

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Caracterização do gene *hisD* de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: clonagem, seqüenciamento, superexpressão e medidas de atividade enzimática do seu produto - a proteína histidinol desidrogenase**

**Rodrigo Gay Ducati**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre Genética e Biologia Molecular.

**Orientador: Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos**

**Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso**

Porto Alegre, março de 2005

Parte deste projeto foi desenvolvida no Laboratório do Grupo de Microbiologia Molecular e Funcional, Centro de Biotecnologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As etapas finais foram executadas no Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Este trabalho foi financiado com recursos do Instituto do Milênio - CNPq/MCT e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Beatriz de Leone Gay e Jorge Ricardo

Ducati, cientistas com quem sempre pude contar com o incentivo e apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Diógenes Santiago Santos, por me aceitar como estudante do grupo de pesquisa que lidera e me orientar tanto em nível de graduação como pós-graduação. Tenho extremo orgulho em fazer parte deste grupo científico, com notáveis condições de trabalho providas.

Agradeço igualmente ao Prof. Dr. Luiz Augusto Basso, não apenas pela orientação, mas principalmente por me ensinar a fazer ciência. Prestigio imensamente os laços de amizade construídos durante nosso convívio.

À Profa. Dra. Georgina Bond-Buckup, por me ensinar a dar os primeiros passos, firmes e seguros, dentro de um laboratório de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Giancarlo Pasquali, pela fundamental contribuição no seqüenciamento de amostras e por engrandecer meu conhecimento teórico nesta área.

À Clotilde Amorim Pinto, por me ensinar todas as etapas, básicas e fundamentais, que se fazem necessárias para desenvolver todo e qualquer projeto nesta área de trabalho.

Ao amigo e colega de mestrado Rafael Guimarães da Silva, cujo conhecimento e experiência prática se mostraram de grande valia na escolha do tema a ser desenvolvido.

Ao Jaim Oliveira, Isabel Fonseca, Diego Santos, Christopher Schneider, Maria de Lourdes Magalhães, Isabel Werlang, Clarissa Czekster e demais colegas pela amizade formada, irrestrita ao ambiente de trabalho.

Ao Elmo Cardoso e Ellen Oliveira, pelo exemplar profissionalismo e eficiência, ambos admiráveis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS pela oportunidade da realização desta etapa.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo e ao Instituto do Milênio - CNPq/MCT pelo importante apoio financeiro.

Ao meu irmão, Gabriel Gay Ducati, e à minha namorada, Laura de Oliveira Neis, pela amizade e companheirismo, cada qual da sua forma singular.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	13
RESUMO .....	14
ABSTRACT .....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Histórico .....	17
1.2. Ressurgimento e epidemiologia .....	21
1.3. Tuberculose: transmissão, infectividade e imunopatologia.....	23
1.4. O bacilo de Koch .....	26
1.4.1. A parede celular micobacteriana .....	28
1.4.2. Análise genômica .....	29
1.5. Latência e reativação .....	31
1.6. Tuberculose resistente a múltiplas drogas.....	32
1.7. O sinergismo entre TB e AIDS .....	33
1.8. Métodos de diagnóstico .....	35
1.9. Desenvolvimento de vacinas .....	36
1.10. Quimioterapia .....	38
1.11. A busca de alvos para o desenvolvimento de novas drogas.....	40
1.11.1. A via de biossíntese de histidina e a enzima histidinol desidrogenase.....	41
2. OBJETIVOS.....	45
2.1. Objetivo Geral .....	45
2.2. Objetivos Específicos .....	45
3. MANUSCRITO.....	46
4. DISCUSSÃO .....	74
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AIDS:** *acquired immune deficiency syndrome* (síndrome da imunodeficiência adquirida)

**BAAR:** bacilo álcool-ácido resistente

**BCG:** *bacilli Calmette-Guérin* (bacilo de Calmette e Guérin)

**Da:** Dalton

**DMSO:** *dimethyl sulfoxide* (dimetilsulfóxido)

**DOTS:** *directly observed treatment short-course* (terapia de curta duração de observação direta)

**HisD:** histidinol desidrogenase

**HIV:** *human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

**IPTG:** *isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside* (isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo)

