

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

LÉIA JASKULSKI

**CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA CITIDINA MONOFOSFATO QUINASE
(EC 2.7.4.14) DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv COMO ALVO PARA O
DESENVOLVIMENTO DE DROGAS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Porto Alegre

2013

LÉIA JASKULSKI

**CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA CITIDINA MONOFOSFATO QUINASE
(EC 2.7.4.14) DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv COMO ALVO PARA O
DESENVOLVIMENTO DE DROGAS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde como requisito para a obtenção do grau de Doutor na área de concentração de Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre

2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO

J39c Jaskulski, Léia

Caracterização da enzima citidina monofosfato quinase (EC 2.7.4.14) de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv como alvo para o desenvolvimento de drogas para o tratamento da tuberculose / Léia Jaskulski. Porto Alegre: PUCRS, 2013.

103 f.: il. tab. Artigo publicado no periódico *Archives Of Biochemistry And Biophysics*.

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

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Farmacologia Bioquímica e Molecular

Isabel Merlo Crespo
Bibliotecária CRB 10/1201

LÉIA JASKULSKI

**CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA CITIDINA MONOFOSFATO QUINASE
(EC 2.7.4.14) DE *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv COMO ALVO PARA O
DESENVOLVIMENTO DE DROGAS PARA O TRATAMENTO DA TUBERCULOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Ciências da Saúde como requisito para a
obtenção do grau de Doutor na área de concentração de
Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Aprovada em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. André Arigony Souto – PUCRS

Prof. Dr. Walter Filgueira de Azevedo Jr. – PUCRS

Prof. Dr. Mauricio Reis Bogo – PUCRS

Prof. Dr. Giancarlo Pasquali – UFRGS

SUPLENTE:

Prof. Dr. Pablo Machado – PUCRS

Porto Alegre

2013

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Osmar N. de Souza pela valiosa colaboração no trabalho.

A Diana C. Rostirolla, ao Leonardo Rosado e ao Luis F. S. M. Timmers pela ajuda no planejamento dos experimentos e na análise dos resultados.

Aos colegas e amigos do CPBMF e da Quatro G pelo carinho, amizade, ajuda, apoio, ensinamentos e força nos momentos mais difíceis que foram de fundamental importância para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa fornecida durante o doutorado.

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

Muito obrigada a todos!

RESUMO

A tuberculose (TB), uma das doenças mais antigas da humanidade, ainda é uma das principais causas de morte entre as doenças infecciosas. A coinfeção com o HIV e a emergência de TB resistente a múltiplas drogas representam um desafio à saúde pública e tem estimulado a pesquisa por novos e mais efetivos agentes terapêuticos contra a doença. Novas abordagens para o desenvolvimento de compostos contra doenças complexas, especialmente doenças endêmicas negligenciadas, são baseadas no uso de alvos moleculares definidos. Enzimas envolvidas no metabolismo de pirimidinas tornam-se alvos moleculares interessantes para compostos inibidores, uma vez que em bactérias, as rotas de interconversão de nucleotídeos pirimidínicos são importantes em inúmeros processos essenciais, incluindo a biossíntese de DNA, RNA e fosfolipídios. A citidina 5'-monofosfato quinase de *Mycobacterium tuberculosis* (*MtCMK*) em estudo, catalisa a transferência reversível de um grupamento fosforil a partir de ATP, preferencialmente para CMP e dCMP. Neste trabalho, os estudos de velocidade inicial e experimentos de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) demonstraram que a adição dos substratos (CMP e ATP) à *MtCMK* segue um mecanismo cinético sequencial aleatório, e que a liberação dos produtos ocorre de forma ordenada, onde o ADP é o primeiro produto a ser liberado. As assinaturas termodinâmicas da ligação do CMP e do CDP à *MtCMK* mostraram variações favoráveis da entalpia e desfavoráveis da entropia, e, a ligação do ATP foi caracterizada por mudanças favoráveis da entalpia e da entropia. As contribuições energéticas oriundas dos eventos de protonação, associados à formação do complexo binário *MtCMK*:receptor do grupamento fosforil, sugerem um ganho líquido de prótons. Além disso, foram calculados os valores de pK_a de um provável grupo envolvido na troca de prótons, e da entalpia de ligação intrínseca. A cadeia lateral do Asp187 da *MtCMK* é sugerido como provável candidato para o evento de protonação. As medidas termodinâmicas da formação do complexo binário foram coletados a fim de avaliar a contribuição do grupo 2'-OH da pentose nas interações intermoleculares. Os dados obtidos foram discutidos comparando-se as características estrutural e funcional entre as CMKs já estudadas e a UMP/CMP quinase humana.

Palavras-chave: citidina 5'-monofosfato quinase; *Mycobacterium tuberculosis*; mecanismo cinético; Calorimetria de Titulação Isotérmica; eventos de protonação; entalpia de ligação intrínseca.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB), one of the oldest recorded human afflictions, is still one of the biggest killers among the infectious diseases. The HIV co-infection and the emergence of multidrug resistant TB have provided a very alarming challenge to global health and led us to focus on the research for new and more effective therapeutics against the disease. The modern approach to the development of new chemical compounds against complex diseases, especially the neglected endemic ones, such as TB, is based on the use of defined molecular targets. Enzymes from the pyrimidine biosynthesis pathway have been considered potential targets for identification or development of novel anti-mycobacterial agents since in bacteria, pyrimidine nucleotide interconversion pathways are important in a number of essential processes, including DNA, RNA, and phospholipid biosynthesis. Cytidine 5'-monophosphate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* (*Mt*CMK) catalyzes the ATP-dependent phosphoryl group transfer preferentially to CMP and dCMP. Here, initial velocity studies and Isothermal Titration Calorimetry (ITC) measurements showed that *Mt*CMK follows a random-order kinetic mechanism of substrate binding, and an ordered mechanism for product release. The thermodynamic signatures of CMP and CDP binding to *Mt*CMK showed favorable enthalpy and unfavorable entropy, and ATP binding was characterized by favorable changes in enthalpy and entropy. The contribution of linked protonation events to the energetics of *Mt*CMK:phosphoryl group acceptor binary complex formation suggested a net gain of protons. Values for the pK_a of a likely chemical group involved in proton exchange and for the intrinsic binding enthalpy were calculated. The Asp187 side chain of *Mt*CMK is suggested as the likely candidate for the protonation event. Data on thermodynamics of binary complex formation were collected to evaluate the contribution of 2'-OH group to intermolecular interactions. The data are discussed in light of functional and structural comparisons among CMP/dCMP kinases and UMP/CMP ones.

Keywords: cytidine 5'-monophosphate kinase; *Mycobacterium tuberculosis*; kinetic mechanism; Isothermal Titration Calorimetry; protonation events; intrinsic binding enthalpy.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: adenosina 5'-difostato

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

AraCMP: citosina β -D-arabinofuranosídeo 5'-monofosfato

ATP: adenosina 5'-trifostato

BCG: *Bacille Calmette-Guérin*

CDA: citidina deaminase

CDP: citidina 5'-difosfato

CMK: citidina 5'-monofosfato quinase ou CMP-quinase

CMP: citidina 5'-monofosfato

CTP: citidina 5'-trifostato

dCDP: 2'-desoxicidina 5'-difosfato

dCMP: 2'-desoxi-citidina 5'-monofosfato

dCTP: 2'-desoxi-citidina 5'-trifostato

ddCMP: 2'-3'-didesoxi-citidina 5'-monofosfato

DNA: ácido desoxirribonucleico

DOTS: *Directly Observed Treatment Short Course*

dTDP: 2'-desoxi-timidina 5'-difosfato

dTMP: 2'-desoxi-timidina 5'-monofosfato

dTTP: 2'-desoxi-timidina 5'-trifostato

dUMP: 2'-desoxi-uridina 5'-monofosfato

dUTP: 2'-desoxi-uridina 5'-trifostato

dUTPase: desoxiuridina trifosfatase

ESI-MS: espectrometria de massa com ionização por eletrospray

FDA: *Food and Drug Administration*

GDP: guanosina 5'-difostato

HEPES: *N-2-hydroxyethylpiperazinyne-N'-2-ethanesulfonic acid*

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HSV: vírus herpes simples

INH: isoniazida

ITC: *Isothermal Titration Calorimetry*

LDH: lactato desidrogenase

MDR-TB: *Multi-drug-resistant tuberculosis*

MS: Ministério da Saúde

MtCMK: citidina 5'-monofosfato quinase de *M. tuberculosis*

MtUMP: uridina 5'-monofosfato quinase de *M. tuberculosis*

NADH: *reduced nicotinamide adenine dinucleotide*

NDP-quinase: nucleosídeo difosfato quinase

NMP: nucleosídeo monofosfato

NMP-quinase: nucleosídeo monofosfato quinase

OMS: Organização Mundial da saúde

PAS: ácido *para*-aminosalicílico

PEP: fosfoenolpiruvato

PK: piruvato quinase

PRPP: 5-fosforribosil- α -1-pirofosfato

PyNP: pirimidina nucleosídeo fosforilase

RIF: rifampicina

RNA: ácido ribonucleico

RNAm: RNA mensageiro

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*

TB: tuberculose

TDR-TB: *Totally drug-resistant tuberculosis*

UDP: uridina 5'-difosfato

UMP: uridina 5'-monofosfato

UPRT: uracil fosforribosil transferase

UTP: uridina 5'-trifosfato

XDR-TB: *Extensively drug-resistant tuberculosis*

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 TUBERCULOSE – HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA	12
1.2 PATOGÊNESE E PROPRIEDADES DA DOENÇA.....	13
1.3 TRATAMENTO.....	15
1.4 RESISTÊNCIA.....	17
1.5 POSSÍVEIS ALVOS MOLECULARES PARA O DESENVOLVIMENTO DE DROGAS ANTI-TB E A VIA DE SALVAMENTO DE PIRIMIDINAS	18
1.5.1 Citidina monofosfato quinases	21
1.5.1.1 A enzima citidina 5'-monofosfato quinase de <i>M. tuberculosis</i> como possível alvo para o desenvolvimento de compostos inibidores	23
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL E JUSTIFICATIVA	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
CAPÍTULO II	29
Manuscrito intitulado “Kinetic mechanism and energetics of binding of phosphoryl group acceptors to <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Cytidine Monophosphate Kinase” aceito para a publicação no periódico <i>Archives of Biochemistry and Biophysics</i>	29
CAPÍTULO III	82
Dependência da temperatura durante a formação do complexo binário <i>Mt</i> CMK:NMP	82
1 MATERIAIS E MÉTODOS	83
1.1 MATERIAIS	83
1.2 PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA	83
1.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE	83
1.4 ESTABILIDADE DA ENZIMA	84
1.5 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA	84
1.6 ANÁLISE DOS DADOS	85
2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87

2.1 DEPENDÊNCIA DA TEMPERATURA DURANTE A FORMAÇÃO DO COMPLEXO BINÁRIO <i>Mt</i> CMK:NMP	87
CAPÍTULO IV	92
CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
REFERÊNCIAS	95
ANEXO	103
CARTA DE ACEITE PARA A PUBLICAÇÃO DO MANUSCRITO “Kinetic mechanism and energetics of binding of phosphoryl group acceptors to <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Cytidine Monophosphate Kinase” NO PERIÓDICO <i>ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS</i>	103

CAPÍTULO I

1 Introdução

1.1 Tuberculose – histórico e epidemiologia

1.2 Patogênese e propriedades da doença

1.3 Tratamento

1.4 Resistência

1.5 Possíveis alvos moleculares para o desenvolvimento de drogas anti-TB e a via de salvamento de pirimidinas

1.5.1 Citidina monofosfato quinases

1.5.1.1 A enzima citidina 5'-monofosfato quinase de *M. tuberculosis* como possível alvo para o desenvolvimento de compostos inibidores

2 Justificativa

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

3.2 Objetivos específicos

1 INTRODUÇÃO

1.1 TUBERCULOSE – HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

A tuberculose (TB), também conhecida como Peste Branca no século XVIII, é uma ameaça aos seres humanos desde a antiguidade. Entre o final do século XIX e o início do século XX, esta doença se tornou a principal causa de morte mundial, vitimando pessoas de todas as classes econômicas (1).

O principal agente etiológico da doença em humanos, o *Mycobacterium tuberculosis*, foi identificado apenas em 1882 pelo alemão Robert Koch (1882) (2) e, a partir disso, foram desenvolvidas inúmeras estratégias terapêuticas para o tratamento da TB e a vacina Bacille Calmette-Guérin (BCG) foi introduzida para a prevenção da doença (3). O tratamento farmacológico da TB teve início com a descoberta da estreptomomicina em 1944 (4, 5) e com o desenvolvimento do ácido *para*-aminosalicílico (PAS) (6) que, em combinação, reduziram drasticamente a mortalidade causada pela TB (4, 7). Adicionalmente, o surgimento de novas drogas como isoniazida (INH) (1952) (6) e rifampicina (RIF) (1966) (5), levou algumas nações desenvolvidas a acreditarem que a TB estaria, senão erradicada, confinada a países pobres (8). No entanto, a TB representa um grave problema de saúde pública (9) e se encontra entre as principais causas de morte por doenças infecciosas no mundo (10).

Segundo a Organização Mundial da saúde (OMS) (10), a incidência de novos casos de TB têm diminuído desde 2006. No entanto, estima-se que, no ano de 2011, ocorreram 8,7 milhões de novos casos (doença ativa) e 1,4 milhão de mortes ocasionadas pela doença (incluindo 990 mil mortes entre pacientes HIV-negativos e 430 mil mortes entre pacientes co-infectados com HIV/TB) (11). Além disso, estima-se que cerca de um terço da população mundial, ou 2 bilhões de pessoas, estejam infectadas (infecção latente) com o *M. tuberculosis* (12).

Globalmente, a maioria dos casos estimados em 2011 ocorreu na Ásia (59%) e na África (26%), com menores proporções registradas na região do Mediterrâneo Oriental (7,7%), região Europeia (4,3%) e região das Américas (3%) (11). O Brasil se encontra entre os 22 países responsáveis por mais de 80% do total de casos de TB no mundo (10) e também apresenta números alarmantes. De acordo com o Ministério da Saúde (MS), a taxa de incidência no Brasil, em 2011, foi de 36,0 casos de TB para cada grupo de 100 mil habitantes, sendo que os estados do

Amazonas (62,6) e Rio de Janeiro (57,6) apresentaram as maiores taxas de incidência do país. A taxa de mortalidade, em 2010, foi de 2,4 óbitos para cada grupo de 100 mil habitantes (13).

A TB é classicamente associada à pobreza, ao crescimento da população e à desnutrição. Porém, a magnitude atual da doença é relacionada principalmente a fatores como a emergência da AIDS/HIV (que teve início na década de oitenta); às crescentes dificuldades no tratamento de linhagens de TB resistentes a múltiplas drogas (em especial, a partir da década de noventa), à dificuldade de acesso aos serviços de saúde (10, 14), imigrações, desigualdades sociais e ao abuso de álcool e drogas (10).

A coinfeção HIV/TB tem ocasionado um número ainda maior de mortes no mundo e estudos epidemiológicos mostram que pacientes coinfectados com o HIV apresentam até 34 vezes mais chances (em comparação com indivíduos HIV-negativos) (10) de desenvolver a TB ativa (15). Dentre os 9 milhões de indivíduos que desenvolveram TB em 2010, 1,1 milhão corresponderam a pacientes coinfectados com HIV (10).

1.2 PATOGÊNESE E PROPRIEDADES DA DOENÇA

A TB humana é uma doença contagiosa causada principalmente pelo *M. tuberculosis* – sendo provocada também por *M. bovis* e *M. africanum* – bactéria aeróbia patogênica que estabelece a infecção predominantemente no interior dos macrófagos alveolares. A infecção geralmente ocorre através da inalação de aerossóis contendo bacilos, expelidos da garganta e dos pulmões de indivíduos que possuem a forma pulmonar ativa da doença (16).

A evolução da doença é fundamentalmente regulada pela integridade do sistema imunológico do hospedeiro, que é capaz de eliminar ou apenas conter a doença – levando ao condicionamento de latência – ou ainda, em casos de falha do sistema imune, resultar no desenvolvimento da doença ativa (1).

Após a inalação dos bacilos, eles são fagocitados pelos macrófagos alveolares, nos quais podem estabelecer a infecção ou serem eliminados. Subsequentemente, ocorre a infiltração de células inflamatórias, principalmente linfócitos e macrófagos ativados, que levam à eliminação de grande parte da carga bacteriana. Estas células são responsáveis pela resposta inflamatória e formação do granuloma, a principal característica da TB (1). Acredita-se que os granulomas formados limitam o crescimento do *M. tuberculosis*, restringindo o acesso ao oxigênio e a

nutrientes e, neste ambiente, o bacilo está exposto ao pH ácido e a efetores imunes, como o óxido nítrico (17).

Normalmente, a fase de contenção da infecção leva à eliminação da maior parte dos bacilos e, conseqüentemente, ao término da infecção primária, sem a apresentação de sintomas. Nestes casos, a única evidência de infecção anterior pode ser identificada pela prova da tuberculina intradérmica ou, em alguns casos, evidências de lesões calcificadas por raios X (7). Todavia, na maioria dos casos, o término da infecção primária caracteriza-se pela permanência do bacilo no hospedeiro em um estado dormente – período no qual o indivíduo infectado não apresenta a TB clínica aparente – constituindo um grande reservatório de bactérias viáveis e patogênicas. Por outro lado, quando a resposta imune não pode suprimir a replicação bacteriana, a infecção primária progride para a TB ativa (1, 18, 19).

O desenvolvimento da doença (TB pós-primária), na qual a TB pulmonar é a manifestação clínica predominante (20), pode ser causado tanto pela reativação da infecção latente ou pela falha no controle de uma nova infecção (21). Entre os indivíduos com TB latente, o risco de progressão para TB ativa é de 5% após o primeiro ano da infecção e de 10% ao longo da vida (1, 7). A reativação da infecção latente, que frequentemente ocorre várias décadas após a infecção inicial, pode ser induzida por vários fatores que comprometem a imunidade do indivíduo como, coinfeção por HIV, desnutrição, envelhecimento, uso de drogas, câncer, diabetes, insuficiência renal crônica ou terapia com drogas imunossupressoras (22).

A TB pós-primária pode envolver danos extensos ao pulmão e é eficientemente transmissível (20). Ela ocorre quando os bacilos viáveis são liberados do interior do granuloma, levando ao desenvolvimento da tosse produtiva e facilitando a propagação dos aerossóis infectados (19) que, por sua vez, podem permanecer em suspensão durante horas, o que torna a TB uma doença altamente contagiosa (23). Nos casos em que a resposta imune do hospedeiro predomina, a lesão é contida, causando danos simplesmente residuais para os pulmões. Entretanto, se ocorre uma expansão da necrose atingindo os brônquios, pode se formar uma cavidade no pulmão permitindo a disseminação maciça de bactérias no ar (7). Na maioria dos pacientes doentes, os bacilos podem ser observados por microscopia através de coloração do esfregaço de escarro; 60 a 70% dos casos de TB pulmonar apresentam baciloscopia positiva (24). Apesar de pacientes com baciloscopia negativa também poderem estar infectados, estes contribuem pouco para a transmissão da doença (25, 26).

Entre os pacientes com a doença ativa, aproximadamente 15% desenvolvem a TB extrapulmonar, ou TB miliar, que é causada pela evolução do granuloma devido ao excessivo crescimento bacteriano, com invasão da corrente sanguínea pelos bacilos e consequente disseminação para várias partes do corpo (1).

Os processos patológicos e inflamatórios da doença produzem os sintomas típicos da TB tais como, fraqueza, febre, perda de peso, sudorese noturna, dor no peito, insuficiência respiratória e tosse (com pouca ou nenhuma produção de escarro) (7). Se a doença não for tratada, a TB pode se desenvolver rapidamente levando a debilidade e esgotamento físico do paciente, podendo progredir para a morte do indivíduo. Aproximadamente dois terços dos pacientes não tratados (com baciloscopia positiva), morrem dentro de cinco a oito anos, a maioria nos primeiros 18 meses. Mesmo entre os pacientes que receberam medicamentos anti-TB, e apresentavam baciloscopia positiva, a taxa de letalidade pode exceder 10% na ocorrência de baixa adesão ao tratamento, altas taxas de coinfeção com HIV ou em casos de resistência às drogas (27).

1.3 TRATAMENTO

No período clássico do Império Romano, Clarissimus Galeno (filho do grande matemático e arquiteto Nikon) prescrevia aos seus pacientes um tratamento à base de leite fresco, ar puro, viagens marítimas, passeios a cavalo e muito descanso em ambientes secos de maior altitude (28). No século XIX, somente a intervenção cirúrgica era possível como tratamento (além dos sanatórios), incluindo a técnica do pneumotórax: provocar o colapso de um pulmão infectado para deixá-lo "descansar" e permitir a cicatrização das lesões. Esta técnica habitual era capaz de auxiliar na melhora dos pacientes, uma vez que as bactérias necessitam de um ambiente com elevado nível de oxigênio para sobreviverem, mas era pouco benéfica, e foi praticamente extinta após 1946 (23, 29).

Em 1934, Frelander obteve sucesso com a primeira lobectomia pulmonar (ressecção) na TB. Contudo, anteriormente ao advento da estreptomicina (1960), a morbidade era de 50% e a mortalidade de 25% (29). Apesar disso, antes da disponibilidade de antimicrobianos eficazes, a intervenção cirúrgica foi uma importante forma de terapia para a TB pulmonar. Nos dias de hoje, com o surgimento de cepas multirresistentes, a ressecção cirúrgica pulmonar é mais uma vez

considerada uma gestão eficaz, quando associada à quimioterapia, para o tratamento de pacientes com TB resistente (29, 30).

A terapia contra a TB possui três objetivos principais: (i) ação bactericida primária contra os microrganismos em rápido crescimento; (ii) eliminar as micobactérias em crescimento lento (esterilização da população bacilar semidormente e dormente); e (iii) evitar o surgimento de resistência aos fármacos (31).

O regime quimioterápico padrão recomendado pela OMS – DOTS (*Directly Observed Treatment Short Course*) (32) – para tratar os casos de TB pulmonar previamente não tratados, consiste na combinação de drogas de primeira linha, INH, RIF, pirazinamida e etambutol, administradas por um período intensivo inicial de dois meses, seguido de quatro meses de tratamento com INH e RIF. Em países que relatam elevados níveis de resistência à INH (ou a falta de sensibilidade à droga), o etambutol é administrado durante a fase de manutenção de quatro meses de tratamento (33). A terapia com observação direta constitui a abordagem mais eficaz para garantir os índices de conclusão do tratamento de até 90% (34).

