



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCIÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Clonagem, expressão, purificação e caracterização da  
enzima citidina monofosfato quinase de *Mycobacterium  
tuberculosis*.

Mestranda: Caroline Thum

Orientadores: Luiz Augusto Basso

Diógenes Santiago Santos

**Caroline Thum**

Clonagem, expressão, purificação e caracterização da  
enzima citidina monofosfato quinase de *Mycobacterium  
tuberculosis*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências  
na Pontifícia Universidade Católica do Rio do Sul como requisito  
para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e  
Molecular.

Orientadores: Luiz Augusto Basso  
Diógenes Santiago Santos

Porto Alegre  
Outubro, 2008

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos professores orientadores Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos e Prof. Dr. Luiz Augusto Basso pela fundamental oportunidade, confiança depositada, aprendizado e apoio durante todo trabalho.

Aos doutores Hermides Pinto Junior, Gaby Renard, Cláudia Paiva Nunes, Eraldo Batista Júnior pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho através de compreensão, apoio, conhecimento e amizade.

A todos os colegas do laboratório que de alguma maneira me ajudaram a executar este trabalho, seja no trabalho de bancada em uma ou outra troca de diálise, pela companhia nas madrugadas de trabalho e até mesmo nos momentos de descontração, hora fundamental de aliviar a tensão. O apoio de vocês foi indispensável e nunca esquecerei disso.

Aos meus pais, Ernani e Carmen pelo apoio, incentivo e o colo nos momentos difíceis durante todos esses anos e principalmente pelo exemplo pessoal a ser seguido; e ao meu irmão Vini, por agüentar meus momentos de mal humor.

Aos meus amigos por entenderem os momentos de estresse. E ao meu noivo Rafael, por entender meus finais de semana e madrugadas no laboratório. Por me apoiar sempre, principalmente nos momentos de crise sabendo dizer exatamente aquilo que eu precisava escutar.

A todos o meu sincero agradecimento e afeto.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Tuberculose: Conceito e transmissão	1
1.2 Tuberculose: Um pouco da história	2
1.3 Dados e estimativas	3
1.4 Co-infecção com HIV e as Cepas Resistentes	4
2.NUCLEOTÍDEOS	7
2.1 Síntese de Nucleotídeos	7
2.1.1 Síntese de pirimidinas	8
2.2 Nucleosídeos monofosfato quinases	12
2.2.1 Citidina Monofosfato Quinase	13
3.OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral e Justificativa	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4. MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL	18
Abbreviations List	20
Abstract	20
Introduction	21
Material and Methods	24
Results and Discussion	28
Acknowledgments	35
References	36
Figure Legends	42
Figures	45
Table1	51
5. CONSIDERACOES FINAIS	52

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
7. ANEXOS	59
ANEXO I	59
ANEXO II	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

- A.C. – antes de Cristo
- BSA – do inglês *bovine serum albumin* (albumina de soro bovino)
- CMK- citidina monofosfato quinase
- CMP – citidina monofosfato
- CDP- citidina difosfato
- CTP- citidina trifosfato
- DCMP - deoxicitidina monofosfato
- HIV – do inglês *Human Immunodeficiency Virus* (vírus da imunodeficiência humana)
- INH – isoniazida
- MDR-TB – do inglês *Multidrug-resistant TB* (tuberculose resistente a múltiplas drogas)
- NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NMP- nucleosídeos monofosfatos
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- ORF – do inglês *open reading frame* (fase de leitura aberta)
- PRPP- 5- fosforribosil-1-pirofosfato
- RIF - rifampicina
- TB – tuberculose
- UMP- uridina monofosfato
- XDR-TB – do inglês *Extensively Drug-Resistant Tuberculosis* (tuberculose extensivamente resistente às drogas)

## RESUMO

A tuberculose (TB), doença infecto contagiosa, causada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, é a maior causa de morte por agente infeccioso do mundo. O aumento da incidência de cepas multi-resistentes (MDR-TB) e extensivamente resistentes (XDR-TB) tem contribuído para o aumento do número de mortes. Por este motivo, há a necessidade de estudos para identificarmos, no metabolismo da micobactéria, possíveis alvos para o desenvolvimento de drogas capazes de combater estas novas cepas. Em bactérias, as rotas de interconversão de nucleotídeos pirimidínicos são importantes em inúmeros processos essenciais, incluindo a biosíntese de DNA, RNA e fosfolipídios. O gene (*cmk*, Rv1712) que codifica a enzima citidina monofosfato quinase (CMK) foi descrito, por homologia de seqüência, no genoma de *M. tuberculosis*. Neste trabalho o gene *cmk* foi amplificado por PCR e clonado em vetor de expressão. A proteína CMK foi expressa em grande escala e purificada. O produto homogêneo desta purificação sofreu seqüenciamento N-terminal e espectrometria de massa. Os resultados da cinética em estado estacionário mostraram que o gene *cmk* de *M. tuberculosis* codifica a proteína monomérica CMK, que fosforila preferencialmente CMP e dCMP, e que UMP é um substrato pobre. Estes resultados reforçam a presença de uma nucleotídeo monofosfato quinase específica para UMP em *M. tuberculosis*. Os parâmetros cinéticos fornecidos pelo ensaio e análise dos gráficos de duplo-recíproco mostraram que a enzima forma um complexo ternário e que seu mecanismo é seqüencial. Um possível papel para a enzima CMK é discutido.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, remains the leading cause of mortality due to a bacterial pathogen. The proliferation rate of multidrug- and extensively drug-resistant strains of *M. tuberculosis* is increasing worldwide. There is a continuous requirement for studies on mycobacterial metabolism to identify promising targets for the development of new anti-TB agents. In bacteria, pyrimidine nucleotide interconversion pathways are important in a number of essential processes, including DNA, RNA, and phospholipid biosynthesis. The gene (*cmk*, *Rv1712*) encoding cytidine monophosphate kinase (CMK) enzyme has been proposed by sequence homology to be present in the genome of *M. tuberculosis*. Here we describe PCR amplification and cloning of *cmk* gene, expression and purification of its product to homogeneity, and N-terminal sequencing and mass spectrometry analyses of the recombinant protein. Results of steady-state kinetics showed that *M. tuberculosis cmk* gene encodes a monomeric CMK that phosphorylates preferentially CMP and dCMP, and that UMP is a poor substrate. These results reinforce the presence of a nucleoside monophosphate kinase specific for UMP in *M. tuberculosis*. Double-reciprocal plots of steady-state kinetic results were consistent with ternary complex formation and sequential mechanism for *M. tuberculosis* CMK reaction. A plausible role for CMK in *M. tuberculosis* is discussed.



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Tuberculose: Conceito e transmissão

Tuberculose (TB) é uma doença infecciosa comum e mortal causada por micobactéria, principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*. A tuberculose, mais comumente, ataca os pulmões, mas também pode afetar a pleura, o sistema nervoso central, o sistema linfático, o sistema circulatório, o sistema urogenital, ossos, articulações e até mesmo a pele. Outras micobactérias tais como *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canetti*, and *Mycobacterium microti* podem, também, causar tuberculose, mas estas espécies não infectam, normalmente, adultos saudáveis [1].

Apesar de também atingir vários órgãos do corpo, a doença só é transmitida por quem estiver infectado com o bacilo nos pulmões (85% dos casos)[2]. A disseminação acontece pelo ar. Quando uma pessoa contaminada espirra, tosse ou fala, expelle partículas infecciosas de 0,5 a 5 µm de diâmetro. Um simples espirro pode expelir cerca de 40.000 gotículas [3]. Cada uma destas gotículas pode transmitir a doença, à medida que a dose infecciosa do bacilo é extremamente baixa, a inalação de apenas uma bactéria pode causar uma nova infecção. Os bacilos da tuberculose jogados no ar permanecem em suspensão durante horas, o que aumenta ainda mais as chances de contaminação [4].

A transmissão ocorre somente através de pessoas que possuem a forma ativa, não latente, de TB. A probabilidade da transmissão de uma pessoa para outra depende do número de partículas infecciosas expelidas pelo portador, a duração da exposição e a virulência da cepa de *M. tuberculosis* [4]. A tuberculose pode ser transmitida, ainda da mãe para o feto, antes ou durante o nascimento, ao respirar ou engolir o líquido amniótico infectado. Nos países em desenvolvimento, as crianças

podem ser infectadas, também, por *Mycobacterium bovis*, que pode estar presente no leite não pasteurizado. A cadeia de transmissão pode, todavia ser quebrada isolando pacientes com a doença ativa e iniciando uma terapia efetiva contra a TB [5].

## **1.2 Tuberculose: Um pouco da história**

A tuberculose é um problema antigo para civilização humana. Presume-se que o gênero *Mycobacterium* originou-se há mais de 150 milhões e que o progenitor de *Mycobacterium tuberculosis* tenha sido contemporâneo e co-evoluído com os primeiros homínidos do leste da África há 3 milhões de anos atrás [2]. Já os representantes modernos de *M. tuberculosis* parecem ter se originado de um progenitor comum entre 15.000 a 30.000 anos atrás. Historiadores estabeleceram a existência da Tuberculose (TB) endêmica no Egito, na Índia e na China a partir de múmias datando de 5.000, 3.300 e 3.300 anos A.C. respectivamente [2]. A epidemia de TB na Europa teve seu início por volta do século 17, devido à alta densidade populacional e às baixas condições sanitárias. Estima-se que em 1650, 20% da população tenha morrido por causa da doença. Já no século 19, o *M. tuberculosis* parece ter sido responsável pela morte de 1/3 da população em Paris. Com o início das grandes navegações e com a colonização das Américas e da África sub-Saariana pelos europeus, a doença foi transmitida a populações africanas espalhando-se mundialmente [2, 6].

Com o surgimento dos antibióticos estreptomicina (década de 1940), isoniazida (década de 1950), etambutol (década de 1960), e rifampicina (década de 1970), a batalha contra a tuberculose parecia ter sido finalmente ganha. Mas, nos meados da década de 1980, o número de casos nos Estados Unidos começou a

aumentar novamente. O advento da AIDS, combinada com a superpopulação e com as más condições de saneamento em muitas áreas urbanas, fez com que a tuberculose voltasse a ser um grave problema de saúde pública [5]. Assim, há uma década, mais precisamente em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a tuberculose em estado de emergência no mundo, sendo ainda hoje a maior causa de morte por doença infecciosa em adultos [5].

### **1.3 Dados e estimativas**

Segundo estimativas da OMS, dois bilhões de pessoas, correspondendo a um terço da população mundial, estão infectados por *Mycobacterium tuberculosis*. Destes, 8 milhões desenvolverão a doença e 2 milhões morrerão a cada ano [5].

O Brasil ocupa o 15º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo (Fig.1). Estima-se uma prevalência de 50 milhões de infectados com cerca de 111.000 casos novos e 6.000 óbitos ocorrendo anualmente [7]. Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan/MS), são notificados anualmente 85 mil casos novos (correspondendo a um coeficiente de incidência de 47/100.000 habitantes) no Brasil.

## Tuberculosis notification rates, 2006

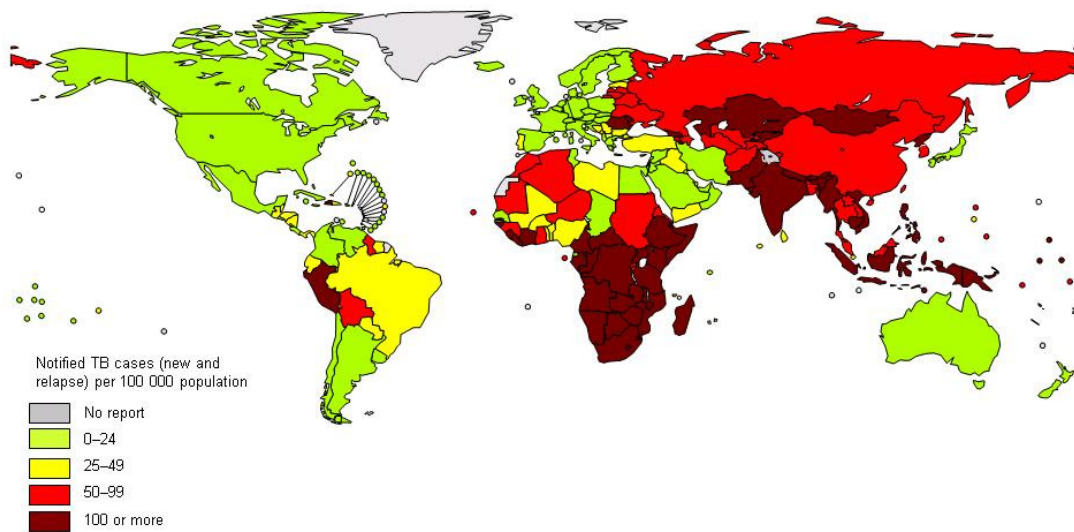


Figura 1 - Casos notificados de TB a cada 100 000 habitantes no ano de 2006. Fonte: WHO: Report WHO/HTM/TB/2008.393, (2008). Página da organização Mundial da Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/healthtopics/tb.htm>. Acesso em: setembro de 2008.

As metas internacionais estabelecidas pela OMS e pactuadas pelo governo brasileiro são de diagnosticar 70% dos casos de tuberculose estimados e curá-los em 85%. A tuberculose ainda é um sério problema da saúde pública, com profundas raízes sociais. Está intimamente ligada à pobreza e à má distribuição de renda, além da não adesão dos portadores e/ou familiares/contactantes do tratamento adequado a doença [7].

### 1.4 Co-infecção com HIV e as Cepas Resistentes

Em alguns países, inclusive no Brasil, o aumento dramático do número de casos da doença deveu-se à disseminação da AIDS. A infecção pelo HIV é atualmente reconhecida como o maior fator de risco já identificado para a ativação da TB do seu estado latente para a TB clinicamente ativa. Estima-se que aproximadamente 1/3 da população mundial possua TB na sua forma latente, pois a

doença é contida pelo sistema imune. Assim aproximadamente 12% das mortes por TB são atribuídas à co-infecção pelo HIV [8,9]. Vinculado a esse fenômeno, o surgimento de linhagens de bactérias resistentes aos medicamentos ameaça transformar a tuberculose num flagelo semelhante ao que varreu o mundo antes da descoberta dos antibióticos [8].