**MDR-TB:** *multidrug-resistant tuberculosis* (tuberculose resistente a múltiplas drogas)

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PAGE:** *polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida)

**pb:** pares de bases

**PCR:** *polimerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

**PPD:** *purified protein derivate* (derivado purificado de proteína)

**SDS:** *sodium dodecyl sulphate* (dodecilsulfato de sódio)

**TB:** tuberculose

**Th:** *T helper* (T auxiliar)

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### Dissertação:

<b>Figura 1A-E.</b> Cinco pesquisadores que realizaram importantes descobertas sobre a TB..	13
<b>Figura 2A-C.</b> Representativas obras de arte da época de romantização da TB.....	14
<b>Figura 3.</b> Análise por microscopia eletrônica de bacilos do <i>M. tuberculosis</i> .....	22
<b>Figura 4.</b> Esquema ilustrativo da parede celular micobacteriana.....	23
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do genoma circular de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	25
<b>Figura 6.</b> Esquema ilustrativo da via de biossíntese de histidina.....	37
<b>Figura 7.</b> Equivalente à Figura 1 do manuscrito.....	64
<b>Figura 8.</b> Equivalente à Figura 2 do manuscrito.....	65
<b>Figura 9.</b> Equivalente à Figura 3 do manuscrito.....	66
<b>Figura 10.</b> Equivalente à Figura 4 do manuscrito.....	67
<b>Tabela 1.</b> Equivalente à Tabela 1 do manuscrito.....	68

### Manuscrito:

<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo da reação catalisada pela enzima histidinol desidrogenase	
<b>Figura 2.</b> Análise da amplificação do gene <i>hisD</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	
<b>Figura 3.</b> Análise da expressão da proteína histidinol desidrogenase recombinante	
<b>Figura 4.</b> Análise da dose dependência da enzima superexpressa em função do volume	
<b>Tabela 1.</b> Análise de atividade enzimática de HisD de <i>M. tuberculosis</i>	



## RESUMO

Dentre todas as doenças infecciosas que têm afligido a raça humana, a tuberculose (TB) continua sendo uma das mais letais, resistindo às tentativas da história da humanidade em derrotar a consumição. Atualmente, epidemiologistas estimam que um terço da população mundial esteja infectada pelo bacilo da TB, com uma taxa anual de 8 a 10 milhões de novos casos e 3 milhões de mortes. O aumento na prevalência da TB, a emergência de cepas resistentes a múltiplas drogas, e o efeito devastador da co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana levaram à urgente necessidade do desenvolvimento de novas e mais eficientes drogas anti-TB. Estas podem ser desenhadas baseadas em vias metabólicas essenciais ao patógeno e ausentes em seu hospedeiro; este é o caso da via de biossíntese de histidina, que está ausente em mamíferos e é comprovadamente essencial em micobactérias. Mais especificamente, demonstrou-se experimentalmente que o nocauteamento por recombinação homóloga do gene *hisD* de *Mycobacterium tuberculosis*, codificante da enzima L-histidinol desidrogenase (HisD), gerou mutantes auxotróficos para histidina completamente inviáveis, comprovando sua essencialidade para sobrevivência. Visto que as enzimas codificantes desta via podem representar alvos atrativos para o desenvolvimento de agentes anti-TB, o gene *hisD* de *M. tuberculosis* H37Rv foi amplificado, clonado e seqüenciado, e a proteína recombinante foi superexpressa na forma solúvel em *Escherichia coli* BL21(DE3). Os resultados aqui apresentados validam *hisD* como o gene estrutural codificante da enzima HisD em *M. tuberculosis*, sendo um passo crucial em direção à purificação da proteína recombinante de forma a prover material para estudos estruturais e cinéticos, visando o desenho racional de novos agentes anti-TB.

