 5' N-terminal and the 3' C-terminal ends of the probable *cdd* (*Rv3315c*) gene, were synthesized to contain, respectively, *Nde*I and *Hind*III restriction sites (bold). These primers were used to amplify the *cdd* coding sequence (402 bp) from *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA. Using standard PCR conditions (an initial denaturation step at 98 °C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 98 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 55 s, and extension at 72 °C for 2 min, and a final extension step for 10 min at 72 °C) and *Pfu* DNA polymerase for high-fidelity amplification (Stratagene), the amplified product was purified by electrophoresis on a low-melting agarose gel, digested with *Nde*I and *Hind*III (New England Biolabs), and ligated into the pET-23a(+) expression vector (Novagen). Nucleotide sequence of the *M. tuberculosis cdd* gene was determined by automated DNA sequencing to confirm the identity, integrity, and absence of PCR-introduced mutations in the cloned gene.

Expression of recombinant MtCDA in E. coli. The recombinant plasmid pET-23a(+):*cdd* was transformed into electrocompetent *E. coli* BL21(DE3) cells and selected on LB agar plates containing 50 µg mL⁻¹ ampicillin [20]. A single colony was used to inoculate 50 mL of LB medium in 250 mL flasks, and grown as mentioned above. As cell cultures reached an OD₆₀₀ value of 0.4-0.6, the

cells were either induced with 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) or not induced; and the cells collected at 3, 6, 9, 12, 24, and 48 h post-induction. The same procedure was employed for *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with the pET-23a(+) vector only, which was used as an experimental control. Cells were harvested at the indicated time points by centrifugation at 20,800g for 5 min at 4 °C, and the supernatant discarded. Cell pellets were suspended in 600 μ L Tris-HCl 50 mM pH 7.5 (buffer A), disrupted by sonication at 4 °C (2 pulses of 10 s each at an amplitude value of 21 %) and cell debris was separated by centrifugation at 48,000g for 30 min at 4 °C. The soluble extract fractions were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [21].

Purification of recombinant MtCDA. Single colonies were used to inoculate 700 mL of LB medium in 2 L flasks, and grown for 6 h past an OD₆₀₀ of 0.4-0.6, without addition of IPTG, which was the optimized protocol for CDA expression as discussed below. All subsequent steps were performed at 4 °C, unless stated otherwise. Cells were harvested by centrifugation at 10,879g for 30 min. The resulting cell paste (10 g) was suspended in buffer A (5 mL per gram), cells were disrupted by sonication (15 pulses of 10 s each at an amplitude value of 60 %) and centrifuged at 23,500g for 30 min. Nucleic acid precipitation present in the supernatant was carried out by addition of streptomycin sulfate 1 % (final concentration), stirring the mixture 30 min, and centrifugation at 48,000g for 30 min. The supernatant containing soluble CDA was dialyzed against buffer A (3 x 1 L, 3 h each) using a dialysis tubing with a 3.5 kDa molecular weight cut off (MWCO) and centrifuged at 48,000g for 30 min. The supernatant was loaded on a Q Sepharose Fast Flow column (GE

Healthcare) pre-equilibrated with buffer A. The column was washed with 10 column volumes of buffer A and the adsorbed material was eluted with a linear gradient (0-100%) of 15 column volumes of 50 mM Tris-HCl pH 7.5 containing 500 mM NaCl (buffer B). The fractions containing the target protein were pooled and concentrated using an AMICON ultrafiltration membrane (MWCO = 30 kDa) and loaded on a Sephacryl S-200 column (GE Healthcare) pre-equilibrated with buffer A. The column was washed with 1.5 column volumes of buffer A at 0.25 mL min⁻¹ flow-rate. The fractions containing the target protein were pooled, incubated with ammonium sulfate to a final concentration of 1 M, stirred for 30 min, and clarified by centrifugation at 23,500g for 30 min. The supernatant was loaded on a Butyl-Sepharose High Performance column (GE Healthcare) pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.5 containing 1 M (NH₄)₂SO₄ (buffer C). The column was washed with 7 column volumes of buffer C and the adsorbed material was eluted with a linear gradient (0-100%) of 20 column volumes of buffer A. All fractions were analyzed by SDS-PAGE and the fractions containing homogeneous CDA were pooled and stored at -80 °C. Protein concentration was determined by the method of Bradford [22] using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad) and bovine serum albumin as a standard.

Determination of MtCDA molecular mass. The molecular mass of native *M. tuberculosis* CDA recombinant protein was determined by gel filtration chromatography using a Superdex 200 (HR 10/30) (GE Healthcare) pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl pH 7.5 containing 200 mM NaCl at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹. The LMW and HMW Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare) was used for protein molecular mass standards in the calibration curve, measuring the elution volumes (V_e) of several standards (ferritin,

catalase, aldolase, albumin, ovalbumin, chymotrypsinogen A, and Ribonuclease A), calculating their corresponding partition coefficients (K_{av}), and plotting these values versus the logarithm of their molecular masses. K_{av} values were determined as $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$, where V_e and V_t are the elution volume of a sample and total bed volume of the column, respectively, and V_o is the void volume, which was determined by loading blue dextran 2000 (GE Healthcare) to the column. Protein elution was monitored at 215, 254 and 280 nm.

Mass spectrometry analysis. Recombinant MtCDA was analyzed by MALDI-TOF/TOF on an ABI 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA), an Ultraflex II (Bruker Daltonics, Germany) and a Q-TOF Ultima API (Micromass, UK) as described elsewhere [23].

N-terminal amino acid sequencing. N-terminal amino acid residues of recombinant homogeneous MtCDA were determined by automated Edman degradation sequencing using a PPSQ 23 protein peptide sequencer (Shimadzu Co., Japan) [23].

MtCDA activity assay and determination of steady-state kinetic parameters. MtCDA enzyme activity assays were performed for all purification steps following the direct spectrophotometric assay described by Cohen and Woldfenden [13]. In short, the time-dependent decrease in absorbance at 282 nm ($\epsilon_{\text{cytidine}} = 3.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_{2\text{'-deoxycytidine}} = 6.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) upon conversion of cytidine or 2'-deoxycytidine to converted to uridine or deoxyuridine, respectively, was monitored using an UV-2550 UV/Visible spectrophotometer (Shimadzu) equipment. Determination of steady-state kinetic parameters for cytidine and 2'-deoxycytidine were determined as a function of substrate concentrations ranging from 50 to 1100 μM . The enzymatic assays were monitored using 0.5

cm light path quartz cuvettes, in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5 at 25 °C, and initiated with addition of 4.11 μM of homogeneous recombinant MtCDA [13]. One unit of enzyme activity (U) is defined as the amount of enzyme required to deaminate 1 μmol of either cytidine or 2'-deoxycytidine per min.

pH Profiles. The dependence of the kinetic parameters on pH was studied using cytidine as the variable substrate in a buffer mixture of MES-HEPES-CHES over the following pH values: 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 7.5, 9.0, 10.0 and 11.0 [24]. Profiles were generated by plotting the either the $\log k_{\text{cat}}$ or $\log k_{\text{cat}}/K_M$ versus the pH values, and data fitted to eq (1), where y is the apparent kinetic parameter, C is the pH-independent plateau value of y , H is the hydrogen ion concentration, and K_a is the apparent acid dissociation constant for ionizing groups. It should be pointed out that data fitting employed the pH range of 4.0-6.0 for $\log k_{\text{cat}}$ versus pH plot and of 4-11 for $\log k_{\text{cat}}/K_M$ versus the pH plot.

$$\log y = \log \left(\frac{C}{1 + \frac{H^+}{K_a}} \right) \quad (1)$$

Results and Discussion

cdd amplification, cloning, and sequencing. PCR amplification of a probable MtCDA coding sequence (*cdd*, Rv3315c) from *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA yielded a product with the expected size (402 bp), which was ligated into the pET-23a(+) expression vector. Nucleotide sequence analysis of *M. tuberculosis cdd* coding sequence confirmed both identity and integrity of the cloned product, showing that no mutations were introduced by the PCR amplification steps.