O tratamento de pacientes infectados por cepas resistentes a dois ou mais antibióticos passou a exigir a combinação de drogas menos potentes e mais tóxicas por um período prolongado (até dois anos) e, em alguns casos, a remoção cirúrgica da porção doente do pulmão [10]. Isso faz com que muitos pacientes abandonem o tratamento – no Brasil, 9,4% desistem precocemente, gerando bacilos resistentes às drogas [7]. Em um estudo realizado no ano 1991, em Nova York, 89% dos 224 pacientes estudados não completaram o tempo de terapia e um quarto retornou aos hospitais dentro de um ano, ainda sofrendo de tuberculose [2]. As cepas resistentes a drogas passaram a ser a maior preocupação dos programas de controle de TB à medida que não há cura para algumas cepas multiresistentes (MDR-TB) de *M. tuberculosis*. Há uma preocupação que estas cepas se espalhem pelo mundo, evidenciando a necessidade de novas medidas de controle, tais como, novos métodos de diagnóstico, melhores drogas para o tratamento e vacinas mais efetivas [5]. Pacientes portadores da cepa MDR-TB, definida como resistente a pelo menos rifampicina (RIF) e Isoniazida (INH), necessitam de um tratamento alternativo envolvendo drogas de segunda-linha que são mais caras, mais tóxicas e menos eficientes. De acordo com o relatório de 2006 da OMS, baseado em uma combinação de levantamentos clínicos e estimativas, aproximadamente 460.000 (17%) dos novos casos globais de TB em 2004 são resistentes a múltiplas drogas (MDR-TB) [11].

Além disso, em 2004, cepas extensivamente resistentes a drogas (XDR) foram introduzidas com larga distribuição mundial [10]. A Organização Mundial de Saúde definiu a XDR-TB como sendo além de uma cepa MDR-TB, também resistente a qualquer fluoroquinolona, e a pelo menos um das três drogas injetáveis usadas no tratamento contra TB: capreomicina, kanamicina e amikacina. Nos Estados Unidos, República da Coreia e Látvia, estudos populacionais demonstram que 4%, 15% e 19%, respectivamente, dos casos de MDR-TB são adicionalmente XDR-TB [10]. Mais recentemente, identificou-se uma cepa XDR-TB na província de KwaZulu-Natal, na África do Sul, altamente mortífera, sendo que de 544 pacientes estudados na área em 2005, 221 apresentavam MDR-TB. Destes 221 pacientes, 53 foram diagnosticados como XDR-TB, sendo que o tempo médio de sobrevivência destes pacientes com XDR-TB, a partir da coleta de amostras para exames, foi de 16 dias para 52 dos 53 pacientes, incluindo 6 trabalhadores de saúde [12]. Os principais fatores que influenciam a emergência de cepas resistentes são regimes de tratamento inapropriados ou falha dos pacientes em cumprir o tratamento, particularmente quando os sintomas da doença desaparecem logo após o começo da ação das drogas, ou quando os efeitos colaterais tornam-se insuportáveis (náuseas, vômitos, icterícia, etc.). Por este motivo, há a necessidade imediata do desenvolvimento de novas drogas que sejam mais eficientes, menos tóxicas, que permitam a diminuição do tempo de terapia e do período de transmissibilidade da doença [10].

## 2. NUCLEOTÍDEOS

### 2.1 Síntese de Nucleotídeos

Os Nucleotídeos ou nucleótidos são compostos ricos em energia e que auxiliam os processos metabólicos, principalmente nas biossínteses, da maioria das células. Funcionam ainda como sinais químicos, respondendo assim a hormônios e outros estímulos extracelulares; eles são também componentes estruturais de cofactores enzimáticos, intermediários metabólicos e parte dos ácidos nucléicos.

Os nucleotídeos contêm resíduos de ácido fosfórico, de um açúcar (em geral uma pentose: ribose ou 2'-desoxiribose e de uma base púrica ou pirimídica). Tanto as bases púricas quanto as pirimídicas possuem anéis heterocíclicos contendo átomos de nitrogênio e carbono. As bases púricas podem ser entendidas como constituídas por um anel pirimidina (anel com 6 átomos: 4C,2N) ligado a um anel imidazol (anel com 5 átomos: 3C,2N). São bases púricas a adenina (6-aminopurina), a guanina (2-amino-6-oxipurina), a hipoxantina (6-oxipurina) e a xantina (2,6-dioxipurina). São bases pirimídicas a citosina (2-oxi-4 aminopirimidina), o uracilo (2,4-dioxipirimidina), a timina (2,4-dioxi-5-metilpirimidina) e o ácido orótico (2,4-dioxi-6-carboxipirimidina)[13].

Por hidrólise dos nucleotídeos (saída dos resíduos fosfato) geram-se nucleosídeos púricos (adenosina, guanosina, inosina, xantosina) ou pirimídicos (citidina, uridina, timidina e orotidina) que contém uma base e uma ose ligados por uma ligação glicosídica de tipo N. Os nucleosídeos monofosfatos (NMP) são os nucleotídeos mais simples e designam-se de acordo com o nucleosídeo constituinte: adenilato (AMP), guanilato (GMP), inosinato(IMP), xantinilato (XMP), citidilato (CMP), uridilato (UMP), timidilato (TMP) e orotidilato (OMP). Se não se especifica o

contrário, subentende-se que o fosfato está ligado (fosfoéster) no hidroxilo 5' da pentose [13].

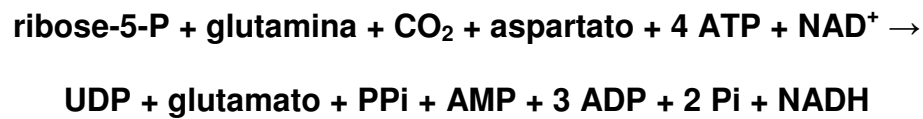
Os nucleotídeos podem ser sintetizados de duas formas: pela síntese “*de novo*” que começa com seus precursores metabólicos: aminoácidos, ribose-5-P, CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>; ou pelas ditas vias de recuperação (salvamento), que podem ser a reconstrução a partir de bases, ou a fosforilação de nucleosídeos liberados na quebra dos ácidos nucléicos. Vários precursores importantes são compartilhados para pirimidinas e purinas, como o PRPP, sendo a estrutura da ribose mantida ou retirada no nucleotídeo produzido. Em cada via um aminoácido é um importante precursor: glicina no caso das purinas e aspartato no caso das pirimidinas. Para que a quantidade de nucleotídeos seja suficiente para a síntese dos ácidos nucléicos, a produção de nucleotídeos precisa continuar ocorrendo durante a síntese destes, podendo inclusive ser um limitante da velocidade, já que a quantidade total de nucleotídeos armazenados nas células é muito pequena [13].

### **2.1.1 Síntese de pirimidinas**

A síntese *de novo* dos nucleosídeos pirimídicos (Fig. 2) envolve, como primeiro passo, uma sintetase de carbamil-P citoplasmática (sintetase de carbamil-P II) em que o doador de nitrogênio é a glutamina ( $\text{CO}_2 + \text{glutamina} + 2 \text{ATP} \rightarrow \text{carbamil-P} + 2 \text{ADP} + \text{Pi} + \text{glutamato}$ ). A segunda reação é catalisada pela transcarbamilase do aspartato ( $\text{carbamil-P} + \text{aspartato} \rightarrow \text{carbamil-aspartato} + \text{Pi}$ ). O carbamil-aspartato vai originar ácido orótico que é o intermediário pirimídico que reagindo com o PRPP gera o primeiro nucleotídeo desta via metabólica: o orotidilato (OMP); a reação é catalisada por uma transferase de fosforibosil (ácido orótico +



PRPP → OMP + PPi). O OMP por descarboxilação gera o UMP. Por ação catalítica de uma quinase o UMP pode ser fosforilado a UDP que está na origem quer do CTP quer do TMP. Os átomos N1, C4, C5 e C6 do anel pirimidina têm origem no aspartato; o átomo N3 na glutamina e o átomo C2 no CO<sub>2</sub> [12]. A equação soma relativa à síntese do UDP pode escrever-se:



O CTP forma-se por aminação do carbono 4 do UTP (transferência do grupo amida da glutamina que sai como glutamato); o UTP forma-se por fosforilação do UDP (ação da quinase de nucleosídeos difosfatos).

Tal como no caso dos nucleosídeos das purinas também os nucleosídeos das pirimidinas podem ser “salvos” por ação de quinases (nucleosídeo + ATP → NMP + ADP). Tal como nos casos da hipoxantina, guanina e adenina também o uracilo pode ser “salvo” por ação de uma fosforibosil-transferase (uracilo + PRPP → UMP + PPi) [14].

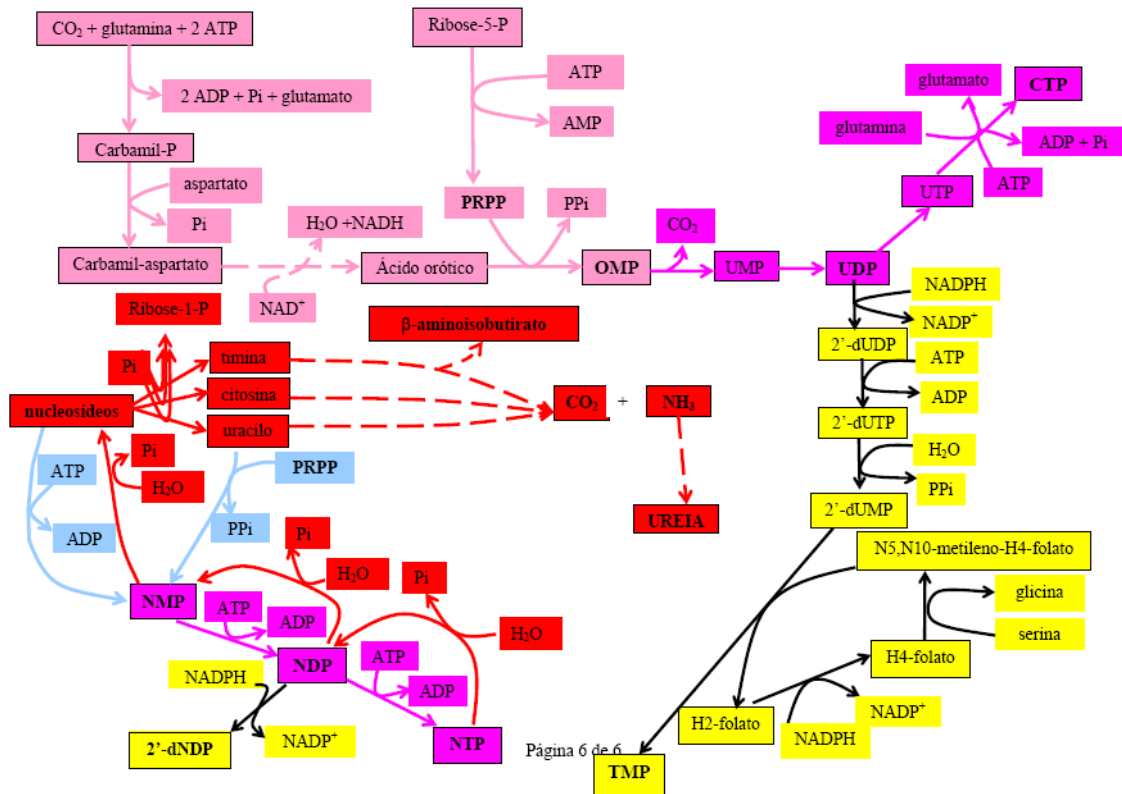
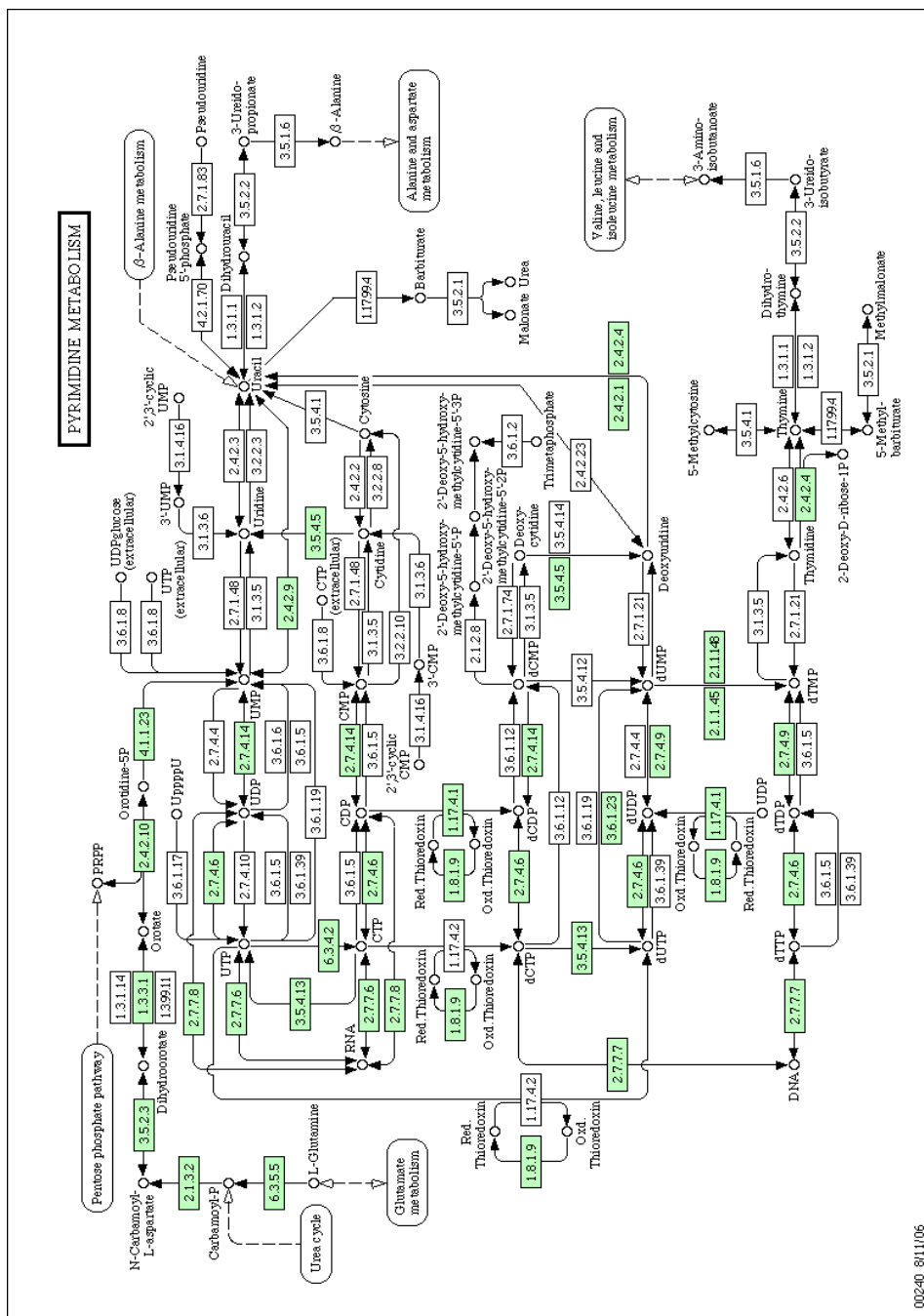


Figura 2 – Esquema da síntese *de novo* dos nucleosídeos pirimídicos [14].