## ABSTRACT

Among all infectious diseases that have afflicted the human race, tuberculosis (TB) remains one of the deadliest, resisting through the historic attempts of humanity on defeating consumption. At present, epidemiologist estimate that one-third of the world population is infected by the tubercle bacilli, with an annual rate of 8 to 10 million new cases and 3 million deaths. The increasing prevalence of TB, the emergence of multidrug-resistant strains, and the devastating effect of the human immunodeficiency virus co-infection have led to an urgent need for the development of new and more efficient anti-TB drugs. They can be designed based on metabolic pathways which are essential for the pathogen and absent in its host; that is the case for the histidine biosynthetic pathway, which is absent in mammals and has been proved to be essential in mycobacteria. More precisely, experimental data has demonstrated that the disruption of *Mycobacterium tuberculosis* L-histidinol dehydrogenase *hisD*-encoding gene by homologous recombination resulted in unviable histidine auxotrophic mutants, proving its essentiality for survival. Since the coding enzymes of this pathway may represent attractive targets for the design of anti-TB agents, the *hisD* gene from *M. tuberculosis* H37Rv was amplified, cloned and sequenced, and the recombinant protein was superexpressed in the soluble form in *Escherichia coli* BL21(DE3). The results reported here validate *hisD* as the structural gene coding for histidinol dehydrogenase in *M. tuberculosis*, which is a crucial step towards purification of recombinant protein to provide material for structural and kinetic studies, aiming at the rational design of new anti-TB agents.

## 1. INTRODUÇÃO

"There is a dread disease which so prepares its victim, as it were, for death; which so refines it of its grosser aspect, and throws around familiar looks, unearthly indications of the coming change - dread disease, in which the struggle between soul and body is so gradual, quiet, and solemn, and the result so sure, that day by day, and grain by grain, the mortal part wastes and withers away, so that the spirit grows light and sanguine with its lightening load, and, feeling immortality at hand, deems it but a new term of mortal life; a disease in which death takes the glow and hue of life, and life the gaunt and grisly form of death; a disease which medicine never cured, wealth warded off, or poverty could boast exemption from; which sometimes moves in giant strides, and sometimes at tardy pace; but, slow or quick, is ever sure and certain", Charles Dickens, 1870, *in* Nicholas Nickleby, Wiendenfeld and Nicholson, London p.243.

A tuberculose humana (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, uma bactéria patogênica aeróbica que estabelece sua infecção preferencialmente em macrófagos alveolares do sistema pulmonar. O desenvolvimento da doença é fundamentalmente regulado pela integridade do sistema imune do hospedeiro, que pode determinar a imediata eliminação do microrganismo, ou mesmo condicioná-lo a um estado de latência. A incapacidade imunológica em conter a evolução da infecção primária provê ao patógeno condições ideais de crescimento, de forma que este, por sua vez, passa a desencadear, conseqüentemente, a doença ativa em seu hospedeiro.

Esta doença tem acompanhado e afligido a humanidade ao longo de séculos de sua história, sendo responsável pela morte de milhões de pessoas, devido principalmente à carência de métodos adequados para o tratamento de enfermos. Apesar de a TB ter sido considerada erradicada a partir da segunda metade do século XX, devido à introdução de drogas para combater o patógeno e vacinas para prevenir o estabelecimento de sua infecção, reconhece-se hoje que esta doença é responsável pela maior parte das mortes humanas causadas por um único agente infeccioso. A ressurgência desta doença em países desenvolvidos se deve a fatores essencialmente antrópicos, como a recente pandemia de

HIV/AIDS e o desenvolvimento de linhagens resistentes a drogas, resultantes de tratamentos inapropriados e/ou ineficientes.

Desta forma, faz-se necessário um maior investimento na pesquisa, de maneira a controlar a doença a partir do desenvolvimento de novas drogas a serem introduzidas no tratamento de pacientes com TB ativa, e da otimização de vacinas de ação profilática ou mesmo terapêutica, de forma a atuar especificamente contra o bacilo causador da TB.