M. tuberculosis CDA expression. Recombinant MtCDA was expressed in *E. coli* BL21(DE3) host cells transformed with the pET-23a(+)::*cdd* plasmid. The best experimental condition found for MtCDA expression in BL21(DE3) was 6 hours of growth after the cell culture reached an OD₆₀₀ value of 0.4-0.6 without IPTG induction (data not shown). SDS-PAGE analysis showed that cell extracts contained a recombinant protein in the soluble fraction with an apparent molecular mass of 14 kDa, in agreement with the expected size of 14,072 Da for MtCDA (Fig. 1).

The pET system makes use of the powerful T7 RNA polymerase, under control of IPTG-inducible *lacUV5* promoter, to transcribe the respective cloned target genes [25]. Expression of *cdd* gene product showed that high levels of protein production can be obtained in stationary phase for cells growing in the absence of inducer as has been previously reported elsewhere [26, 27, 28]. It has been suggested this phenomenon is due to derepression of *lac* operon requiring cyclic-AMP [29].

M. tuberculosis CDA purification. Recombinant MtCDA was purified as described under Materials and Methods; each chromatographic step was analyzed by SDS-PAGE and assayed for enzyme activity, in the forward

direction. In the first purification step, an anion-exchange chromatography (Q Sepharose Fast Flow column), the target protein was eluted with approximately 0.9 % of buffer B and these fractions were pooled as indicated by SDS-PAGE analysis (Fig. 2). This step resulted in 2.4-fold protein purification (Table 1), with removal of some contaminants with apparent subunit molecular mass values larger than 20 kDa (Fig. 2). The second purification step, gel filtration chromatography (Sephacryl S-200 column), resulted in 1.8-fold protein purification, with the removal of a substantial amount of contaminants (Fig. 2). This decrease in the purification-fold might have been affected by the contaminants purified during this chromatographic this step, for instance removal of MtCDA activators, or simply due to uncertainties in protein concentration determination that are inherent to every method. The recombinant protein was suspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 containing 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (buffer C) and loaded on a hydrophobic interaction column (Butyl-Sepharose High Performance), the third and final purification step; the target protein was eluted with approximately 44 % of buffer C and yielded homogeneous MtCDA in solution, with protein yield of approximately 10 % (Table 1). The 2.3-fold purification protocol yielded approximately 35 mg (Table 1) of homogeneous *M. tuberculosis* CDA from 10 g of cells.

MtCDA molecular mass determination. The subunit molecular mass of MtCDA was determined to be 13,938.55 Da by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), indicating the removal of the N-terminal methionine residue (theoretical molecular mass 14,075.15 Da; predicted methionine molecular mass = 131.20 Da) and the loss of four protons due to oxidation of

two of the three disulfides bonds. These results provide evidence that confirms the identity and purity of the recombinant MtCDA.

The protein native molecular mass determined by gel filtration chromatography showed a single peak with elution volume consistent with a molecular mass of 52.99 kDa, suggesting that the recombinant MtCDA protein is a tetramer in solution. In agreement with other studies, the comparative alignment of CDA from different sources, such as *B. subtilis*, indicates that CDA contains two conserved tyrosine residues that are not found in any dimeric CDA sequence, which appears to be strictly correlated with a tetrameric quaternary structure in deaminases [30].

N-terminal amino acid sequencing. The Edman degradation method identified the first 30 N-terminal amino acid residues of recombinant MtCDA as PDVDWNMLRGNATQAAAGAYLPYSRFAVGA. This result unequivocally demonstrates that the homogeneous recombinant protein is MtCDA and confirms the removal of the N-terminal methionine. Protein N-terminal methionine excision is a common type of co-/post-translational modification process that occurs in the cytoplasm of many organisms and in two organelles (i.e. mitochondria and plastids) displaying protein synthesis. Methionine aminopeptidase catalyzed cleavage of initiator methionine is usually directed by the penultimate amino acid residues with the smallest side chain radii of gyration (Gly, Ala, Ser, Thr, Pro, Val, and Cys) [31]. The removal of N-terminal methionine from MtCDA is in agreement with this rule, since proline is in the penultimate N-terminal amino acid residue.

Sequence alignment of CDAs from *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* AF2122, *M. leprae* ML2174, *M. marinum* MMAR_1204, *M. avium* 4296, *M.*

smegmatis, and *B. subtilis* was carried out using Clustal W [32]. The identity between the CDA sequences was 21.58 % and almost all of the residues that are conserved among the CDAs from the 7 organisms analyzed (Fig. 3) are involved in interactions that are important for the substrate, zinc ion binding and tetrameric interactions. The relationships between the conserved residues and their functional roles have been reported for CDAs from other organisms [14, 30, 33, 34]. Here we briefly discuss the probable role of conserved residues in *M. tuberculosis* CDA sequence. The residues Phe27, Asn45, Glu47, Ala57, and Phe128 (*M. tuberculosis* numbering) mediate substrate-binding and were conserved in all sequences. Residues Cys56, Glu58, Cys89, and Cys92 are reported as probable zinc ligands for *B. subtilis* and *E. coli* CDAs, and were absolutely conserved in all sequences analyzed here [17, 33, 34]. The zinc ligand is coordinated to three cysteines in tetrameric *B. subtilis* CDA [30], which is in agreement with the three conserved cysteine residues (Cys56, Cys89, and Cys92) and the tetrameric oligomeric state of MtCDA reported here. In *M. tuberculosis* Ser25, Arg93, Gln94, Glu98, and Leu124 are related to tetrameric interactions. The tetrameric CDAs contain two highly conserved tyrosine residues not found in any of the dimeric CDA sequences [30], which correspond to the two highly conserved tyrosine residues (Tyr24 and Tyr51) identified in MtCDA sequence (Fig. 3) and is in agreement with the experimental results here reported.

MtCDA kinetics. The activity of MtCDA was linearly dependent on sample concentration added to the reaction mixture for both cytidine and 2'-deoxycytidine (Fig. 4), demonstrating that true initial velocities are being measured. The steady-state kinetic parameters determined for MtCDA are

summarized in Table 2. Data were fitted to a hyperbolic equation, suggesting that MtCDA reaction obeys Michaelis–Menten kinetics (Fig. 5). The K_M and k_{cat} values were, respectively, $1004 \pm 53 \mu\text{M}$ and $4.8 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ for cytidine and $1059 \pm 64 \mu\text{M}$ and $3.5 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ for 2'-deoxycytidine. The MtCDA K_M values are larger than *E. coli* CDA ($220 \mu\text{M}$ for cytidine and $58 \mu\text{M}$ for 2'-deoxycytidine). Furthermore, the k_{cat} value for *M. tuberculosis* CDA was lower than the ones reported for *E. coli* and human liver CDAs (136.6 s^{-1} and 65 s^{-1} , respectively) [12]. The specificity constant values (k_{cat}/K_M) for both substrates are quite similar (Table 2: $4.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for cytidine and $3.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for 2'-deoxycytidine), which indicates that MtCDA has no preference for any of the two substrates (cytidine or 2'-deoxycytidine) free in solution. The *E. coli* CDA has been shown to be more specific for 2'-deoxycytidine than cytidine [12, 35]. Our results, however, demonstrate that MtCDA has similar specificity for both substrates. Interestingly, even though further studies are required to show whether or not MtCDA is a metalloenzyme or metal-ion activated, here we demonstrate that recombinant MtCDA catalyzes deamination of cytidine and 2'-deoxycytidine in the absence of any metal.