Os fármacos bactericidas, como a INH e RIF, atuam contra as bactérias em divisão (35, 36) sendo que a RIF também exerce atividade de esterilização sobre a população bacilar dormente (37). A pirazinamida possui atividade bactericida e tem uma potente ação esterilizante, principalmente no meio ácido predominante no interior dos macrófagos, e em áreas de inflamação aguda. Tanto na lesão pulmonar quanto nas zonas inflamatórias da parede cavitária, os bacilos fagocitados pelos macrófagos apresentam seu crescimento inibido pelo ambiente ácido. Esses bacilos, denominados persistentes e em fase de multiplicação esporádica, são os responsáveis pela recaída bacteriológica da TB. A pirazinamida é o medicamento mais eficaz para eliminar essa população (38) e, a inclusão do etambutol no tratamento de primeira linha, é recomendada para prevenir a resistência à RIF, quando há suspeita de resistência à INH (39).

As drogas de segunda linha anti-TB são introduzidas no regime de tratamento em casos de TB resistente aos antimicrobianos primários, caracterizada pela presença de culturas positivas após cinco meses de terapia apropriada (40). As fluoroquinolonas (levofloxacina, moxifloxacina, gatifloxacina), os aminoglicosídeos (streptomina, canamicina e amicacina) e a capreomicina, possuem ação bactericida e oferecem maior eficácia entre as drogas de segunda linha (41, 42). Os demais antibióticos (etionamida, cicloserina, PAS) exibem atividade bacteriostática, e são consideravelmente menos potentes, mais tóxicos e mais caros (43).

1.4 RESISTÊNCIA

As cepas de TB resistente têm sido relatadas desde o princípio da introdução da quimioterapia contra a TB. Porém, a propagação das cepas de *M. tuberculosis* resistente a múltiplas drogas (MDR-TB), bem como de cepas extensivamente resistentes (XDR-TB) e, mais recentemente, o surgimento das cepas totalmente resistentes (TDR-TB), têm-se tornado um importante problema de saúde pública e uma ameaça ao controle da TB no mundo (44, 45).

A MDR-TB ocorre quando uma cepa de *M. tuberculosis* é resistente a, pelo menos, INH e RIF, e o tratamento dessas cepas requer o uso de medicamentos de segunda linha por um longo período (33). A XDR-TB é caracterizada por uma cepa de *M. tuberculosis* com extensiva resistência às drogas de segunda linha (46), e foram definidas como resistentes a INH e RIF (MDR-TB) com resistência adicional a qualquer fluoroquinolona e a qualquer uma das três drogas injetáveis de segunda linha (amicacina, canamicina ou capreomicina) (47, 48). A TDR-TB foi identificada no Irã entre 2006 e 2008 e é caracterizada como MDR-TB com resistência adicional a todos os medicamentos de primeira e segunda linha testados (49). Portanto, o tratamento da MDR-TB e da XDR-TB consiste em drogas de segunda linha, que são mais caras, mais tóxicas, menos eficazes, apresentam mais efeitos adversos e são utilizadas por um período de tempo maior (pelo menos 20 meses de tratamento) (46).

O desenvolvimento de resistência pelo *M. tuberculosis* ocorre essencialmente através de mutações cromossomais (50) e, a resistência medicamentosa pode ser tipicamente adquirida ou amplificada devido a fatores relacionados aos medicamentos, como a utilização inadequada dos mesmos (devido a falhas na prescrição ou à falta de adesão dos pacientes ao tratamento) ou devido à utilização de medicamentos inadequados ou de baixa qualidade (40, 46). A resistência pode ser considerada primária, ou seja, quando a infecção inicial se dá por uma cepa de *M. tuberculosis* com resistência medicamentosa, ou secundária, quando a infecção se dá por uma cepa suscetível e que, após o contágio, ocorre alguma mutação que a torna resistente (51).

Outro fator relevante para o desenvolvimento de cepas resistentes é a coinfeção HIV/TB uma vez que a infecção por HIV favorece a sobrevivência e transmissão de cepas de *M. tuberculosis* entre os indivíduos coinfectados (40) e, adicionalmente, o índice de abandono ao tratamento é maior entre estes pacientes (52, 53). É importante observar também que o uso de antirretrovirais diminui a eficácia dos medicamentos anti-TB (52, 54).

A OMS estima a ocorrência de aproximadamente 310.000 casos de MDR-TB em 2011, sendo que quase 60% dos casos ocorreram na Índia, China e Rússia (11). As cepas XDR-TB apresentam uma ampla distribuição geográfica, sendo encontradas também no Brasil (43) e, no ano de 2011, 84 países reportaram à OMS pelo menos um caso de infecção com XDR-TB (11).

Embora existam agentes quimioterápicos disponíveis para tratamento da TB, a resistência tornou-se um problema dramático. Existe uma urgente necessidade de serem introduzidos medicamentos mais eficazes e menos tóxicos, que atuem em alvos micobacterianos diferentes aos alvos das drogas atualmente utilizadas, com a finalidade de proporcionar um tratamento alternativo eficaz, inclusive para as infecções provocadas por MDR-TB e XDR-TB. Além disso, há a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos que sejam efetivos em caso de infecção latente (55, 56).

1.5 POSSÍVEIS ALVOS MOLECULARES PARA O DESENVOLVIMENTO DE DROGAS ANTI-TB E A VIA DE SALVAMENTO DE PIRIMIDINAS

As enzimas envolvidas na rota de salvamento de purinas e pirimidinas são consideradas alvos atrativos para desenvolvimento de agentes quimioterápicos para o tratamento de doenças infecciosas (12, 55). Desde que a toxicidade de compostos análogos de pirimidina para o crescimento celular foi identificada, eles têm sido largamente utilizados no tratamento de doenças virais e do câncer (57).

Os nucleotídeos de pirimidina têm funções essenciais em muitos processos bioquímicos, em especial na biossíntese dos ácidos nucléicos. As rotas biossintéticas para moléculas de purinas e pirimidinas constroem a base para todos os demais passos do metabolismo de nucleotídeos e rotas relacionadas. Existem duas principais rotas para a síntese de nucleotídeos pirimidínicos: a via *de novo* e a de salvamento (58).

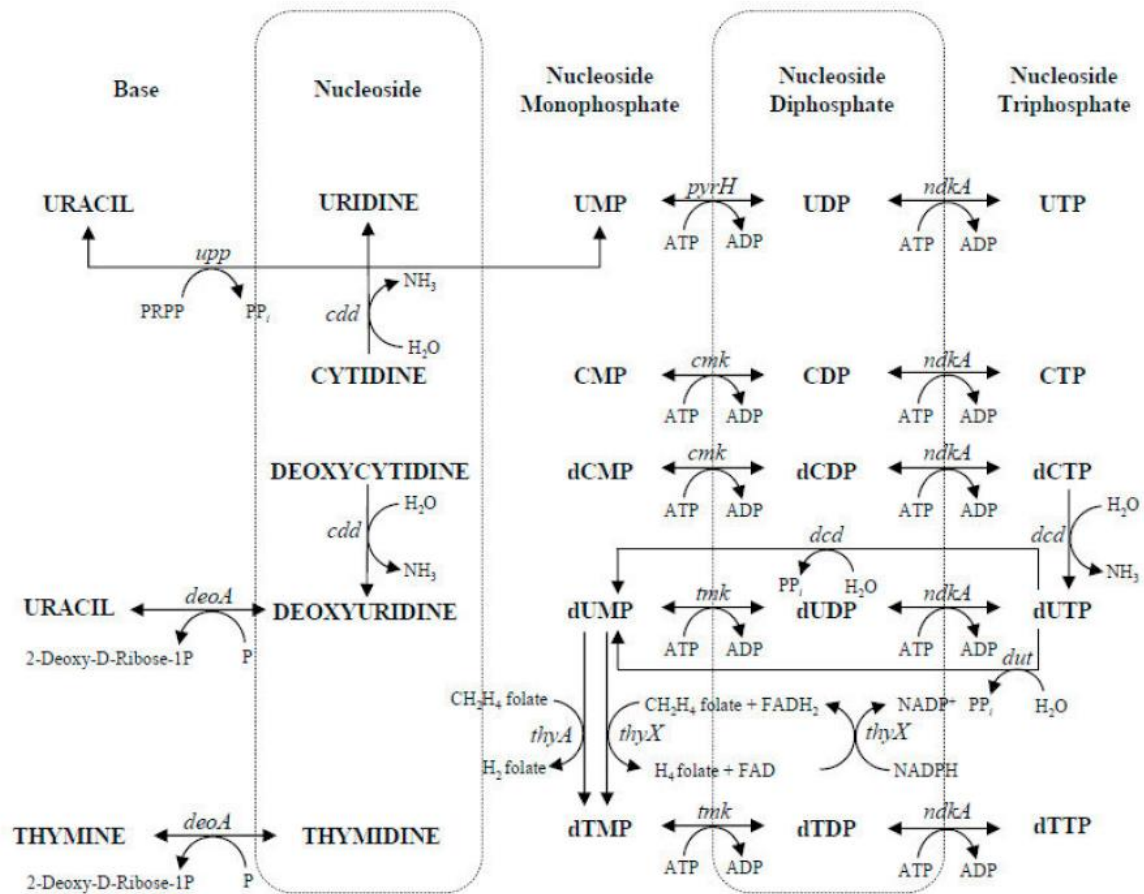
Na rota *de novo*, a síntese de nucleotídeos inicia a partir de precursores simples (aminoácidos, ribose 5'-fosfato, CO₂ e NH₃), e resulta na formação do produto final 2'-desoxitimidina 5'-trifosfato (dTTP) e dos intermediários obrigatórios uridina 5'-trifosfato (UTP), citidina 5'-trifosfato (CTP) e 2'-desoxicidina 5'-trifosfato (dCTP) (58, 59). Uma vez que esta via requer um maior consumo de energia, as células utilizam preferencialmente a via de salvamento

para o aproveitamento das bases de pirimidina e nucleosídeos, provenientes dos nucleotídeos pré-formados (58, 59).

A rota de salvamento de pirimidinas possui diversas funções fisiológicas tais como, (i) a assimilação de bases exógenas livres e nucleosídeos, (ii) o fornecimento da pentose dos nucleosídeos exógenos, e de nitrogênio a partir do grupo amino dos compostos com citosina e, (iii) a reutilização de bases livres e nucleosídeos produzidos intracelularmente pelo catabolismo dos nucleotídeos (60).

Diversas enzimas da via de salvamento de pirimidinas (**Fig. 1**) foram identificadas no *M. tuberculosis* H37Rv a partir da homologia de seqüências no genoma da micobactéria (61) e estão representadas na Figura 1. São elas: dCTP deaminase (gene *dcd*) – que catalisa a conversão de 2'-desoxicitidina 5'-trifosfato (dCTP) a 2'-desoxiuridina 5'-trifosfato (dUTP); desoxiuridina trifosfatase (dUTPase) (gene *dut*) – converte dUTP a 2'-desoxiuridina 5'-monofosfato (dUMP); timidilato sintase (gene *thyA*) – converte dUMP a 2'-desoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP); dTMP kinase (gene *tmk*) – catalisa a conversão de dTMP a 2'-desoxitimidina 5'-difosfato (dTDP) seguida pela nucleosídeo difosfato quinase (NDP-quinase ou NDK) (gene *ndkA*), que converte dTDP a dTTP; citidina deaminase (CDA) (gene *cdd*) – converte citidina ou desoxicitidina a uridina ou desoxiuridina, respectivamente; pirimidina nucleosídeo fosforilase (PyNP) (gene *deoA*) – recicla o nucleosídeo timidina ou uridina a desoxiribose-1-fosfato e timina ou uracil; a enzima uracil fosforribosil transferase (UPRT) (gene *upp*) – catalisa a conversão de uracil e 5-fosforribosil- α -1-pirofosfato (PRPP) a uridina 5'-monofosfato (UMP) e pirofosfato (PPi); citidina 5'-monofosfato quinase (gene *cmk*) e uridina 5'-monofosfato quinase (*Mt*UMPCK) (gene *pyrH*), que catalisam a conversão reversível do grupamento γ -fosforil do nucleosídeo trifosfato para citidina 5'-monofosfato (CMP) e UMP, respectivamente, para gerar citidina 5'-difosfato (CDP) e uridina 5'-difosfato (UDP), respectivamente (55).

Figura 1. Visão geral da via de salvamento de pirimidinas em *M. tuberculosis* H37Rv



Fonte: Villela et al., 2011 (55).

As enzimas envolvidas na via de salvamento de pirimidinas são consideradas alvos atrativos para o desenho racional de compostos contra a TB, uma vez que podem desempenhar um papel importante no estado de latência do bacilo causador da doença, pois é provável que o microrganismo tenha que reciclar bases e/ou nucleosídeos para sobreviver no ambiente hostil oferecido pelos macrófagos do hospedeiro (55).

Além disso, uma estratégia para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças infecciosas, como a TB, é estudar a bioquímica básica do organismo causador da doença a fim de determinar quais as diferenças presentes entre o agente infeccioso e as células humanas. Tais conhecimentos podem ser explorados para o desenvolvimento de agentes terapêuticos que interagem especificamente com a enzima do microrganismo o que, por sua vez, resultaria em toxicidade seletiva (62).

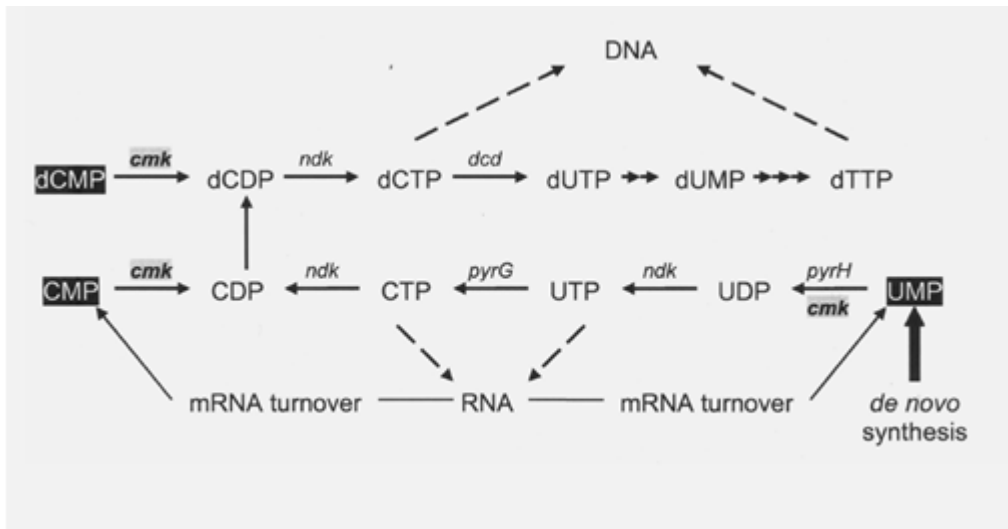
A seletividade de vários agentes antivirais é baseada em diferenças existentes nas enzimas envolvidas no metabolismo das purinas e das pirimidinas e de rotas relacionadas (63). Para melhor exemplificar agentes terapêuticos que podem ser desenvolvidos baseados na diferença entre as enzimas (patogênica e humana), tomemos como exemplo o fármaco aciclovir, que atua contra o vírus do herpes simples e da varicela-zoster. Mesmo que as células humanas expressem várias nucleotídeo quinases e DNAs polimerases, a atividade antiviral do aciclovir é sobretudo devida a sua fosforilação seletivamente realizada pela timidina quinase do vírus. Por conseguinte, as células do hospedeiro convertem a forma monofosfada em trifosfato de aciclovir, que inibe a DNA polimerase viral (64). Outro exemplo é a zidovudina (AZT), inibidor da transcriptase reversa do HIV (para a qual apresenta uma afinidade 100 vezes superior à apresentada as DNA polimerase das células hospedeiras) (63). Portanto, o diferente reconhecimento de substratos entre enzimas homólogas podem representar um ponto de partida para o desenvolvimento de drogas anti-TB.

Adicionalmente, inibidores seletivos que não necessitam de etapas de ativação – como, por exemplo, para a enzima desoxitimidina 5'-monofosfato quinase de *M. tuberculosis* – têm sido com sucesso desenhados com base no conhecimento das diferenças estruturais sutis entre as enzimas similares (65).

1.5.1 Citidina monofosfato quinases

As nucleosídeo monofosfato quinases (NMP-quinases) são enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos (66, 67). Elas atuam especificamente nos nucleosídeos monofosfatados (NMP) formados a partir das vias *de novo* ou de salvamento de nucleotídeos de purina ou pirimidina, catalisando a transferência reversível de um grupo γ -fosforil, a partir de um nucleosídeo trifosfatado, geralmente da adenosina 5'-trifostato (ATP) para um NMP (67, 68).

Figura 2. Esquema geral da via reversível de nucleotídeos pirimidínicos em *E. coli*



Fonte: Fricke et al., 1995 (69).

A enzima citidina 5'-monofosfato quinase de *Escherichia coli* (CMP-quinase ou, CMK), pertencente a terceira família das NMP-quinases, é um exemplo típico das CMKs bacterianas (67). Ela faz parte da via reversível de síntese de nucleotídeos pirimidínicos (Figura 2) e realiza a reutilização do CMP e 2'-desoxi-citidina 5'-monofosfato (dCMP) (69). Esta enzima é responsável por formar CDP ou 2'-desoxi-citidina 5'-difosfato (dCDP) (66) os quais são posteriormente fosforilados para produzir CTP e dCTP (69), precursores de moléculas biológicas importantes como o RNA, o DNA e para a síntese de fosfolipídios (66).

As enzimas CMKs bacterianas são consideradas alvos potenciais para o desenvolvimento de drogas, devido a divergências na estrutura primária e na especificidade pelo substrato, quando comparadas à UMP/CMP-quinase humana (66). Três principais diferenças são observadas nas NMP-quinases envolvidas na fosforilação de nucleosídeos pirimidínicos monofosfatados. Em primeiro lugar, em eucariotos, uma única enzima fosforila com similar eficiência UMP e CMP, enquanto que as CMKs bacterianas fosforilam UMP com uma velocidade muito baixa, sendo este papel atribuído a uma distinta CMP/UMP-quinase. Em segundo lugar, a CMK de *E. coli* fosforila dCMP com uma eficiência próxima a que faz com o CMP. Pelo contrário, as UMP/CMP-quinases eucarióticas, fosforilam os correspondentes desoxinucleotídeos com uma eficiência muito baixa. Em terceiro lugar, as diferenças das características cinéticas, observadas entre as UMP/CMP-quinases eucarióticas e as CMKs bacterianas, podem ser atribuídas às diferenças nas

suas sequências de aminoácidos (66). Além disso, a CMK foi reportada como essencial para a viabilidade do *Streptococcus pneumonia* (70) e *Bacillus subtilis* (71).

1.5.1.1 A enzima citidina 5'-monofosfato quinase de *M. tuberculosis* como possível alvo para o desenvolvimento de compostos inibidores

O nosso grupo de pesquisa publicou, em 2009, que o gene *cmk* (Rv1712) em MTB (H37Rv) codifica uma funcional enzima, nomeada citidina 5'-monofosfato quinase de *M. tuberculosis* (*MtCMK*) (EC 2.7.4.14) (72). Neste trabalho, foi reportada a expressão heteróloga da proteína recombinante, purificação, sequenciamento da região N-terminal da proteína, análises de espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS), análise por cromatografia de exclusão por tamanho e estudos de cinética enzimática em estado estacionário. De modo geral, estes estudos serviram como ponto de partida para o trabalho desta tese.

Assim como outros membros pertencentes à terceira família das NMP-quinases (66, 67), a enzima *MtCMK* catalisa a transferência de um grupo γ -fosforil do ATP, para os substratos CMP, dCMP ou para o UMP (72). Entretanto, a *MtCMK* preferencialmente fosforila CMP e dCMP (72). Adicionalmente, foi reportado que a proteína *MtCMK* recombinante é um monômero em solução e apresenta uma massa de 23,930.56 Da (72). A especificidade da *MtCMK* não é surpreendente, uma vez que foi demonstrado que o locus RV2883c (*pyrH*) em *M. tuberculosis* H37Rv codifica para uma uridina 5'-monofosfato quinase (*MtUMPK*) funcional, com preferência para o substrato UMP (73).

Estudos de mutagênese utilizando-se *transposons*, sugerem que o gene *cmk* é essencial para o crescimento *in vitro* do *M. tuberculosis* H37Rv (74). Além disso, resultados obtidos por meio de caracterização fenotípica global de alta resolução, permitiram aos autores propor a essencialidade do gene *cmk* para o crescimento *in vitro* do bacilo em meio contendo glicerol e colesterol (fontes de carbono críticas durante a infecção) (75). Ainda que, a CMK de *E. coli* (uma bactéria gram negativa) não é essencial para este organismo, o mutante nulo para o gene *cmk* apresentou uma significativa deficiência no crescimento, diminuição na velocidade de replicação e sensibilidade ao frio (69).

Estudos demonstram que, para as bactérias gram-negativas *E. coli* (69) e *S. typhimurium* (76), a função fisiológica fundamental da CMK é realizar a fosforilação do CMP produzido

durante a reciclagem dos ácidos nucleicos para produzir as moléculas di- e tri-fosfatadas e, que a inativação do gene *cmk* resulta em aumento dos níveis intracelulares de CMP e na excreção de uracila e citidina (69, 76), visto que, na ausência da enzima CMK, o CMP pode acumular como subproduto da síntese de fosfolipídios ou oriundo da clivagem hidrolítica do RNAm (69). Assim, o papel fisiológico da enzima *MtCMK* é de reciclar CMP à CDP (72), o qual é rapidamente fosforilado à CTP pela NDP-quinase inespecífica, ou reduzido à dCDP (77). Em bactérias, o CDP, assim como a adenosina 5'-difostato (ADP), o UDP e a guanosina 5'-difostato (GDP), podem também resultar da clivagem fosforolítica do RNAm pela polinucleotídeo fosforilase (78, 79).

Embora até o momento não haja nenhuma estrutura cristalográfica disponível para a proteína *MtCMK*, já foi publicado o primeiro modelo tridimensional da *MtCMK* na forma apo e complexada com CMP (80). Na estrutura tridimensional das CMKs, são encontrados os três domínios clássicos das NMP-quinases (80, 81): o domínio CORE (composto por cinco folhas beta paralelas centrais, rodeadas por alfa hélices); um domínio LID que, como uma tampa, fecha o sítio ativo durante a ligação do ATP; e o domínio de ligação NMP, que fecha o sítio ativo sob a ligação do acceptor de fosfato (66).