As enzimas responsáveis pelo metabolismo de pirimidinas de *M. tuberculosis* estão representadas esquematicamente na figura 3. Porém, as enzimas marcadas em verde, como por exemplo, a enzima nucleosídeo monofosfato quinase não tiveram, ainda a sua atuação comprovada no metabolismo das pirimidinas deste organismo evidenciando a necessidade de estudos voltados para a síntese de nucleotídeos desse organismo.

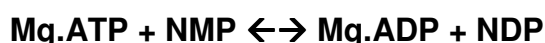


00240 8/11/06

Figura 3 - Representação esquemática do metabolismo de pirimidinas do *Mycobacterium tuberculosis* e as enzimas responsáveis pela catálise das reações [15].

## 2.2 Nucleosídeo monofosfato quinases

Nucleosídeo monofosfato quinases (NMP quinases) (E.C 2.7.4.4) pertencem a uma família de enzimas essenciais no metabolismo celular, incluindo a biossíntese e regeneração de ácidos nucleicos celulares. Eles também participam da ativação de pró-drogas tais como AZT ou Aciclovir que são usados principalmente no tratamento de câncer ou em infecções virais [16]. As NMP quinases atuam especificamente nos nucleotídeos monofosfatos (NMPs) formados na rota “de novo” ou de salvamento das purinas e pirimidinas, catalisando a transferência de um grupo  $\gamma$  fosforil de um nucleosídeo trifosfatado para um NMP de acordo com o esquema:



As enzimas UMP/CMP quinases catalisam a transferência do grupo fosforil do ATP para UMP ou CMP para formar ADP e UDP ou CDP. Todas as pirimidinas celulares são derivadas do UMP, sendo a UMP quinase a enzima que catalisa o primeiro passo no comprometimento do metabolismo das pirimidinas.

Embora as NMP quinases de diferentes espécies pareçam ser bem conservadas em termos de seqüência e estrutura tridimensional, variações na sua especificidade pelo substrato ou estrutura quaternária são freqüentemente observadas. Em Eucariotos, por exemplo, a fosforilação de UMP e CMP é executada por uma única enzima, já em procariotos, há distintas NMP Kinases para cada nucleotídeo pirimidínico: CMP/dCMP, UMP e TMP [16]. Quanto à estrutura quaternária as enzimas CMP quinases bacterianas são monômeros como a maioria das NMP kinases, porém, as UMP kinases tem se apresentado como hexâmeros e

as enzimas TMPK de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Herpes simplex* se apresentaram como dímeros [17].

### 2.2.1 Citidina Monofosfato Quinase

As estruturas das proteínas CMP/UMP quinases foram determinadas, através de cristalografia (formação de cristais de proteína), de vários organismos: CMP quinase de *E. coli* (fig. 4) [18; 19]. UMP/CMP quinase de *Dictiostelium discoideum* [20, 21], UMP quinase de *E. coli* [22], *Saccharomyces cerevisiae* [23, 24], *Streptococcus pneumoniae* [25], *Staphylococcus aureus* [26] e Humano [27, 28].

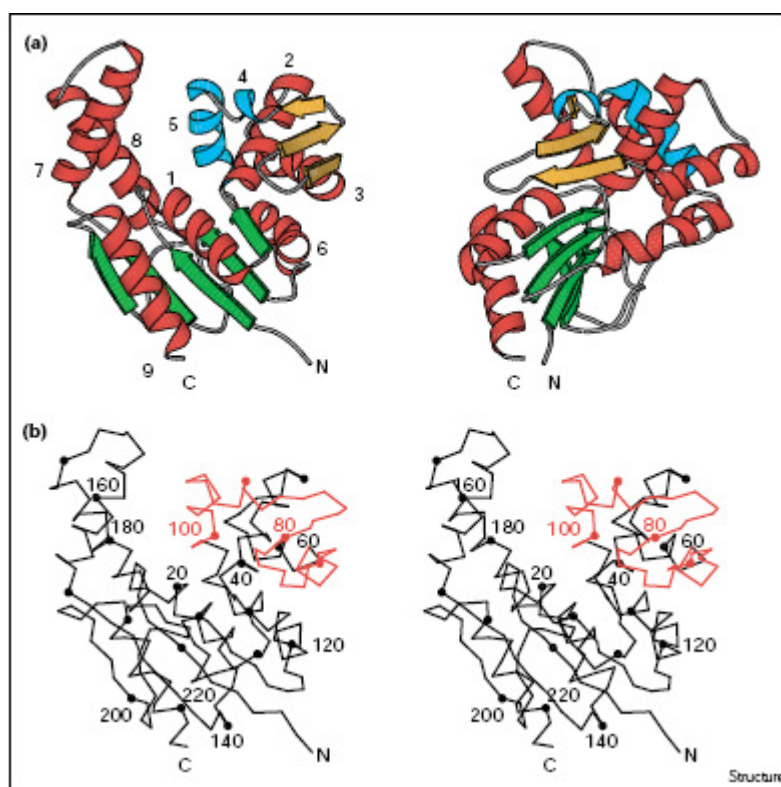


Figura 4: Estrutura geral da CMK de *E. coli* em complexo com CDP. (a) Duas visões ortogonais da molécula de proteína: hélices  $\alpha$  em vermelho e numeradas; folhas  $\beta$  em verde. Na estrutura secundária elementos do inserto entre Leu63-Gln 102 estão mostrados em azul (hélices  $\alpha$ ) e em laranja (folhas  $\beta$ ). (b) Desenho mostrando o traçado dos  $C\alpha$  de CDP-CMK de *E. coli*. Cada 10 resíduos estão representados por uma bola e cada 20 resíduos são numerados. O inserto Leu63-Gln102 é mostrado em vermelho. (figura retirada de Briozzo et al, 1998).

As CMP quinases bacterianas (EC 2.7.4.14) conservam os três domínios que são encontrados em UMP/CMP quinases eucarióticas (EC 2.7.4.14): Cinco folhas beta paralelas centrais rodeadas por alfa hélices, definida como domínio CORE, uma seqüência *fingerprint* de Gly-X-X-Gly-x-Gly-Lys (loop de ligação ao fosfato), e uma alta concentração de aminoácidos de carga negativa na cavidade central, para ligação ao substrato. O domínio CORE é usado como uma plataforma rígida onde ao seu redor se localizam as alfa hélices pequenas do domínio LID, situado na porção C-terminal, e o domínio de ligação NMP que se move por um mecanismo de ligação, fechando-se sob a ligação de um doador de fosfato e um nucleotídeo acceptor respectivamente [18].

NMP quinases possuem seqüências substancialmente similares, e as enzimas desta família exibem uma estrutura tri-dimensional relacionada. Porém a presença de inserções no domínio de ligação NMP, leva a uma diversidade estrutural e a variação na especificidade pelo substrato nesta família de proteínas [18].

A CMP quinase de *E. coli*, por exemplo, difere de outras NMP-quinases pela presença de uma longa inserção de mais ou menos 40 resíduos no domínio de ligação de NMP, entre  $\alpha 3$  e  $\alpha 6$  (fig. 4), e um domínio LID pequeno. O inserto destes resíduos formam três folhas betas e duas alfa hélices, o que provoca rearranjos conformacionais na ligação de CDP [18].

As NMP quinases tem sido classificadas dentro de duas famílias: as pequenas NMP quinases com uma pequena região LID e as longas NMP quinases com longas regiões LID que contém um inserto de 25 resíduos de aminoácidos. Embora as CMP quinases de *E. coli* e *Mycobacterium tuberculosis* pertençam às NMP quinases longas (com inserto de 40 resíduos), elas possuem uma pequena

região LID. Assim essas enzimas fazem parte de uma terceira família de NMP quinases: longa seqüência com grande variedade de insertos. Essa família não está só restrita a esses dois exemplos, pois o alinhamento de pelo menos 13 seqüências publicadas de CMP quinases bacterianas contém um inserto bem conservado de 40 resíduos de aminoácidos [18].

A estrutura do cristal de CMP quinase de *E. coli* sozinho e em complexo com o produto da reação CDP ou com vários NMPs (CMP, dCMP, AraCMP e ddCMP), permitiu identificar os resíduos envolvidos no reconhecimento da nucleobase, da pentose e dos grupos fosfatos [18, 19]. Assim, descobriu-se que os resíduos envolvidos na interação com o fosfato de vários NMPs são a Arg41, Arg131, e Arg181. Descobriu-se também a especificidade das interações da CMPK de *E.coli* com CDP não é relacionada com o inserto no sítio de ligação NMP, mas sim devido à interação de resíduos típicos da seqüência de CMP quinase que não pertencem ao inserto. Estes resíduos estão localizados na  $\alpha$  hélice 2 (Ser36),  $\alpha$ 6 (Arg110), na conexão do loop  $\beta$ 6 para  $\beta$ 7 (Asp132),  $\alpha$ 8 (Arg188) e são fortemente conservados entre as CMP quinases. A ligação do CDP, por sua vez, causa mudanças conformacionais ao domínio NMP fechando as duas  $\alpha$  hélices e movimentando a folha  $\beta$  para longe do substrato [18, 19].

Alem disso, a análise da estrutura de CMP quinase de *E. coli* em complexo com CMP ou dCMP mostrou que a discriminação entre CMP e UMP é executada pela Ser36, Arg110 e Asp132, que forma pontes de hidrogênio com o grupo amino e com o átomo N3 da citosina (fig. 45) [16]. Outros experimentos, estes de mutações sítio dirigidas, confirmaram o papel da Ser101, Arg181 e Asp185 no reconhecimento do açúcar pentose (fig. 4).

Mutantes de *E. coli* desprovidos de atividade de CMP quinase possuem um nível de CTP comparáveis à cepa selvagem, devido à enzima CTP sintetase que produz CTP através da aminação do UTP. Porém o pool de dCDP e a taxa de replicação de DNA estão reduzidos nos mutantes pois a enzima ribonucleosídeo difosfato redutase, que catalisa a formação do 2'-deoxiribonucleosídeo difosfato dos seus correspondentes ribonucleotídeos, não podem ser inteiramente compensadas na falta de CMK quinase de *E.coli* [18, 19]. Portanto a fosforilação de dCMP aparece como o principal papel da CMK E.coli.

Porém, a condição letal dos mutantes isolados de *Saccharomyces cerevisiae* para UMP/CMP quinase foi recentemente identificada indicando a necessidade desta enzima para a sobrevivência do organismo e possivelmente de células de mamíferos. Além disso, a enzima CMK já foi sugerida como sendo essencial para o crescimento de duas bactérias Gram-positivas: *Bacillus subtilis* e *Streptococcus pneumoniae* [25, 26]. Sabendo-se que as CMKs bacterianas diferem de outras NMP quinases por possuírem um inserto de 40 resíduos no domínio de ligação das NMPs e um domínio LID pequeno, essas diferenças poderiam ser exploradas no desenvolvimento de novas drogas antibacterianas mais seguras.

CMK de *Mycobacterium tuberculosis* exibe uma significativa similaridade de seqüência com outras NMP quinases bacterianas, inclusive nos resíduos envolvidos na ligação do substrato e na catálise. A enzima possui 230 resíduos de aminoácidos e pertence à classe das NMP quinases longas, que incluem CMK e AMPK de *E. coli* (227 e 214 resíduos respectivamente), ao contrário das NMP quinases pequenas entre as quais se encontram a UMPK de *Saccharomyces cerevisiae* (204 resíduos) e AMPK quinase suína (194 resíduos) [18].



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral e Justificativa

Este trabalho faz parte de um projeto maior de caracterização das rotas metabólicas das purinas e pirimidinas de *Mycobacterium tuberculosis*. Algumas enzimas destas rotas já foram mostradas como essenciais em organismos procariotos, inclusive em *Mycobacterium tuberculosis*. Na busca de novos alvos para drogas anti-tuberculose buscou-se caracterizar, neste trabalho, uma das enzimas do metabolismo das pirimidinas, a enzima citidina monofosfato quinase (CMK).

No presente trabalho tivemos como objetivo a produção heteróloga da enzima CMK em *E. coli*, garantindo assim quantidades necessárias da enzima para ensaios que ajudem a elucidar seu papel no metabolismo do *M. tuberculosis*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Clonagem do gene que codifica a enzima citidina monofosfato quinase de *Mycobacterium tuberculosis* em vetor de clonagem pCR-Blunt (Invitrogen) para posterior subclonagem em vetor de expressão pET-23a(+) (Invitrogen).
- Superexpressão da enzima em diferentes cepas de *Escherichia coli* a fim de obtê-la na sua forma solúvel.
- Otimização do processo de purificação da enzima CMK por cromatografia líquida de rápida performance FPLC testando várias colunas para estabelecer um protocolo de purificação e obter a proteína altamente pura;
- Seqüenciamento dos aminoácidos da porção N-terminal da proteína purificada;
- Análise da identidade por espectrometria de massas;
- Testes da atividade enzimática utilizando ensaio com enzimas acopladas em espectrofotômetro em UV-visível.

#### **4. MANUSCRITO DO TRABALHO EXPERIMENTAL**

Title of the article:

The *Rv1712* locus from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv codes for a functional cytidine monophosphate kinase that preferentially phosphorylates (d)CMP

Periodic chosen for submission:

Journal of Bacteriology

**The *Rv1712* locus from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv codes for a functional cytidine monophosphate kinase that preferentially phosphorylates (d)CMP**

Caroline Thum<sup>a,b</sup>, Christopher Z. Schneider<sup>a</sup>, Mario S. Palma<sup>c</sup>, Diógenes S. Santos<sup>a\*</sup>, Luiz A. Basso<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

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

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

*Keywords:* nucleotide biosynthesis, pyrimidine metabolism, cytidine monophosphate kinase, *Mycobacterium tuberculosis*, mycobacteria

Running title: CMP kinase from *Mycobacterium tuberculosis*

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

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

Brazil. Phone/Fax: +55 51 33203629; E-mail addresses: [luiz.basso@pucri.br](mailto:luiz.basso@pucri.br) or

[diogenes@pucri.br](mailto:diogenes@pucri.br)

## Abbreviations List

CMK, cytidine monophosphate kinase; dCMP, deoxycytidine monophosphate; DMSO, dimethyl sulfoxide; ESI-MS, Electrospray Ionization Mass Spectrometry; IPTG, isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; MDR-TB, multidrug-resistant tuberculosis; MtCMK, cytidine monophosphate kinase from *Mycobacterium tuberculosis*; NMP, nucleoside monophosphate; NMP kinases, nucleoside monophosphate kinases; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TB, tuberculosis; UMP kinase, uridine monophosphate kinase; XDR-TB, extensively drug-resistant tuberculosis.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB), caused by *Mycobacterium tuberculosis*, remains the leading cause of mortality due to a bacterial pathogen. The proliferation rate of multidrug- and extensively drug-resistant strains of *M. tuberculosis* is increasing worldwide. There is a continuous requirement for studies on mycobacterial metabolism to identify promising targets for the development of new anti-TB agents. In bacteria, pyrimidine nucleotide interconversion pathways are important in a number of essential processes, including DNA, RNA, and phospholipid biosynthesis. The gene (*cmk*, *Rv1712*) encoding cytidine monophosphate kinase (CMK) enzyme has been proposed by sequence homology to be present in the genome of *M. tuberculosis*. Here we describe PCR amplification and cloning of *cmk* gene, expression and purification of its product to homogeneity, and N-terminal sequencing and mass spectrometry analyses of the recombinant protein. Results of steady-state kinetics showed that *M. tuberculosis cmk* gene encodes a monomeric CMK that phosphorylates preferentially CMP and dCMP, and that UMP is a poor substrate. These results reinforce the presence of a nucleoside monophosphate kinase specific for UMP in *M. tuberculosis*. Double-reciprocal

plots of steady-state kinetic results were consistent with ternary complex formation and sequential mechanism for *M. tuberculosis* CMK reaction. A plausible role for CMK in *M. tuberculosis* is discussed.

## INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is one of the major causes of morbidity and mortality worldwide, especially in poor and developing countries. The World Health Organization estimated that in 2006 occurred 9.2 million new cases of TB with 1.7 million deaths, and that there were 0.5 million cases of multi-drug resistant TB (MDR-TB), which is defined as strains resistant to at least isoniazid and rifampicin, the most potent drugs (45). The Centers of Disease Control and Prevention of USA has reported the emergence of extensively drug-resistant (XDR) TB cases, defined as cases in persons with TB whose isolates are MDR-TB as well as resistant to any one of the fluoroquinolone drugs and to at least one of the three injectable second-line drugs, Amikacin, Kanamycin or Capreomycin (10, 11). XDR-TB is widespread raising the prospect of virtually incurable TB worldwide (15). The factors that most influence the emergence of drug-resistant strains include inappropriate treatment regimens, and patient noncompliance in completing the prescribed courses of therapy due to the lengthy standard “short-course” treatment or when the side effects become unbearable (16). *M. tuberculosis* has been considered the world’s most successful pathogen and this is largely due to the ability of the bacillus to persist in host tissues, where drugs that are rapidly bactericidal *in vitro* require prolonged administration to achieve comparable *in vivo* effects (20). Hence, more effective and less toxic anti-tubercular agents are needed to shorten the duration of current treatment, improve the treatment of MDR- and XDR-TB, and to provide effective treatment of latent tuberculosis infection.

The genomic revolution has been the main driver of the target-based approach to drug development. The rational design for drug development includes structural and functional efforts. Enzyme inhibitors make up roughly 25 % of the drugs marketed in the United States (34). Enzymes catalyze multistep chemical reactions and achieve phenomenal rate accelerations by matching protein and substrate chemical groups in the transition state. Inhibitors that take advantage of these chemical interactions are among the most potent and effective drugs known (35). Accordingly, mechanistic analysis should always be a top priority for new enzyme-targeted drug programs to allow function-based design of potent inhibitors. The first step to enzyme target validation must include experimental data demonstrating that a gene predicted by *in silico* analysis encodes a particular protein and catalyzes the proposed chemical reaction.

Nucleoside monophosphate kinases (NMP kinases) are key enzymes in the metabolism of ribo- and deoxyribonucleoside triphosphates, and catalyze the reversible phosphoryl transfer from a nucleoside triphosphate (usually ATP) to a specific nucleoside monophosphate (46). The resulting nucleoside diphosphates will be further phosphorylated (and eventually reduced) to produce nucleoside triphosphates, precursors of the major biological molecules DNA, RNA, and phospholipids (Fig. 1). The presence of a *cmk*-encoded (*Rv1712*) Cytidine Monophosphate Kinase (CMK) has been predicted by sequence homology to be present in the genome of *M. tuberculosis* (14). CMK, which is a member of NMP kinase family, has been shown to be essential for the growth of two Gram-positive bacteria: *Bacillus subtilis* (40) and *Streptococcus pneumoniae* (47). In addition, it has been proposed that CMK is essential for *in vitro* growth of *M. tuberculosis* based on transposon site hybridization studies (36). However, to the best of our knowledge, there has been no report showing that *cmk* gene indeed encodes a protein having CMK activity in *M. tuberculosis*.

Here we describe PCR amplification, cloning and sequencing of *M. tuberculosis* Rv1712 (*cmk*) sequence. We also report heterologous recombinant protein expression, purification to homogeneity, N-terminal amino acid sequencing, electrospray ionization mass spectrometry analysis, and size exclusion chromatography of functional *cmk*-encoded *M. tuberculosis* CMK (MtCMK). Results of steady-state kinetics showed that MtCMK phosphorylates preferentially CMP and dCMP, and that UMP is a poor substrate, which is consistent with the presence of an NMP specific for UMP in *M. tuberculosis*. Double-reciprocal plots were consistent with ternary complex formation and sequential mechanism for MtCMK reaction. A discussion of the probable role of CMK in *M. tuberculosis* is also discussed. The availability of MtCMK protein in large quantities will allow further functional studies and structural efforts to be undertaken in order to provide a framework on which to base the design of chemical compounds that inhibit the enzyme activity.

## MATERIALS AND METHODS

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

**Amplification, cloning, and expression of *M. tuberculosis cmk* gene.** Two oligonucleotides, CMK1 (5'-GGCATATGAGTCGCCTAAGCGCAGCGGTAGT-3') and CMK2 (5'-GTGGATCCTCACCGCACTGCCTCACTTCGC-3'), complementary to the amino-terminal coding and the carboxy-terminal non-coding strands of the putative *M. tuberculosis cmk* (*Rv1712*) gene (14) were synthesized to contain, respectively, *Nde*I and *Bam*HI restriction sites (underlined). These primers were used to PCR amplify the *cmk* gene from *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA. The PCR product (693 bp) was purified by gel electrophoresis, cleaved with *Nde*I and *Bam*HI (New England), and ligated into the pET-23a(+) expression vector (Novagen). The sequence of the *M. tuberculosis cmk* gene was determined to confirm the identity, integrity, and absence of PCR-introduced mutations in the cloned gene. The recombinant pET-23a(+):*cmk* plasmid was introduced into *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) electrocompetent cells and selected on LB agar plates containing 50 µg mL<sup>-1</sup> ampicillin. The protocol for recombinant protein expression described here is the best one chosen from a number of tests carried out at different experimental conditions. LB medium (3 liters) containing 50 µg mL<sup>-1</sup> ampicillin was inoculated with a single colony, and grown for 9 h at 180 rpm and 37 °C without isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) induction. Cells were harvested by centrifugation at 4,000 × *g* for 30 min at 4°C and were stored at -20°C. Soluble and insoluble fractions were analyzed by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (23).



**Purification of recombinant *M. tuberculosis* CMK (MtCMK).** Approximately 10 g of cells were resuspended in 60 mL of 50 mM Tris HCl buffer, pH 7.5 (buffer A), containing 0.2 mg mL<sup>-1</sup> lysozyme. Cells were disrupted by sonication and debris removed by centrifugation at 48,000 × *g* for 30 min. The supernatant was incubated with 1% (wt/vol) streptomycin sulfate and centrifuged at 48,000 × *g* for 30 min. The resulting supernatant was dialyzed against buffer A, and loaded on a Q-Sepharose Fast Flow column (GE Healthcare) preequilibrated with buffer A, and the absorbed material eluted with a linear gradient from 0 to 1 M NaCl. The fractions containing MtCMK were pooled and concentrated to 8 mL using an Amicon ultrafiltration cell (molecular weight cutoff 10,000). The sample was loaded on a Sephacryl S200 HR column (GE Healthcare) and eluted with buffer A. Fractions containing MtCMK were pooled and loaded on a Mono Q HR 10/10 (GE Healthcare) column and eluted with a linear gradient 0-0.5 M NaCl. The homogeneous recombinant protein was stored at -80°C. Protein expression and all purification steps were analyzed by SDS-PAGE, and protein concentrations were determined by the method of Bradford (3) using the Bio-Rad Laboratories protein assay kit.

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

**Mass spectrometry analysis.** The subunit molecular mass was assessed by electron-spray ionization mass spectrometry (ESI-MS), employing some adaptations made to the system described by Chassigne and Lobinski (12). Samples were analyzed on a triple quadrupole mass spectrometer (model QUATTRO II) equipped with a standard ESI probe (Micromass,

Altrincham, United Kingdom) and adjusted to a flow rate of ca. 250  $\mu\text{l min}^{-1}$ . The source temperature (80°C) and needle voltage (3.6 kV) were maintained constant throughout experimental data collection, applying a drying gas (nitrogen) flow of 200 liters  $\text{h}^{-1}$  and a nebulizer gas flow of 20 liters  $\text{h}^{-1}$ . The mass spectrometer was calibrated with intact horse heart myoglobin and its typical cone voltage-induced fragments. The ESI-MS molecular mass of the MtCMK subunit was determined by adjusting the mass spectrometer to give a peak with a half-height of 1 mass unit, and the cone sample to skimmer lens voltage controlling the transfer of ions to the mass analyzer was set to 38 V. About 50 pmol sample was injected into electrospray transport solvent. The ESI spectrum was obtained in the multichannel acquisition mode, with scanning from 500 to 1,800  $m/z$  at a scan time of 7 s. The mass spectrometer is equipped with MassLynx and Transform software for data acquisition and spectrum handling.

**Determination of native MtCMK molecular mass.** The molecular mass of native MtCMK was determined by gel filtration using Superdex S-200 (10 mm x 30 cm) column eluted with buffer A containing 200  $\mu\text{M NaCl}$  at 0.4  $\text{mL min}^{-1}$ . The protein elution was monitored at 280 nm. The protein molecular weight standards were from Low Molecular Weight and High Molecular Weight Calibration kits (GE Healthcare).

**MtCMK activity assay.** MtCMK activity was assayed in the forward direction by coupling the ADP product formation to the pyruvate kinase (PK; EC 2.7.1.40) and lactate dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) reactions following the protocol described by others (2, 28). MtCMK-dependent oxidation of NADH was continuously monitored at 340 nm ( $\epsilon = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). All reactions were carried out at 25°C and initiated with addition of MtCMK enzyme. The assay mixture contained 100 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 50mM KCl, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.6 mM MtCMK, 2.5 mM ATP, 1mM phosphoenolpyruvate (PEP), 0.1mM NADH, 3

U mL<sup>-1</sup> PK, and 2.5 U mL<sup>-1</sup> units of LDH. Initial steady-state rates were calculated from the linear portion of the reaction curve relative to rates obtained likewise with extracts of *E. coli* BL21 (DE3) cells harboring pET-23a(+) plasmid. PEP, ATP, NADH, LDH and PK were purchased from Sigma. One unit of enzyme activity (U) is defined as the amount of enzyme catalyzing the conversion of 1 μmol of substrate per minute at 25°C.

**Data analysis.** Initial velocity kinetic data were fitted to appropriate equations by using nonlinear regression function of SigmaPlot 2000 (SPSS, Inc.). Substrate hyperbolic saturation curves at a single concentration of the fixed substrate and varying concentrations of the other substrate were fitted to Eq. [1]. Intersecting initial velocity patterns were fitted to Eq. [2], which describes a sequential mechanism. For Eqs. [1] and [2], *v* is the measured reaction velocity, *V* is the maximal velocity, *A* represents the concentrations of either CMP, UMP or dCMP; and *B* represents ATP. *K<sub>a</sub>* and *K<sub>b</sub>* are the corresponding Michaelis-Menten constants, and *K<sub>ia</sub>* is the dissociation constant for substrate A (13).

$$v = VA/(K_a + A) \quad [1]$$

$$v = VAB/(K_aB + K_bA + K_{ia}K_b + AB) \quad [2]$$

## RESULTS AND DISCUSSION

**Expression and biochemical characterization of MtCMK.** A PCR amplification fragment consistent with the size expected for *cmk* (693 bp) was detected on agarose gel (Fig. 2A), which was confirmed by automatic sequencing. A number of experimental conditions were tested for expression of recombinant MtCMK in soluble form in BL21(DE3) *E. coli* host cells, and the best one was 9 hours of cell growth in the absence of IPTG induction (Fig. 2B). SDS-PAGE analysis shows expression of a protein with subunit molecular weight in agreement with the predicted for MtCMK (Fig. 2B), and densitometric measurements indicate that MtCMK represents approximately 17% of total protein in the soluble cell extract. In the pET system, target genes are positioned downstream of bacteriophage T7 late promoter. Typically, production hosts contain a prophage ( $\lambda$ DE3) encoding the highly processive T7 RNA polymerase under control of the IPTG-inducible *lacUV5* promoter that would ensure tight control of recombinant gene basal expression. In agreement with the results presented here, high levels of protein expression in the absence of inducer have been shown to occur in the pET system (26, 27, 30, 33, 39). It has been proposed that leaky protein expression is a property of *lac*-controlled system when cells approach stationary phase in complex medium and that cyclic AMP, acetate, and low pH are required to achieve high-level expression in the absence of IPTG induction, which may be part of a general cellular response to nutrition limitation (19).

MtCMPK was purified to homogeneity from crude extract (Fig. 2C) by a three-step protocol: an anionic exchange column, a gel filtration column followed by a strong anionic exchange resin, yielding 5 mg of recombinant protein per liter of cell culture. Homogeneous recombinant protein was stored at -80°C. Analytical gel filtration chromatography revealed a single peak of approximately 24 kDa, indicating that MtCMPK is a monomer in solution.

**N-terminal amino acid sequencing.** The first 16 N-terminal amino acid residues of MtCMK were identified to be RLSAAVVAIDGPAGTG by the Edman degradation method. This result unambiguously identifies the homogeneous recombinant protein as MtCMK and confirms removal of the N-terminal methionine. Modification at the N-termini is a common type of co-/post-translational alteration of proteins synthesized in prokaryotic cells. Methionine aminopeptidase-catalyzed cleavage of initiator methionine is usually directed by the second amino acid residues with the smallest side chain radii of gyration (glycine, alanine, serine, threonine, proline, valine, and cysteine) (25). The N-terminal methionine was removed from the *E. coli* expressed MtCMK enzyme, consistent with the finding that some middle-sized second amino acid residues (Asn, Asp, Leu, and Ile) undergo N-terminal processing (21).

**Mass spectrometry analysis.** The electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) revealed just one peak at the expected mass for MtCMK subunit (23.93 kDa; data not shown), which is in agreement with removal of the N-terminal methionine (predicted molecular mass: 24.06 kDa).