To assess the role of acid/base chemistry in the MtCDA enzymatic reaction, the pH dependence of k_{cat} and k_{cat}/K_M for cytidine was studied. The pH-rate profiles of the kinetic parameters using cytidine as substrate are shown in Fig. 6. It should be pointed out that data fitting employed the pH range of 4.0-6.0 for $\log k_{cat}$ versus pH plot and of 4-11 for $\log k_{cat}/K_M$ versus pH plot. The pH rate profile for k_{cat} was quite complex. It showed a decrease at low pHs with a slope of 1 (Fig. 6A), demonstrating that protonation of a group with apparent pK_a value of 4.3 ± 1.0 abolishes MtCDA activity for cytidine as substrate.

Moreover, pH rate profile for k_{cat} indicates that a group with apparent $\text{p}K_{\text{a}}$ value of 8-9 increases even further the catalytic rate when deprotonated. Even though pH dependence profiles exhibiting three $\text{p}K_{\text{a}}$ values have been described [24], measurements of enzyme activity at pH values larger than 11 would be required for MtCDA. However, most enzymes and proteins undergo denaturative changes in conformation when exposed to pH values above 10-12 [36]. At any rate, it is preliminary to invoke more complex models at this point and further experimental results should be provided. The $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ profile showed a decrease at low pH values with a slope of 1 (Fig. 6B), suggesting that protonation of a single ionizable group, exhibiting an apparent $\text{p}K_{\text{a}}$ value of 4.7 ± 0.7 , reduces cytidine binding. The $\text{p}K_{\text{a}}$ values of 4.3 for k_{cat} and of 4.7 for $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ lie in the normal $\text{p}K$ range for the β -carboxyl of aspartate and γ -carboxyl of glutamate amino acid residues. A glutamic acid residue has been shown to be conserved in dimeric and tetrameric CDAs from different organisms and was correlated with substrate binding [30, 33]. The pH-rate profiles of *E. coli* and *B. subtilis* indicated a decrease at low pHs, with $\text{p}K_{\text{a}}$ values of 4.7 and 5.4, respectively, which also display a single protonated group [30]. It is thus tempting to suggest that the conserved Glu47 residue of MtCDA (Fig. 3) plays an important role in substrate binding. Site-directed mutagenesis, equilibrium binding, and measurements of steady-state kinetic parameters of mutant protein will have to be carried out to ascertain whether Glu47 plays any role in substrate binding and/or catalysis.

Enzyme kinetics and structural studies provide a framework on which to base the target-based rational design of new agents with antitubercular activity. However, the availability of sufficient amounts of proteins of *M. tuberculosis* still

remains an essential and laborious step. Unfortunately, even when a genome can be sequenced, only up to 20 % of the protein targets can produce soluble proteins under very basic experimental conditions [37]. Thus, expression of proteins in soluble form has been identified as an important bottleneck in efforts to determine biological activity and crystal structure of *M. tuberculosis* proteins [38]. The results presented here will provide homogeneous MtCDA in quantities necessary for studies on the enzyme mechanism of action by pre-steady-state kinetics, its metal requirement by atomic absorption spectroscopy, three-dimensional structure determination by X-ray diffraction. Incidentally, MtCDA has been crystallized, X-ray diffraction patterns collected and structural refinement underway, which should be reported shortly elsewhere. We believe that the results reported here are pivotal to further efforts towards understanding the role, if any, of pyrimidine salvage pathway in *M. tuberculosis* survival and/or persistence by gene replacement, as well as MtCDA functional and structural studies on which to base the rational design of antitubercular agents.

Acknowledgments

This work was supported by National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPEs) and Millennium Initiative Program (CNPq), Brazil, to DSS and LAB. DSS and LAB also acknowledge grants awarded by FINEP. DSS (304051/1975-06) and LAB (520182/99-5) are research career awardees from the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq). ZASQ acknowledges a scholarship awarded by CNPq. The authors are grateful to Lucas S. Toniolo and Sarah L. Selbach for technical assistance.

References

1. C. Dye, S. Scheele, P. Dolin, V. Pathania, M.C. Raviglione, Global burden of tuberculosis: Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project, *J Am Med Ass* 282 (1999) 677–686.
2. WHO/Stop TB Partnership. The Global Stop TB 2006-2015. WHO/HTM/STB/2006.35, World Health Organization (<http://www.who.int>).
3. CDC. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with Extensive Resistance to Second-Line Drugs Worldwide, 2000-2004, *MMWR* 55 (2006) 301-305.
4. A. Jain, R. Mondal, Extensively drug-resistant tuberculosis: current challenges and threats, *FEMS Immunol Med Microbiol* 53 (2008) 145-50.
5. L.A. Basso, L.H.P. Silva LH, A.G. Fett-Neto, W.F. Azevedo Jr, I.S. Moreira, M.S. Palma, J.B. Calixto, S. Astolfi Filho, R.R. Santos, M.B. Soares, D.S. Santos, The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases-a review, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100 (2005) 475-506.
6. G. E. Shambaugh, Pyrimidine biosynthesis, *Am. J Clin Nutr* 32 (1979) 1290-1297
7. P. R. Wheeler, Biosynthesis and scavenging of pyrimidines by pathogenic mycobacteria, *J Gen Microbiol* 136 (1990) 189-201.
8. J. E. Hyde, Targeting purine and pyrimidine metabolism in human apicomplexan parasites, *Curr. Drug Targets*, 8 (2007) 31-47.

9. S.T. Cole, K.D. Eisenach, D.N. McMurray, W.R. Jacobs, Tuberculosis and the Tubercle Bacillus, ASM Press, Washington, D.C., 2005.
10. M. Braibant, P. Gilot, J. Content, The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*, FEMS Microbiol. Rev. 24 (2000) 449-467.
11. C.W. Carter, The nucleoside deaminases for cytidine and adenosine: Structure, transition state stabilization, mechanism, and evolution, Biochimie 77 (1995) 92-98.
12. G.W. Ashley, P.A. Bartlett, Purification and Properties of Cytidine Deaminase from *Escherichia coli*, J Biol Chem 259 (1984) 13615-13620.
13. R.M. Cohen, R. Wolfenden, Cytidine deaminase *Escherichia coli*, J Biol Chem 246 (1971) 7561-7565.
14. B.H. Song, J. Neuhard, Chromosomal location, cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* *cdd* gene encoding cytidine/deoxycytidine deaminase, Mol Gen Genet 216 (1989) 462-468.
15. P.L. Itapa, G. Cercignani, E. Balestreri, Partial purification and properties of Cytidine deaminase from Baker's yeast, Biochemistry 9 (1970) 3390-3395.
16. D.F. Wentworth and R. Wolfenden, Cytidine deaminases (from *Escherichia coli* and human liver), Biochemistry 14 (1983) 5099-5105.
17. L. Betts, S. Xiang, S.A. Short, R. Wolfenden, C.W. Carter, Cytidine deaminase. The 2.3 Å crystal structure of an enzyme: transition-state analog complex, J Mol Biol 235 (1994) 635-656.
18. A. Vita, T. Cacciamani, P. Natalini, S. Puggieri, G. Magn, Cytidine deaminase from human spleen, Exp Med Biol 253 (1989) 71-77.