De modo clássico, as NMP-quinases são divididas em duas famílias, as pequenas e as longas NMP-quinases, de acordo com a forma curta ou longa do domínio LID (66). A adenilato quinase é um exemplo de NMP-quinase longa, com uma inserção de 27 resíduos no domínio LID. Em contraste, as UMP/CMP-quinases eucarióticas têm um pequeno domínio LID (66).

As proteínas CMKs bacterianas possuem características distintas das citadas anteriormente, contendo um curto domínio LID, e uma inserção de 40 resíduos de aminoácidos no domínio NMP, sendo classificadas em uma terceira família das NMP-quinases (67).

A estrutura global da proteína *MtCMK* é similar a outras NMP-quinases cuja estrutura tridimensional foi resolvida. O domínio LID na *MtCMK* corresponde ao segmento Arg160-Asp174, enquanto o domínio NMP corresponde ao segmento Gly38-Glu123 e é formado por duas folhas beta e cinco hélices alfa (80). Na *MtCMK* é encontrado o P-loop, que é uma sequência *fingerprint* Gly13-X-X-Gly16-X-Gly18-Lys19, onde X representa qualquer aminoácido que caracteriza as proteínas que se ligam, por exemplo, ao ATP e faz parte do motivo de ligação de nucleotídeos (80).

Na estrutura da tridimensional da *Mt*CMK, determinada por modelagem molecular na ausência do CMP (80), o domínio LID na apoenzima aparece numa conformação aberta, entretanto, assume uma conformação mais fechada na presença do CMP, ao mesmo tempo foi demonstrado a ocorrência de grandes alterações na estrutura em regiões contendo alças e no domínio de ligação NMP.

A fim de identificar os resíduos na interface do complexo biomolecular que podem ser responsáveis por doar ou receber prótons, as principais interações entre os resíduos de aminoácidos da *Mt*CMK com o receptor do grupamento fosforil devem ser levadas em consideração.

Os resíduos da *Mt*CMK que estão envolvidos na interação com o CMP por meio de ligação de hidrogênio (nomeados: Arg111, Asp134, Arg133, Arg183, Asp187) (80) são altamente conservados entre as NMP-quinases (82). Caceres e colaboradores (80) demonstraram que estes contatos incluem interações (i) da Arg133 com o fosfato α do CMP, e também com a citosina; (ii) da Arg183 e do Asp187 com a pentose; (iii) e interações da Arg111, Arg190 e do Asp134 com a citosina.

Tais conhecimentos, agregados aos estudos desenvolvidos na presente tese, podem ser explorados para o desenvolvimento de compostos que interajam especificamente com a enzima do *M. tuberculosis*, resultando em toxicidade seletiva (62). Além disso, tem sido proposto que a seletividade de agentes inibidores, mesmo quando enzimas homólogas apresentam atividade catalítica semelhante, depende também de fatores como a diferença de especificidade destas enzimas pelos substratos (64). Tais diferenças podem, ocasionalmente, ser observadas na estrutura primária (55) e nas propriedades cinéticas das enzimas homólogas (64).

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, a vigilância do tratamento e a realização de pesquisas avançadas para o desenvolvimento de novas drogas, se tornaram prioridades na luta contra a TB. Embora o número de casos de TB tenha diminuído, o *M. tuberculosis* continua entre os principais agentes infecciosos envolvidos em desfechos fatais (83). A emergência de cepas de *M. tuberculosis* MDR, XDR e TDR, e sua rápida propagação em países populosos, nos quais grande parte da população vive em condições de pobreza, torna urgente o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da doença (1).

Vias de síntese de nucleotídeos, especialmente as vias de salvamento, são consideradas fontes de alvos moleculares para medicamentos antibacterianos (84), que possam ser futuramente utilizados no tratamento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes e durante a fase de latência (12, 55).

Medindo esforços para a pesquisa por novos alvos, o nosso grupo de pesquisa estuda as enzimas da biossíntese de purinas e pirimidinas, a fim de determinar a sua relevância no metabolismo do *M. tuberculosis*. Novas abordagens para o desenvolvimento de compostos contra doenças complexas, especialmente doenças endêmicas negligenciadas, são baseadas no uso de alvos moleculares definidos (12). Tais abordagens facilitam a pesquisa e identificação de compostos líderes, com mecanismos moleculares definidos contra um alvo específico. Além disso, permitem a análise de um número maior de compostos com melhor custo benefício. Muito ainda há que ser explorado neste contexto, uma vez que o repertório de agentes antimicobacterianos disponível compreende apenas alguns alvos validados como a RNA polimerase, DNA girase, enoil-ACP redutase e ATP sintase (85).

Considerando que muitas vias anabólicas e catabólicas podem ser diferencialmente reguladas em resposta às condições extremas do interior dos macrófagos, uma melhor compreensão das vias essenciais utilizadas pelo bacilo para a sobrevivência durante a infecção é crucial para uma abordagem racional no desenvolvimento de novas drogas contra o *M. tuberculosis*.

Deste modo, a caracterização bioquímica detalhada da *Mt*CMK é de grande relevância para o entendimento do seu papel na biologia do bacilo causador da TB. Estudos cinéticos e de calorimetria de titulação isotérmica, visando o entendimento do mecanismo de ação da enzima

em questão, podem prover uma base sólida para posteriores estudos de inibição. Além disso, estes estudos representam um passo inicial na pesquisa por inibidores com alvo molecular definido.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL E JUSTIFICATIVA

Este trabalho teve como objetivo a caracterização bioquímica e biofísica da enzima citidina 5'-monofosfato quinase (EC 2.7.4.14) de *M. tuberculosis* H37Rv.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produção e ensaio de atividade da enzima recombinante *Mt*CMK;
2. Determinação das constantes cinéticas verdadeiras em estado estacionário da reação catalisada pela enzima *Mt*CMK com o AraCMP;
3. Determinação do mecanismo cinético através da técnica de ITC e das constantes de afinidade de ligação da enzima aos substratos;
4. Determinação, através da técnica de ITC, do número de prótons envolvidos na interação entre a *Mt*CMK e o substrato receptor do grupamento fosforil;
5. Determinação dos parâmetros termodinâmicos envolvidos na formação do complexo binário entre a *Mt*CMK e o substrato receptor do grupamento fosforil, em função da variação da temperatura;

CAPÍTULO II

Manuscrito intitulado “Kinetic mechanism and energetics of binding of phosphoryl group acceptors to *Mycobacterium tuberculosis* Cytidine Monophosphate Kinase” aceito para a publicação no periódico *Archives of Biochemistry and Biophysics*

**Kinetic mechanism and energetics of binding of phosphoryl group acceptors to
Mycobacterium tuberculosis Cytidine Monophosphate Kinase**

Léia Jaskulski^{1,2,5}, Leonardo A. Rosado^{1,3,5}, Diana C. Rostirolla^{1,2}, Luis F. S. M. Timmers^{3,4}, Osmar N. de Souza^{3,4}, Diogenes S. Santos^{1,2,*}, Luiz A. Basso^{1,2,*}

¹Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil.

⁴ Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas (LABIO), Faculdade de Informática, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵ These authors contributed equally to this work.

Running title: Kinetics and thermodynamics of *M. tuberculosis* CMK

*Corresponding authors: Luiz A. Basso or Diogenes 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@pucrs.br or
diogenes@pucrs.br

E-mail addresses of co-authors:

Léia Jaskulski: lejask@hotmail.com

Diana C. Rostirolla: diana_rostirolla@yahoo.com.br

Leonardo A. Rosado: leo.rosado@gmail.com

Luis F. S. M. Timmers: luisfernandosaraiva@gmail.com

Osmar N. de Souza: osmar.norberto@pucrs.br

Abstract

Cytidine monophosphate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* (*MtCMK*) likely plays a role in supplying precursors for nucleic acid synthesis. *MtCMK* catalyzes the ATP-dependent phosphoryl group transfer preferentially to CMP and dCMP. Initial velocity studies and Isothermal titration calorimetry (ITC) measurements showed that *MtCMK* follows a random-order mechanism of substrate (CMP and ATP) binding, and an ordered mechanism for product release, in which ADP is released first followed by CDP. The thermodynamic signatures of CMP and CDP binding to *MtCMK* showed favorable enthalpy and unfavorable entropy, and ATP binding was characterized by favorable changes in enthalpy and entropy. The contribution of linked protonation events to the energetics of *MtCMK*:phosphoryl group acceptor binary complex formation suggested a net gain of protons. Values for the pK_a of a likely chemical group involved in proton exchange and for the intrinsic binding enthalpy were calculated. The Asp187 side chain of *MtCMK* is suggested as the likely candidate for the protonation event. Data on thermodynamics of binary complex formation were collected to evaluate the contribution of 2'-OH group to intermolecular interactions. The data are discussed in light of functional and structural comparisons between CMP/dCMP kinases and UMP/CMP ones.

Keywords: cytidine monophosphate kinase; *Mycobacterium tuberculosis*; enzyme mechanism; isothermal titration calorimetry; proton linkage; intrinsic binding enthalpy.

1. Introduction¹

Human tuberculosis (TB), caused mainly by *Mycobacterium tuberculosis*, remains one of the most critical problems for global health control, reaching over 1.4 million deaths in 2010 [1-3]. TB “short-course” therapy consists of 2 months of treatment with rifampicin, isoniazid, ethambutol and pyrazinamide, followed by 4 months of treatment with isoniazid and rifampicin [3]. However, noncompliance with TB treatment gives rise to appearance of drug-resistant strains of *M. tuberculosis* [4,5,6], which underlines the need for alternative therapeutic chemical entities to both shorten the duration of therapy and combat the problem of clinical drug resistance. As the *cmk*-gene product has been predicted to be required for optimal *in vitro* growth of *M. tuberculosis* H37Rv strain by Himar1-based transposon mutagenesis [7]. More recently, high-resolution global phenotypic profiling results have prompted the proposal that the *cmk*-gene product is essential for *in vitro* growth in glycerol and cholesterol (a critical carbon source during infection) media [8]. Accordingly, efforts to understand the mode of action of the *cmk*-gene product appear to be worth pursuing to provide a basis for function-based design of inhibitors with potential anti-tubercular activity.

¹ *Abbreviations used:* ADP, adenosine 5'-diphosphate; AraCMP, cytosine-β-D-arabinofuranoside 5'-monophosphate; ATP, adenosine 5'-triphosphate; CDP, cytidine 5'-diphosphate; CHES, Cyclohexylaminoethanesulfonic acid; CMP, cytidine 5'-monophosphate; CMK, cytidine 5'-monophosphate kinase; dCMP, 2'-deoxy-cytidine 5'-monophosphate; ddCMP, 2'-3'-dideoxy-cytidine 5'-monophosphate; ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry; HEPES, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid; HEPPS, *N*-2Hydroxyethylpiperazine-*N'*-3-propane-sulfonic acid; ITC; Isothermal Titration Calorimetry; LDH; lactate dehydrogenase; MES; 2-(*N*-Morpholino)ethanesulfonic acid; MOPS; 3-(*N*-Morpholino)propanesulfonic acid; MtCMK, cytidine monophosphate kinase from *Mycobacterium tuberculosis*; NADH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide; NMP, nucleoside monophosphate; NMP kinases, nucleoside monophosphate kinases; PEP, phosphoenolpyruvate; PK, pyruvate kinase; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; TB, tuberculosis; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; UMP, uridine 5'-monophosphate; UMPK, uridine 5'-monophosphate kinase

Nucleoside monophosphate (NMP) kinases play pivotal roles in both *de novo* synthesis and salvage pathway of DNA and RNA precursors [9, 10]. Bacterial cytidine 5'-monophosphate (CMP) kinase (CMK), which is part of pyrimidine nucleotide interconversion pathways, catalyzes the γ -phosphoryl group transfer from, usually, adenosine-5'-triphosphate (ATP) to either CMP or 2'-deoxy-CMP (dCMP). We have previously reported that *cmk* gene in *M. tuberculosis* encodes a protein with CMK activity (*MtCMK*), which catalyzes the phosphoryl transfer from ATP to dCMP, CMP or uridine 5'-monophosphate (UMP) to form the corresponding nucleoside diphosphates [11]. However, *MtCMK* preferentially phosphorylates dCMP and CMP, whereas UMP is a poor substrate [11] (**Fig. 1**). The specificity of *MtCMK* for dCMP and CMP is not surprising since it has recently been shown that the Rv2883c locus (*pyrH*) in *M. tuberculosis* codes for a functional uridine 5'-monophosphate kinase (*MtUMP*K) [12].

Bacterial CMP kinases are regarded as potential drug targets due to the primary structure divergence and substrate affinity when compared with the human orthologue UMP/CMP kinase [13]. In addition, CMK enzymes have been reported to be essential for different organisms: *Streptococcus pneumonia* [14], *Bacillus subtilis* [15], *Salmonella typhimurium* [16] and, probably, *M. tuberculosis* [7, 8] due to its proposed role in recycling nucleotides derived from RNA degradation in the latter [11].

NMP kinases undergo large conformational changes upon binding of substrates [17]. NMP kinases have an overall well-conserved fold with three domains [18]: the relatively rigid CORE domain (containing a five-stranded parallel β -sheet), the LID domain that closes the active site upon ATP binding, and the NMP binding domain, which closes the active site upon binding of the phosphate acceptor. NMP kinases are

divided into short and long forms. The latter group consists of adenylate kinases with an insertion of approximately 27 amino acid residues in the LID domain [13]. Bacterial CMKs, including *Mt*CMK, belongs to a third family of NMP kinases as they possess distinct features: a short LID domain, and an insertion of 40 amino acid residues in the NMP-binding domain [18].

In the present work, isothermal titration calorimetry (ITC) studies were performed to determine the order, if any, of addition of substrates (CMP and ATP) to and release of products (CDP and ADP) from *Mt*CMK. Initial velocity studies were also carried out to evaluate the specificity of *Mt*CMK for phosphate acceptor using cytosine- β -D-arabinofuranoside 5'-monophosphate (AraCMP) and 2'-3'-dideoxy-cytidine 5'-monophosphate (ddCMP) as substrates. The number of protons released/taken up upon binary complex formation between *Mt*CMK and either CMP, dCMP or AraCMP were evaluated using buffers with different enthalpies of ionization. An estimate for the pK_a of a likely chemical group involved in proton exchange upon binary complex formation was obtained from pH-dependence of the binding energetics. A linkage between binary complex formation and protonation was observed and a value for the intrinsic enthalpy of binding was determined. Data on thermodynamics of CMP, dCMP and AraCMP binding to *Mt*CMK were collected to evaluate the contribution of 2'-OH group to binary complex formation. The data here presented provide a thermodynamic evaluation of the role of ionizable groups involved in *Mt*CMK: CMP, *Mt*CMK:dCMP and *Mt*CMK:AraCMP complex formation.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Chemicals were of analytical or reagent grade and used without further purification. ATP, CMP, cytidine 5'-diphosphate (CDP) and dCMP were purchased from Sigma-Aldrich. AraCMP was obtained from Santa Cruz Biotechnology® and ddCMP from Synfine Research. All purification steps were carried out using an ÄKTA system (GE Healthcare) at 4 °C and sample elution was monitored by UV detection. Protein fractions were analyzed by SDS-PAGE 12% [19]. The steady-state activity assays were performed using a UV-2550 UV/Visible spectrophotometer (Shimadzu) in 1 cm pathlength cuvettes and assay mixtures of 500 µL final volume. ITC experiments were carried out using an iTC200 Microcalorimeter (MicroCal, Inc., GE Healthcare).

2.2 Protein preparation

Electrocompetent BL21(DE3) *E. coli* cells were transformed with pET-23a(+):*cmk* recombinant plasmid, and cell growth and purification steps of *MtCMK* were as described elsewhere [11]. The pooled fractions were dialyzed against 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM KCl and 5 mM MgCl₂, concentrated using an AMICON (Millipore Corporation, Bedford, MA) ultrafiltration membrane (MWCO = 10 kDa), and stored at -80 °C. Total protein concentration was determined by the method of Bradford [20], using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories) and bovine serum albumin as

standard. As described elsewhere [11], a typical yield of 5 mg of homogeneous recombinant *Mt*CMK per liter of cell culture could be obtained.

2.3 Enzyme activity assays and determination of steady-state kinetic parameters

Enzyme activity was routinely measured using CMP and ATP as substrates and the reaction was started by the addition of recombinant *Mt*CMK. All enzyme activity measurements were carried out at 25 °C. The ADP product formation was coupled to chemical reactions catalyzed by pyruvate kinase (PK; EC 2.7.1.40) and lactate dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27), and the decrease in absorbance at 340 nm ($\epsilon_{\beta\text{-NADH}} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) due to NADH oxidation was monitored as described elsewhere [11, 21, 22]. The enzyme assay mixture contained 40 mM HEPES pH 7.6, 40 mM KCl and 5 mM MgCl_2 , 1.5 mM PEP, 0.2 mM NADH, 6 U mL^{-1} PK, and 5 U mL^{-1} LDH. Initial steady-state rates were calculated from the linear portion of the reaction curve under experimental conditions in which less than 5 % of substrate was consumed.

To evaluate further the specificity for phosphate acceptor, CMP was replaced with either AraCMP or ddCMP (nucleoside monophosphate analogs), at varying concentrations, utilizing the coupled standard assay. Initially, increasing amounts of *Mt*CMK were added to the reaction mixture, and measurements of enzymatic reaction with the nucleotide analogue AraCMP (1 mM) and the substrate ATP (1 mM) were carried out to determine the range in which the enzyme activity is linearly dependent on recombinant enzyme concentration. The true steady-state kinetic parameters and initial velocity patterns for AraCMP were evaluated by measuring the enzyme activity in the

presence of several concentrations of AraCMP (30-800 μM) against fixed-varying concentrations of ATP (150, 350, 800, 1200 and 2000 μM). The apparent steady-state kinetic parameters were determined for ddCMP at fixed concentration of ATP (2 mM) and varying concentrations of the phosphate acceptor (0.1-50 mM). Data analysis was performed using SigmaPlot 2000 (SPSS, Inc.) software. One unit of *Mt*CMK activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μmol of ADP product per minute. All the measurements were corrected for non-catalyzed chemical reactions in the absence of *Mt*CMK.

2.4 Isothermal titration calorimetry (ITC)

A typical ITC experiment consisted of injections of ligand into protein, with both solutions in the same buffer. The reference cell (200 μL) was loaded with Milli Q water and the sample cell (200 μL) was filled with *Mt*CMK. A total of either 18 or 25 injections, each of 2.2 μL or 1.62 μL volume injections, respectively, were carried out with 5 s duration, at 180 s intervals. An initial pre-injection of 0.5 μL was made and the result from this injection was not used for data analysis. The amount of power required to maintain the reaction cell at constant temperature after each injection was monitored as a function of time. To correct for the heat effects not directly related to the binding reaction (heat of dilution and mixing), control experiments were performed by making identical injections of the titrant solution into buffer. The control titrations were subtracted from the experimental titrations prior to data analysis. The stirring speed was 500 rpm at a constant pressure and the enzyme was prepared for ITC experiments by dialysis against the desired buffer at 4 $^{\circ}\text{C}$.

To determine the order of addition of substrates and release of products, equilibrium binding values for binary complex formation were measured by ITC, determining the heat transferred upon ligand binding to *Mt*CMK in 50 mM Hepes pH 7.5, 50 mM KCl and 5 mM MgCl₂ at 25 °C. The sample cell contained *Mt*CMK at 115-140 μM concentration range and the injection syringe contained substrates or products at the following concentrations: 4 mM CMP, 2.5 mM ATP, 4 mM CDP, and 2.5 mM ADP.

To assess whether there is any proton exchange between buffer and *Mt*CMK:ligand binary complex formation (proton linkage), binding experiments were carried out at various pH values at 25 °C (298.15 K) in buffers with different enthalpies of ionization (ΔH_{ion}). Buffers and their ionization enthalpies at 25 °C were as follows: Carbonate (2.1 kcal mol⁻¹), MES (3.58 kcal mol⁻¹), Hepes (4.94 kcal mol⁻¹), MOPS (5.0 kcal mol⁻¹), HEPPS (5.06 kcal mol⁻¹), Bis-Tris (6.75 kcal mol⁻¹), Imidazol (8.7 kcal mol⁻¹), Ches (9.45 kcal mol⁻¹), Tris (10.32 kcal mol⁻¹) and Glycine (10.45 kcal mol⁻¹) [23]. All buffers were at 40 mM concentration, and contained 40 mM KCl and 5 mM MgCl₂. Calorimetric data on binary complex formation as a function of enthalpy of ionization of buffer were collected with 140 μM *Mt*CMK in the sample cell, and syringe concentrations were 4 mM for CMP, 3 mM for dCMP, and 2 mM for AraCMP. Control titrations were performed to subtract the heats of dilution and mixing for each experiment.

2.5 Sequence alignment

Amino acid sequence alignment was performed using the MEGA software version 4 [24] to identify the residues that are likely to play a role in nucleotide substrate binding.

The amino acid sequence of CMK from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (NP_216228.1) was aligned to the amino acid sequences of “short” human form UMP/CMP kinase (SP_P30085) and to *Escherichia coli* CMK (EcCMK) (GB_ABJ00327.1), whose three-dimensional structures have been solved [13, 18, 25, 26].

2.6 Molecular modeling

The homology modeling approach, implemented in the MODELLER [27] 9v10 program, was used to build the models for *Mt*CMK associated with CMP, dCMP and AraCMP, and *E.coli* CMK was employed as template (PDB ID: 1KDO, 1KDR and 1KDP). The protocol used in the modeling experiments generated 10 models for each *Mt*CMK:ligand complex. All models were submitted to the DOPE [28] energy scoring function that is implemented in the MODELLER 9v10 aiming to select the best structures. The MOLPROBITY webserver [29] and PROCHECK [30] were employed to verify and validate the stereochemical quality of the models. Intermolecular hydrogen bonds were calculated and displayed with the program LIGPLOT [31].