**Cytidine monophosphate kinase activity assay.** To confirm the correct assignment to the structural gene encoding *M. tuberculosis* CMK, the biological activity of recombinant MtCMK was probed by steady-state kinetics. The true steady-state kinetic constants (Table 1) and substrate specificity were determined for CMP (Fig. 3), dCMP (Fig. 4), and UMP (Fig. 5). To distinguish between a sequential and a ping-pong mechanism, initial velocity patterns were determined using either CMP, dCMP, UMP or ATP as the variable substrate. Analysis of the double-reciprocal plots showed intersecting patterns for all substrates tested (Figs. 3, 4,

5), consistent with ternary complex formation and a sequential mechanism. Double reciprocal plots intersect to the left of the y axis and thus rule out a rapid equilibrium ordered mechanism. Similar intersecting initial velocity patterns have been reported for *Escherichia coli* (7). The  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  ratio is an apparent second-order rate constant that determines the specificity for competing substrates (17). The results presented here demonstrate that MtCMK preferentially phosphorylates CMP and dCMP, and that UMP is a poor substrate (Table 1).

We have recently reported a molecular model for MtCMK using *E. coli* CMK (PDB access code: 1KDO) (8). The results of modeling predicted that *E. coli* CMK would have higher affinity for CMP than MtCMK (8). In agreement with *in silico* prediction, the CMP  $K_{\text{m}}$  value, which represents the overall dissociation constant of all enzyme-bound species (17), for *E. coli* CMK (35  $\mu\text{M}$ ; 29) is smaller than that determined here for MtCMK (120  $\mu\text{M}$ ).

**Probable role of CMK in *M. tuberculosis*.** 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. There are two major pathways for pyrimidine nucleotide synthesis: *de novo* pathway and salvage pathway. Since the *de novo* pyrimidine ribonucleotide synthesis requires higher energy levels, cells use the salvage pathway to reutilize pyrimidine bases and nucleosides derived from preformed nucleotides (22). A number of enzymes of pyrimidine salvage pathway (Fig. 1) have been identified by sequence homology in the *M. tuberculosis* genome (14): dCTP deaminase (*dcd*, *Rv0321*), which converts dCTP to dUTP; deoxyuridine triphosphatase (*dut*, *Rv2697c*), which converts dUTP to dUMP; thymidylate synthase (*thyA*, *Rv2764c*; *thyX*, *Rv2754c*), which takes dUMP to dTMP; and finally makes dTTP by thymidylate kinase (*tmk*, *Rv3247c*) that converts dTMP to dTDP followed by nucleoside diphosphate kinase (*ndkA*, *Rv2445c*) enzyme of *de novo* pathway that converts dTDP to

dTTP. Additional genes encoding enzymes in the pyrimidine salvage pathway include *cdd* (*Rv3315c*), a deaminase that converts cytidine or deoxycytidine to, respectively, uridine or deoxyuridine, and a thymidine phosphorylase (*deoA*, *Rv3314c*) that rescues the nucleoside back to deoxyribose-1-phosphate and thymine, the free base. Homology was also found for uracil phosphorybosyltransferase (*upp*; *Rv3309c*), uridine monophosphate kinase (*pyrH*, *Rv2883c*), and cytidine monophosphate kinase (*cmk*, *Rv1712*) described here. No homology was found for uridine nucleosidase, uridine phosphorylase, uracil monophosphatase and thymidine kinase encoding genes.

Hydrophilic agents traverse the mycobacterial cell wall slowly because of mycobacterial porin inefficiency in permeation of solutes, and low concentration of porins. Lipophilic agents are retarded by the lipid bilayer which is of unusually low fluidity (38). Internalization of chemical compounds having negative net charge into cells is hampered due to net negative charge of mycobacterial cell wall (5). Therefore, mono-, di-, or tri-phosphate nucleosides are not likely to enter the mycobacterial cell unless there is a transport system to carry out this process. Notwithstanding, no transporters for bases, nucleosides or nucleotides of nucleic acids could be identified in *M. tuberculosis* (4). It is thus likely that *M. tuberculosis* has to rescue bases and/or nucleosides and/or nucleotides to survive in a hostile environment offered by the host. In general, pyrimidine bases and nucleosides, which are the transportable precursors of the nucleotides, are not available as exogenous nutrients to most bacteria. It has been estimated that thymidine and uridine, for instance, may be available to mycobacteria growing in the host at a concentration range of 0.5-5.5  $\mu\text{M}$  (43). It was described that *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy, is able to incorporate exogenously supplied pyrimidines as bases or nucleosides, but not as a nucleotide, into its nucleic acids (43). It was also reported that other pathogenic mycobacteria, such as *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium microti*, although could not take up uridine nucleotides directly, were

able to utilize the pyrimidines by hydrolyzing them to uridine and then taking up the uridine (44). Exogenous bases are usually transported into the cell by specific membrane proteins, such as cytosine, uracil, and xanthine permeases. However, none of these were described or found in the *M. tuberculosis* genome, as well as in other pathogenic mycobacteria.

CMK has been shown to be essential for the growth of two Gram-positive bacteria: *Bacillus subtilis* (40) and *Streptococcus pneumoniae* (47). In addition, it has been proposed that CMK is essential for *in vitro* growth of *M. tuberculosis* based on transposon site hybridization studies (36). However, this approach is a screening tool and *cmk* gene replacement must be carried out to assign an essential role to its protein product. The first step should thus be demonstration that the *Rv1712* locus indeed encodes a CMK enzyme. Accordingly, the results here presented provide experimental evidence for *cmk* sequence encoding a CMK enzyme that preferentially phosphorylates (d)CMP and that UMP is a poor substrate. These results reinforce the likelihood of *M. tuberculosis* having a nucleoside monophosphate kinase specific for UMP.

Although CMP is not produced in the *de novo* pathway, it might accumulate either from CTP during the synthesis of phospholipids or from the hydrolytic cleavage of mRNA. Therefore, the physiological role of CMK is also to recycle CMP to CDP, which is either rapidly phosphorylated by the unspecific nucleoside-diphosphate kinase to CTP or reduced to dCDP (7). In bacteria CDP (as well as ADP, UDP, or GDP) can also result from phosphorolytic cleavage of mRNA by polynucleotide phosphorylase (EC 2.7.7.8) (9, 32). It therefore seems worth looking for a possible link between these two CDP-producing enzymes, *i.e.*, CMK and polynucleotide phosphorylase. The *cmk* gene is located in the *M. tuberculosis* chromosome between *engA* (probable GTP-binding protein) and *Rv1711* (probable RNA pseudouridylate synthase). In bacteria, the *engA* gene product plays a role in linking DNA replication to cell growth and cell division. The EngA family are thought to act



as a cellular messenger by forming interactions with the ribosome, with the overexpression of EngA in *E. coli* restoring the growth of null mutants of an rRNA methyltransferase (RrmJ), which modifies the 23S rRNA in intact 50S ribosomal subunits (24). Pseudouridines are made by seven pseudouridine synthases in *Escherichia coli*. The 16S and 23S ribosomal RNAs of *E. coli* contain 11 pseudouridines clustered predominantly in functionally important regions of the ribosome (31). Although speculative, the location of the gene *cmk* may support its role in recycling of nucleotides derived from RNA degradation.

NMP kinases usually exhibit a high degree of sequence identity at the amino acid level, despite variations observed in their substrate specificity. In eukaryotes, for instance, phosphorylation of UMP and CMP is carried out by a single enzyme (29). Conversely, bacteria possess two distinct enzymes, specific to either UMP or CMP and TMP (29). Bacterial CMKs catalyze the phosphoryl transfer from ATP to CMP or dCMP. NMP kinases are composed of three domains: the CORE, LID that closes upon binding of the phosphate donor ATP, and NMP-binding domain that closes the active site upon binding of the phosphate acceptor (42). The crystal structure of *E. coli* CMP kinase resembles those of other NMP kinases sharing common features such as a central five-stranded  $\beta$ -sheet connected by  $\alpha$ -helices, a fingerprint sequence of Glu-X-X-Gly-X-Gly-Lys (P-loop), and an anion hole in the central cavity for substrate binding (6). Classically, NMP kinases are divided into short (including eukaryotic UMP-CMP kinases) and long forms. The latter group consists of adenylate kinases with an insertion of around 27 residues into the LID domain (1). Bacterial CMKs represent a third distinct family of NMP kinases, as they possess a short LID domain but have an insertion of 40 amino acid residues in the NMP-binding domain (6). Multiple sequence alignment of mycobacterial CMKs and *E. coli* CMK demonstrates that the P-loop sequence is conserved and that amino acid residues interacting with the pyrimidine ring and pentose moiety of CMP are conserved (Fig. 6). These functional and structural differences

could be exploited in the development of novel inhibitors targeted specifically towards *M. tuberculosis* and other pathogenic mycobacteria. Accordingly, the demonstration of *M. tuberculosis cmk*-encoded protein as a CMK with higher specificity for (d)CMP and availability of functional homogeneous recombinant MtCMK will pave the way for future structural efforts. Moreover, the results presented here are pivotal for providing a solid foundation on which to base *M. tuberculosis* gene manipulation experiments (37) to demonstrate the role, if any, of *cmk* in the biology of *M. tuberculosis*.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

Financial support for this work was provided by Millennium Initiative Program MCT-CNPq, Ministry of Health-Department of Science and Technology (Brazil) to D.S.S. and L.A.B. D.S.S. and L.A.B. also acknowledge grants awarded by CNPq, FINEP, and PRONEX/FAPERGS/CNPq. D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06), L.A.B. (CNPq, 520182/99-5) and M.S.P. (CNPq, 500079/90-0) are research career awardees from the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil (CNPq). C.T. was supported by a studentship from FARMASA (Laboratório Americano de Farmacoterapia S.A.).

## REFERENCES

1. **Bertrand, T., P. Briozzo, L. Assairi, A. Ofiteru, N. Bucurenci, H. Munier-Lehmann, B. Golinelli-Pimpaneau, O. Bârzu, and A. M. Gilles.** 2002. Sugar specificity of bacterial CMP kinases as revealed by crystal structures and mutagenesis of *Escherichia coli* enzyme. *J. Mol. Biol.* **315**:1099-1110.
2. **Blondin, C., L. Serina, L. Wiesmüller, A. M. Gilles, and O. Bârzu.** 1994. Improved spectrophotometric assay of nucleoside monophosphate kinase activity using the pyruvate kinase/lactate dehydrogenase coupling system. *Anal. Biochem.* **220**:219-221.
3. **Bradford, M. M., R. A. McRorie, and W. L. Williams.** 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
4. **Braibant M., P. Gilot, J. Content.** 2000. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**:449-467.
5. **Brennan, P. J., and H. Nikaido.** 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:29-63.
6. **Briozzo, P., B. Golinelli-Pimpaneau, A. M. Gilles, J. F. Gaucher, S. Burlacu-Miron, H. Sakamoto, J. Janin, and O. Bârzu.** 1998. Structures of *Escherichia coli* CMP kinase alone and in complex with CDP: a new fold of the nucleoside monophosphate binding domain and insights into cytosine nucleotide specificity. *Structure.* **6**:1517-1527.
7. **Bucurenci, N., H. Sakamoto, P. Briozzo, N. Palibroda, L. Serina, R. S. Sarfati, G. Labesse, G. Briand, A. Danchin, O. Bârzu, and A. M. Gilles.** 1996. CMP kinase from *Escherichia coli* is structurally related to other nucleoside monophosphate kinases. *J. Biol. Chem.* **271**:2856–2862.

8. **Caceres, R. A., L. F. S. M. Timmers, A. L. Vivan, C. Z. Schneider, L. A. Basso, W. F. Azevedo Jr., D. S. Santos.** 2008. Molecular modeling and dynamics studies of cytidylate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J. Mol. Model.* **14**:427-434.
9. **Carpousis, A. J., G. Van Houwe, C. Ehretsmann, H. M. Krisch.** 1994. Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell.* **76**:889–900.
10. **Centers of Disease Control and Prevention (CDC).** 2006. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs-worldwide. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **55**:301-305.
11. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 2007. Extensively drug-resistant tuberculosis – United States, 1993-2006. *MMWR* **56**:250-253.
12. **Chassaigne, H., R. Lobinski.** 1998. Characterization of horse kidney metallothionein isoforms by electrospray MS and reversed-phase HPLC-electrospray MS. *Analyst.* **123**:2125-2130.
13. **Cleland, W. W.** 1977. Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **45**:273-387.
14. **Cole, S. T., R. Brosch , J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 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, and B. G. Barrell.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* **393**:537–544.
15. **Dorman, S.E. and R.E. Chaisson.** 2007. From magic bullets back to the magic mountain: the rise of extensively drug-resistant tuberculosis. *Nat. Med.* **13**:295-298.

16. **Duncan K.** 2003. Progress in TB drug development and what is still needed. *Tuberculosis*. **83**:201-207.
17. **Fersht, A.** 1999. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. W. H. Freeman and Company, NY, USA.
18. **Fricke, J., J. Neuhard, R. A. Kelln, and S. Pedersen.** 1995. The *cmk* gene encoding cytidine monophosphate kinase is located in the *rpsA* operon and is required for normal replication rate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**:517-523.
19. **Grossman, T. H., E. S. Kawasaski, S. R. Punreddy, M. S. Osburne.** 1998. Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*. **209**:95-103.
20. **Hingley-Wilson, S. M., V. K. Sambandamurthy, W. R. Jacobs Jr.** 2003. Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Immunol.* **4**:949-955.
21. **Hirel P. H., M. J. Schmitter, P. Dessen, G. Fayat, and S. Blanquet.** 1989. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the sidechain length of the penultimate amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:8247-8251.
22. **Islam M. R., H. Kim, S. W. Kang, J. S. Kim, Y. M. Jeong, H. J. Hwang, S. Y. Lee, J. C. Woo, and S. G. Kim.** 2007. Functional characterization of a gene encoding a dual domain for uridine kinase and uracil phosphoribosyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **63**:465-477.
23. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
24. **Ling, X., P. S. P. Muench, A. Roujeinikova, S. E. Sedelnikova, and D. W. Rice.** 2006. Cloning, purification and preliminary crystallographic analysis of the *Bacillus subtilis* GTPase YphC–GDP complex. *Acta Cryst.* **62**:435–437.