19. S.T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry III, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, B.G. Barrell, Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature* 393 (1998) 537–544.
20. J. Sambrook, D.W. Russell, *Molecular Cloning A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
21. U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.
22. M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72 (1976) 248-254.
23. G.D. Brand, F.C. Krause, L.P. Silva, J.R. Leite, J.A. Melo, M.V. Prates, J.B. Pesquero, E.L. Santos, C.R. Nakaie, C.M. Costa-Neto, C.Jr. Bloch, Bradykinin related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*, *Peptides* 27 (2006) 2137-2146.
24. P.F. Cook, W.W. Cleland, pH dependence of kinetic parameters and isotope effects, in *Enzyme Kinetics and Mechanisms*, Garland Science, London and New York, 2007, pp. 325-366.
25. K.C. Kelley, K.J. Huestis, D.A. Austen, C.T. Sanderson, M.A. Donoghue, S.K. Stickel, E.S. Kawasaki, M.S. Osburne, Regulation of CD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in *Escherichia coli*, *Gene* 156 (1995) 33–36.

26. J.S. Oliveira, C.A. Pinto, L.A. Basso, D.S. Santos, Cloning and overexpression in soluble form of functional shikimate kinase and 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*, *Protein Expr. Purif.* 22 (2001) 430–435.
27. R.G. Silva, L.P. Carvalho, J.S. Oliveira, C.A. Pinto, M.A. Mendes, M.S. Palma, L.A. Basso, D.S. Santos, Cloning, overexpression, and purification of functional human purine nucleoside phosphorylase, *Protein Expr. Purif.* 27 (2003) 158–164.
28. C. Rizzi, J. Frazzon, F. Ely, P.G. Weber, I.O. Fonseca, M. Gallas, J.S. Oliveira, M.A. Mendes, B.M. Souza, M.S. Palma, D.S. Santos, L.A. Basso, DAHP synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning, expression, and purification of functional enzyme, *Protein Expr. Purif.* 40 (2005) 23–30.
29. T.H. Grossman, E.S. Kawasaki, S.R. Punreddy, M.S. Osburne. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability, *Gene* 209 (1998) 95–103.
30. D.C. Carlow, C.W. Carter, N. Mejhede, R. Wolfenden, Cytidine Deaminases from *B. subtilis* and *E. coli*: Compensating Effects of Changing Zinc Coordination and Quaternary Structure, *Biochemistry* 38 (1999) 12258–12265.
31. P.H. Hirel, M.J. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, S. Blanquet, Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid, *Proc Natl Acad Sci* 86 (1989) 8247–8251.

32. J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Research* 22 (1994) 4673-4680.
33. E. Johansson, N. Mejlhede, S. Larsen, Crystal Structure of the Cytidine Deaminase from *Bacillus subtilis* at 2.0 Å Resolution, *Biochemistry* 41 (2002) 2563-2570.
34. E. Johansson, J. Neuhard, M. Willemoe, S. Larsen, Structural, Kinetic, and Mutational Studies of the Zinc Ion Environment in Tetrameric Cytidine Deaminase, *Biochemistry* 43 (2004) 6020-6029.
35. R.B. Trimble, F. Maley, Metabolism of 4-N-Hydroxy-Cytidine in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 108 (1971) 145-153.
36. S. England, S. Seifter, Precipitation techniques, *Methods Enzymol.* 182 (1990) 285-300.
37. S.A. Lesley, P. Kuhn, A. Godzik, A.M. Deacon, I. Mathews, A. Kreusch, G. Spraggon, H. E. Klock, D. McMullan, T. Shin, J. Vincent, A. Robb, L.S. Brinen, M.D. Miller, T.M. McPhillips, M.A. Miller, D. Scheibe, J.M. Canaves, C. Guda, L. Jaroszewski, T.L. Selby, M.A. Elsliger, J. Wooley, S.S. Taylor, K.O. Hodgson, I.A. Wilson, P.G. Schultz, R.C. Stevens RC, Structural genomics of the *Thermotoga maritima* proteome implemented in a high-throughput structure determination pipeline, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 11664-11669.
38. R. Vicentelli, C. Bignon, A. Gruez, S. Canaan, G. Sulzenbacher, M. Tegoni, V. Campanacci, C. Cambillau, Medium-scale structural genomics:

strategies for protein expression and crystallization, *Acc. Chem. Res.* 36
(2003) 197-225.

Figures and legends

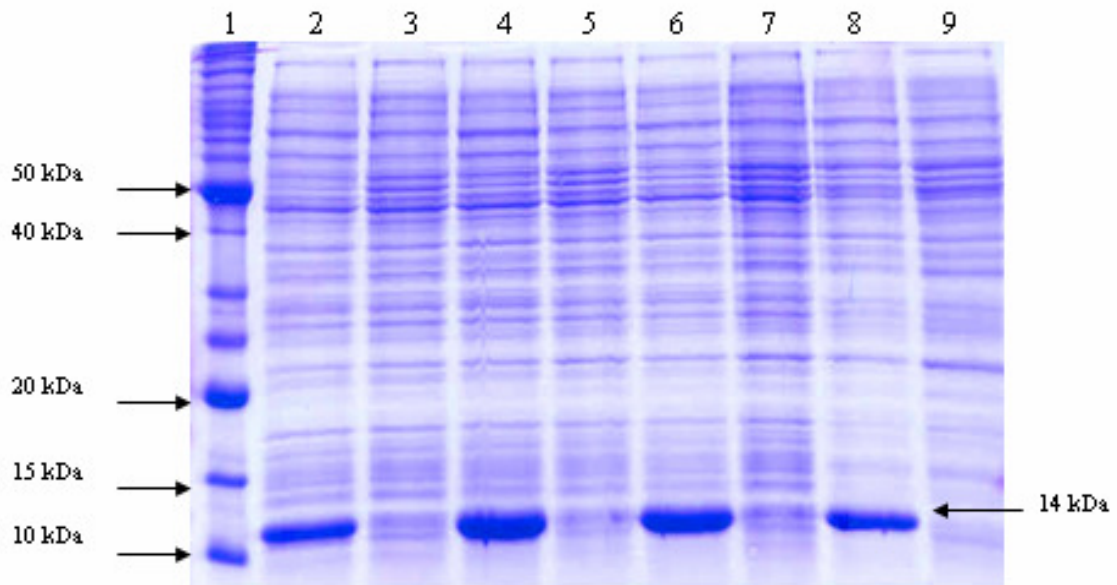


Fig. 1. SDS-PAGE (15 %) analysis of total soluble protein as a function of growth time. Lane 1, MW Bench marker (Invitrogen); Lane 2, 4, 6, and 8, *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a(+)::*cdd*]; lanes 3, 5, 7, and 9, *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a(+)(control)]. The times of cell growth were 3h (lanes 2 and 3), 6h (lanes 4 and 5), 9h (lanes 6 and 7), and 12h (lanes 8 and 9).