2.7 Data analysis

The kinetic and binding parameters, as well as their standard errors were obtained from data fitting to appropriate equations by using the nonlinear regression function of SigmaPlot 2000 (SPSS, Inc.). Initial rate data at a single concentration of the fixed substrate were fitted to the Michaelis-Menten equation (**Eq. 1**) [32], in which v is

the initial velocity, V is the apparent maximum initial velocity, A is the varying substrate concentration and K represents the apparent Michaelis-Menten constant.

$$v = \frac{VA}{K + A} \quad \text{Eq. 1}$$

The family of lines intersecting to the left of the y -axis in double-reciprocal plots was fitted to **Eq. 2**, which describes a mechanism involving ternary complex formation and a sequential substrate binding [32].

$$v = \frac{V_{\max} AB}{K_{ia}K_b + K_aB + K_bA + AB} \quad \text{Eq. 2}$$

For **Eq. 2**, v is the initial velocity (as for Eq. 1), V_{\max} is the true maximum initial velocity, A and B are the concentrations of the substrates, K_a and K_b are their respective Michaelis-Menten constants, and K_{ia} is the dissociation constant for enzyme-substrate A binary complex formation.

The equilibrium binding constants (K_{eq}), the observed enthalpy change (ΔH^0_{obs}), and stoichiometry (N) of the formation of the complex were determined by fitting the binding isotherms to the standard Marquardt non-linear regression method provided in the Origin 7 SR4 software (Microcal, Inc.). The overall binding isotherms were best fitted to a model of one set of sites. To obtain the magnitudes of Gibbs free energy (ΔG^0) and the entropy changes (ΔS^0), the ITC data were fitted to the thermodynamic relationship

described in **Eq. 3** [33], in which R is the gas constant (1.98 cal K⁻¹ mol⁻¹ or 8.314 J K⁻¹ mol⁻¹) and T is the temperature in Kelvin (T = °C + 273.15).

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq} = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad \text{Eq. 3}$$

The number of protonation events occurring upon complex formation was determined by plotting the observed enthalpy values (ΔH^0_{obs}) from titration experiments at constant pH in multiple buffers against the enthalpy of ionization of each buffer (ΔH_{ion}), and fitting the data to **Eq. 4**. The slope of this linear function is equal to the number of protons released ($\Delta n_{H^+} > 0$) or taken up ($\Delta n_{H^+} < 0$) by the buffer on protein:ligand binary complex formation, and the y-intercept gives the enthalpy (ΔH^0_{bind}) of binding that would be measured in a buffer with ΔH_{ion} equal to zero [34].

$$\Delta H^0_{obs} = \Delta H^0_{bind} + \Delta n_{H^+} \Delta H_{ion} \quad \text{Eq. 4}$$

The value of binding enthalpy measured in a buffer with enthalpy of ionization equal to zero (ΔH^0_{bind}) contains contributions from protonation, and thereby does not correspond to the intrinsic binding enthalpy (ΔH^0_{int}). An estimate for the value of ΔH^0_{int} can be derived from fitting the data to **Eq. 5** [34, 35]:

$$\Delta H^0_{bind} = \Delta H^0_{int} + \Delta n_{H^+} \Delta H^f_p + H^c \delta \Delta H_p \quad \text{Eq. 5}$$

The terms of the above equation are as follows: ΔH_p^f is the enthalpy of protonation of free protein, H^c corresponds to the fractional saturation of protons in the protein in complex with ligand (given by **Eq. 6**), and $\delta\Delta H_p$ represents the change in enthalpy of protonation of free protein that occurs upon binding of the ligand. For **Eq. 6**, K_p^c represents the proton affinity constant for the liganded form of enzyme.

$$H^c = \frac{K_p^c(10^{-pH})}{1 + K_p^c(10^{-pH})} \quad \text{Eq. 6}$$

The pK_a for the amino acid side chain involved in proton linkage (proton exchange) upon binary complex formation can thus be estimated from determination of Δn_{H^+} values at different pHs [34, 35]. The observed ligand binding constant (K_{obs}) at any proton activity ($a_{H^+} = 10^{-pH}$) is given by **Eq. 7**, in which K_{int} represents the intrinsic ligand binding constant (the binding constant for the unprotonated protein), $10^{pK_p^c}$ represents K_p^c (proton affinity constant for the liganded form of enzyme), and $10^{pK_p^f}$ represents the proton affinity constant for the free form of enzyme (K_p^f) [34].

$$K_{obs} = K_{int} \left(\frac{1 + 10^{(pK_p^c - pH)}}{1 + 10^{(pK_p^f - pH)}} \right) \quad \text{Eq. 7}$$

Eq. 8 (obtained by combining **Eq. 4** and **Eq. 5**) gives a three-dimensional surface relating ΔH_{obs}^0 to pH and ΔH_{ion} [34].

$$\Delta H_{obs}^0 = \Delta H_{int}^0 + \Delta n_{H^+} \Delta H_p^f + H^c \delta \Delta H_p + \Delta n_{H^+} \Delta H_{ion} \quad \text{Eq. 8}$$

3. Results and discussion

3.1 Substrate specificity parameters

Although it has been shown that *Mt*CMK preferentially phosphorylates dCMP and CMP [11], further studies to evaluate the enzyme specificity appeared to be warranted to assess the role, if any, of 3'-OH (ddCMP) and stereochemistry of 2'-OH groups of the pentose. Accordingly, to evaluate whether or not a D-arabinose-containing phosphoryl group acceptor could act as a substrate for *Mt*CMK enzyme, steady-state kinetic measurements were carried out with AraCMP as substrate. However, before embarking on determination steady-state kinetic parameters, experimental conditions for initial velocity measurements should be established. The activity of *Mt*CMK in the presence of AraCMP and ATP substrates was linearly dependent (linear correlation coefficient = 0.997543; $p < 0.0001$) on protein concentration in the reaction mixture (data not shown), thereby showing that true initial velocities are being measured in this protein concentration range. Accordingly, steady-state kinetics measurements were carried out in assay mixtures containing 50 nM of recombinant *Mt*CMK. All initial velocity measurements were carried out in duplicates. The double-reciprocal plots for the dependence of enzyme velocity on varying AraCMP concentrations at fixed-varied ATP concentrations, and varying ATP concentrations at fixed-varied AraCMP concentrations showed a pattern of intersecting lines to the left of the y-axis (**Fig. 2**). These data are

consistent with ternary complex formation and suggest a sequential mechanism. In addition, this pattern of lines rules out ping-pong (parallel lines), steady-state random (that gives non-linear reciprocal plots), and rapid-equilibrium ordered (one of the family of lines should cross at a single value on the y-axis) mechanisms. However, the double-reciprocal plots alone cannot distinguish between rapid-equilibrium random and steady-state compulsory ordered bi bi mechanisms. A sequential mechanism is used to denote systems in which all substrates must bind to the enzyme before any product is released. In the rapid-equilibrium random mechanism, any substrate can bind to free enzyme on route to ternary complex formation, and all steps that precede the rate-limiting catalytic step are at equilibrium. In a steady-state compulsory ordered mechanism, the ternary complex is formed following an ordered substrate addition, and the rate constants of the binding events are of the same order of magnitude as the rate constant for the chemical conversion of substrates into products. The double-reciprocal data were fitted to the equation for a sequential initial velocity pattern (**Eq. 2**), yielding the following values for the true steady-state kinetic parameters (linear correlation coefficient = 0.9885; $p < 0.0001$): $k_{\text{cat}} = 3.8 (\pm 0.1) \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{AraCMP}} = 106 (\pm 6) \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}}/K_{\text{AraCMP}} = 0.36 (\pm 0.02) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $K_{\text{ATP}} = 402 (\pm 25) \mu\text{M}$, and $k_{\text{cat}}/K_{\text{ATP}} = 9.5 (\pm 0.6) \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Interestingly, no enzyme activity could be detected with up to 50 mM of ddCMP as phosphoryl group acceptor in the presence of 2 mM ATP.

3.2 Enzyme mechanism assessed by equilibrium binding of substrates and products

We have previously reported that the double-reciprocal plots for the dependence of enzyme velocity on varying CMP concentrations at fixed-varied ATP concentrations,

and varying ATP concentrations at fixed-varied CMP concentrations showed a pattern of intersecting lines to the left of the y-axis [11]. However, as reported here for AraCMP, these data could not distinguish between rapid-equilibrium random and steady-state compulsory ordered bi bi mechanisms. Accordingly, equilibrium binding constants for binary complex formation between *Mt*CMK and either substrates (CMP and ATP) or products (CDP and ADP) were determined by ITC to determine the enzyme mechanism followed by *Mt*CMK. It is important to point out that CMP was here employed as a surrogate for the alternative phosphoryl group acceptors (dCMP, UMP, and AraCMP), as *Mt*CMK shows a slight preference to phosphorylate CMP [11]. The binding reactions were characterized by exothermic heat changes (top panels of **Fig. 3**) of binding of CMP (**Fig. 3A**), ATP (**Fig. 3B**), CDP (**Fig. 3C**) and ADP (**Fig. 3D**) to *Mt*CMK. The enthalpy of binding for each injection (calculated as the individual heat of binding upon integration and normalization of raw data, corrected for the heat of ligand dilution, and divided by the number of moles injected) are shown in the bottom panels of **Fig. 3**. The ITC data were best fitted to one binding site model, consistent with *Mt*CMK being a monomer in solution [11]. The ITC results suggest that CMP (**Fig. 3A**) and ATP (**Fig. 3B**) substrates can bind to free *Mt*CMK enzyme. The thermodynamic parameters (**Table 1**) for CMP were $K_d = 58 (\pm 6) \mu\text{M}$, $\Delta H^0_{\text{obs}} = -6.9 (\pm 0.6) \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta G^0_{\text{obs}} = -5.7 (\pm 0.6) \text{ kcal mol}^{-1}$, and $-T\Delta S^0_{\text{obs}} = +1.2 (\pm 0.1) \text{ kcal mol}^{-1}$. For ATP, the thermodynamic parameters (**Table 1**) were $K_d = 266 (\pm 16) \mu\text{M}$, $\Delta H^0_{\text{obs}} = -4.6 (\pm 0.1) \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta G^0_{\text{obs}} = -4.9 (\pm 0.3) \text{ kcal mol}^{-1}$, and $-T\Delta S^0_{\text{obs}} = -0.29 (\pm 0.02) \text{ kcal mol}^{-1}$. As the pattern of intersecting lines to the left of the y-axis suggested either rapid-equilibrium random mechanism or steady-state compulsory ordered mechanism, the ITC data provide support for the random

mechanism of substrate binding to *Mt*CMK (**Fig. 4**). Incidentally, it has been put forward that the mere demonstration that both substrates can bind to the free enzyme points towards a random-order mechanism [36]. The ITC titrations also suggest that the product CDP can bind to free enzyme (**Fig. 3C**), with the following thermodynamic parameters (**Table 1**): $K_d = 44 (\pm 7) \mu\text{M}$, $\Delta H_{\text{obs}}^0 = -12.8 (\pm 0.5) \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\Delta G_{\text{obs}}^0 = -5.8 (\pm 0.9) \text{ kcal mol}^{-1}$, and $-T\Delta S_{\text{obs}}^0 = +7 (\pm 1) \text{ kcal mol}^{-1}$. No titration of ADP binding to free *Mt*CMK enzyme could be observed by ITC (**Fig. 3D**), even though small heat signals corresponding to nonspecific heat effects were apparent. As there is a limit of 1 mM for measurable dissociation constant values by ITC titrations [33], it is possible that ADP binds to free enzyme with a dissociation constant larger than 1mM. Notwithstanding, these data suggest that *Mt*CMK follows an ordered product release mechanism, in which ADP is released first followed by CDP dissociation from *Mt*CMK:CDP binary complex to yield free enzyme (**Fig. 4**). It should, however, be pointed out that this order of substrate binding and product release is suggested on the basis of thermodynamic and not kinetic results. Interestingly, a sequential ordered mechanism for addition of substrates and release of products has been proposed for *E. coli* CMK enzyme [26]. As will be discussed in more detail in section 3.4, ITC measurements of dCMP binding to *Mt*CMK (**Table 2**) yielded dissociation constant values that were in the same range as for CMP at 25 °C (**Table 1**).

3.3 Thermodynamic signatures of substrate(s) and product(s) interactions.

The heat changes brought about by protein-ligand complex formation provide thermodynamic signatures of non-covalent interactions to each binding process. Observed enthalpies arise largely as a result of changes in interatomic interactions (e.g., hydrogen bonds and/or van der Waals interactions), in which the sign indicates whether there is a net favorable (negative ΔH) or unfavorable (positive ΔH) redistribution of the network of interactions between the reacting species (including solvent) [33]. Hydrophobic interactions are related to the relative degrees of disorder in the free and bound systems and thus these interactions are reflected in the entropy change. The release of “bound” water molecules from a surface to the bulk solvent is usually a source of favorable entropy (positive ΔS). A reduction in conformational states in either ligand or protein upon complex formation is entropically unfavorable (negative ΔS) [33].

CMP and CDP binding processes to free *Mt*CMK were characterized by favorable binding enthalpy, unfavorable entropic contribution, and similar dissociation constant values (**Table 1**). The unfavorable entropic contribution for CMP binding process is likely due to large motions of NMP domain that occurs on *Mt*CMK: CMP binary complex formation [37]. The larger unfavorable entropy for CDP may indicate protein conformational changes that restrict the protein to a particular conformer to facilitate product release from *Mt*CMK: CDP binary complex to yield free enzyme, which is compensated for by the larger enthalpic contribution probably due to an extra phosphoryl group of CDP as compared to CMP.

The ITC data for ATP binding to *Mt*CMK indicate that this process is accompanied by favorable enthalpy and entropy changes (**Table 1**). The slightly favorable entropic contribution is somewhat surprising as it has been reported that ATP binding induces conformational changes in the LID domain of CMKs [14, 17]. It is thus

tempting to suggest that the favorable overall entropic contribution is due to exclusion of water molecules from *Mt*CMK active site, which should minimize the more favorable intramolecular hydrolysis of ATP to bound ADP and phosphate in the enzyme active site as compared to hydrolysis in solution [38].

3.4 CMP, dCMP and AraCMP binding profiles at 25 °C

Comparisons of the binding energetics at 25 °C of both natural substrates suggest that the 2'-OH of the pentose plays a minor, if any, role in binary complex formation (**Table 2**), as there appears to be no obvious trend when comparing the values for the overall dissociation constants (K_d) in different buffers at the same pH value. The observed enthalpy change values (ΔH_{obs}^0) appear to be more favorable for CMP as compared to dCMP (**Table 2**). This could tentatively be attributed to interactions between the 2'-OH of CMP and *Mt*CMK, which would be absent in the *Mt*CMK:dCMP binary complex. On the other hand, there appears to be an enthalpy-entropy compensation as the entropic contribution to *Mt*CMK:dCMP binary complex formation is somewhat more favorable as compared to *Mt*CMK: CMP formation. It has been put forward that the Michaelis-Menten constants for each substrate (at infinite concentration of the other substrate) in a rapid-equilibrium random-order mechanism is equal to the dissociation constant for dissociation of the substrate from the ternary complex [36]. The similar values for the Michaelis-Menten constants for CMP (120 μ M) and dCMP (165 μ M) previously presented [11] are in agreement with the ITC data for *Mt*CMK:phosphoryl group acceptor binary complex formation here reported. However, this conclusion

should be taken with caution as it is known that the Michaelis-Menten constant represents an apparent dissociation constant of all enzyme-bound species [39] and it has contribution from the van Slyke-Cullen constant [40].

It has been shown that there were two molecules in the asymmetric unit of the crystal structure of *E. coli* CMK in complex with dCMP [13]. In one of the crystal structure of *E. coli* CMK in complex with dCMP the sugar puckering of the pentose was in C3'-*endo* as for the binary complex with CMP, whereas it was C2'-*endo* as for the binary complex with CDP [13]. The C3'-*endo* conformation preferred for bound CMP brings the 3'-OH closer to Arg181 and Asp185 in *E. coli* CMK [13], which allows a bidentate interaction of the carboxylate of Asp185 with both hydroxyls of the ribose. These authors have proposed that Asp185 of *E. coli* CMK (Asp187 in *Mt*CMK; **Fig. 6**) participates in catalysis (possibly through transition-state stabilization), which would involve the interaction of this residue with the 3'-OH favoring a C3'-*endo* conformation, allowing the 3'-OH to interact with Arg181, a residue that can stabilize the α -phosphate of acceptor substrate [13]. These authors have also proposed that the two alternative modes of binding of dCMP to *E. coli* CMK correspond to tight binding (C3'-*endo* as for *E. coli* CMK: CMP binary complex) and loose binding (C2'-*endo* as *E. coli* CMK: CDP binary complex [13]. The larger Michaelis-Menten constant value for dCMP as compared to CMP was invoked to support this hypothesis [13]. However, it does not appear to hold for *Mt*CMK as the dissociation constant value for *Mt*CMK:dCMP binary complex formation (72 μ M) is slightly lower than for *Mt*CMK: CMP formation (81 μ M) in Hepes buffer at pH 7.6 (**Table 2**). The molecular models for the binary complexes between *Mt*CMK and CMP, (**Fig. 7A**), dCMP (**Fig. 7B**) and AraCMP (**Fig. 7C**) a C3'-*endo* sugar

puckering for the ribose moiety of these phosphoryl group acceptors. At any rate, ideally, determination of the crystal structures for the binary complexes of *Mt*CMK with either CMP or dCMP should shed light on this issue.

The effect of stereochemistry of aldopentose sugars was evaluated by comparing the thermodynamics of binary complex formation between *Mt*CMK and the epimers D-arabinose of AraCMP and D-ribose of CMP as phosphoryl group acceptors. There appears to be a reduction in the observed enthalpy changes (ΔH^0_{obs}) for AraCMP as compared to CMP (**Table 2**). However, enthalpy-entropy compensation appears to occur for *Mt*CMK:AraCMP complex formation. In agreement, the Michaelis-Menten constant values for AraCMP (106 μM) presented here, and CMP (120 μM) and dCMP (165 μM) reported elsewhere [11] are quite similar, providing the assumption described at the bottom of the first paragraph of this section is accepted. These observations suggest that the values for the overall dissociation constant of all enzyme-bound species for AraCMP, CMP and dCMP are similar. On the other hand, the catalytic constant values for AraCMP ($k_{\text{cat}} = 3.8 \text{ s}^{-1}$) here presented, and for CMP ($k_{\text{cat}} = 52 \text{ s}^{-1}$) and dCMP ($k_{\text{cat}} = 30 \text{ s}^{-1}$) previously determined [11] suggest a likely role for the stereochemistry of 2'-OH group of the pentose in catalysis. Although we have not determined the thermodynamic parameters for ddCMP binding to *Mt*CMK, no enzyme activity could be detected with this phosphoryl group acceptor as described in section 3.1, implying a role in binding and/or catalysis for the 3'-OH group of the pentose. Interestingly, UMP, CMP and AraCMP have been shown to be better substrates than dCMP for human UMP/CMP kinase, whereas ddCMP was a poorer substrate (relative efficiency of ~20 %) than dCMP [41].

3.5 pH dependence of *Mt*CMK:NMP binary complex formation

To examine the contribution of linked protonation events to the observed energetics for *Mt*CMK:phosphoryl group acceptor, ITC experiments were performed at 25 °C in buffers with varying ionization enthalpies at pH values of 6.2, 7.6 and 9.0 (**Fig. 5** and **Table 2**). Protonation events linked to nucleotide binding were used to assess the NMP interaction dependence over a pH range to identify the energetics of binding and a possible pK_a shift upon binary complex formation. The number of protons taken up by the protein ($\Delta n_{H^+} > 0$), or released to bulk solvent ($\Delta n_{H^+} < 0$), upon nucleotide binding and the ΔH_{bind}^0 were determined based on the relationship given by **Eq. 4**. The dependence of ΔH_{obs}^0 on ΔH_{ion} at pH values of 6.2, 7.6 and 9.0 upon binary complex formation are depicted in **Fig. 5**. Data fitting to **Eq. 4**, yielded the number of protons exchanged (Δn_{H^+}) upon binary complex formation at pH values of 6.2, 7.6 and 9.0 that were, respectively: 0.43, 0.73 and -0.47 for *Mt*CMK:CMP; 0.57, 0.018 and 0.19 for *Mt*CMK:dCMP; and 1.57, 0.4 and -0.22 for *Mt*CMK:AraCMP. These results suggest a net gain of protons upon binary complex formation at pH values near physiological. Primary sequence comparison (**Fig. 6**), and analysis of *Mt*CMK structural model (**Fig. 7**) and of other bacterial CMK protein structures [13, 14, 42] suggest that the chemical groups that may contribute to the proton uptake effect include the 3-imino group of pyrimidine ring (pK_a of 4.26), and/or the side chain(s) of Asp134 and Asp187 (**Fig. 7**) located in the NMP binding site (pK_a value of 3.9-4.0 for the β -carboxyl group of aspartate in solution). It is possible that this protonation event would assist in orientating the hydroxyl group of α -phosphate of the phosphoryl group acceptor (CMP, dCMP or

AraCMP) ready for nucleophilic attack by the γ -phosphate of ATP. Incidentally, it has been shown that Asp185 of *E. coli* CMK (corresponding to Asp187 in *Mt*CMK) plays a more relevant role in catalysis than in NMP substrate binding [13]. It has also been pointed out that whether the α -phosphate of the substrate acceptor (e.g., CMP) is protonated in phosphoryl transfer reactions remains controversial as the local enzymatic environment can influence its pK_a value [43, 44]. Quantum mechanics calculations have suggested that UMP/CMP kinase from *Dictyostelium discoideum* follows a concerted phosphoryl transfer mechanism in which the α -phosphate group of CMP is protonated [45]. Accordingly, it is plausible that Asp185 (corresponding to Asp187 in *Mt*CMK; **Fig. 7**) is the likely candidate for the protonation event as it has been shown to interact with the pentose whereas Asp132 (corresponding to Asp134 in *Mt*CMK) forms H-bonds to cytosine bound to *E. coli* CMK [13]. Site-directed mutagenesis of Asp134 and Asp187 residues of *Mt*CMK should, however, be pursued in the near future to provide a solid ground to this proposal.