### 1.1. Histórico

*"The captain of all these men of death that came against him to take him away, was the consumption, for it was that brought him down to the grave", John Bunyan, 1680, in The Life and Death of Mr. Badman, Dent, London, 1928, p.282.*

A partir da segunda metade do século XVII, a grande peste branca conquistou o título de “capitã de todas as mortes humanas” por John Bunyan, quando esta já atingia substanciais índices de mortalidade no continente europeu. A mesma doença que dizimou populações no final do século XIX e início do século XX, é hoje a principal infecção causadora de mortes em adultos no mundo devido a um único agente patogênico (DANIEL, 1997). Apesar de ter sido provavelmente descrita pela primeira vez em textos indianos, a TB pulmonar é conhecida desde os tempos de Hipócrates como tísica, termo de origem grega utilizado para referir-se ao enfraquecimento ou desgaste corpóreo (CASTIGLIONI, 1993). O efeito devastador desta patologia tem sido acompanhado durante séculos pela humanidade, ao longo dos quais serviu de inspiração para a realização de fantásticas descobertas científicas e para a produção de magníficas obras de arte.

Em 1680, o pesquisador francês Franciscus Sylvius (Figura 1A) realizou estudos anátomo-patológicos da doença em nódulos pulmonares de vítimas de TB, aos quais

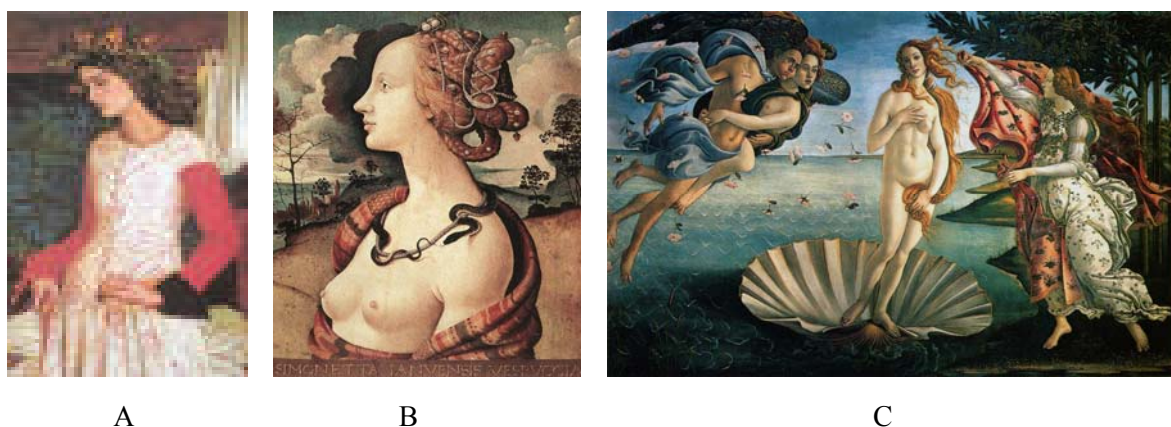
denominou de tubérculos (origem do nome da doença), observando sua evolução para úlceras pulmonares. Muitos dos grandes patologistas da época acreditavam se tratarem de tumores ou glândulas anormais, descartando qualquer possível origem infecciosa. Entretanto, a primeira especulação confiável quanto à sua natureza infecciosa foi inferida somente 42 anos mais tarde, quando o médico britânico Benjamin Marten propôs que a TB seria transmitida pela exalação de uma pessoa doente, sendo subsequente inalação por uma pessoa sadia, tornando-a então doente (CASTIGLIONI, 1993). Finalmente, em 1865, o cirurgião militar francês Jean-Antoine Villemin (Figura 1C) demonstrou formalmente a propriedade infecto-contagiosa da doença em modelos animais. Apesar desta demonstração científica, estes resultados experimentais foram ignorados por seus colegas durante muitos anos (VILLEMIN, 1865).



**Figura 1.** Cinco pesquisadores que realizaram importantes descobertas sobre a TB, em ordem cronológica, respectivamente. A. Franciscus Sylvius - 1680; B. Richard Morton - 1689; C. Jean-Antoine Villemin - 1865; D. Robert Koch - 1882; E. Albert Calmette - 1908/1921.