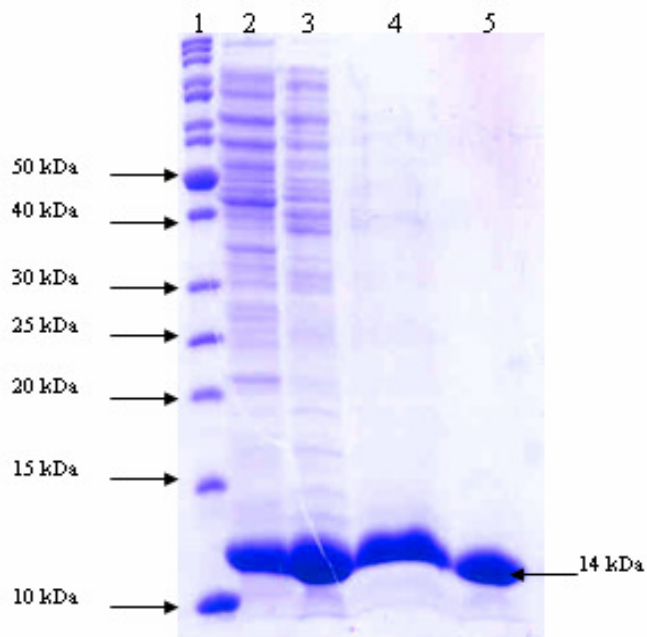


Fig. 2. SDS-PAGE (15 %) analysis of pooled fractions of the chromatographic steps of MtCDA protein purification protocol. Lane 1, MW Bench marker (Invitrogen); lane 2, crude extract (190.5 μg); lane 3, Q-Sepharose Fast Flow (207.4 μg); lane 4, Sephacryl S-200 (17.5 μg); lane 5, Butyl HP (11.6 μg). The values given between parentheses are for the amount of total protein loaded on each lane

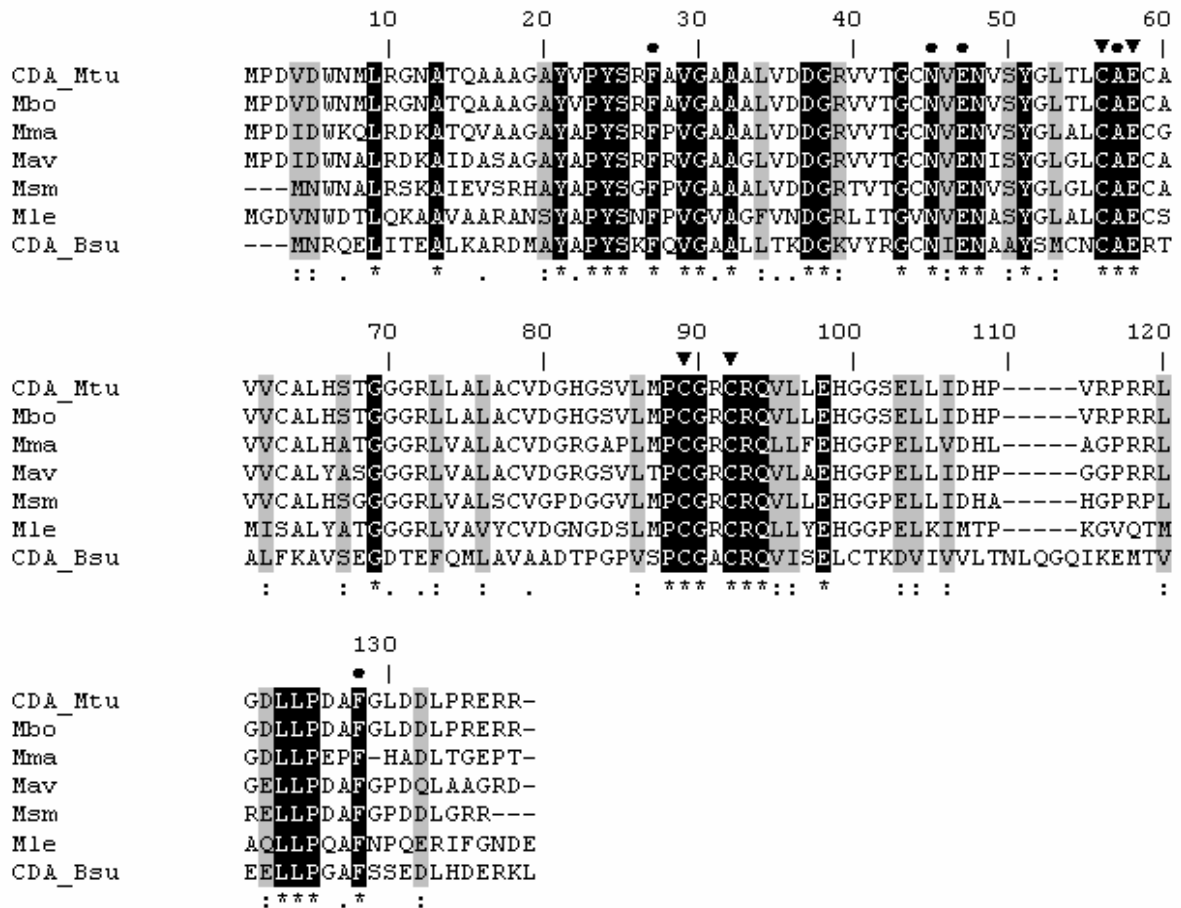


Fig. 3. Multiple sequence alignment of *M. tuberculosis* CDA (CDA_Mtu) with homotetrameric *B. subtilis* CDA (CDA_Bsu), whose crystal structure was determined, and other potential mycobacterial CDAs: *M. bovis* (Mbo), *M. marinum* (Mma), *M. avium* (Mav), *M. smegmatis* (Msm), and *M. leprae* (Mle) using the program CLUSTALW [Thompson *et al.* 1994]. Identical conserved residues are shown in white on a black background and are also indicated by asterisks below the alignment. Strongly similar and weakly similar residues are identified by columns and periods, respectively. Strongly similar residues are also shaded in gray. Triangles and circles above the alignment indicate, respectively, active-site residues involved in the presumptive ribose binding loop and zinc coordination.

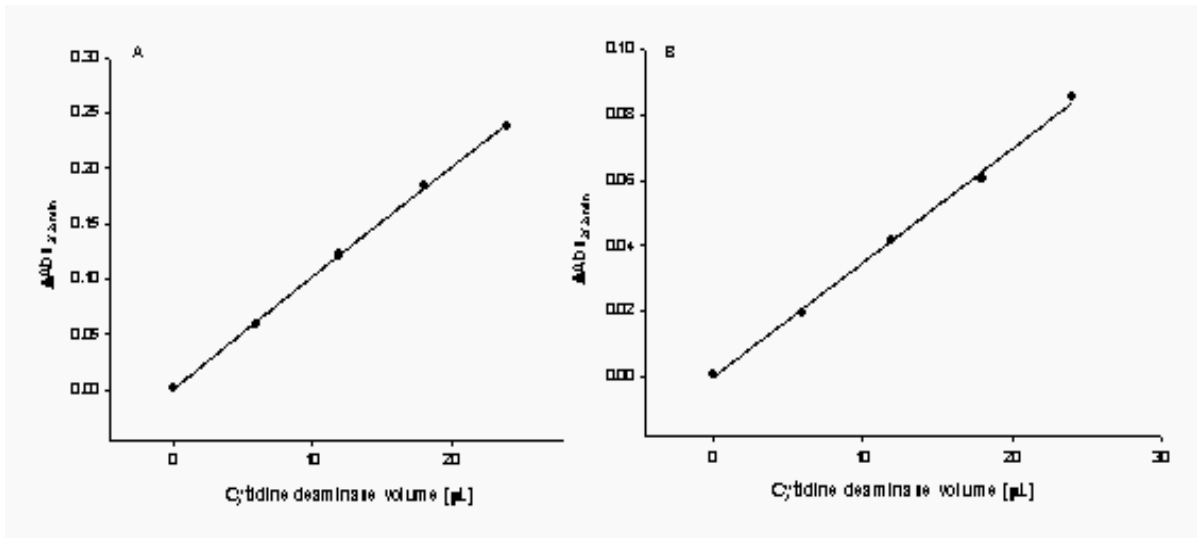


Fig. 4. Linear dependence of MtCDA activity on protein volume. Reactions were started by addition of varying volumes of recombinant protein with 2'-deoxycytidine (Fig. 3A) and cytidine (Fig. 3B) at a constant concentration value of 333.6 μM.