The lack of a common crossing point at the y-axis intercepts of the linear functions of **Fig. 5** demonstrates that the values for ΔH_{bind}^0 change as a function of pH. Accordingly, there exists a change in enthalpy of protonation of free protein that occurs upon binding of the ligand, that is, there is a $\delta\Delta H_p$ term and thereby ΔH_{bind}^0 does not correspond to the intrinsic binding enthalpy (ΔH_{int}^0) at all pH values [34]. Data fitting of ΔH_{bind}^0 values (**Table 2**) to **Eq. 5** yielded estimates for the intrinsic binding enthalpy (ΔH_{int}^0), the enthalpy of protonation of free protein (ΔH_p^f), the fractional saturation of protons in the protein in complex with ligand (H^c), and the change in enthalpy of protonation of free protein that occurs upon binding of the ligand ($\delta\Delta H_p$). In other words,

for the latter, $\Delta H_p^c = \Delta H_p^f + \delta\Delta H_p$. Data fitting to **Eq. 6** and **Eq. 7** yielded values for both the proton affinity constant for the form of enzyme in complex (K_p^c), and thereby its pK_a value and the intrinsic ligand binding constant for unprotonated protein (K_{int}). These results are given in **Table 3**. Alternatively, global fitting to **Eq. 8** of experimental ΔH_{obs}^0 values as a function of pH and ΔH_{ion} allows a three-dimensional representation of data, as shown in the graphical abstract. The latter provides a summary of the data given in **Fig. 5** and **Table 2**.

The calculated pK_a coupled for CMP, dCMP and AraCMP using aspartate as a possible source of the protonation event were, respectively, 5.5, 5.6 and 6.1 (**Table 3**). These values suggest similar changes in pK_a values for the natural substrates, and a larger change for the synthetic AraCMP substrate. The lower intrinsic ligand binding affinity value for AraCMP suggests that its interaction with unprotonated *Mt*CMK is less favorable as compared to CMP and dCMP (**Table 3**), which are likely the physiological substrates. The exothermic intrinsic binding enthalpies are two-fold more favorable for CMP and dCMP as compared to AraCMP, thereby indicating a more pronounced role for entropy in AraCMP binding over the pH range studied here as its K_{int} value is lower as compared to the natural substrates.

Baker and Murphy [34] have pointed out that in case $\delta\Delta H_p$ is equal to, or close to, zero, plots of ΔH_{obs}^0 versus ΔH_{ion} at any pH would all intersect where ΔH_{ion} is equal to and opposite the protonation enthalpy of free protein ($\Delta H_p^f = -\Delta H_{ion}$). Measurements carried out at pH 6.2 and 7.6 for CMP and dCMP demonstrate a common intercept at ΔH_{ion} close to 0, indicating a low ionization enthalpy. As carboxylate groups have low ΔH_{ion} values, it is tempting to suggest participation of either Asp134 or Asp187 in this

proton linkage event, the former being more likely (**Fig. 7**). On the other hand, measurements at pH 9.0 for CMP and dCMP and all measurements carried out with AraCMP show an intersection distant from ΔH_{ion} value of zero, indicating that another residue with a larger ionization enthalpy might be involved. As amine-type groups have large ΔH_{ion} values and carboxylate groups low ΔH_{ion} values, it is tempting to suggest that a group other than Asp134 and Asp187 is(are) involved in proton linkage events seen at high pH. The 3-imino group of pyrimidine ring is neutral and any conserved arginine (Arg111, Arg133, Arg183 and Arg190 in *MtCMK*) could be invoked as involved in proton uptake from primary sequence comparison data (**Fig. 6**). On the other hand, structural analysis of *MtCMK* suggests that the side chain of Arg42, Arg111, Arg133, and Arg190, all of which make contact with the phosphoryl group acceptor, could play a role in proton uptake. The crystal structure of *E. coli* CMK show H-bond interactions between Arg41 and Arg131 with α -phosphate, and between Arg110 and Arg188 with the cytosine of phosphoryl group acceptor [13]. In the *Staphylococcus aureus* CMK crystal structure [42], Arg39 and Arg126 are H-bonded to the α -phosphate, Arg105 interacts with both the cytosine moiety and α -phosphate, Arg183 forms H-bonds to cytosine, and Arg176 interacts with the hydroxyl groups of the pentose. At any rate, site-directed mutagenesis of Arg111, Arg133, Arg183 and Arg190 residues of *MtCMK* should be carried out to shed light on this proposal.

3.6 Sequence alignment and *MtCMK* structural analysis

The crystallographic structures of *E. coli* CMP kinase (Protein Data Bank accession numbers: 1KDO, 1KDP, 1KDR, 1CKE, and 2CMK) [13, 18] in complex with substrates or products together with a three-dimensional model of *Mt*CMK in complex with CMP [37; **Fig. 7**] permit to propose the possible amino acid side chains in *Mt*CMK that are involved in binding of the phosphoryl group acceptors (CMP, dCMP, AraCMP, ddCMP). A comparison between bacterial CMKs and human UMP/CMP kinase may assist in identifying the residues responsible for discrimination between CMP and dCMP over UMP. The amino acid sequence alignment of the *Mt*CMK and *Ec*CMK reveals that these orthologues share a sequence identity of 38.7% (**Fig. 6**). In contrast, the amino acid sequence of *Mt*CMK is 9.5 % identical to human UMP/CMP kinase (**Fig. 6**).

The side chains of Arg111, Arg133, Asp134, Arg183, Asp187 and Arg190 (*Mt*CMK numbering) make contacts with CMP (**Fig. 7**) and are conserved in the bacterial CMK proteins (**Fig. 6**). The larger specificity constant of *E. coli* CMK for CMP ($2.9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [13] as compared to *Mt*CMK ($0.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [11] is consistent with increased intermolecular contacts in the former [37]. The amino acids of *E. coli* that form H-bonds to cytosine (Asp132, Arg110 and Arg188), which correspond to Asp134, Arg111 and Arg190 in *Mt*CMK (**Fig. 6**), are conserved only in bacterial CMKs [13]. The structure of *E. coli* CMK in complex with dCMP is somewhat similar to the structure with CMP except differences in sugar puckering and in interactions between the pentose and Asp185, Ser101 and Arg181 residues (Asp187, Ser102 and Arg183 in *Mt*CMK). There is a 10-fold reduction for AraCMP specificity constant for *Mt*CMK similar to *E. coli* CMK [13]. As mentioned above, no activity could be detected with ddCMP (up to 50 mM) for *Mt*CMK enzyme in the presence of 2 mM ATP, whereas a 10,000-fold reduction in specificity constant was observed for *E. coli* CMK [13]. The structures of *E. coli* CMK in complex

with either AraCMP or ddCMP showed that a few intermolecular interactions are lost, such as no H-bond between the α -phosphate and Arg131 and Arg181 residues (Arg133 and Arg183, respectively, in *MtCMK*). For AraCMP, a loss of interaction between the 3'-OH group of the pentose and Ser101 (Ser102 in *MtCMK*) was also observed. For ddCMP, the absence of 3'-OH group resulted in loss of polar interactions between Arg181 (Arg183 in *MtCMK*) and between Asp132 (Asp134 in *MtCMK*) and the nucleobase. Site-directed mutagenesis studies have shown the role of Asp132 in substrate recognition for *E. coli* UMP kinase [25].

It has been pointed out that the Ser36 residue (Thr37 in *MtCMK*), which is common to CMP kinases from Gram-negative bacteria, alternates in CMP kinases from Gram-positive organisms with a Thr side chain, but never with Ala as in UMP/CMP kinases [25]. Site-directed mutagenesis has been employed to show that Arg110 and Ser36 side chains (Arg111 and Thr37 in *MtCMK*), which are not conserved in human UMP/CMP kinase (**Fig. 6**), cannot form H-bonds with UMP, and their substitutions affect the steady-state kinetic parameters for CMP and dCMP [25]. The Ser36 residue has been proposed to act as an H-bond acceptor for the substrates [25]. Based on crystal structure of apo enzyme and molecular modeling, it has been shown how substrate-induced conformational changes (open to closed conformations) can be invoked to explain the larger affinity of human UMP/CMP kinase for UMP and CMP as compared to dCMP and AraCMP, and the role of Lys61 in substrate discrimination [46].

Conclusions

The results presented in our manuscript allowed both a number of conclusions to be drawn and proposals to be suggested. The D-arabinose-containing phosphoryl group acceptor (AraCMP) is a substrate for *Mt*CMK enzyme. The 2'-3'-dideoxy-cytidine 5'-monophosphate (ddCMP) is not a phosphoryl group acceptor of *Mt*CMK. Steady-state kinetic measurements and ITC data upon binary complex formation suggest that *Mt*CMK follows a random mechanism for substrate (CMP and ATP) addition, and an ordered mechanism of product release mechanism, in which ADP is released first followed by CDP. Thermodynamic signatures of CMP and CDP binding to *Mt*CMK showed favorable binding enthalpy and unfavorable entropy of binding. ATP binding was characterized by favorable enthalpy and entropy changes. The ITC data for CMP, dCMP and AraCMP binding processes showed similar dissociation constant values. Based on ITC and steady-state kinetics data, it is proposed a role in catalysis for the stereochemistry of 2'-OH group of the pentose. No enzyme activity could be detected with ddCMP, suggesting a role in binding and/or catalysis for the 3'-OH group of the pentose. ITC experiments to address the contribution of linked protonation events to the energetics for *Mt*CMK:phosphoryl group acceptor binary complex formation indicated that there is a net gain of protons at pH values near physiological. This result prompted the proposal that this protonation event assists in orientating the hydroxyl group of α -phosphate of the phosphoryl group acceptor ready for nucleophilic attack by the γ -phosphate of ATP. In addition, Asp187 of *Mt*CMK is suggested as the likely candidate for the protonation event. Values of 5.5, 5.6 and 6.1 were calculated for pK_a coupled for, respectively, CMP, dCMP and AraCMP using aspartate as a possible source of the proton linkage event. A comparison of crystallographic structures of *E. coli* CMP kinase and a molecular model

of *Mt*CMK allowed to identification of amino acid side chains involved in binding of phosphoryl-group acceptor substrate. Residues that are conserved in CMP kinases from prokaryotes and not conserved in human UMP/CMP kinase are discussed, and these differences may assist in the design of species-specific inhibitors of *Mt*CMK enzyme activity.

The currently available repertoire of antimycobacterial agents reveals only a handful of comprehensively validated targets, namely RNA polymerase, DNA gyrase, NADH-dependent enoyl-ACP reductase and ATP synthase [47]. The target-based rational design of new agents with anti-TB activity includes functional and structural efforts. Accordingly, mechanistic analysis should be included in enzyme-targeted drug programs aiming at the rational design of potent enzyme inhibitors. Moreover, ITC has been used as an important technique for the direct determination of thermodynamic parameters of enzymatic reactions [48]. The substrate specificity of *Mt*CMK as compared to human UMP/CMP kinase indicates that the former may represent a possible target for anti-TB drug development. Understanding the mode of action of *Mt*CMK should inform us on how to better design inhibitors targeting this enzyme with potential therapeutic application in TB chemotherapy. Incidentally, the U.S. Food and Drug Administration has recently approved bedaquiline, an ATP synthase inhibitor, for treatment of multi-drug resistant strains of *M. tuberculosis* [49].

Figure legends

Fig. 1. Chemical reaction catalyzed by *Mt*CMK. This enzyme catalyzes the ATP-dependent phosphoryl group transfer preferentially to CMP and dCMP [11].

Fig. 2. Intersecting initial velocity patterns for varied concentrations of AraCMP (A) against fixed-varied concentrations of ATP, and for varied concentrations of ATP (B) against fixed-varied concentrations of AraCMP. The data were fitted to **Eq. 2**.

Fig. 3. Isothermal titration calorimetry (ITC) analysis of binding of ligands. The top panels show the differential power signals (exothermic heat changes) of binding of CMP (A), ATP (B), CDP (C) or ADP (D) to *Mt*CMK. The bottom panels show the integrated heat pulses, normalized per mol of injectant as a function of the molar ratio (ligand/*Mt*CMK). The concentrations of protein in the sample cell and ligand in the injection syringe were: (A) CMP: 0.14/4 mM, (B) ATP: 0.125/2.5 mM, (C) CDP: 0.125/4 mM, (D) ADP 0.115/2.5 mM. The binding curves were best fitted to a single set of sites model equation.

Fig. 4. Proposed enzyme mechanism for *Mt*CMK. Steady-state kinetic and ITC data suggest that *Mt*CMK follows a mechanism of random order of substrate addition (CMP and ATP), and an ordered mechanism of product release, in which ADP release is followed by CDP to yield free enzyme.

Fig. 5. Observed binding enthalpy (ΔH_{obs}) plotted against enthalpy of ionization of buffers (ΔH_{ion}) at pH values of pH 6.2 (●), 7.6 (▼), and 9.0 (■), for CMP (A), dCMP (B) and AraCMP (C). The buffers and their ionization enthalpies (ΔH_{ion}) are given in **Table 2**. The data were fitted to **Eq. 4**, in which the slopes provide the number of protons taken up by the protein ($\Delta n_{\text{H}^+} > 0$) or released to bulk solvent ($\Delta n_{\text{H}^+} < 0$) upon binary complex formation, and the y-intercepts give the enthalpy (ΔH_{bind}^0) of binding that would be measured in a buffer with ΔH_{ion} equal to zero.

Fig. 6. Alignment of the amino acid sequence of *Mt*CMK (Mt) with *E. coli* CMK (Ec), for which crystal structures are available, and “short” human UMP/CMP kinase (Hu). Numbering is indicated for *Mt*CMK. Identical conserved residues are shown in white on a black background. The symbols above the alignment indicate: (●) residues in the proposed lipophilic part of NMP binding pocket, (▼) likely amino acid residues that interact with the pyrimidine ring of CMP/dCMP, (■) likely amino acid residues that interact with α -phosphate of the CMP/dCMP, (◆) amino acid residue that probably interacts with hydroxyl groups of the pentose. The positions of the phosphate-binding loop (P loop), the NMPbind domain and the LID domain of the *Mt*CMK are indicated below the alignment.

Fig. 7. Structural models for *Mt*CMK. (A) *Mt*CMK: CMP. (B) *Mt*CMK: dCMP. (C) *Mt*CMK: AraCMP. The secondary structures are drawn as ribbon diagrams and the residues making contact with CMP, dCMP and AraCMP are drawn as sticks. Image generated with PyMOL [50].

Acknowledgements

This work was supported by funds awarded by Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPES to National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (INCT-TB) to D.S.S. and L.A.B. L.A.B., D.S.S., and O.N.S. also acknowledge financial support awarded by FAPERGS-CNPq-PRONEX-2009. O.N.S. acknowledges financial support granted by CNPq. L.A.B. (CNPq, 520182/99-5), D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06) and O.N.S. are Research Career Awardees of the National Research Council of Brazil (CNPq). L.J., L.A.R. and D.C.R. have been supported by a scholarship awarded by CNPq. Last, the sponsors played no role in study design, collection, analysis and interpretation of data.

References

- [1] R.T. Rustad, A.M. Sherrid, K.J. Minch, D.R. Sherman, Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency, *Cell. Microbiol.* 11 (2009) 1151-1159.
- [2] R.G. Ducati, A. Ruffino-Netto, L.A. Basso, D.S. Santos, The resumption of consumption: A review on tuberculosis, *Mem. Instit. Oswaldo Cruz.* 7 (2006) 697-714.
- [3] World Health Organization. Global Tuberculosis Control: WHO report 2011 (2011) Available from: http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html
- [4] Z. Ma, C. Lienhardt, H. McIlleron, A. Nunn, X. Wang, Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality, *Lancet.* 375 (2010) 2100-2109.
- [5] A.A. Velayati, P. Farnia, M.R. Masjedi, T.A. Ibrahim, P. Tabarsi, R.Z. Haroun, H.O. Kuan, J. Ghanavi, P. Farnia, M. Varahram, Totally drug-resistant tuberculosis strains: evidence of adaptation at the cellular level, *Eur. Respir. J.* 34 (2009) 1202-1203.
- [6] M.R. Velayati, M.R. Masjedi, P. Farnia, P. Tabarsi, J. Ghanavi, A.H. Ziazarifi, S.E. Ziazarifi, S.R. Hoffner, Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran, *Chest.* 136 (2009) 420-425.
- [7] C.M. Sassetti, D.H. Boyd, E.J. Rubin, Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 77-84.
- [8] J.E. Griffin, J.D. Gawronski, M.A. DeJesus, T.R. Ioerger, B.J. Akerley, C.M. Sassetti, High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism, *PLoS Pathog.* 7(9) (2011) e1002251.

- [9] A.D. Villela, Z.A Sanchez-Quitian, R.G. Ducati, D.S. Santos, L.A. Basso, Pyrimidine salvage pathway in *Mycobacterium tuberculosis*, *Current Med. Chem.* 18 (2011) 1286-1298.
- [10] R.G. Ducati, A. Breda, L.A. Basso, D.S. Santos, Purine Salvage Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*, *Current Med. Chem.* 18 (2011) 1258-1275.
- [11] C. Thum, C.Z. Schneider, M.S. Palma, D.S. Santos, L.A. Basso, The Rv1712 Locus from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv codes for a functional CMP kinase that preferentially phosphorylates dCMP, *J. Bacteriol.* 191 (2009) 2884-2887.
- [12] D.C. Rostirolla, A. Breda, L.A. Rosado, M.S. Palma, L.A. Basso, D.S. Santos, UMP kinase from *Mycobacterium tuberculosis*: Mode of action and allosteric interactions, and their likely role in pyrimidine metabolism regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 505 (2011) 202-212.
- [13] T. Bertrand, P. Briozzo, L. Assairi, A. Ofiteru, N. Bucurenci, H. Munier-Lehmann, B. Golinelli-Pimpaneau, O. Barzu, A.M Gilles, Sugar specificity of bacterial CMP kinases as revealed by crystal structures and mutagenesis of *Escherichia coli* enzyme, *J. Mol. Biol.* 315 (2002) 1099-1110.
- [14] L. Yu, J. Mack, P.J. Hajduk, S.J. Kakavas, A.Y.C. Saiki, C.G. Lerner, E.T. Olejniczak, Solution structure and function of an essential CMP kinase of *Streptococcus pneumoniae*, *Protein Sci.* 12 (2003) 2613-2621.
- [15] A. Sorokin, P. Serror, P. Pujic, V. Azevedo, S.D. Ehrlich, The *Bacillus subtilis* chromosome region encoding homologues of the *Escherichia coli* *mssA* and *rpsA* gene products, *Microbiology.* 141 (1995) 311-319.

- [16] C.F. Beck, J. Neuhard, E. Thomassen, J.L. Ingraham, E. Kleker, *Salmonella typhimurium* mutants defective in cytidine monophosphate kinase (cmk), J. Bacteriol. 120 (1974) 1370-1379.
- [17] C. Vonrhein, G.J. Schlauderer, G.E. Schulz, Movie of the structural changes during a catalytic cycle of nucleoside monophosphate kinases, Structure 3 (1995) 483-490.
- [18] P. Briozzo, B. Golinelli-Pimpaneau, A.M. Gilles, J.F. Gaucher, S. Burlacu-Miron, H. Sakamoto, J. Janin, O. Bâzru, 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 (1998) 1517-1527.
- [19] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227 (1970) 680-685.
- [20] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248-254.
- [21] C. Blondin, L. Serina, L. Wiesmuller, A.M. Gilles, O. Bâzru, Improved spectrophotometric assay of nucleoside monophosphate kinase activity using the pyruvate kinase/lactate dehydrogenase coupling system, Anal. Biochem. 220 (1994) 219-221.
- [22] G. Millar, A. Lewendon, M.G. Hunter, J.R. Coggins, 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 (1986) 427-437.

- [23] R.N. Goldberg, N. Kishore, R.M. Lennen, Thermodynamic quantities for the ionization reactions of buffers, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 31 (2002) 231-370.
- [24] K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, *Mol. Biol. Evol.* 24 (2007) 1596-1599.
- [25] A. Ofiteru, N. Bucurenci, E. Alexov, T. Bertrand, P. Briozzo, H. Munier-Lehmann, A.M. Gilles, Structural and functional consequences of single amino acid substitutions in the pyrimidine base binding pocket of *Escherichia coli* CMP kinase, *FEBS J.* 274 (2007) 3363-3373.
- [26] N. Bucurenci, H. Sakamoto, P. Briozzo, N. Palibroda, L. Serina, R.S. Sarfati, G. Labesse, G. Briand, A. Danchin, O. Bârză, A.M. Gilles, CMP kinase from *Escherichia coli* is structurally related to other nucleoside monophosphate kinases, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 2856-2862.
- [27] A. Sali, T.L. Blundell, Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints, *J. Mol. Biol.* 234 (1993) 779-815.
- [28] M.-Y. Shen, A. Sali, Statistical potential for assessment and prediction of protein structures, *Prot. Science.* 15 (2006) 2507-2524.
- [29] V.B. Chen, W.B. Arendall, J.J. Headd, D.A. Keedy, R.M. Immormino, G.J. Kapral, L.W. Murray, J.S. Richardson, D.C. Richardson, MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* D66 (2010)12-21.
- [30] R.W. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, J.M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, *J. Appl. Cryst.* 26 (1993) 283-291.
- [31] A.C. Wallace, R.A. Laskowski, J.M. Thornton, LIGPLOT: a program to generate

schematic diagrams of protein-ligand interactions, *Protein Eng.* 8 (1995) 127-134.

[32] I.H. Segel, *Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems*, John Wiley & Sons, New York, 1975.

[33] J.E. Ladbury, M.L. Doyle, *Biocalorimetry: Applications of calorimetry in the biological sciences*, John Wiley & Sons, Chichester, 1998.

[34] B.M. Baker, K.P. Murphy, Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry, *Biophysical J.* 71 (1996) 2049-2055.

[35] J. Gomez, E. Freire, Thermodynamic mapping of the inhibitor site of the aspartic protease endothiapepsin, *J. Mol. Biol.* 252 (1995) 337–350.

[36] P.C. Engel, *Enzyme kinetics*, Chapman and Hall, London, 1977.

[37] R.A. Caceres, L.F.S.M. Timmers, A.L.V. Vivan, C.Z. Schneider, L.A. Basso, W.F. De Azevedo Jr., D.S. Santos, Molecular modeling and dynamics studies of cytidylate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *J. Mol. Model.* 14 (2008) 427-434.

[38] W.P. Jencks, *Catalysis in chemistry and enzymology*, Dover Publications, Inc., New York, 1975.

[39] A. Fersht, *Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding*, W.H. Freeman and Company, New York, 1998.

[40] S. Schnell, P.K. Maini, Enzyme kinetics at high enzyme concentration, *Bull. Math. Biol.* 62 (2000) 483-499.

[41] J.Y. Liou, G.E. Dutschman, W. Lam, Z. Jiang, Y.C. Cheng, Characterization of human UMP/CMP kinase and its phosphorylation of D- and L-form deoxycytidine analogue monophosphates, *Cancer Res.* 62 (2002) 1624-1631.