Com a doença definitivamente estabelecida entre todas as classes de cidadãos europeus e afligindo muitos dos intelectuais e artistas do continente na metade do século

XIX, a TB viveu uma época de “romantização”, quando sintomas enfêrmicos clássicos, como a esqualidez e palidez passaram a ser considerados sinais de beleza e status (DANIEL, 1997); esta renovação conceitual foi claramente retratada em pinturas da época, como na obra de William Morris (Figura 2A), que esboça toda a beleza da lendária Guinevere, esposa do Rei Arthur, que já apresentava os sintomas iniciais da doença. Outro famoso exemplo é o da bela e jovem Simonetta Vespucci (Figura 2B), vitimada pela TB ainda aos 23 anos, após ter posado para Sandro Botticelli; o artista se inspirou na modelo, produzindo uma de suas obras mais célebres, de caráter profano e mitológico, O nascimento de Vênus (Figura 2C), onde a retrata sobre uma concha, emergindo da espuma do mar, para simbolizar o nascimento da beleza a partir do nu feminino.



**Figura 2.** Representativas obras de arte da época de romantização da TB. A. Guinevere, de William Morris; B. Simonetta Vespucci; C. O nascimento de Vênus, de Sandro Botticelli.

Um dos trabalhos de maior prestígio na pesquisa sobre a TB foi realizado por um dos grandes cientistas do século XIX, o médico e bacteriologista alemão Robert Koch (Figura 1D), que conseguiu isolar e cultivar *M. tuberculosis*, identificando-o como o

agente etiológico da doença no ano de 1882 (KOCH, 1882). Oito anos de dedicação à pesquisa experimental resultaram, em 1890, na produção de um filtrado de cultura denominado tuberculina, para o qual atribuiu propriedades de cura da doença; entretanto, seu otimismo exagerado o condenou a uma profunda frustração, da qual nunca viria a se recuperar. Alguns anos mais tarde, após ser parcialmente purificado, este mesmo filtrado tornou-se a principal ferramenta utilizada no diagnóstico deste tipo de infecção, sendo atualmente conhecido como teste dermatológico de reatividade à tuberculina, a partir do derivado purificado de proteína (PPD) (DANIEL, 1997).

Em 1896, o bacteriologista americano Theobald Smith demonstrou que a tuberculose bovina não parecia ser causada pelo *M. tuberculosis*, mas por uma outra espécie micobacteriana, *M. bovis* (DANIEL, 1997). Em 1908, o casal Albert Calmette (Figura 1E) e Camille Guérin isolou esta variante de tubérculos bovinos e a cultivou experimentalmente. A análise da 39<sup>a</sup> geração revelou a existência de uma variante morfológica avirulenta em modelos animais, e que os imunizava a desafios contra *M. tuberculosis*. Treze anos de pesquisa possibilitaram a obtenção da 231<sup>a</sup> geração, a qual foi administrada pela primeira vez como vacina em humanos para imunizar uma criança cuja mãe havia morrido durante o parto, vítima de TB (CALMETTE, 1927). Esta vacina, posteriormente denominada de bacilo de Calmette e Guérin (BCG), passou a ser utilizada mundialmente no combate à TB, a partir da administração infantil profilática de bacilos atenuados vivos (DANIEL, 1997).

A partir da descoberta do bacilo de Koch, instituir-se-iam diversas terapias visando o tratamento de tuberculosos. Uma das primeiras investidas em combater a doença foi realizada em 1884 por Edward Livingston Trudeau, que, após se recuperar da doença, estabeleceu o primeiro sanatório norte-americano, baseado no descanso, ar fresco e dieta

equilibrada. Visto que os índices de recuperação jamais foram representativos, fez-se necessária a descoberta de drogas terapêuticas. A introdução de antibióticos como estreptomicina, isoniazida e ácido para-amino-salicílico revolucionaram a quimioterapia contra a doença ativa, reduzindo consideravelmente a mortalidade por TB. Posteriormente, surgiram outras drogas, como etambutol e rifampicina (BLOOM & MURRAY, 1992; DANIEL, 1997).