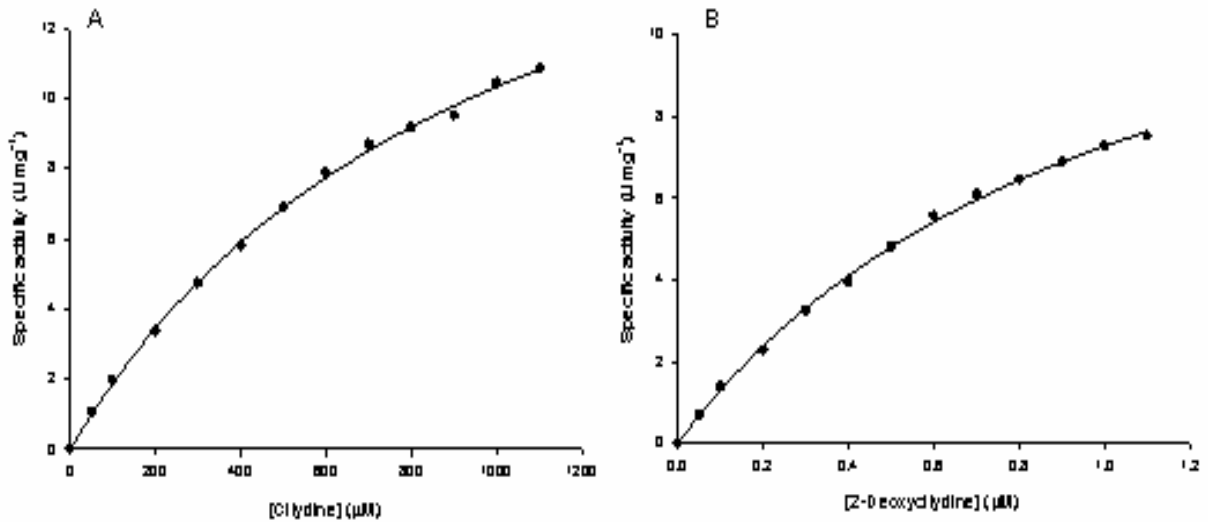


Fig. 5. Determination of steady-state kinetic parameters. Substrate saturation curves for (A) cytidine, and (B) 2'-deoxycytidine as the variable substrate.

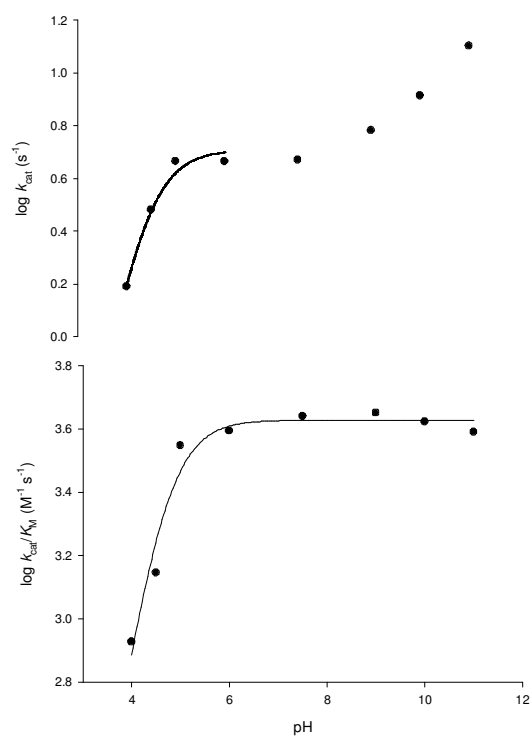


Fig. 6. Dependence of kinetic parameters on pH for MtCDA-catalyzed deamination of cytidine. (A) pH dependence of $\log k_{\text{cat}}$ on pH, (B) pH dependence of $\log k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$. Data fitting as described in Material and Methods.

Table 1. MtCDA protein purification protocol starting from 10 g of cells obtained from 2.8 L of cell culture.

Purification step	Total protein (mg)	Total enzyme activity (U)	Specific activity (U mg ⁻¹)	Substrate	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	819.15	1923.35	2.35	Cytidine	1	100
		1376.36	1.68	2'-deoxycytidine	1	100
Qsepharose FF	207.4	1151.95	5.55	Cytidine	2.4	60
		799.16	3.85	2'-deoxycytidine	2.3	58
Sephacryl S-200	84.14	363.76	4.32	Cytidine	1.8	19
		259.49	3.08	2'-deoxycytidine	1.8	19
Butyl HP	34.98	190.17	5.44	Cytidine	2.3	10
		131.13	3.75	2'-deoxycytidine	2.2	10

Table 2. Apparent kinetic parameters for MtCDA^a.

Substrates	V _{max} (U mg ⁻¹)	K _M (μM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _M (M ⁻¹ s ⁻¹)
Cytidine	21 ± 1	1004 ± 53	4.8 ± 0.1	4.8 (± 0.3) x 10 ³
2'-deoxycytidine	15 ± 1	1059 ± 64	3.5 ± 0.1	3.3 (± 0.2) x 10 ³

^a All constants were measured in 50mM Tris-HCl pH 7.5 at 25 °C.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ressurgimento de diferentes cepas de *M. tuberculosis*, o agente da tuberculose, resistentes a pelo menos três drogas de segunda geração (XDR-TB) reflete a evidente necessidade de gerar novas formas de combater a doença para melhorar as condições do tratamento utilizado atualmente, o qual, segundo dados da Organização Mundial da Saúde, é responsável pela morte de uma pessoa a cada 16 segundos [22]. Levando-se em conta a importância do estado de latência à sobrevivência do bacilo, quando diferentes genes e rotas metabólicas são diferencialmente expressos, é necessário o desenvolvimento de trabalhos que caracterizem com maior profundidade esta fase da infecção por *M. tuberculosis* [18]. Dentre estas rotas, a possível participação da via de salvamento de pirimidinas na viabilidade da bactéria torna as enzimas desta via importantes alvos para o desenvolvimento de futuros fármacos e tratamentos capazes de evitar a progressão e a reativação da infecção.

Os programas globais de descobrimento de novas drogas antituberculose têm prestado particular interesse na identificação de análogos de pirimidinas com atividade seletiva contra *M. tuberculosis*, justificando nosso interesse na enzima citidina deaminase do metabolismo de pirimidinas.

A amplificação e clonagem do gene *cdd* foi confirmada pelo sequenciamento concluindo que o produto deste corresponde à proteína CDA reportada para *M. tuberculosis*. A CDA obteve uma melhor expressão (figura 1 do artigo) durante 24 h, obtendo um pico maior às 6 h, após observamos a uma diminuição na expressão.