- [42] B. Dhaliwal, J. Ren, M. Lockyer, I. Charles, A.R. Hawkins, D.K. Stammers, Structure of *Staphylococcus aureus* cytidine monophosphate kinase in complex with cytidine 5'-monophosphate, *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 62 (2006) 710–715.
- [43] R.A. Alberty, Thermodynamic properties of enzyme-catalyzed reactions involving cytosine, uracil, thymine, and their nucleosides and nucleotides, *Biophys Chem.* 127 (2007) 91–96.
- [44] A. Warshel, J. Åqvist, Electrostatic energy and macromolecular function, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20 (1991) 267-298.
- [45] M.C. Hutter, V. Helms, Phosphoryl transfer by a concerted reaction mechanism in UMP/CMP-kinase, *Protein Sci.* 11 (2000) 2225–2231.
- [46] D. Segura-Peña, N. Sekulic, S. Ort, M. Konrad, A. Lavie, Substrate-induced conformational changes in human UMP/CMP kinase. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 33882-33889.
- [47] T.S. Balganesh, P.M. Alzari, S.T. Cole, Rising standards for tuberculosis drug development, *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (2008) 576-581.
- [48] M.L. Bianconi, Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions, *Biophys. Chem.* 126 (2007) 59-64.
- [49] J. Cohen, Approval of novel TB drug celebrated – with restraint, *Science* 339 (2013) 130.
- [50] W.L. Delano, J.W. Lam, PyMOL: a communications tool for computational models, *Abstr. Pap. -Am. Chem. Soc.* 230 (2005) U1371–U1372.

Research highlights

> Substrate addition is random for *Mycobacterium tuberculosis* CMP kinase (*MtCMK*). > CMP and CDP binding to *MtCMK* showed favorable enthalpy and unfavorable entropy. > ATP binding to *MtCMK* was characterized by favorable enthalpy and entropy changes. > *MtCMK*:phosphoryl group acceptor complex formation involves a net gain of protons. > Asp187 of *MtCMK* is suggested as the likely candidate for the protonation event.

Fig. 1.

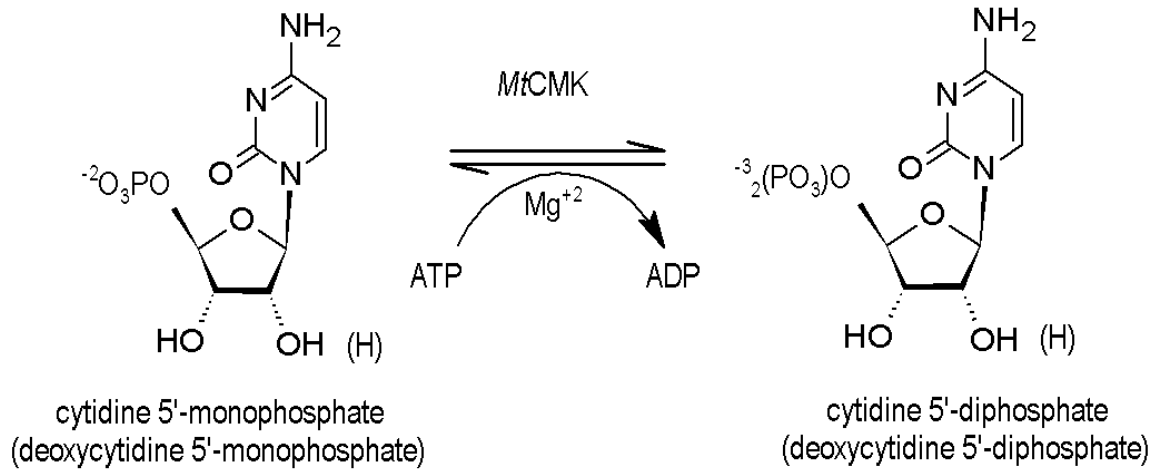


Fig. 2.

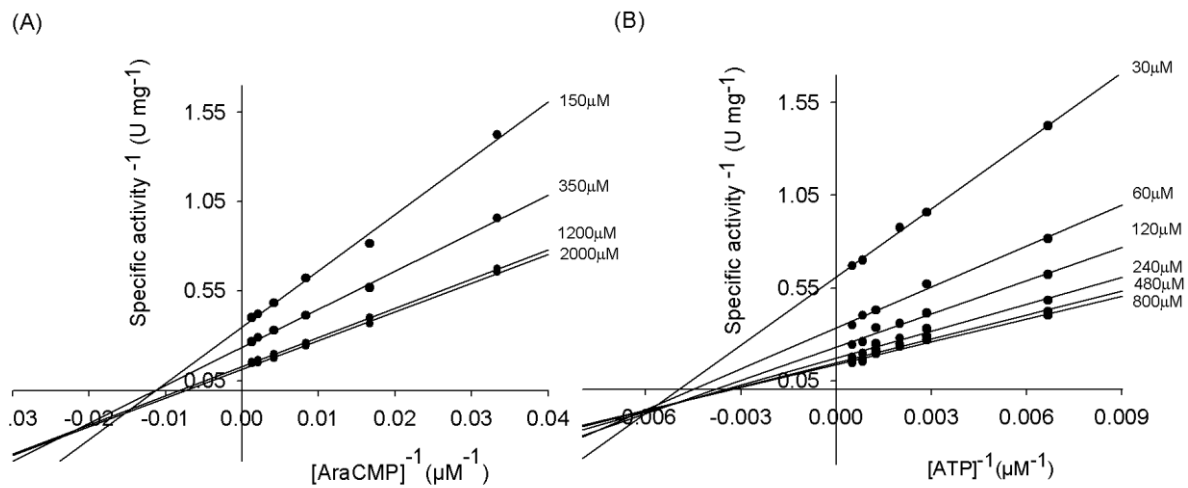


Fig. 3.

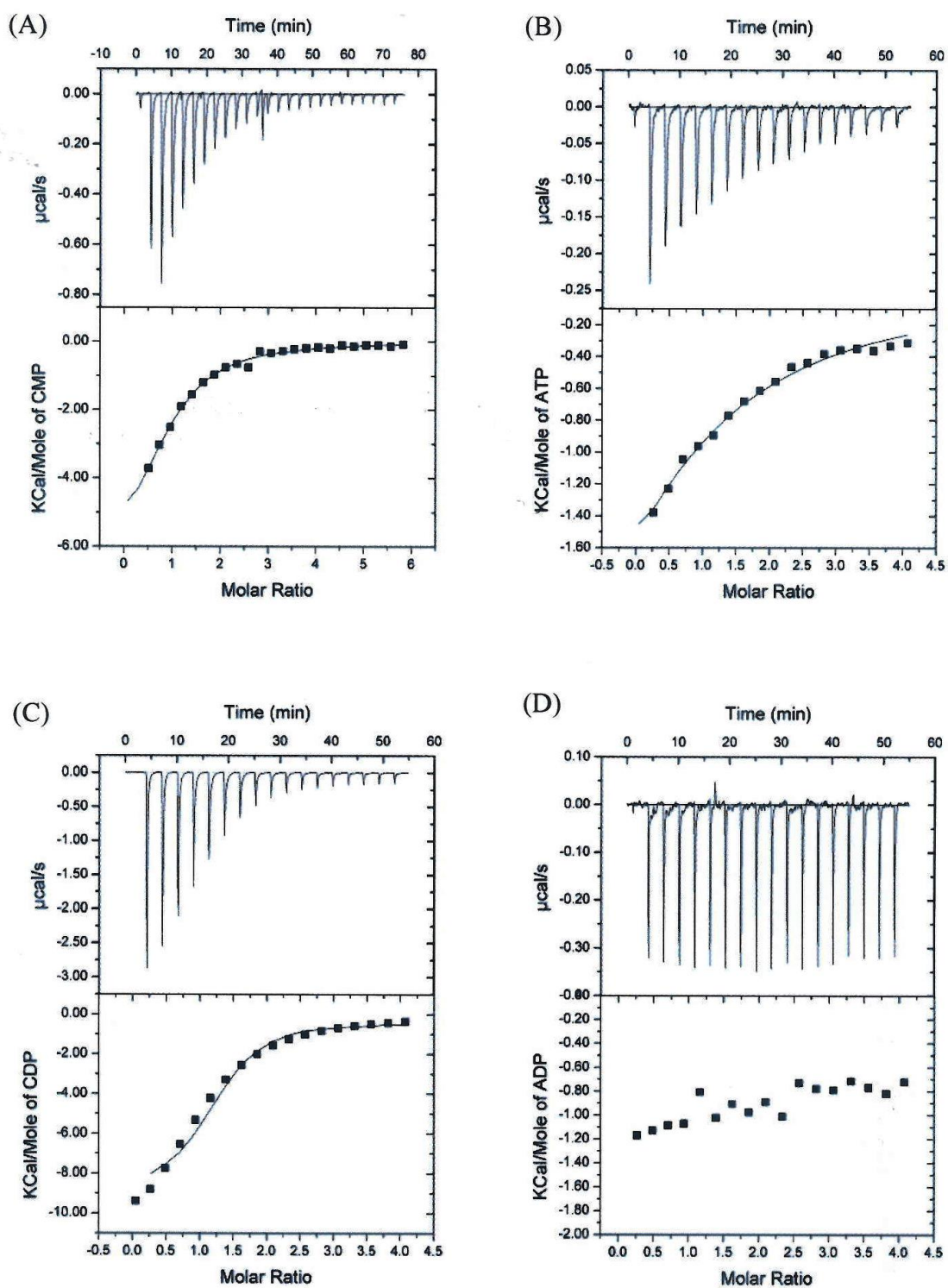


Fig. 4.

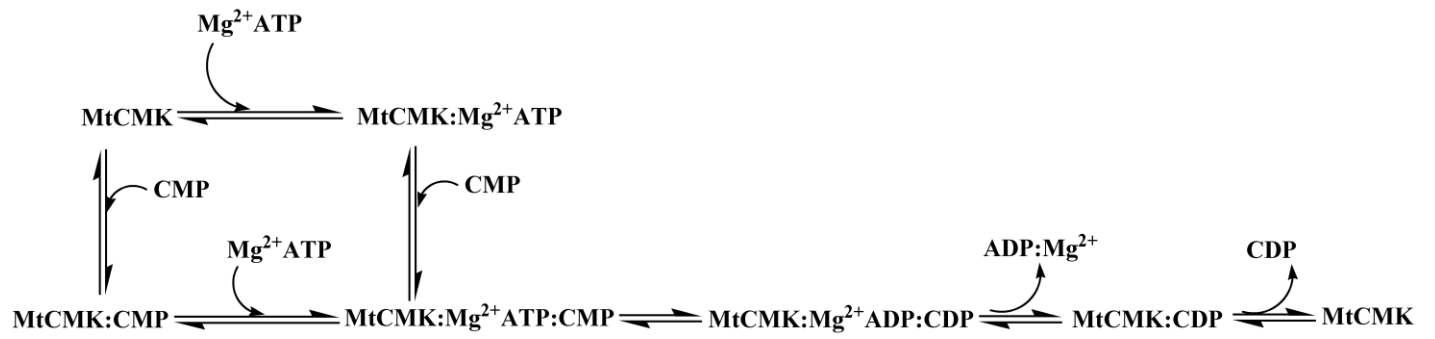


Fig. 5.

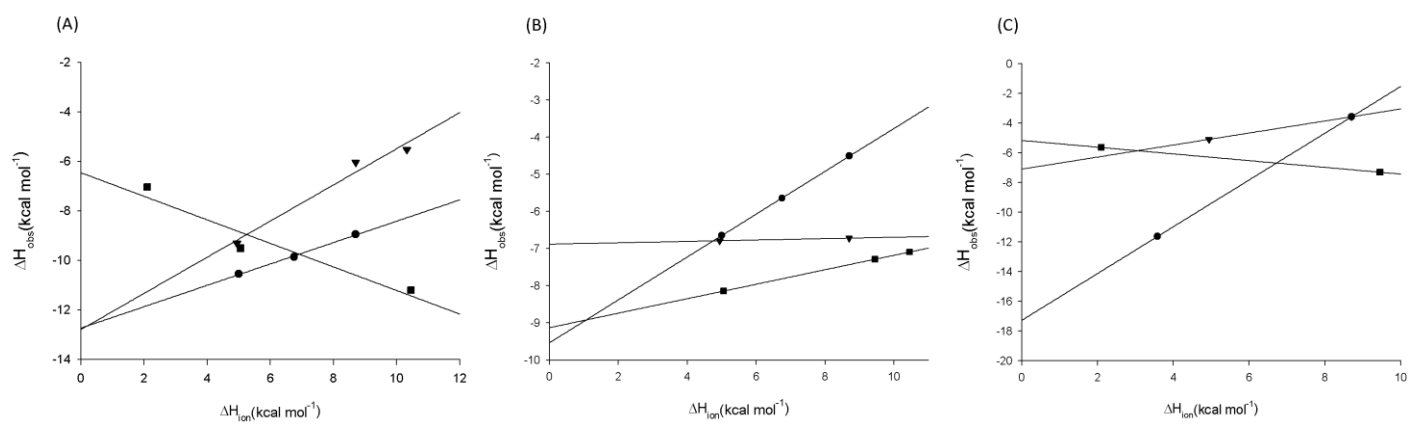


Fig. 6.

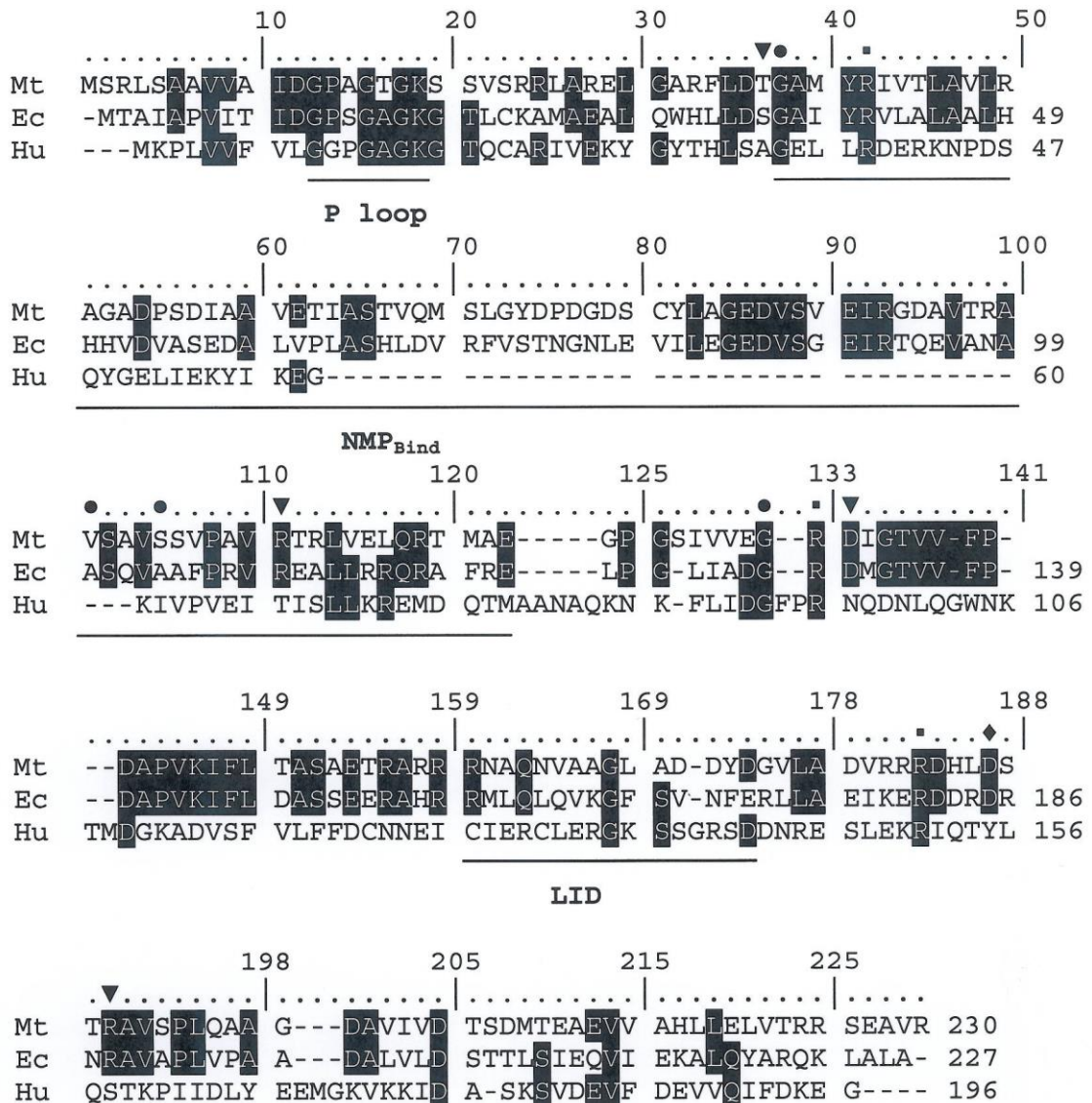
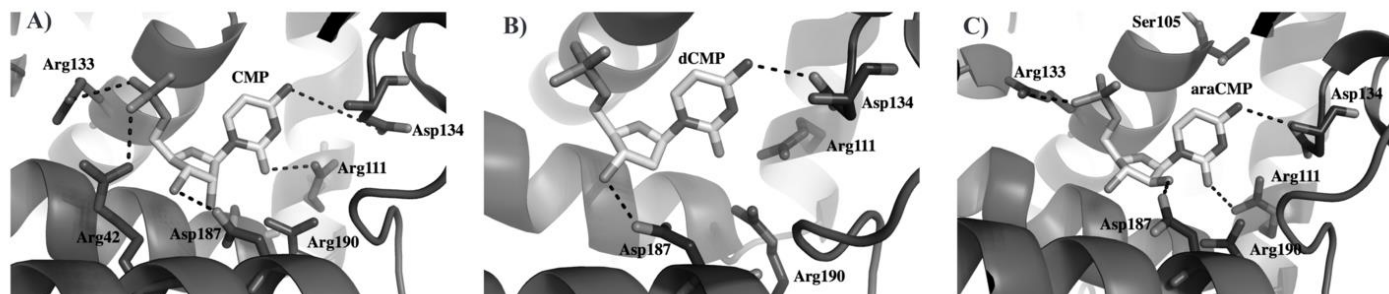


Fig. 7.



Graphical Abstract

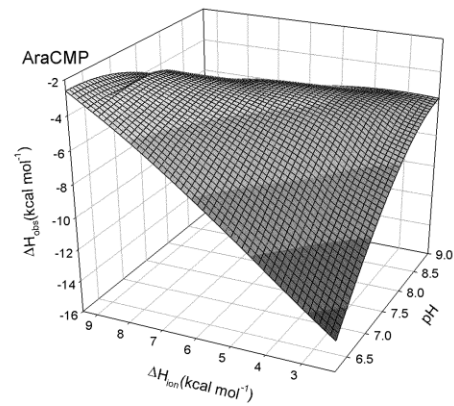
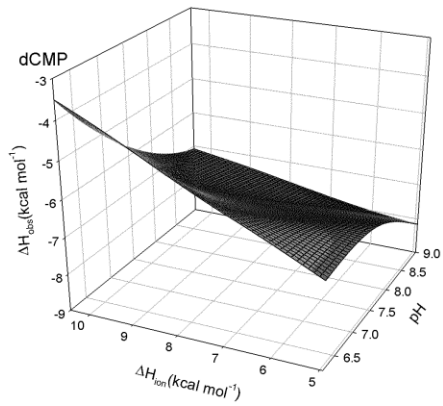
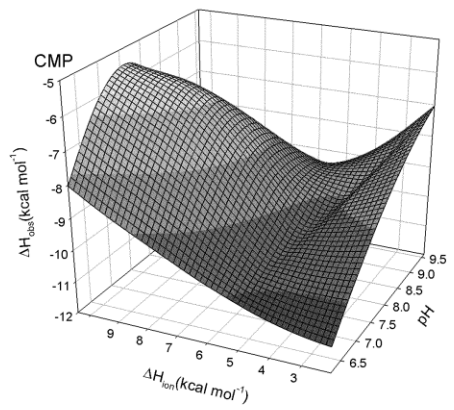


Table 1. Thermodynamic parameters for binary complex formation upon binding of either CMP, ATP, or CDP to *Mt*CMK. K_d represents the equilibrium dissociation constant, ΔH^0_{obs} is the observed binding enthalpy, ΔS^0_{obs} is the observed binding entropy, ΔG^0_{obs} is the observed Free Gibbs energy, and $-T\Delta S^0_{\text{obs}}$ is the negative term for temperature (in Kelvin) times observed binding entropy.