## **1.2. Ressurgimento e epidemiologia**

No ano de 1993, a TB foi declarada uma questão de urgência à saúde pública global pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo a única doença a receber esta designação até então. No entanto, a mesma pôde ser considerada reemergente apenas em alguns países desenvolvidos (europeus e norte americanos), visto que esta constitui um problema presente a longo prazo em nações subdesenvolvidas como o Brasil (RUFFINO-NETTO, 2002). Seu gradual ressurgimento em países desenvolvidos se deve principalmente a fatores como: o aumento na incidência de cepas resistentes a drogas; a epidemia de HIV/AIDS surgida no início da década de 1980; a baixa adesão dos pacientes ao tratamento; o aumento no número de usuários de drogas injetáveis; mudanças na estrutura social; o aumento no número de imigrantes oriundos de países com uma alta prevalência da doença; o envelhecimento da população mundial; o aumento do número de ambientes de aglomeração humana (prisões, hospitais e asilos), onde o bacilo é facilmente transmitido; e a deterioração dos sistemas de saúde (FÄTKENHEUER *et al.*, 1999; BLOOM & MURRAY, 1992).



Apesar de terem sido criados hospitais e instituídas quimioterapias para o combate à TB, que reduziram consideravelmente sua incidência em países de primeiro mundo, dados históricos calculados pela OMS indicam que estes esforços não têm surtido grandes efeitos no problema global desde a época de Koch (BLOOM & MURRAY, 1992). Atualmente, a doença é responsável pela maior parte da mortalidade humana causada por um único agente infeccioso, representando 26% das mortes possíveis de se prevenir e 7% de todas as mortes no mundo (ENARSON & MURRAY, 1996). Dados epidemiológicos baseados em testes dermatológicos de reatividade à tuberculina indicam que aproximadamente um terço da população mundial esteja infectada com *M. tuberculosis*, estando sob risco de desenvolverem a doença; e estima-se que ocorram cerca de 8 a 10 milhões de novos casos e 3 milhões de mortes anualmente, atingindo principalmente os adultos mais jovens e economicamente produtivos (ENARSON & MURRAY, 1996). Segundo a OMS, a TB vitima mais pessoas que a malária e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) juntas, sendo responsável pela morte de 100.000 crianças anualmente. Espera-se mais de 1 bilhão de novos casos de infecção para as duas próximas décadas deste milênio, dos quais 200 milhões virão a desenvolver a doença, e 70 milhões morrerão de TB, caso o controle não seja reforçado (PASQUALOTO & FERREIRA, 2001).

A TB apresenta-se, até certo ponto, sob controle em países como Japão e Estados Unidos, mas prolifera-se descontroladamente no sudeste da Ásia, África e partes da região do Pacífico, principalmente em função das complicações geradas pela epidemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pela geração de cepas resistentes a drogas (BRENNAN, 1997). Estudos econômico-geográficos demonstraram que cerca de 95% dos casos de TB ocorrem em países em desenvolvimento (ou subdesenvolvidos), para os quais atribuem-se

98% dos óbitos mundiais causados pela doença (WHO, 1998), reflexos trágicos de uma realidade em que poucos recursos estão disponíveis para garantir um tratamento adequado e onde a infecção pelo HIV pode ser comum (YOUNG, 1998). Segundo a relação da OMS de 1998, o Brasil já alcançou o décimo terceiro lugar dentre 22 países onde a TB apresenta-se mais disseminada (RUFFINO-NETTO, 2002). Atualmente, a tuberculose resistente a múltiplas drogas (MDR-TB) apresenta alta incidência, de forma crescente, na Letônia, Índia, Estônia, República Dominicana e Argentina, e baixa incidência na maioria dos países da Europa Ocidental, África e América do Norte (FÄTKENHEUER *et al.*, 1999), e estima-se que cerca de 50 milhões de pessoas estejam infectadas pela cepa multi-resistente (PASQUALOTO & FERREIRA, 2001). A presença de linhagens resistentes está diretamente relacionada à disponibilidade de medicamentos para combater a doença e inversamente relacionada à eficácia do tratamento. A partir de um projeto global de vigilância de MDR-TB, realizado em 35 países, demonstrou-se que, durante o período de 1994 a 1997, todas as regiões analisadas apresentavam cepas resistentes a pelo menos uma das drogas anti-TB, sendo geralmente a isoniazida ou estreptomicina, o que revela a doença como um problema global (PABLOS-MENDEZ *et al.*, 1998).