25. **Lowther, W. T., B. W. Matthews.** 2000. Structure and function of the methionine aminopeptidases. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**:157-167.
26. **Magalhães, M. L. B., C. P. Pereira, L. A. Basso, and D. S. Santos.** 2002. Cloning and expression of functional shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.25) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Prot. Expr. Purif.* **26**:59-64.
27. **Mendonça J. D., F. Ely, M. S. Palma, J. Frazzon, L. A. Basso, and D. S. Santos.** 2007. Functional characterization by genetic complementation of *aroB*-encoded dehydroquinate synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its heterologous expression and purification. *J. Bacteriol.* **189**:6246-6252.
28. **Millar, G., A. Lewendon, M. G. Hunter, and J. R. Coggins.** 1986. The cloning and expression of the *aroL* gene from *Escherichia coli* K12. Purification and complete amino acid sequence of shikimate kinase II, the *aroL*-gene product. *Biochem. J.* **237**:427–437.
29. **Ofiteru, A., N. Bucurenci, E. Alexov, T. Bertrand, P. Briozzo, H. Munier-Lehmann, and A. M. Gilles.** 2007. Structural and functional consequences of single amino acid substitutions in the pyrimidine base binding pocket of *Escherichia coli* CMP kinase. *FEBS J.* **274**:3363-3373.
30. **Oliveira, J. S., C. A. Pinto, L. A. Basso, and D. S. Santos.** 2001. Cloning and overexpression in soluble form of functional shikimate kinase and 5- enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase enzymes from *Mycobacterius tuberculosis*. *Protein Expr. Purif.* **22**:430-435.
31. **Pavanapuresan, P.V., P. D. Murray, and A. Malhotra.** 2007. RluD, a highly conserved pseudouridine synthase, modifies 50S subunits more specifically and efficiently than free 23S rRNA. *RNA.* **13**:1868–1876.
32. **Py, B., H. Causton, E. A. Mudd, and C. F. Higgins.** 1994. A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **14**:717–729.

33. **Rizzi, C., 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, and L. A. Basso.** 2005. DAHP synthase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: cloning, expression, and purification of functional enzyme. *Protein Expr. Purif.* **40**:23-30.
34. **Robertson J. G.** 2005. Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry.* **44**:5561-5571.
35. **Robertson J. G.** 2007. Enzymes as a special class of therapeutic target: clinical drugs and modes of action. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**:674-679.
36. **Sassetti, C. M., D. H. Boyd, and E. J. Rubin.** 2003. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **48**:77-84.
37. **Schneider C. Z., T. Parish, L. A. Basso, and D. S. Santos.** 2008. The two chorismate mutases from *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*: biochemical analysis and limited regulation of promoter activity by aromatic amino acids. *J. Bacteriol.* **190**:122-134.
38. **Schroeder E. K., O. N. de Souza, D. S. Santos, J. S. Blanchard, and L. A. Basso.** 2002. Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **3**:197-225.
39. **Silva, R. G., L. P. S. Carvalho, J. S. Oliveira, C. A. Pinto, M. A. Mendes, M. S. Palma, L. A. Basso, and D. S. Santos.** 2003. Cloning, overexpression, and purification of functional human purine nucleoside phosphorylase. *Protein Expr. Purif.* **27**:158-164.
40. **Sorokin A., P. Serror, P. Pujic, V. Azevedo, and S. D. Ehrlich.** 1995. The *Bacillus subtilis* chromosome region encoding homologues of the *Escherichia coli* *mssA* and *rpsA* gene products. *Microbiology.* **141**:311-319.



41. **Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* **22**:4673-4680.
42. **Vonrhein, C., G. J. Schlauderer, and G. E. Schulz.** 1995. Movie of the structural changes during a catalytic cycle of nucleoside monophosphate kinases. *Structure* **3**:483-490.
43. **Wheeler, P. R.** 1989. Pyrimidine scavenging by *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **48**:179-184.
44. **Wheeler, P. R.** 1990. Biosynthesis and scavenging of pyrimidines by pathogenic mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **136**:189-201.
45. **World Health Organization.** 2008. WHO Report 2008. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
46. **Yan, H., and M. D. Tsai.** 1999. Nucleoside monophosphate kinases: structure, mechanism, and substrate specificity. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **73**:103-134.
47. **Yu, L., J. Mack, P. J. Hajduk, S. J. Kakavas, A. Y. C. Saiki, C. G. Lerner, and E. T. Olejniczak.** 2007. Solution structure and function of an essential CMP kinase of *Streptococcus pneumoniae*. *Protein Sci.* **12**:2613-2621.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1: General scheme of pyrimidine nucleotide interconversion pathways in *M. tuberculosis*.** Individual enzymes are identified by their corresponding gene names (above each relevant catalytic step): *cmk*, cytidine monophosphate kinase (*Rv1717*); *dcd*, deoxycytidine triphosphate deaminase (*Rv0321*); *ndk*, nucleoside diphosphate kinase (*Rv2445c*); *pyrG*, CTP synthase (*Rv1699*); *pyrH*, uridine monophosphate kinase (*Rv2883c*). The Rv numbering system from (14) is mentioned for clarity. MtCMK (shaded in gray) transfers a phosphate group from ATP to either CMP (and dCMP) or UMP to form CDP (and dCDP) or UDP (substrates for MtCMK are shown in white on a black background). As we demonstrate in the present work, UMP is a very poor substrate for MtCMK, and the predicted *M. tuberculosis* UMP kinase (PyrH) probably represents the major NMP kinase for UMP in the tubercle bacillus. Figure adapted from (18) and the KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg/>).

**Figure 2: Cloning, expression, and purification of MtCMK.** (A) Agarose gel (2%) electrophoresis showing the PCR amplified *cmk* fragment. 1 - Molecular weight marker 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen); 2- PCR amplified *cmk* fragment (693 bp). (B) SDS-PAGE analysis of MtCMK expression in protein-soluble crude extracts. All samples were grown in LB liquid medium containing 50 mg mL<sup>-1</sup> ampicillin at 37°C to an OD<sub>600</sub> value of 1 either induced by addition of 0.5 mM IPTG or not induced and then grown for an additional 9 h. Lane 1, protein molecular size standards (50, 40, 30, 25, 20, 15 and 10 kDa) (Invitrogen); Lane 2, *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a(+):*cmk*] cells induced; Lane 3, *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a(+):*cmk*] cells uninduced; Lane 4, *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a(+)] cells induced (control); Lane 5, *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a(+)] cells uninduced. (C) SDS-PAGE analysis

of fractions obtained during the purification of MtCMK. Lane 1, crude extract after dialysis; Lanes 2 through 4, MtCMK after elution on Q-Sepharose Fast Flow, Sephacryl S200, and Mono Q HR column respectively; Lane 5, protein molecular size standards (50, 40, 30, 25 and 20 kDa) (Invitrogen).

**Figure 3: Initial velocity patterns for MtCMK with both substrates ATP (left panel) and CMP (right panel) as variable substrate.** Each curve represents varied-fixed levels of the cosubstrate. The CMP concentrations varied from 23.4 to 1500  $\mu\text{M}$  and ATP varied from 31.2 to 1000  $\mu\text{M}$ .

**Figure 4: Initial velocity patterns for MtCMK with both substrates ATP (left panel) and dCMP (right panel) as variable substrate.** Each curve represents varied-fixed levels of the cosubstrate. The dCMP concentrations varied from 46.8 to 1500  $\mu\text{M}$  and ATP varied from 62.5 to 1000  $\mu\text{M}$ .

**Figure 5: Initial velocity patterns for MtCMK with both substrates ATP (left panel) and UMP (right panel) as variable substrate.** Each curve represents varied-fixed levels of the cosubstrate. The UMP concentrations varied from 6.5 to 50 mM and ATP varied from 0.25 to 4 mM.

**Figure 6: A multiple sequence alignment of mycobacterial CMKs with the known three-dimensional CMK structure from *E. coli* (CMK\_Eco).** The putative CMKs for *M. tuberculosis* (Mtb), *M. bovis* (Mbo), *M. leprae* (Mle), *M. avium* (Mav), and *M. smegmatis* (Msm) were aligned with CMK\_Eco using default settings of the program CLUSTALW (41). 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 colons and periods, respectively. Strongly similar residues are also shaded in gray. Triangles and circles above the alignment indicate key residues interacting with the pyrimidine ring of CMP (Ser36, Arg110, Asp132, and Arg188 in CMK\_Eco) and in pentose recognition (Ser101, Arg181, and Asp185 in CMK\_Eco), respectively, as determined by site-directed mutagenesis and crystallographic studies (1, 29). The conserved fingerprint sequence GXXGXGK (where X stands for any amino acid) of NMP kinases, which forms the phosphate binding loop (P loop), is indicated at the N-terminal portion of CMKs (7).

Figure 1

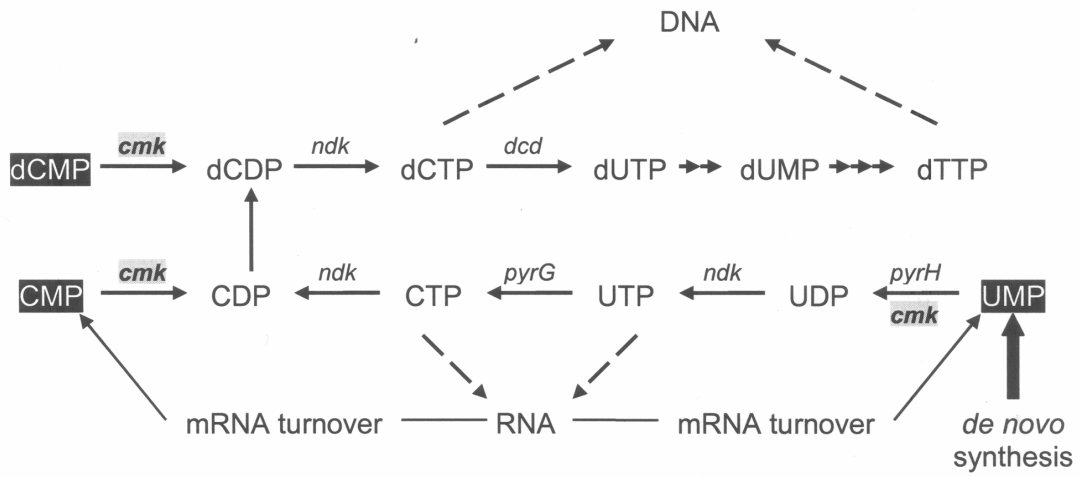


Figure 2

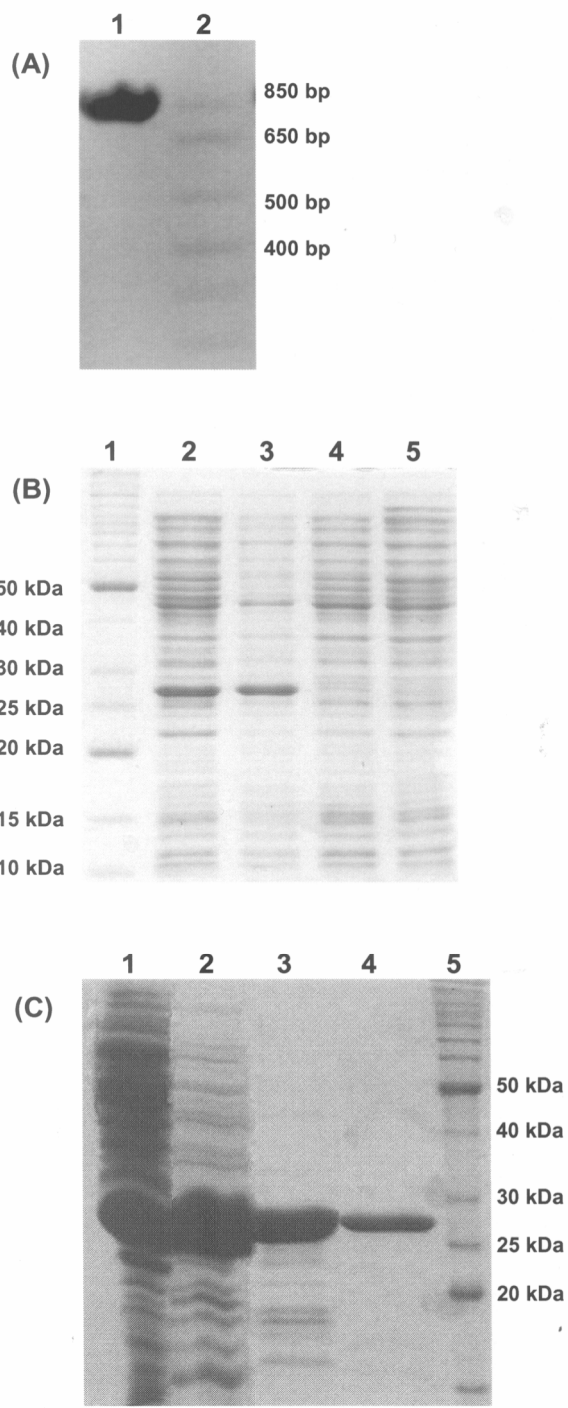


Figure 3 (Left)

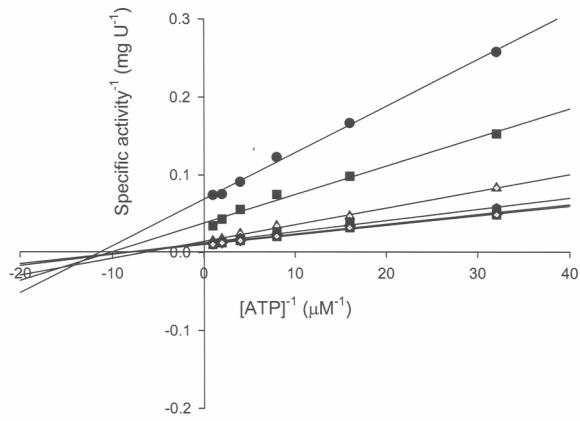
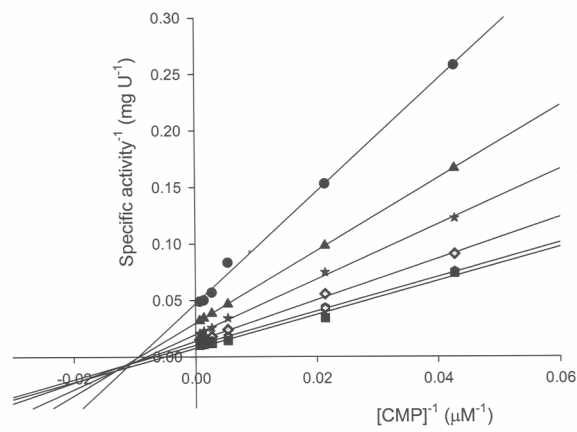
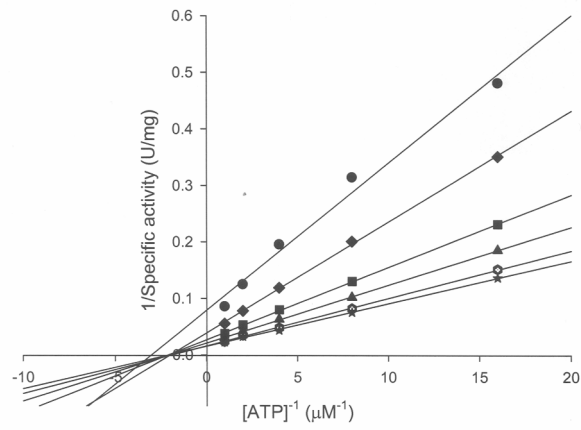