Ligand*	K_d (μM)	ΔG^0_{obs} (kcal mol^{-1})	ΔH^0_{obs} (kcal mol^{-1})	$-T\Delta S^0_{\text{obs}}$ (kcal mol^{-1})
CMP	58 (\pm 6)	-5.7 (\pm 0.6)	-6.9 (\pm 0.6)	1.2 (\pm 0.1)
ATP	266 (\pm 16)	-4.9 (\pm 0.3)	-4.6 (\pm 0.1)	-0.29 (\pm 0.02)
CDP	44 (\pm 7)	-5.8 (\pm 0.9)	-12.8 (\pm 0.5)	7 (\pm 1)

Table 2. Thermodynamic parameters of NMP (CMP, dCMP, AraCMP) binding to *Mt*CMK at different pH values.

pH	Buffer	ΔH_{ion} (kcal mol ⁻¹)	$\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta G^{\circ}_{\text{obs}}$ (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S^{\circ}_{\text{obs}}$ (kcal mol ⁻¹)	K_d (μM)
CMP						
6.2	MOPS	5.0	-10.55 (\pm 0.07)	-5.7 (\pm 0.1)	4.9 (\pm 0.1)	65 (\pm 1)
6.2	Bis-Tris	6.75	-9.86 (\pm 0.01)	-4.9 (\pm 0.5)	4.9 (\pm 0.5)	234 (\pm 22)
6.2	Imidazol	8.7	-8.9 (\pm 0.1)	-5.4 (\pm 0.2)	3.6 (\pm 0.2)	115 (\pm 4)
7.6	Hepes	4.94	-9.3 (\pm 0.2)	-5.6 (\pm 0.5)	3.7 (\pm 0.3)	81 (\pm 7)
7.6	Imidazol	8.7	-6.04 (\pm 0.02)	-6.2 (\pm 0.7)	-0.12 (\pm 0.01)	30 (\pm 3)
7.6	Tris-HCl	10.32	-5.6 (\pm 0.2)	-6.0 (\pm 0.7)	-0.46 (\pm 0.05)	41 (\pm 5)
9.0	Carbonate	2.1	-7.03 (\pm 0.09)	-5.3 (\pm 0.2)	1.73 (\pm 0.05)	127 (\pm 4)
9.0	HEPPS	5.06	-9.5 (\pm 0.2)	-5.4 (\pm 0.3)	4.0 (\pm 0.2)	101 (\pm 6)
9.0	Glycine	10.45	-11.2 (\pm 0.5)	-5.5 (\pm 0.3)	5.7 (\pm 0.3)	91 (\pm 5)
dCMP						
6.2	MOPS	5.0	-6.6 (\pm 0.1)	-5.8 (\pm 0.4)	0.85 (\pm 0.05)	57 (\pm 4)
6.2	Bis-Tris	6.75	-5.64 (\pm 0.07)	-5.2 (\pm 0.1)	0.49 (\pm 0.01)	167 (\pm 5)
6.2	Imidazol	8.7	-4.5 (\pm 0.2)	-5.3 (\pm 0.4)	-1.1 (\pm 0.1)	65 (\pm 6)
7.6	Hepes	4.94	-6.7 (\pm 0.1)	-5.6 (\pm 0.1)	1.14 (\pm 0.02)	72 (\pm 2)
7.6	Imidazol	8.7	-6.72 (\pm 0.05)	-5.4 (\pm 0.1)	1.29 (\pm 0.02)	104 (\pm 2)

pH	Buffer	ΔH_{ion} (kcal mol ⁻¹)	$\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta G^{\circ}_{\text{obs}}$ (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S^{\circ}_{\text{obs}}$ (kcal mol ⁻¹)	K_d (μM)
9.0	HEPPS	5.06	-8.14 (\pm 0.06)	-5.5 (\pm 0.1)	2.65 (\pm 0.06)	94 (\pm 2)
9.0	Ches	9.45	-7.28 (\pm 0.09)	-5.5 (\pm 0.2)	1.75 (\pm 0.06)	88 (\pm 3)
9.0	Glycine	10.45	-7.10 (\pm 0.07)	-5.9 (\pm 0.2)	1.22 (\pm 0.04)	50 (\pm 2)
AraCMP						
6.2	Mes	3.58	-11.6 (\pm 0.3)	-6.0 (\pm 0.6)	5.6 (\pm 0.6)	39 (\pm 4)
6.2	MOPS	5.0	-5.6(\pm 0.5)	-5 (\pm 2)	-0.7 (\pm 0.3)	22 (\pm 9)
6.2	Imidazol	8.7	-3.6 (\pm 0.3)	-7 (\pm 4)	-3 (\pm 2)	13 (\pm 8)
7.6	Hepes	4.94	-5.1 (\pm 0.4)	-6 (\pm 2)	-1.1 (\pm 0.4)	29 (\pm 10)
7.6	Imidazol	8.7	-3.6 (\pm 0.4)	-6 (\pm 4)	-3 (\pm 2)	196 (\pm 130)
9.0	Carbonate	2.1	-5.6 (\pm 0.3)	-5.4 (\pm 0.3)	0.25(\pm 0.01)	111(\pm 7)
9.0	Ches	9.45	-7.3 (\pm 0.4)	-6 (\pm 2)	1.0 (\pm 0.3)	26 (\pm 7)

Table 3. Thermodynamic parameters derived from equations 5, 6 and 7.

Ligand	K_{int} (μM)	$\text{pK}_{\text{a, coupled}}$	$\Delta H^{\circ}_{\text{int}}$ (kcal mol^{-1})	$\Delta H^{\dagger}_{\text{p}}$ (kcal mol^{-1})	$\delta\Delta H_{\text{p}}$ (kcal mol^{-1})
CMP	114.6	5.5 (± 0.5)	-8.7 ($\pm 2 \times 10^{-15}$)	-8.23 ($\pm 3 \times 10^{-15}$)	-2.65 ($\pm 2 \times 10^{-14}$)
dCMP	76.42	5.6 (± 0.1)	-7.96 ($\pm 8 \times 10^{-16}$)	-5.81 ($\pm 5 \times 10^{-15}$)	-6.86 (± 1)
AraCMP	13.34	6.1 (± 0.1)	-3.57 ($\pm 3 \times 10^{-16}$)	-8.6 (± 1)	-0.071 ($\pm 4 \times 10^{-15}$)

CAPÍTULO III

Dependência da temperatura durante a formação do complexo binário *Mt*CMK:NMP

1 Materiais e Métodos

1.1 Materiais

1.2 Preparação da proteína

1.3 Ensaio de atividade

1.4 Estabilidade térmica da enzima

1.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica

1.6 Análise dos dados

2 Resultados e Discussão

2.1 Dependência da temperatura durante a formação do complexo binário *Mt*CMK:NMP

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 MATERIAIS

Todos os reagentes utilizados, ATP, CMP, dCMP, fosfoenolpiruvato (PEP), NADH, lactato desidrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) e piruvato quinase (PK; EC 2.7.1.40) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A citosina- β -D-arabinofuranosídeo 5'-monofosfato (AraCMP) foi obtido da Santa Cruz Biotechnology[®].

1.2 PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA

Células eletrocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com o plasmídeo recombinante pET-23a(+):*cmk* e utilizadas para a produção da enzima recombinante. O crescimento celular e os passos de purificação da proteína recombinante *MtCMK* foram efetuados seguindo protocolos previamente descritos (72). Todas as etapas de purificação foram efetuadas a 4 °C utilizando o sistema de purificação ÄKTA (GE Healthcare) e a eluição da amostra foi monitorada através de detecção por UV a 215, 254 e 280 nm e analisadas por SDS-PAGE 12%. As frações contendo a proteína homogênea foram agrupadas, dialisadas contra 50 mM Tris-HCl pH 7,5 contendo 50 mM KCl e 5 mM MgCl₂ e armazenadas a -80 °C. A concentração total de proteínas foi determinada pela técnica desenvolvida por Bradford (86) utilizando-se o *kit* de ensaio de proteínas da Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories) e albumina de soro bovino como proteína padrão. Todos os pontos da curva e a quantificação da proteína recombinante foram feitos em triplicata em espectrofotômetro Ultrospec 3100pro. Na purificação obteve-se um rendimento de 5 mg de proteína recombinante por litro de cultura de células, como previamente descrito (72).

1.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE

A atividade catalítica da *MtCMK* foi monitorada por meio de um ensaio de reação padrão acoplado com as enzimas piruvato quinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH), a partir da formação do produto ADP. Neste experimento, monitora-se o decréscimo da absorbância a 340

nm devido ao consumo de NADH ($\epsilon_{\beta\text{-NADH}} = 6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) pela enzima LDH, como previamente descrito (87). A reação final (500 μL) foi preparada em tampão 40 mM Hepes pH 7,6, 40 mM KCl e 5 mM MgCl_2 , contendo PEP (1,5 mM), NADH (0,2 mM), PK (6 U mL^{-1}), LDH (5 U mL^{-1}), CMP (1 mM) e ATP (2,5 mM). Todas as reações foram realizadas a 25 °C, em duplicata, e iniciadas com a adição da proteína recombinante *MtCMK* (50 nM). Misturas de reação na ausência da *MtCMK* foram monitoradas a fim de subtrair possíveis artefatos químicos gerados durante a leitura de reação. Os ensaios foram realizados utilizando um espectrofotômetro UV/Visível, UV-2550 (Shimadzu), e cubetas com caminho óptico de 1,0 cm. Uma unidade de atividade da enzima (U) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μmol de substrato por min.

1.4 ESTABILIDADE DA ENZIMA

Previamente à determinação dos parâmetros termodinâmicos com a variação da temperatura, a estabilidade da enzima foi examinada, a fim de avaliar se a *MtCMK* seria estável por um período de 2 horas nas temperaturas a serem utilizadas durante os experimentos calorimétricos. Foram incubadas amostras da enzima recombinante em diferentes temperaturas (15 – 37 °C) e alíquotas foram apanhadas em tempos diferentes de incubação para a realização da atividade da enzima a 25 °C, na presença de concentrações saturantes de CMP (1 mM) e ATP (2,5 mM), numa mistura de ensaio contendo o tampão em pH 7,6 (40 mM Hepes, 40 mM KCl e 5 mM MgCl_2), PEP (1,5 mM), NADH (0,2 mM), PK (6 U mL^{-1}) e LDH (5 U mL^{-1}). A reação foi iniciada e monitorada conforme descrito acima, para a determinação da atividade no ensaio de reação padrão. Reações na ausência da enzima foram monitoradas a fim de subtrair possíveis artefatos químicos gerados durante a leitura de reação. A análise dos dados foi realizada utilizando o software SigmaPlot 2000 (SPSS, Inc.).

1.5 CALORIMETRIA DE TITULAÇÃO ISOTÉRMICA

Os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram realizados sob pressão e temperatura constantes, utilizando-se o microcalorímetro iTC200 (MicroCal, Inc., GE Healthcare).

Previamente aos ensaios, a proteína recombinante *Mt*CMK foi concentrada e preparada por dialise contra o tampão 40 mM Hepes pH 7,6, 40 mM KCl e 5 mM MgCl₂, utilizando uma membrana de ultrafiltração AMICON (PM_{Cut-off} = 10 kDa) (Millipore Corporation, Bedford, MA). As soluções dos titulantes foram preparadas de forma a conterem exatamente o mesmo tampão utilizado para a preparação da enzima e para o preenchimento da célula nas titulações-controle.

Os experimentos de ITC foram realizados para obtenção dos parâmetros termodinâmicos com a variação da temperatura, durante a interação entre a *Mt*CMK e o NMP – substrato receptor do grupamento fosforil (CMP, dCMP e AraCMP). A célula de referência (200 µL) foi completada com água MilliQ[®] durante todos os experimentos e a célula de amostra (200 µL) foi preenchida com a proteína (*Mt*CMK) na concentração de 140 µM. A seringa de injeção (39 µL) foi carregada com os titulantes nas seguintes concentrações: CMP (4 mM), dCMP (3 mM) ou AraCMP (2 mM). As titulações foram realizadas na faixa de temperatura de 10 – 37 °C (283 – 310 K). A reação de ligação foi iniciada com uma injeção de 0,5 µL do ligante seguida de 25 injeções de 1,62 µL em intervalos de 180 s, chegando a um volume final injetado de 39 µL com uma velocidade de agitação de 500 rpm. Titulações-controle foram realizadas para subtrair o calor de diluição e de mistura para cada experimento.

1.6 ANÁLISE DOS DADOS

Os valores da constante de ligação em equilíbrio (K_{eq}), da variação da entalpia observada (ΔH^0_{obs}) e da estequiometria (n), referentes às interações com a *Mt*CMK, foram determinados adequando as isotermas de ligação ao método Marquardt de regressão não-linear padrão fornecido no software Origin 7 SR4 software (Microcal, Inc.). Os dados das isotermas de ligação foram adequados a um modelo matemático em que se espera um grupo de sítios com a mesma afinidade e assinatura termodinâmica (*one set of sites*). O valor inicial da estequiometria n foi fixado em 1, sabendo-se que a *Mt*CMK se encontra como um monômero em solução (72). Para a obtenção dos parâmetros da energia livre de Gibbs observada (ΔG^0_{obs}) e da variação da entropia observada (ΔS^0_{obs}), os dados do ITC foram adequados à relação termodinâmica descrita na Equação 1 (88), em que R é a constante dos gases (1,98 cal K⁻¹ mol⁻¹ ou 8,314 J K⁻¹ mol⁻¹) e T é a temperatura em Kelvin ($T = ^\circ\text{C} + 273,15$).

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq} = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad \text{Eq. 1}$$

A variação na capacidade calorífica (ΔC_p) a pressão constante foi obtida em dois passos. Primeiro, fez-se a aproximação dos pontos obtidos experimentalmente através do método de regressão linear, que permitiu obter os coeficientes linear e angular da reta. Este último corresponde à derivada parcial do ΔH^0_{obs} em relação à temperatura (T), que, por sua vez, corresponde ao ΔC_p almejado, conforme verificado pela Equação 2 (88).

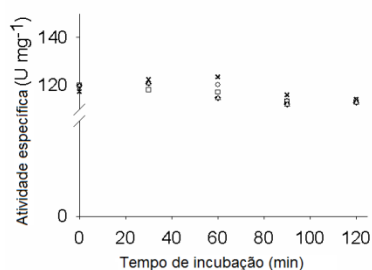
$$\Delta C_p = \frac{\partial \Delta H}{\partial T} \quad \text{Eq. 2}$$

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 DEPENDÊNCIA DA TEMPERATURA DURANTE A FORMAÇÃO DO COMPLEXO BINÁRIO *Mt*CMK:NMP

Os experimentos de ITC foram realizados para obtenção dos parâmetros termodinâmicos com a variação da temperatura, durante a interação entre a *Mt*CMK e o NMP – substrato receptor do grupamento fosforil (CMP, dCMP e AraCMP). Como o tempo de duração de um ensaio típico de ITC é de aproximadamente 2 horas, foi avaliada a estabilidade térmica da *Mt*CMK neste intervalo de tempo nas temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 37 °C. A *Mt*CMK manteve-se estável nestas temperaturas durante todo o intervalo de tempo utilizado para a coleta de dados de ITC (**Fig. 3**). Em toda a faixa de temperatura (**Tabela 4**) a interação da *Mt*CMK com os receptores do grupamento fosforil (CMP, dCMP e AraCMP) foi caracterizada por significantes mudanças exotérmicas da entalpia. Os dados das isotermas de ligação foram adequados ao modelo *one set of sites*, e os parâmetros termodinâmicos foram obtidos conforme descrito na seção de análise dos dados. Os valores de ΔH^0_{obs} mostraram-se significativamente dependentes da temperatura, tal que as interações tornaram-se mais exotérmicas na medida em que a temperatura foi aumentada (**Tabela 1, Fig. 4**). Por outro lado, as contribuições da entropia (representada pelo termo $-T\Delta S^0_{\text{obs}}$) tornaram-se menos favoráveis com o aumento da temperatura (**Tabela 1, Fig. 4**). No entanto, a energia livre de Gibbs (ΔG^0_{obs}) mostrou-se independente da temperatura.

Figura 3. Estabilidade térmica da enzima *Mt*CMK



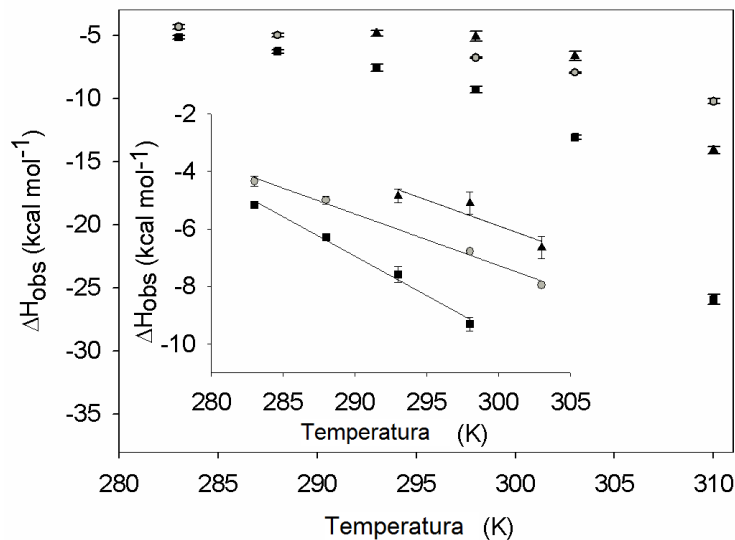
Nota: Medidas da atividade da *Mt*CMK a 25 °C, durante 2 horas de incubação nas diferentes temperaturas de 15 °C (x), 20 °C (o), 25 °C (□), 30 °C (◆) e 37 °C (Δ). A atividade enzimática foi determinada em ensaio acoplado pelo monitoramento contínuo da oxidação do NADH a 340 nm, dependente da atividade da *Mt*CMK, e corrigidas para as reações químicas geradas durante a leitura da reação na ausência da enzima. Uma unidade de atividade da enzima (U) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a conversão de 1 μmol de substrato por min. Fonte: O autor, 2013.

Tabela 1. Parâmetros termodinâmicos da ligação do NMP (CMP, dCMP, AraCMP) à *Mt*CMK em diferentes temperaturas.

T (K)	K_d (μM)	$\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ (kcal mol ⁻¹)	$\Delta G^{\circ}_{\text{obs}}$ (kcal mol ⁻¹)	$-T\Delta S^{\circ}_{\text{obs}}$ (kcal mol ⁻¹)
CMP				
283,15	30 (\pm 3)	-5,2 (\pm 0,1)	-5,9 (\pm 0,7)	-0,69 (\pm 0,08)
288,15	52 (\pm 4)	-6,3 (\pm 0,1)	-5,6 (\pm 0,4)	+0,64 (\pm 0,01)
293,15	62 (\pm 8)	-7,6 (\pm 0,3)	-5,6 (\pm 0,7)	+1,94 (\pm 0,25)
298,15	81 (\pm 7)	-9,3 (\pm 0,2)	-5,6 (\pm 0,5)	+3,7 (\pm 0,3)
303,15	108 (\pm 4)	-13,1 (\pm 0,2)	-5,5 (\pm 0,2)	+7,6 (\pm 0,3)
310,15	205 (\pm 7)	-25,9 (\pm 0,4)	-5,2 (\pm 0,2)	+20,7 (\pm 0,7)
dCMP				
283,15	70 (\pm 8)	-4,3 (\pm 0,1)	-5,4 (\pm 0,6)	-1,39 (\pm 0,1)
288,15	60 (\pm 5)	-5,0 (\pm 0,1)	-5,6 (\pm 0,4)	-0,56 (\pm 0,04)
298,15	72 (\pm 2)	-6,7 (\pm 0,1)	-5,6 (\pm 0,1)	+1,14 (\pm 0,02)
303,15	74 (\pm 2)	-7,96 (\pm 0,07)	-5,7 (\pm 0,1)	+2,23 (\pm 0,06)
310,15	111 (\pm 6)	-10,2 (\pm 0,2)	-5,6 (\pm 0,4)	+4,6 (\pm 0,3)
AraCMP				
293,15	26 (\pm 6)	-4,9 (\pm 0,2)	-6 (\pm 1)	-1,3 (\pm 0,3)
298,15	29 (\pm 10)	-5,1 (\pm 0,4)	-6 (\pm 2)	-1,1 (\pm 0,4)
303,15	36 (\pm 9)	-6,6 (\pm 0,4)	-6 (\pm 2)	+0,5 (\pm 0,1)
310,15	92 (\pm 5)	-14,1 (\pm 0,3)	-5,7 (\pm 0,3)	+8,4 (\pm 0,4)

Nota: O K_d representa a constante de dissociação em equilíbrio, $\Delta H^{\circ}_{\text{obs}}$ é a entalpia de ligação observada, $\Delta S^{\circ}_{\text{obs}}$ é a entropia de ligação observada, $\Delta G^{\circ}_{\text{obs}}$ é a energia livre de Gibbs observada e $-T\Delta S^{\circ}_{\text{obs}}$ é o termo negativo da temperatura (em Kelvin) multiplicando a entropia de ligação observada.

Figura 4. Representação gráfica dos valores de ΔH^0_{obs} versus a temperatura para a ligação do CMP, dCMP e AraCMP à MtCMK



Nota: (■): CMP; (●): dCMP e (▲): AraCMP. No gráfico inserido, os dados foram adequados a Equação 2 e a linha contínua representa a regressão linear resultante dos dados. A linearidade do ΔC_p é perdida em temperaturas acima de 25 °C (298 K) para o CMP e acima de 30 °C (303 K) para o dCMP e o AraCMP. Fonte: O autor, 2013.

A dependência de ΔH^0_{obs} em função da temperatura é uma importante propriedade termodinâmica representativa das interações intermoleculares visto que, a variação na capacidade calorífica de uma interação (ΔC_p) pode ser relacionada com a mudança na área acessível ao solvente durante a formação do complexo binário (88). É uma prática padrão obter o ΔC_p das reações de ligação a partir da inclinação da reta dada pela função linear dos dados da ΔH^0_{obs} versus a temperatura (89). Contudo, foi evitado obter estimativas do ΔC_p nas temperaturas mais elevadas (89, 90), uma vez que perturbações na estrutura da proteína, principalmente em temperaturas próximas a um ponto médio da temperatura de desnaturação (T_m) natural da proteína, podem contribuir para os valores de ΔC_p (91). Por exemplo, as proteínas CMKs de *E. coli* e de *B. subtilis* apresentam um T_m de ~48 °C (92). Contudo, uma estreita faixa de temperatura também tem sido utilizada para a obtenção do ΔC_p (89) como, por exemplo, para a timidina quinase do vírus herpes simples (HSV) tipo I – que apresenta um T_m de ~43 °C (90).

Os valores do ΔC_p foram obtidos na faixa de temperatura onde a relação entre ΔH^0_{obs} e a temperatura é linear (ΔC_p é independente da temperatura) e pela adequação dos dados a Equação 2 (gráfico inserido na **Fig. 4**). Deste modo, excluimos da regressão linear os pontos nas temperaturas acima de 25 °C (298 K), da análise para o CMP, e acima de 30 °C (303 K) para o

dCMP e o AraCMP. Na ausência desses pontos, a regressão linear forneceu estimativas semelhantes dos valores de ΔC_p durante a associação da *MtCMK* para o CMP $\Delta C_p = -0,27 (\pm 0,02)$ kcal mol⁻¹·K⁻¹; dCMP $\Delta C_p = -0,18 (\pm 0,01)$ kcal mol⁻¹·K⁻¹; e AraCMP $\Delta C_p = -0,18 (\pm 0,08)$ kcal mol⁻¹·K⁻¹.

Na faixa de temperatura utilizada para a obtenção do ΔC_p , o ΔG^0_{obs} permaneceu notavelmente insensível à temperatura por meio de (linear) uma compensação entálpica/entrópica. Este é um fenômeno onipresente visto em muitas reações de associação e acredita-se que está relacionada diretamente com o papel das moléculas de água do solvente no processo de associação (93). De acordo com as leis da termodinâmica, a dependência do ΔH^0_{obs} e ΔS^0_{obs} com a temperatura são oriundas de mudanças substanciais da capacidade térmica. Em quase todos os processos de associação com proteínas, o ΔC_p tem um sinal negativo se os componentes livres estão no estado de referência (90, 94). Além disso, o ΔG^0_{obs} é considerado o parâmetro termodinâmico mais importante para determinar a estabilidade de qualquer complexo proteína-ligante (95). Contudo, estas observações sugerem na faixa de temperatura utilizada para a obtenção do ΔC_p , o ΔH^0_{obs} e o ΔC_p genuinamente refletem a específica formação do complexo binário (90). É importante salientar que, mesmo quando os valores de ΔC_p não podem ser obtidos a partir dos dados de ITC em temperaturas maiores, não há problema em obter valores precisos das ΔH^0_{obs} nestas temperaturas. Na verdade, as entalpias de ligação, quando obtidas na temperatura de ~35 °C são mais significativas para os biólogos do que as entalpias de ligação a 25 °C, uma vez que 35 °C é próximo à temperatura fisiológica (89).