A proteína pura foi obtida através de três passos cromatográficos (troca aniônica, gel filtração e interação hidrofóbica). Diferentes colunas cromatográficas foram testadas a fim de determinar um protocolo eficiente de purificação. Os testes realizados para definição do protocolo encontram-se no Anexo 2. A proteína pura apresentou atividade em todas as etapas de purificação, mostrando uma diminuição apenas no passo de exclusão por tamanho (gel filtração); os contaminantes encontrados podem ter ocasionado esta diminuição na atividade devido a uma interferência na ligação enzima-substrato.

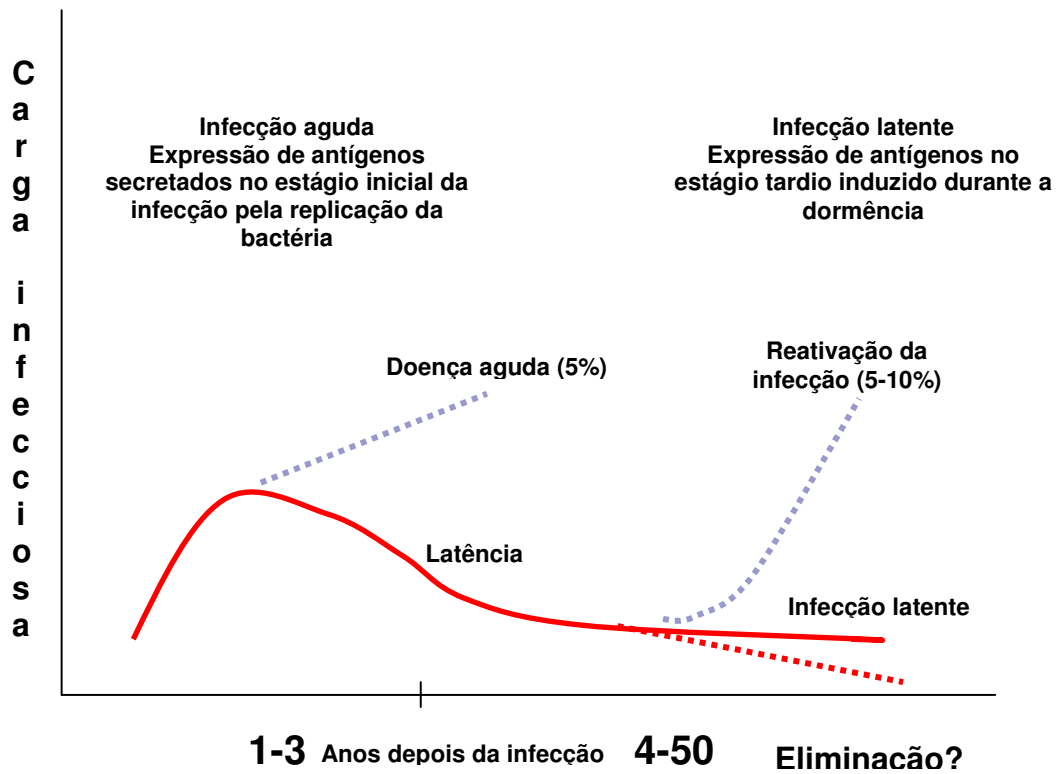
Durante a realização dos ensaios cinéticos constatou-se a necessidade da utilização de uma cubeta com o caminho óptico de 0.5cm, devido às altas concentrações de substrato necessárias para alcançar a saturação desejada. Desta forma, foi possível determinar as constantes aparentes para cada substrato e o perfil de pH.

Por fim, experimentos de cristalização foram realizados e cristais da proteína homogênea foram obtidos segundo o protocolo descrito no anexo 4. Estes experimentos foram repetidos a fim de estabelecer um protocolo e estes resultados servirão para posteriores estudos estruturais. Ensaio de associação entre a *MtCDA* e alguns metais serão realizados a fim de determinar um mecanismo de ação para a enzima. Estudos comparativos entre a *MtCDA* e outras CDAs (proteínas homologas de outros organismos) também serão realizados a fim de demonstrar uma similaridade e complementar os resultados previamente obtidos.

Este trabalho amplia o conhecimento da citidina deaminase com o objetivo de, futuramente, identificar inibidores naturais e/ou sintéticos que

permitam o posterior desenvolvimento de drogas para o tratamento da infecção latente causada por *M. tuberculosis*, além de fornecer indícios que revelem a eventual importância desta proteína ao metabolismo do bacilo da TB.

ANEXO 1. DESENVOLVIMENTO DA TUBERCULOSE



Adaptado de Anderson P. TRENDS in Microbiology.2006,15,7-13.

ANEXO 2. TESTES DE PURIFICAÇÃO DA CDA DE *M. tuberculosis*

Os testes de purificação da CDA recombinante foram realizados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) através do equipamento ÄKTA (GE Healthcare). As células foram preparadas a partir de uma colônia de BL21(DE3) contendo o plasmídeo recombinante (previamente selecionada em meio sólido com os antibióticos necessários) que foi inoculada em 50 mL de LB líquido e cultivada a 37°C, 180 rpm por 16-18h. Do crescimento obtido, 1 mL foi inoculado em 4 frascos de 2 L contendo 700 mL de LB líquido com antibiótico. Quando o cultivo atingiu a OD₆₀₀ entre 0.4-0.6 foi incubado por mais 6 horas. As células foram centrifugadas a 10,879 g por 30 min e armazenadas a -20°C. Este protocolo rendeu aproximadamente 10 g de células.

As células foram ressuspensas na proporção de 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7.5 (tampão A) para cada grama de células. A fração solúvel das células foi sonicada (15 pulsos 10s 60% de amplitude) e centrifugada a 23,500 por 30 min. O sobrenadante foi tratado com sulfato de estreptomicina 1% para clivagem do DNA presente na amostra, centrifugada e dialisada contra o tampão A.

Para estabelecer o protocolo final de purificação foram utilizadas diferentes mini-colunas cromatográficas, tais como de troca catiônica (HiTrap SP FF, HiTrap SP XL, HiTrap CM FF), de exclusão por tamanho (Sephacryl S-200), de interação hidrofóbica (HiTrap Phenyl FF high sub, Butyl Sepharose HP, Octyl FF), de troca aniônica (Hi Trap QFF e Hi Trap DEAE FF).

A proteína de interesse não interagiu com as colunas HiTrap de troca catiônica. Como primeira coluna foi escolhida a coluna de troca aniônica Hi Trap QFF, que interagiu bem com a CDA eliminando alguns dos contaminantes. Como segunda coluna, sempre foi utilizada a Sephacryl S-200 sendo útil não só para retirar algumas proteínas contaminantes da amostra, como também para trocar o tampão permitindo a utilização de uma terceira coluna. E finalmente, nas interações hidrofóbicas houve interação da proteína alvo com a resina, sendo a mesma foi observada no gradiente. O melhor resultado foi obtido com a Butyl sepharose HP, utilizada como terceira coluna.

Contudo, apenas a coluna de troca catiônica HiTrap SP FF (Figura 1) e a de exclusão por tamanho Sephacryl S-100 (Figura 2) mostraram eficiência na eliminação dos contaminantes durante a eluição da proteína de interesse. O protocolo de purificação da proteína está descrito no manuscrito.

ANEXO 3. CRISTALIZAÇÃO DA CDA DE *M. tuberculosis*

Os cristais da proteína foram obtidos pelo método de difusão de vapor em gota pendente utilizando Hampton Crystal Screen and Crystal Screen 2 kits (Hampton Research).