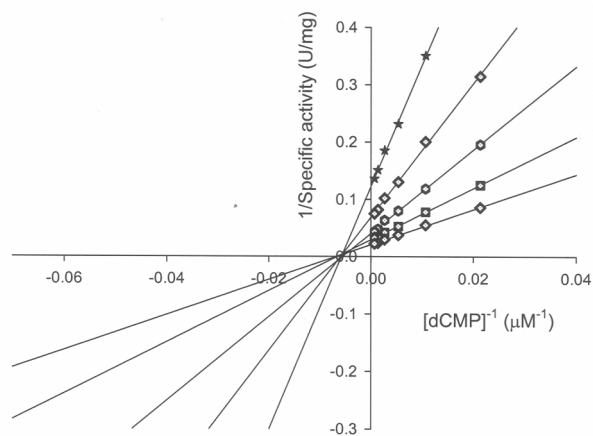
Figure 3 (Right)



**Figure 4 (Left)**

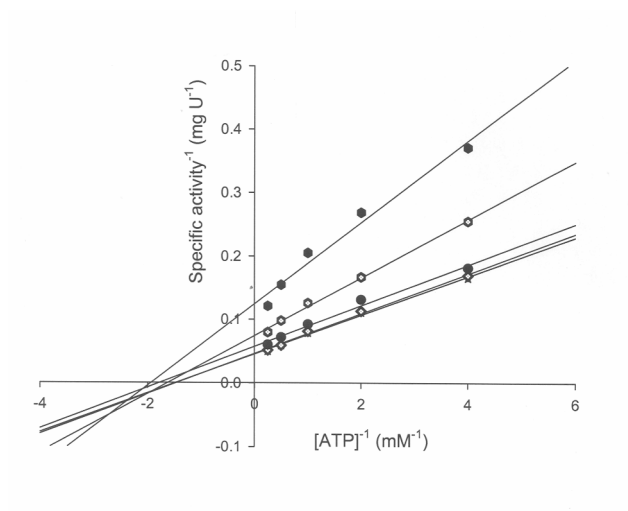


**Figure 4 (Right)**

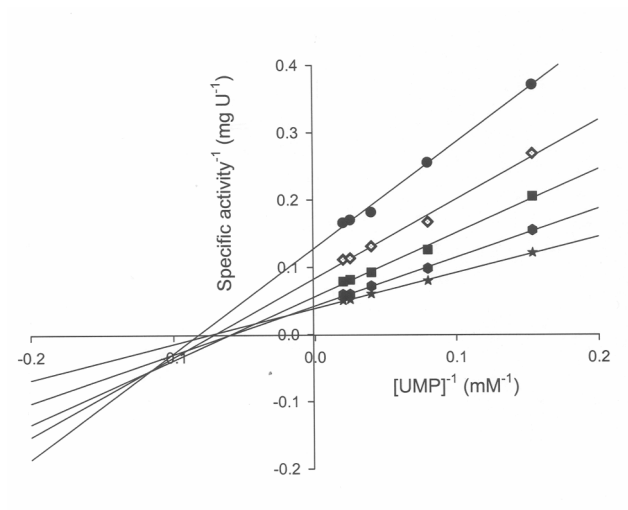




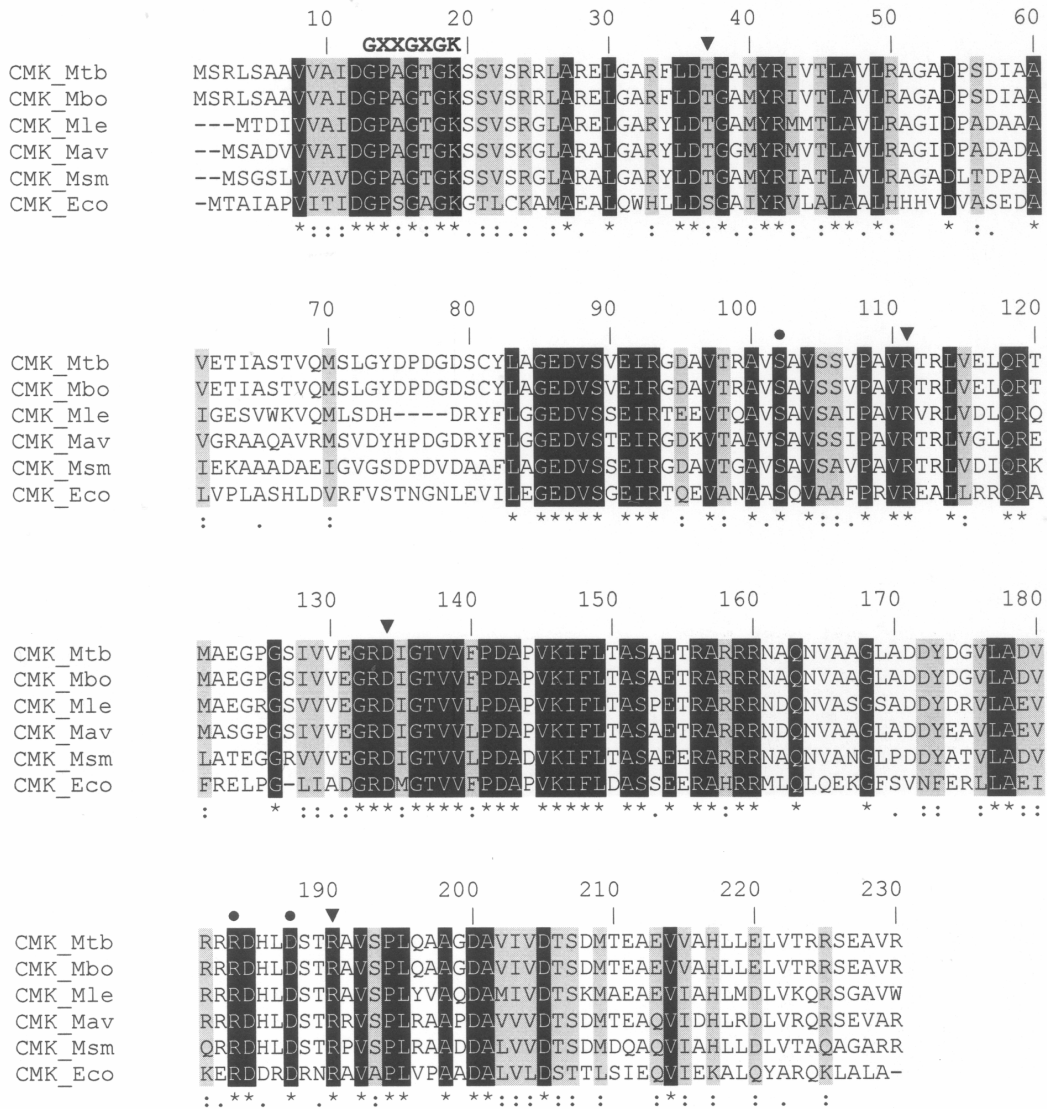
**Figure 5 (Left)**



**Figure 5 (Right)**



### Figure 6



**Table1**

**TABLE 1.** True steady-state kinetic parameters for *M. tuberculosis* CMK with three NMPs and ATP as phosphate donor.

Phosphate acceptor	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ (U/mg)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
CMP	$120 \pm 9$	$131 \pm 4$	$52 \pm 2$	$1.1 \times 10^6$
dCMP	$165 \pm 7$	$75 \pm 2$	$30 \pm 1$	$0.2 \times 10^6$
UMP	$13854 \pm 771$	$32 \pm 1$	$12.2 \pm 0.4$	$0.88 \times 10^3$

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A TB humana é a doença causada por um único agente infeccioso responsável pela maior taxa de mortalidade na atualidade. O microorganismo causador desta doença, *Mycobacterium tuberculosis*, que acompanha o ser humano há milênios e que possui um alto poder de adaptação às defesas do organismo hospedeiro, foi o responsável por milhares de mortes no passado quando não havia nenhum conhecimento sobre as causas da doença.

Este panorama começou a ser revertido no final do século XIX, quando Robert Koch identificou o seu agente causador. Nesta época, já existia o conhecimento de que a doença era transmissível. No entanto, apenas na metade do século XX é que surgiram os primeiros agentes para tratar a TB, como a INH e a pirazinamida. Com a introdução posterior de outras drogas, entre elas, rifampicina e etambutol, foi possível criar um esquema terapêutico eficaz para controlar e combater a doença.

Durante décadas, observou-se uma queda das taxas de novos casos e de mortalidade em países desenvolvidos e uma estabilização destes indicadores em países subdesenvolvidos. De fato, pensava-se que a TB poderia ser eliminada até o fim do século XX. No entanto, no final da década de 80 e início da década de 90, esse quadro começou a sofrer um revés no mundo todo, em especial em países desenvolvidos, principalmente, nos EUA, com o surgimento e a disseminação de cepas resistentes a múltiplas drogas (MDR-TB). Além disso, o número de casos de tuberculose no seu estado ativo aumentou drasticamente devido a co-infecção com o vírus da HIV. Nesta época, começou a ser discutida e aplicada a prática da detenção involuntária, principalmente, na cidade de Nova York (EUA). Esta prática

consistia na restrição do direito universal de ir e vir dos pacientes diagnosticados com MDR-TB, sendo os mesmos obrigados pelo Estado a permanecerem internados em instituições de saúde durante o período de tratamento, a fim de que não disseminassem pela sociedade estas cepas de TB resistentes. O tratamento destes pacientes foi possível graças à existência das drogas de segunda linha, mais tóxicas e de maior custo que as de primeira linha. Porém, para agravar a situação em meados de 2004 surgiram casos mais graves de resistências as drogas, as cepas XDR-TB, o que preocupa epidemiologistas e profissionais da saúde com a possível ameaça do retorno do tratamento da TB à era pré-quimioterápicos quando, aproximadamente, 50% dos pacientes faleciam.

Este panorama epidemiológico, associado ao fato de que há mais de quatro décadas não ocorre a introdução de novos agentes quimioterápicos para o tratamento da TB, criaram a necessidade urgente de desenvolvimento de novos medicamentos, que sejam menos tóxicos e que possam encurtar a duração do tratamento atual, além de sua produção em larga escala ser, economicamente, viável a países em desenvolvimento.

Em busca de novo alvos para o desenvolvimento de drogas, buscou-se neste trabalho a confirmação de que o gene *cmk* descrito por homologia ao genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, codificava a proteína citidina monofosfato quinase. Para tal, clonamos a enzima em vetor de expressão e desenvolvemos um protocolo de expressão em *E. coli* afim de conseguirmos proteína necessária para os ensaios que permitissem confirmar e caracterizar a sua atividade.

Os parâmetros cinéticos foram determinados espectrofotometricamente por acoplamento na formação de nucleotídeos difosfatados pela reação catalisada pela piruvato quinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH) na presença de

fosfoenolpiruvato (PEP) e NADH como indicador, pois os produtos e os substratos da CMK não são detectáveis em UV visível.

Os parâmetros cinéticos fornecidos pelo ensaio e análise dos gráficos de duplo-recíproco mostraram que a enzima forma um complexo ternário e que seu mecanismo é seqüencial. A intersecção das retas do gráfico de duplo-recíproco ao lado esquerdo do eixo Y, permitiram excluir o mecanismo de rápido equilíbrio ordenado.

A razão entre  $K_{cat}/K_m$  determinou a constante de especificidade entre os substratos, demonstrando que CMK fosforila preferencialmente CMP e dCMP, e que UMP é um substrato pobre. Este resultado reforça a idéia de que há uma enzima específica para a fosforilação de UMP.

Porém, esta metodologia não permitiu análises mais aprofundadas do mecanismo enzimático, pois ensaios de pH, temperatura e inibição por produto não puderam ser feitos, com o risco de que estes fatores influenciassem as enzimas acopladas. Estes ensaios poderão ser feitos, futuramente, no microcalorímetro, aparelho que está sendo adquirido pelo laboratório. Ou ainda pela técnica de diálise em equilíbrio.

Outras técnicas foram testadas, a fim de se obter mais dados cinéticos, da enzima CMK. A espectroscopia de fluorescência ou fluorimetria, baseia-se na medição da fluorescência emitida por alguns aminoácidos (triptofano e tirosina) depois de excitados por específicos comprimentos de luz. As características de ligação dos substratos à enzima são avaliadas pela interferência que causam à fluorescência da proteína. Porém, no caso da enzima CMK e seus substratos, quando ambos eram colocados em uma cubeta para análise, a luz emitida pelo fluorímetro era totalmente absorvida pelos substratos (ATP, CMP e dCMP) não

permitindo a formação do estado de excitação da enzima e sua detecção pelo aparelho, este fenômeno é conhecido como “inner filter effect”. Portanto nenhum dado foi obtido deste experimento.

Dados cinéticos de ligação em equilíbrio foram testados no BIACORE. O princípio de detecção do equipamento BIACORE baseia-se na ressonância plasmônica de superfície (SPR), um fenômeno óptico que ocorre quando a luz incide em delgados filmes condutores sob condições específicas. O uso da tecnologia de ressonância plasmônica de superfície (SPR) permite observar a ligação de qualquer molécula à enzima imobilizada na superfície. As medidas quantitativas da ligação entre uma ou mais moléculas são dependentes da imobilização da enzima à superfície do sensor por *chip*. O SPR detecta mudanças de massa na camada aquosa junto à superfície do sensor por *chip* medindo mudanças no índice de refração. Quando as moléculas na solução teste se ligam a moléculas alvo, a massa molecular aumenta, quando elas dissociam a massa diminui e este princípio simples é a base do sensograma – um monitoramento contínuo e em tempo real da associação e dissociação da interação das moléculas. Esta quantificação de massa molecular é dada em RUs pelo sensograma do aparelho.

Foram testados alguns protocolos (descritos no ANEXO I) de imobilização da enzima CMK nos *chips*. Porém, após a imobilização, da enzima não houve aumento de massa, visto no sensograma, que indicasse a ligação do substrato a enzima imobilizada. Várias hipóteses foram sugeridas para estes resultados, como a perda de função da proteína pelas condições redutoras do tampão de imobilização ou pelo bloqueio do sítio ativo da enzima pela imobilização no *chip*.

Com o objetivo de se obter detalhes em nível molecular acerca da estrutura da enzima CMK e a interação entre a enzima e seus substratos, foram realizadas

tentativas de obtenção de cristais da enzima e dos complexos enzima-substrato. Para tal fim, foram utilizadas soluções de proteína com concentrações entre 10 a 13 mg mL<sup>-1</sup>, variadas concentrações de substratos, e *kits* de *screening* de cristalização da Hampton Research, os quais possuem variadas condições de cristalização com relação à composição e concentração de tampão, sais e agentes precipitantes. Além disso, foram testadas outras condições de cristalização, apresentados em artigos [19], como 0,4M de sulfato de amônio. Outra técnica testada foi a cristalização induzida pelo substrato, CMP, em concentrações saturantes. Todo este processo foi realizado duas vezes, mas sem sucesso. Poderão ser testadas no futuro outras condições de cristalização ainda não abordadas.