De modo geral, a mudança na área de superfície acessível ao solvente (ΔASA) é determinada pela diferença entre o estado final e o estado inicial da ASA. Para um processo de interação molecular, isto representa a diferença entre a ASA do complexo e a soma da ASA da macromolécula e do ligante, o que resulta em valores negativos de ΔASA . A ΔASA é subdividida em contribuições não-polares e polares, para definir quais os átomos que fazem parte da superfície (95). Contudo, para fornecer uma conexão entre o parâmetro termodinâmico ΔC_p e as contribuições da hidratação/desidratação dos grupos da proteína (polares e não polares) entre o estado inicial e final da *MtCMK* durante a associação com os ligantes, deverão ser realizados estudos da estrutura tridimensional da *MtCMK*. Enquanto isso, a técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC), que realiza uma varredura da estabilidade térmica da proteína,

poderia ser utilizada para examinar a fase de transição na proteína (obter o T_m) (88) e, se qualquer processo de transição já estaria presente em temperaturas entre 30 °C e 37 °C (89).

CAPÍTULO IV

Considerações finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenho racional de novos agentes com atividade anti-TB inclui esforços para o entendimento funcional e estrutural de enzimas alvo. Deste modo, a análise mecanística do alvo deve ser sempre uma prioridade nos programas de descoberta de novas drogas que possui como objetivo, a busca pelo desenho racional de potentes inibidores enzimáticos. Além disso, a técnica de ITC tem sido usada como importante ferramenta para a determinação direta de parâmetros termodinâmicos e cinéticos de reações enzimáticas (96).

A importância da caracterização da *MtCMK* advém do fato que ela pode representar um possível alvo para o desenvolvimento de drogas anti-TB, devido a divergência na estrutura primária e na especificidade pelo substrato em relação à UMP/CMP-quinase humana. Além disso, resultados obtidos por meio de caracterização fenotípica global de alta resolução, permitiram aos autores propor a essencialidade do gene *cmk* para o crescimento *in vitro* do bacilo em meio contendo glicerol e colesterol (fontes de carbono críticas durante a infecção) (75).

O entendimento do modo de ação da *MtCMK*, assim como de outras enzimas envolvidas no metabolismo do bacilo, representa um passo importante para o desenho de inibidores com alvo definido, e com potencial aplicação terapêutica no tratamento da TB. Recentemente, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a bedaquilina, um inibidor da adenosina 5'-trifosfato sintase (ATP sintase) de *M. tuberculosis*, para o tratamento de pacientes adultos com MDR-TB (97).

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o AraCMP, receptor do grupamento fosforil que contém como componente açúcar a D-arabinose, é um substrato para a *MtCMK*. No entanto, a molécula 2'-3'-didesoxi-citidina 5'-monofosfato (ddCMP) não é receptora do mesmo grupamento. Os estudos de velocidade inicial e os experimentos realizados através da técnica de ITC sugerem que a enzima segue um mecanismo cinético sequencial aleatório para ligação dos substratos e que a liberação dos produtos ocorre de forma ordenada, onde o ADP é liberado, seguido pela dissociação do CDP. A partir dos experimentos de ITC também se pôde demonstrar que o processo termodinâmico de ligação do CMP e do CDP foi caracterizado por uma entalpia de ligação favorável e contribuições entrópicas desfavoráveis, enquanto que, a ligação do ATP foi caracterizada por uma entalpia de ligação favorável e pequenas mudanças favoráveis da entropia. Os dados de ITC relacionados aos processos termodinâmicos de ligação do CMP, dCMP e AraCMP à *MtCMK*, demonstraram valores similares para as constantes de

dissociação destes ligantes. Baseando-se nos dados de cinética em estado estacionário e nos experimentos de ITC, foi proposto um papel para a estereoquímica do grupo 2'-OH da pentose na catálise. Adicionalmente, nenhuma atividade da enzima *MtCMK* foi detectada com a molécula ddCMP, sugerindo um papel do grupo 3'-OH da pentose na ligação e/ou catálise.

Os experimentos de ITC direcionados a investigação das contribuições nas medidas calorimétricas oriundas da associação de prótons durante a formação dos complexos binários, indicam que há um ganho líquido de prótons em valores de pH próximos ao fisiológico. Tal resultado permite propor que este evento de protonação vem auxiliar na orientação do grupamento hidroxila do fosfato α do receptor do grupamento fosforil para o ataque nucleofílico do fosfato γ do ATP. Além disso, o Asp187 da *MtCMK* é sugerido como provável candidato para o evento de protonação. Por conseguinte, os valores de pK_a de 5,5, 5,6 e 6,1 foram calculados utilizando o aspartato como uma provável fonte do evento de associação de prótons de um grupo ionizável da proteína referentes aos complexos binários formados, com o CMP, dCMP ou AraCMP, respectivamente.

A comparação entre as estruturas cristalográficas da CMK de *E. coli* e a modelagem molecular da *MtCMK*, em conjunto com a análise das estruturas primárias realizada por meio de alinhamento de sequências, permitiu propor quais são as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação do substrato receptor de grupamento fosforil. O alinhamento das sequências de aminoácidos também permitiu discutir quais resíduos são conservados entre as CMKs dos procariotos e não são conservados na UMP/CMP-quinase humana, e tais diferenças podem auxiliar no desenho de inibidores específicos da atividade da enzima *MtCMK*.

Adicionalmente, nos experimentos de ITC direcionados a determinação da variação da capacidade calorífica (ΔC_p) foram estimados valores semelhantes para este parâmetro termodinâmico durante a formação dos complexos binários *MtCMK*:CMP, *MtCMK*:dCMP, *MtCMK*:AraCMP.

REFERÊNCIAS

1. Ducati RG, Ruffino-Netto A, Basso LA, Santos DS. The resumption of consumption - a review on tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(7):697-714.
2. Taylor GM, Stewart GR, Cooke M, Chaplin S, Ladva S, Kirkup J, et al. Koch's bacillus - a look at the first isolate of *Mycobacterium tuberculosis* from a modern perspective. *Microbiology*. 2003;149(Pt 11):3213-20.
3. Kaufmann SH. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. *Trends Immunol*. 2005;26(12):660-7.
4. Lienhardt C, Glaziou P, Uplekar M, Lonnroth K, Getahun H, Raviglione M. Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(6):407-16.
5. Jarlier V, Nikaido H. Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;123(1-2):11-8.
6. Vilcheze C, Jacobs WR, Jr. The mechanism of isoniazid killing: clarity through the scope of genetics. *Annu Rev Microbiol*. 2007;61:35-50.
7. Bloom BR, Murray CJ. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science*. 1992;257(5073):1055-64.
8. Marcus B, Conde GMS, Afranio L. Kritski. *Tuberculose sem medo*. 1 ed. São Paulo: Atheneu; 2002.
9. Mark Doherty T. New vaccines against tuberculosis. *Trop Med Int Health*. 2004;9(7):818-26.
10. WHO. World Health Organization. *Global Tuberculosis Control: WHO report 2011*. Geneva: WHO Press; 2011.
11. WHO. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2012*. Geneva: WHO Press; 2012.
12. Ducati RG, Breda A, Basso LA, Santos DS. Purine Salvage Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Med Chem*. 2011;18(9):1258-75.
13. Ministério da Saúde (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde. *Boletim Epidemiológico. Especial Tuberculose*. Brasília. 2012 Mar; (43): 1-12.
14. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *Jama*. 1999;282(7):677-86.

15. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*. 2004;430(6996):242-9.
16. Pasqualoto KF, Ferreira EI. An approach for the rational design of new antituberculosis agents. *Curr Drug Targets*. 2001;2(4):427-37.
17. Rustad TR, Sherrid AM, Minch KJ, Sherman DR. Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. *Cell Microbiol*. 2009;11(8):1151-9.
18. Ehlers S. Immunity to tuberculosis: a delicate balance between protection and pathology. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999;23(2):149-58.
19. Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Aug;2(8):569-77.
20. Selwyn PA, Hartel D, Lewis VA, Schoenbaum EE, Vermund SH, Klein RS, et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1989;320(9):545-50.
21. Vynnycky E, Fine PE. The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. *Epidemiol Infect*. 1997;119(2):183-201.
22. Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol*. 1998;6(3):107-12.
23. Taming tuberculosis -- again. *Nat Struct Biol*. 2000;7(2):87-8.
24. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Hesseling AC, Obihara CC, Nelson LJ, et al. The clinical epidemiology of childhood pulmonary tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2004;8(3):278-85.
25. Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet*. 1999;353(9151):444-9.
26. Hernandez-Garduno E, Cook V, Kunimoto D, Elwood RK, Black WA, FitzGerald JM. Transmission of tuberculosis from smear negative patients: a molecular epidemiology study. *Thorax*. 2004;59(4):286-90.
27. Dye C, Floyd K. Tuberculosis. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, et al., editors. *Disease Control Priorities in Developing Countries*. Washington: The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank Group; 2006. New York: Oxford University Press, 2006.
28. Daniel TM. *Captain of Death: The Story of Tuberculosis*. New York: University of Rochester Press; 1997.

29. Marsico GA. Tratamento cirúrgico da tuberculose pulmonar. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2006;5(2):107-11.
30. Kir A, Tahaoglu K, Okur E, Hatipoglu T. Role of surgery in multi-drug-resistant tuberculosis: results of 27 cases. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1997;12(4):531-4.
31. Mitchison DA. The Garrod Lecture. Understanding the chemotherapy of tuberculosis--current problems. *J Antimicrob Chemother*. 1992;29(5):477-93.
32. WHO. World Health Organization. The global plan to stop TB 2011-2015: transforming the fight towards elimination of tuberculosis. Geneva: WHO Press; 2010.
33. WHO. World Health Organization. Treatment of Tuberculosis: Guidelines. Geneva: WHO Press; 2010.
34. Gilman AG, Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica: McGraw-Hill; 2003.
35. Hafner R, Cohn JA, Wright DJ, Dunlap NE, Egorin MJ, Enama ME, et al. Early bactericidal activity of isoniazid in pulmonary tuberculosis. Optimization of methodology. The DATRI 008 Study Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(3 Pt 1):918-23.
36. Jindani A, Aber VR, Edwards EA, Mitchison DA. The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1980;121(6):939-49.
37. Dickinson JM, Mitchison DA. Experimental models to explain the high sterilizing activity of rifampin in the chemotherapy of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis*. 1981;123(4 Pt 1):367-71.
38. Arbex MA, Varella MdCL, Siqueira HRd, Mello FAFd. Drogas antituberculose: interações medicamentosas, efeitos adversos e utilização em situações especiais - parte 1: fármacos de primeira linha. *J Bras Pneumol*. 2010;36:626-40.
39. Blumberg HM, Burman WJ, Chaisson RE, Daley CL, Etkind SC, Friedman LN, et al. American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America: treatment of tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):603-62.
40. IOM. Addressing the Threat of Drug-Resistant Tuberculosis: A Realistic Assessment of the Challenge: Workshop Summary. Washington: National Academies Press; 2009.
41. Mukherjee JS, Rich ML, Soccia AR, Joseph JK, Viru FA, Shin SS, et al. Programmes and principles in treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Lancet*. 2004;363(9407):474-81.
42. Frieden TR, Sherman LF, Maw KL, Fujiwara PI, Crawford JT, Nivin B, et al. A multi-institutional outbreak of highly drug-resistant tuberculosis: epidemiology and clinical outcomes. *JAMA*. 1996;276(15):1229-35.
43. Dorman SE, Chaisson RE. From magic bullets back to the magic mountain: the rise of

extensively drug-resistant tuberculosis. *Nat Med*. 2007;13(3):295-8.

44. Zumla A, Abubakar I, Raviglione M, Hoelscher M, Ditiu L, McHugh TD, et al. Drug-resistant tuberculosis--current dilemmas, unanswered questions, challenges, and priority needs. *J Infect Dis*. 2012;205 Suppl 2:S228-40.
45. Prasad R. Multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis management: Evidences and controversies. *Lung India*. 2012;29(2):154-9.
46. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with Extensive Resistance to Second-Line Drugs. Worldwide, 2000 – 2004. *MMWR* [Internet]. 2006; 55:[301-5 pp.].
47. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Revised Definition of Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *MMWR* [Internet]. 2006; 55:[1176 p.].
48. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response [Internet]. 2010.
49. Velayati AA, Masjedi MR, Farnia P, Tabarsi P, Ghanavi J, Ziazarifi AH, et al. Emergence of new forms of totally drug-resistant tuberculosis bacilli: super extensively drug-resistant tuberculosis or totally drug-resistant strains in iran. *Chest*. 2009;136(2):420-5.
50. Chandra N, Kumar D, Rao K. Systems biology of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011;91(5):487-96.
51. Lashley FR, Durham JD. *Emerging Infectious Diseases: Trends and Issues*, 2nd ed. New York: Springer Publishing Company; 2007.
52. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Managing Drug Interactions in the Treatment of HIV-Related Tuberculosis [Internet]. 2007.
53. Brennan PJ. Tuberculosis in the context of emerging and reemerging diseases. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1997;18(4):263-9.
54. Hu Y, Hoffner S, Jiang W, Wang W, Xu B. Extensive transmission of isoniazid resistant *M. tuberculosis* and its association with increased multidrug-resistant TB in two rural counties of eastern China: a molecular epidemiological study. *BMC Infect Dis*. 2010;10:43.
55. Villela AD, Sanchez-Quitian ZA, Ducati RG, Santos DS, Basso LA. Pyrimidine salvage pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Med Chem*. 2011;18(9):1286-98.
56. Spigelman M, Gillespie S. Tuberculosis drug development pipeline: progress and hope. *Lancet*. 2006;367(9514):945-7.
57. O'Donovan GA, Neuhard J. Pyrimidine metabolism in microorganisms. *Bacteriol Rev*. 1970;34(3):278-343.

58. Islam MR, Kim H, Kang SW, Kim JS, Jeong YM, Hwang HJ, et al. Functional characterization of a gene encoding a dual domain for uridine kinase and uracil phosphoribosyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. 2007;63(4):465-77.
59. Moffatt BA, Ashihara H. Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arabidopsis Book*. 2002;1:e0018.
60. Voet D, Voet JG. *Bioquímica*. 3 ed. Porto Alegre: Artmed; 2006. 1596 p.
61. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393(6685):537-44.
62. Parker WB, Long MC. Purine metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* as a target for drug development. *Curr Pharm Des*. 2007;13(6):599-608.
63. Golan DE. *Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
64. Elion GB. Mechanism of action and selectivity of acyclovir. *Am J Med*. 1982;73(1a):7-13.
65. Familiar O, Munier-Lehmann H, Negri A, Gago F, Douguet D, Rigouts L, et al. Exploring acyclic nucleoside analogues as inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* thymidylate kinase. *Chem Med Chem*. 2008;3(7):1083-93.
66. Bertrand T, Briozzo P, Assairi L, Ofiteru A, Bucurenci N, Munier-Lehmann H, et al. Sugar specificity of bacterial CMP kinases as revealed by crystal structures and mutagenesis of *Escherichia coli* enzyme. *J Mol Biol*. 2002;315(5):1099-110.
67. Briozzo P, Golinelli-Pimpaneau B, Gilles AM, Gaucher JF, Burlacu-Miron S, Sakamoto H, et al. 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(12):1517-27.
68. Yan H, Tsai MD. Nucleoside monophosphate kinases: structure, mechanism, and substrate specificity. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1999;73:103-34.
69. Fricke J, Neuhard J, Kelln RA, Pedersen S. 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*. 1995;177(3):517-23.
70. Yu L, Mack J, Hajduk PJ, Kakavas SJ, Saiki AY, Lerner CG, et al. Solution structure and function of an essential CMP kinase of *Streptococcus pneumoniae*. *Protein Sci*. 2003;12(11):2613-21.

71. Sorokin A, Serror P, Pujic P, Azevedo V, Ehrlich SD. The *Bacillus subtilis* chromosome region encoding homologues of the *Escherichia coli* mssA and rpsA gene products. *Microbiology*. 1995;141 (Pt 2):311-9.
72. Thum C, Schneider CZ, Palma MS, Santos DS, Basso LA. The Rv1712 Locus from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv codes for a functional CMP kinase that preferentially phosphorylates dCMP. *J Bacteriol*. 2009;191(8):2884-7.
73. Rostirolla DC, Breda A, Rosado LA, Palma MS, Basso LA, Santos DS. UMP kinase from *Mycobacterium tuberculosis*: Mode of action and allosteric interactions, and their likely role in pyrimidine metabolism regulation. *Arch Biochem Biophys*. 2011;505(2):202-12.
74. Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol*. 2003;48(1):77-84.
75. Griffin JE, Gawronski JD, Dejesus MA, Ioerger TR, Akerley BJ, Sasseti CM. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. *PLoS Pathog*. 2011;7(9):e1002251.
76. Beck CF, Neuhard J, Thomassen E, Ingraham JL, Kleker E. *Salmonella typhimurium* mutants defective in cytidine monophosphate kinase (*cmk*). *J Bacteriol*. 1974;120(3):1370-9.
77. Bucurenci N, Sakamoto H, Briozzo P, Palibroda N, Serina L, Sarfati RS, et al. CMP kinase from *Escherichia coli* is structurally related to other nucleoside monophosphate kinases. *J Biol Chem*. 1996;271(5):2856-62.
78. Carpousis AJ, Van Houwe G, Ehretsmann C, Krisch HM. Copurification of *E. coli* RNAase E and PNPase: evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. *Cell*. 1994;76(5):889-900.
79. Py B, Causton H, Mudd EA, Higgins CF. A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1994;14(4):717-29.
80. Caceres RA, Macedo Timmers LF, Vivan AL, Schneider CZ, Basso LA, Azevedo WF, Jr., et al. Molecular modeling and dynamics studies of cytidylate kinase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Mol Model*. 2008;14(5):427-34.
81. Dhaliwal B, Ren J, Lockyer M, Charles I, Hawkins AR, Stammers DK. Structure of *Staphylococcus aureus* cytidine monophosphate kinase in complex with cytidine 5'-monophosphate. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2006;62(Pt 8):710-5.
82. Ofiteru A, Bucurenci N, Alexov E, Bertrand T, Briozzo P, Munier-Lehmann H, et al. Structural and functional consequences of single amino acid substitutions in the pyrimidine base binding pocket of *Escherichia coli* CMP kinase. *Febs j*. 2007;274(13):3363-73.
83. Pelicic V, Reyrat JM, Gicquel B. Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol*. 1998;28(3):413-20.

84. El Kouni MH. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacol Ther.* 2003;99(3):283-309.
85. Balganesch TS, Alzari PM, Cole ST. Rising standards for tuberculosis drug development. *Trends Pharmacol Sci.* 2008;29(11):576-81.
86. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
87. Blondin C, Serina L, Wiesmuller L, Gilles AM, Barzu O. Improved spectrophotometric assay of nucleoside monophosphate kinase activity using the pyruvate kinase/lactate dehydrogenase coupling system. *Anal Biochem.* 1994;220(1):219-21.
88. Ladbury JE, Chowdhry BZ. *Biocalorimetry: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*; Wiley; 1998.
89. Wintrode PL, Privalov PL. Energetics of target peptide recognition by calmodulin: a calorimetric study. *J Mol Biol.* 1997;266(5):1050-62.
90. Perozzo R, Jelesarov I, Bosshard HR, Folkers G, Scapozza L. Compulsory order of substrate binding to herpes simplex virus type 1 thymidine kinase. A calorimetric study. *J Biol Chem.* 2000;275(21):16139-45.
91. Jung HI, Bowden SJ, Cooper A, Perham RN. Thermodynamic analysis of the binding of component enzymes in the assembly of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Bacillus stearothermophilus*. *Protein Sci.* 2002;11(5):1091-100.
92. Schultz CP, Ylisastigui-Pons L, Serina L, Sakamoto H, Mantsch HH, Neuhard J, et al. Structural and catalytic properties of CMP kinase from *Bacillus subtilis*: a comparative analysis with the homologous enzyme from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* 1997;340(1):144-53.
93. Lumry R, Rajender S. Enthalpy-entropy compensation phenomena in water solutions of proteins and small molecules: a ubiquitous property of water. *Biopolymers.* 1970;9(10):1125-227.
94. Baker BM, Murphy KP. Prediction of binding energetics from structure using empirical parameterization. *Methods Enzymol.* 1998;295:294-315.
95. Perozzo R, Folkers G, Scapozza L. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J Recept Signal Transduct Res.* 2004;24(1-2):1-52.
96. Bianconi ML. Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions. *Biophys Chem.* 2007;126(1-3):59-64.
97. Cohen J. Infectious disease. Approval of novel TB drug celebrated--with restraint.

Science. 2013;339(6116):130.

ANEXO

CARTA DE ACEITE PARA A PUBLICAÇÃO DO MANUSCRITO “Kinetic mechanism and energetics of binding of phosphoryl group acceptors to *Mycobacterium tuberculosis* Cytidine Monophosphate Kinase” NO PERIÓDICO *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*

From: ees.yabbi.0.217e09.f1a62279@eesmail.elsevier.com [ees.yabbi.0.217e09.f1a62279@eesmail.elsevier.com] on behalf of ABB [abb@elsevier.com]
Sent: Monday, May 27, 2013 4:18 PM
To: Luiz Augusto Basso
Subject: Acceptance of ABBI-13-150R1

Ms. No.: ABBI-13-150R1
Title: Kinetic mechanism and energetics of binding of phosphoryl group acceptors to *Mycobacterium tuberculosis* Cytidine Monophosphate Kinase
Archives of Biochemistry and Biophysics

Dear Dr Basso,

Thank you for submitting your revised paper to Archives of Biochemistry and Biophysics. The review process has concluded, and I am pleased to inform you that your recently revised manuscript has been accepted for publication in Archives of Biochemistry and Biophysics.

The publisher has been notified of this decision, and you will receive confirmation from them shortly.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Sincerely,

Paul F. Fitzpatrick
Executive Editor
Archives of Biochemistry and Biophysics