CDA foi dializada contra 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 e concentrada até 12 mg/mL. A proteína recombinante foi cristalizada em gotas que contém 2 μ L de proteína e 2 μ L da solução de cristalização. Dos kits utilizados, o primeiro (Crystal screen) formou cristais em três condições diferentes às 24h do crescimento. Escolhemos a condição que apresentava cristais mais definidos (Hepes 0.1 M, pH 7.5 e cloreto de sódio 4.3 M) para posteriores estudos.

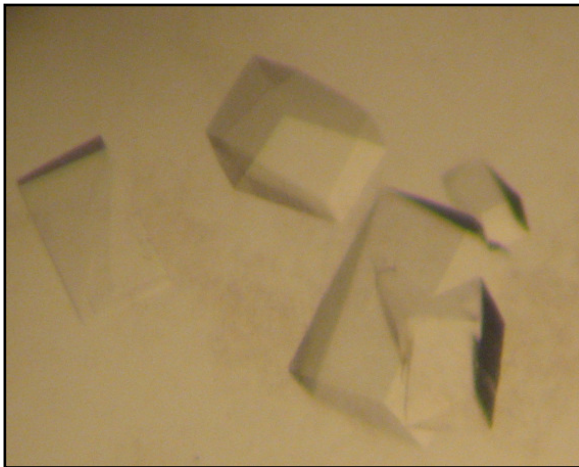


Figura 5. Cristais obtidos a partir da proteína homogenea Citidina deaminase

ANEXO 4. CONFIRMAÇÃO DO ARTIGO SUBMETIDO

From: PEP (ELS) [mailto:pep@elsevier.com]
Sent: Mon 2/23/2009 2:10 PM
To: Luiz Augusto Basso
Subject: Protein Expression and Purification: Submission Confirmation

Title: The Rv3315c locus from Mycobacterium tuberculosis H37Rv codes for a functional cytidine deaminase that hydrolyses cytidine and 2'-deoxycytidine
Corresponding Author: Dr. Luiz Augusto Basso
Authors: Zilpa A Sanchez-Quitian, MSc; Christopher Z Schneider, PhD; Rodrigo G Ducati, PhD; Carlos Bloch Jr, PhD; Diogenes S Santos, PhD;

Dear Dr. Basso,

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

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

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

Your username is: LBASSO

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

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

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

Kind regards,

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andersen P. Vaccine strategies against latent tuberculosis infection. Trends Microbiol. 2006 (15):7-13.
2. Ber J, Timoczko J, Stryer L. Biochemistry. Chapter Nucleotide biosynthesis. Fifth edition, Ed. Guanabara Kogan 2002.
3. Betts L, Xiang S, Short SA, Wolfenden R, Carter CW. Cytidine deaminase. The 2.3 Å crystal structure of an enzyme: transition-state analog complex, J Mol Biol. 1994 (235):635-656.
4. Carlow DC, Carter CW, Mejhede N, Wolfenden R. Cytidine deaminases from *B. subtilis* and *E. coli*: Compensating Effects of changing zinc coordination and quaternary structure, Biochemistry. 1999 (38):12258-12265.
5. Chung SJ, Fomme C, Verdine G, Structure of human Cytidine Deaminase bound to a potent inhibitor, J. Med. Chem 2005 (48): 658–660
6. Cohen RM, Wolfenden R. Cytidine deaminase from *Escherichia coli*. J Biol Chem. 1971 (246):7561-7565.
7. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. Arch Intern Med. 2003 (163):1009–21.
8. Ducati R, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos SD. The resumption of consumption- A review on tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006 (101):697-714.

9. [Jackson M](#), [Berthet FX](#), [Otal I](#), [Rauzier J](#), [Martin C](#), [Gicquel B](#), [Guilhot C](#). The *Mycobacterium tuberculosis* purine biosynthetic pathway: isolation and characterization of the purC and purL genes. *Mycrobiol.*1996 (142):2439-47.
10. Johansson E, Mejlhede N, Larsen S. Crystal Structure of the Cytidine Deaminase from *Bacillus subtilis* at 2.0 Å Resolution, *Biochemistry*. 2002 (41):2563-2570.
11. [Matteelli A](#), [Migliori GB](#), [Cirillo D](#), [Centis R](#), [Girard E](#), [Raviglion M](#). Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control. *Expert Rev Ant Infect Ther*. 2007 (5):857-71.
12. [Leyten EM](#), [Lin MY](#), [Franken KL](#), [Friggen A.H.](#), [Prins C.](#), [van Meijgaarden K.E.](#), [Voskuil M.I.](#), [Weldingh K.](#), [Andersen P.](#), [Schoolnik G.K.](#), [Arend S.M.](#), [Ottenhoff T.H.](#) and [Klein M.R.](#) Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect*. 2006 (8):2052-60.
13. Johansson E, Neuhard J, Willemoe M, Larsen S. Structural, Kinetic, and Mutational studies of the zinc ion environment in tetrameric Cytidine Deaminase, *Biochemistry*. 2004: (43) 6020-6029.
14. Navatnam N, Sarwar R. An overview of Cytidine deaminase, *Int J Hematology* 2006 (83):192-200.
15. Neidhardt F. *Escherichia coli* and *Salmonella*, *Cellular and Molecular Biology*. Washington: ASM PRESS; 2005
16. O`Donovan, GA, Neuhard J. Pyrimidine metabolism in microorganisms. *Bact Rev*. 1970 (34):278-343.

17. 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):489-95.
18. Pastel S, Parsyan A, Gunn J, Barry M, Reed C, Sharnprapai S, Horsburgh C. Risk of progression to active tuberculosis among foreign-born persons with latent tuberculosis. *Chest J.* 2007 (131):1811-1816.
19. Pasqualoto KF, Ferreira EI. An approach for the rational design of new antituberculous agents. *Curr Drug Targets.* 2001 (4):27-37.
20. Pierard A, Glansdorff N, Yashphe J. Mutations affecting uridine monophosphate pyrophosphorylase or the *argB* gene in *Escherichia coli*. Effects on carbamoyl phosphate and pyrimidine biosynthesis and on uracil uptake. *Mol Gen Genet.* 1972 (118):235-245.
21. Somasekaram A, Jurmuz A, How A, Scott J. Intracellular Localization of Human Cytidine Deaminase, *J Biol Chem* 1999 (274):28405-28412.
22. Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility (TAACF). Global discovery program for novel anti-tuberculosis drugs. (<http://www.taacf.org/>). Acesso em: 4 set. 2008.
23. Ulmer JE, Boum Y, Thouvenel CD, Myllykalio H, Sibley H. 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):2056–2064.
24. Voet D, Voet J. *Bioquímica*. Porto Alegre: Artes médicas; Ed. John Wiley & Sons 2006

25. WHO (2006) Global Tuberculosis Control: Surveillance, planning, financing, WHO/HTM/TB/2006.362, World Health Organization, Geneva (<http://www.who.int>). Acesso em: 20 jul. 2008.
26. WHO/Stop TB Partnership. The Global Stop TB 2006-2015. WHO/HTM/STB/2006.35, World Health Organization (<http://www.who.int>).
27. Wise J. Southern Africa is moving swiftly to combat the threat of XDR-TB. Bull World Health Organ. 2006 (84):924-25.
28. Wentworth DF, Wolfenden R. Cytidine deaminase (from *Escherichia.coli* and human liver). Met Enz. 1978 (51):401-407.