A fim de explorar as diferenças estruturais e funcionais encontradas nas NMP quinases eucarióticas e bacterianas, para o desenvolvimento de drogas racionais, este trabalho apresentou um protocolo de produção da enzima CMK de *Mycobacterium tuberculosis* de forma homogênea e ativa. A produção da proteína permitiu demonstrar que CMK fosforila preferencialmente CMP e dCMP em relação a UMP. Além disso, os resultados apresentados aqui são essenciais para embasar posteriores experimentos de manipulação gênica em *M. tuberculosis* a fim de confirmar seu papel biológico.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). TB- General information, 2007. Disponível em: <http://www.cdc.gov/tb/pubs/TBfactsheets.htm>. Acesso em: setembro, 2008.
2. Palomino JC, Leão SC, Ritacco V. Tuberculosis 2007- From Basic Science to Patient Care. First edition.
3. Cole E, Cook C. Characterization of infectious aerosols in health care facilities: an aid to effective engineering controls and preventive strategies. *Am J Infect Control*.1998; 26: 453-64.
4. Nicas M, Nazaroff WW, Hubbard A. Toward understanding the risk of secondary airborne infection: emission of respirable pathogens. *J Occup Environ Hyg*. 2005; 2 (3): 143–54.
5. WHO: Report WHO/HTM/TB/2008.393, (2008). Página da organização Mundial da Saúde. Disponível em: <http://www.who.int/healthtopics/tb.htm>. Acesso em: Abril de 2008.
6. *Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know, 4th edition (2000)*. Publicado pela *Division of Tuberculosis Elimination* dos EUA. Disponível em: <http://www.cdc.gov/tb/pubs/corecurr/default.htm>. Acesso em: setembro, 2008.
7. Página do Ministério da Saúde do Brasil. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21445](http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21445). Acesso em: setembro de 2007.
8. Reid A, Scano F, Getahun H, Willians B, Dye C, Nunn P, De Cock KM, Hankins C, Miller B, Castro KG, Raviglione MC. Towards universal access to HIV prevention, treatment, care, and support: the role of tuberculosis/HIV collaboration. *The Lancet Infectious Diseases*. 2006; 6(8): 483-95.
9. Brudney K, Dobkin J. Resurgent tuberculosis in New York City. Human immunodeficiency virus, homelessness, and the decline of tuberculosis control programs. *Am Rev Respir Dis*. 1991; 144: 745-9.
10. World Health Organization. XDR-TB – Extensive Drug Resistant TB. 2006. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2006/np23/en/index.html>. Acesso em: setembro de 2008.
11. World Health Organization. Global Tuberculosis Control Report, 2006.
12. Singh JA, Upshur R, Padayatchi N. XDR-TB in South Africa: No Time for Denial or Complacency. *PloS Medicine*. 2007; 4: 19-25.
13. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biochemistry. **Hardcover**. 2006. 6ª edição.
14. Fontes R. *Síntese e degradação de bases púricas e pirimídicas* – Disponível em: [http://users.med.up.pt/ruifonte/PDFs/20062007/G22\\_bases\\_puricas\\_e\\_pirimidicas.pdf](http://users.med.up.pt/ruifonte/PDFs/20062007/G22_bases_puricas_e_pirimidicas.pdf). Acesso em: setembro de 2008.
15. KEGG PATHWAY Database. Disponível em: [http://www.genome.ad.jp/dbgetbin/get\\_pathway?org\\_name=mtu&mapno=00240](http://www.genome.ad.jp/dbgetbin/get_pathway?org_name=mtu&mapno=00240). Acesso: setembro de 2007.
16. Ofiteru A, Bucurenci N, Alexov E, Bertrand T, Briozzo P, Munier-Lehmann H, Gilles AM. Structural and functional consequences of single amino acid substitutions in the

- pyrimidine base binding pocket of *Escherichia coli* CMP kinase. FEBS Journal. 2007; 274: 3363–3373
17. Wild K, Bohner T, Aubry A, Folkers G, Schultz GE. The three-dimensional structure of thymidine Kinase from Herpes simplex virus type 1. FEBS Lett. 1995; 368: 289–292.
  18. Briozzo P, Golinelli-Pimpaneau B, Gilles AM, Gaucher JF, Burlacu-Miron S, Sakamoto H, Janin J, Barzu O. Structures of *Escherichia coli* CMP kinase alone and in complex with CDP: A new fold of the nucleoside monophosphate binding domain and insights into cytosine nucleotide specificity. Structure. 1998; 6: 1517–1527.
  19. Bertrand T, Briozzo P, Assairi L, Ofiteru A, Bucurenci N, Munier-Lehmann H, Golinelli-Pimpaneau B, Barzu O, Gilles AM. Sugar specificity of bacterial CMP kinases as revealed by crystal structures and mutagenesis of *Escherichia coli* enzyme. J. Mol. Biol. 2002; 315: 1099–1110.
  20. Scheffzek K, Kliche W, Wiesmuller L, Reinstein J. Crystal structure of the complex of UMP/CMP kinase from *Dictyostelium discoideum* and the bisubstrate inhibitor P1–(5\_adenosyl) P5–(5\_uridyl) pentaphosphate (UP5A) and Mg<sup>2+</sup> at 2.2 Å: Implications for water-mediated specificity. Biochemistry. 1996; 35: 9716–9727.
  21. Schlichting I, Reinstein J. Structures of active conformations of UMP kinase from *Dictyostelium discoideum* suggest phosphoryl transfer is associative. Biochemistry. 1997; 36: 9290–9296.
  22. Briozzo P, Evrin C, Meyer P, Assairi L, Joly N, Barzu O, Gilles AM. Structure of *Escherichia coli* UMP Kinase Differs from That of other Nucleoside Monophosphate Kinases and Sheds New Light on Enzyme Regulation. J. Bio. Chemis. 2005; 280, 27: 25533-25540.
  23. Müller-Dieckmann HJ, Schulz GE. The structure of uridylate kinase with its substrates, showing the transition state geometry. J. Mol. Biol. 1994; 236: 361–367.
  24. Müller-Dieckmann HJ, Schulz GE. Substrate specificity and assembly of the catalytic center derived from two structures of ligated uridylate kinase. J. Mol. Biol. 1995; 246: 522–530.
  25. Yu L, Mack J, Hajduk P J, Kakavas S J, Saiki AYC, Lerner CG, Olejniczak E T. Solution structure and function of an essential CMP kinase of *Streptococcus pneumoniae*. Protein Science. 2003; 12:2613-2621.
  26. Dhaliwal B, Ren J, Lockyer M, Charles I, Hawkins A.R, Stammers DK. Structure of *Staphylococcus aureus* cytidine monophosphate kinase in complex with cytidine 5'-monophosphate. Acta Crystallogr. 2006; 62: 710-715.
  27. Suzuki NN, Koizumi K, Fukushima M, Matsuda A., Inagaki F. Structural basis for the specificity, catalysis, and regulation of human uridine-cytidine kinase Structure. 2004; 12: 751-764.
  28. Sekulic N, Ort S, Konrad M, Lavie A. Substrate-induced Conformational Changes in Human UMP/CMP Kinase. J.Biol.Chem. 2004; 279: 33882-33889.

## 7. ANEXOS

### ANEXO I

#### PROTOSCOLOS BIACORE

Foram utilizados nas análises o aparelho BIAcore X (GE Healthcare) e o *chip* Sensor Chip CM5, contendo cadeias de dextran carboxi-metilado covalentemente ligadas à superfície de ouro.

Inicialmente, foi determinado o pH do tampão de imobilização a partir do cálculo do ponto isoelétrico (PI) de CMK. Como a proteína possui PI em torno de 4,8 foram testados os tampões acetato de sódio 10 mM pH 4.0 e pH 4.5, pois neste pH, menor que o PI, os grupos amino das proteínas encontram-se carregados positivamente e assim permitem sua ligação à matriz, carregada negativamente, do *chip*.

A proteína CMK estava, desde a sua purificação em tampão Tris HCl pH 7,5, porém neste tampão a enzima não pode ser passada pelo chip, pois o Tris compete pela ligação as dextranas carregadas positivamente. Assim, a proteína foi dializada contra o tampão Hepes (0,01 M Hepes, 0,15 M NaCl, pH 7,4).

Para imobilização da proteína CMK, esta foi diluída para 40 µg/ml no tampão acetato escolhido. O tampão escolhido para a ativação das dextranas, imobilização das proteínas e bloqueio das dextranas não ligadas as enzimas foi o HBS-N (0,01 M Hepes, 0,15 M NaCl, pH 7,4).

O chip possui duas células iguais, isto é com a mesma composição (cadeias de dextran carboxi-metilado), porém, estas são separadas fisicamente permitindo que se tenha um controle negativo do experimento. Durante o experimento, tudo o que é realizado em uma célula é feita na outra, a única diferença é que no controle não é ligada a proteína (enzima CMK).

A ativação das dextranas (EDC/NHS, 1:1) foi feita, portanto, nas duas células, em uma delas foi injetada a proteína para a imobilização e na outra as mesmas quantidades de tampão, que estava diluída a enzima. Em seguida as duas células foram bloqueadas (1M Etanolamida, a 10  $\mu$ L/min por 7'). A quantidade de proteína imobilizada na célula é dada em RUs (do inglês *resonance units*), que aumenta a medida que mais proteína é imobilizada na célula. O valor real de RUs imobilizados no chip é dado pela subtração dos RUs da célula com proteína dos RUs da célula controle.

No primeiro ensaio, com a proteína diluída com tampão acetato pH 4, foram 4 injeções (10  $\mu$ L/min) da solução de enzima (40  $\mu$ g/ml), 20  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 10  $\mu$ L e 20  $\mu$ L respectivamente. Após o bloqueio tal ligação gerou uma diferença de RUs para o controle de 15.000. Para ensaios enzimáticos os valores recomendados de RUs de ligação variam enormemente em diferentes artigos, variando entre 200 a 3000 RUs. Portanto a quantidade de RUs obtidas neste ensaio foi muito grande em relação às injeções de proteína.

No segundo ensaio, foi utilizado o tampão acetato pH 4,5, a proteína foi diluída para 20  $\mu$ g/ml com objetivo de evitar uma grande quantidade (RUs) de imobilização no chip. Com as mesmas quantidades de aplicações foi obtido 300 RUs de imobilização.

Os substratos, CMP, dCMP e ATP foram diluídos com o mesmo tampão da diálise para as concentrações de 62,5  $\mu$ M, 125  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 750  $\mu$ M e 1000  $\mu$ M. A passagem dos substratos pelas duas células (a controle e a com a enzima imobilizada) não apresentou diferença significativa de RUs, mostrando que não houve ligação de nenhum dos substratos testados a enzima imobilizada.

Outros testes foram realizados mantendo-se a concentração da enzima diluída, em tampão acetato pH 4,5, a 40 µg/ml constante e variando os tampões com o qual a enzima era dializada e os substratos diluídos. Foram testados também outras quantidades de RUs imobilizados de enzima (variando de 500 a 3000). Tentou-se variar também a velocidade de passagem do substrato pelo enzima, 5 µl/min ,10 µl/min, 20 µl/min , 30 µl/min.

A seguir encontram-se os tampões e condições utilizados em testes posteriores:

- Hepes 100 mM, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7,5 (na diálise e nos substratos)
- Tris HCl 50mM, NaCl 150 mM (nos substratos)
- Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 3% DMSO (nos substratos).

## ANEXO II

**From:** [journalsrr@asmusa.org](mailto:journalsrr@asmusa.org) [mailto:[journalsrr@asmusa.org](mailto:journalsrr@asmusa.org)]

**Sent:** Wed 9/24/2008 12:41 PM

**To:** Luiz Augusto Basso

**Subject:** Manuscript submission (JB01337-08 Version 1)

Dr Luiz A. Basso  
Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul - PUCRS  
Faculdade de Biociências - Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional  
Av. Ipiranga, 6681  
TECNOPUC - Predio 92A  
Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90619-900  
Brazil

Re: The Rv1712 locus from Mycobacterium tuberculosis H37Rv codes for a functional cytidine monophosphate kinase that preferentially phosphorylates (d)CMP (JB01337-08 Version 1)

Dear Dr. Basso:

You have successfully submitted your manuscript via the Rapid Review system. The control number of your manuscript is JB01337-08 Version 1. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor. You may log onto the Rapid Review system at any time to see the current status of your manuscript and the name of the editor handling it. The URL is <http://www.rapidreview.com/ASM2/author.html>, and your user name is labasso. To find contact information for the editor handling your manuscript, go to the following URL: <http://www.asm.org/journals/editors.asp>

In submitting your manuscript to the Journal of Bacteriology (JB), the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere and that all of the authors are aware of and agree to the submission.

By publishing in the journal, the authors agree that any DNAs, viruses, microbial strains, mutant animal strains, cell lines, antibodies, and similar materials newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion, at reasonable cost, and in limited quantities to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Similarly, the authors agree to make available computer programs, originating in the authors' laboratory, that are the only means of confirming the conclusions reported in the article but that are not available commercially. The program(s) and suitable documentation regarding its (their) use may be provided by any of the following means: (i) as a program transmitted via the Internet, (ii) as an Internet server-based tool, or (iii) as a compiled or assembled form on a suitable medium (e.g., magnetic or optical). It is expected that the material will be provided in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

If your manuscript is accepted for publication, a condition of acceptance is that you assign copyright to the American Society for Microbiology. A copyright transfer agreement is sent with each letter of acceptance after the manuscript has been scheduled for publication.

If your manuscript is accepted for publication in a 2008 issue, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$65 per printed page for the first eight pages and \$200 for each page in excess of eight for a corresponding author who is an ASM member or \$75 per printed page for the first eight pages and \$250 for each page in excess of eight for a nonmember corresponding author. A corresponding author who is not a member may join ASM to obtain the member rate. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals. For more details, including type of articles not charged, see the Instructions to Authors.

**IMPORTANT NOTICE:** For its primary-research journals, ASM posts online PDF versions of manuscripts that have been peer reviewed and accepted but not yet copyedited. This feature is called "JB Accepts" and is

accessible from the Journals website. The manuscripts are published online as soon as possible after acceptance, on a weekly basis, before the copyedited, typeset versions are published. They are posted "As Is" (i.e., as submitted by the authors at the modification stage), and corrections/changes are NOT accepted. Accordingly, there may be differences between the JB Accepts version and the final, typeset version. The manuscripts remain listed on the JB Accepts page until the final, typeset versions are posted, at which point they are removed from the JB Accepts page and become available only through links from the final, typeset version. They are under subscription access control until 4 months after the typeset versions are posted, when access to all forms becomes free to everyone. Any supplemental material intended, and accepted, for publication is not posted until publication of the final, typeset article.

Thank you for submitting your manuscript for consideration.

Jack Kenney  
Production Editor  
Journal of Bacteriology (JB)