### **1.3. Tuberculose: transmissão, infectividade e imunopatologia**

A TB é uma doença infecto-contagiosa causada por algumas micobactérias do “complexo *M. tuberculosis*”, sendo transmitida principalmente por meio de partículas infectivas. A tosse de pacientes com a doença ativa, que caracteriza o sintoma de inflamação pulmonar crônica, constitui o principal mecanismo de disseminação do organismo para novos (e susceptíveis) hospedeiros (GLICKMAN & JACOBS, 2001).

Estas partículas, resultantes da formação de aerossóis de secreções respiratórias, são propelidas do pulmão para o ar, podendo permanecer em suspensão durante horas; esta propriedade justifica o fato da doença ser altamente contagiosa (*NSB Editorial comment, 2000; PASQUALOTO & FERREIRA, 2001*). Dentre os principais determinantes de risco de infecção estão a concentração de organismos presentes na partícula exalada e a duração da exposição à mesma (*BLOOM & MURRAY, 1992*).

Uma vez inalados, os bacilos são ingeridos por macrófagos alveolares fagocíticos, residindo dentro de um vacúolo ligado à membrana, o fagossomo (*BLOOM & MURRAY, 1992; GLICKMAN & JACOBS, 2001*); os primeiros podem, então, seguir dois caminhos: serem imediatamente eliminados ou crescerem intracelularmente em lesões localizadas chamadas tubérculos. Geralmente 2 a 6 semanas após a infecção, ocorre o estabelecimento de imunidade celular, seguida de infiltração de linfócitos e macrófagos ativados na lesão, resultando na eliminação da maior parte dos bacilos e o término da infecção primária, geralmente sem a apresentação de sintomas (*BLOOM & MURRAY, 1992; YOUNG, 1998*). Entretanto, o bacilo pode algumas vezes persistir e coexistir pacificamente em seu hospedeiro como uma infecção quiescente em macrófagos alojados em estruturas calcificadas chamadas tubérculos (estruturas cicatrizadas resultantes da tentativa do indivíduo em isolar a área infectada) (*NSB Editorial comment, 2000*), estabelecendo um grande reservatório bacteriano em indivíduos infectados; estes apresentam um risco de desenvolver a doença ativa de aproximadamente 5% após o primeiro ano e de 10% ao longo da vida. Portanto, o estado de latência representa um estágio de equilíbrio entre a persistência do patógeno e a resposta imune do hospedeiro. Assim como a maior parte dos bacilos que são eliminados, uma grande proporção de fagócitos infiltrantes e células do parênquima pulmonar também são mortas, produzindo uma estrutura necrosante sólido-

esponjosa denominada granuloma, onde alguns bacilos podem se refugiar (BLOOM & MURRAY, 1992; YOUNG, 1998). No pulmão, onde a carga bacteriana é constantemente alta, observa-se uma evidente patologia crônico-progressiva; pode ocorrer fibrose intersticial, havendo substituição gradual de grande parte do espaço aéreo do pulmão por tecido fibroso denso separando grupos de sacos alveolares, dando ao pulmão a aparência de um “favo de mel” (EHLERS, 1999). Estas estruturas podem causar a desestabilização e destruição de tecidos adjacentes, podendo ocorrer necrose e, conseqüentemente, formação de cavidades (JAGIRDAR & ZAGZAG, 1996), sendo geralmente resultantes de reações de hipersensibilidade do tipo tardia mediada por células CD4 em tecidos parenquimais. Portanto, basicamente o mesmo sistema envolvido na redução do crescimento bacteriano é também responsável pela formação de granulomas (EHLERS, 1999).

Muitos dos sintomas da TB, incluindo a destruição tecidual que eventualmente liquêfaz porções infectadas do pulmão, são preferivelmente mediados pela resposta imune do hospedeiro contra o bacilo ao invés da virulência bacteriana propriamente dita (GLICKMAN & JACOBS, 2001). O predomínio da resposta imune do hospedeiro pode conter a lesão, permanecendo apenas danos residuais no pulmão. Em contraposição, a expansão da reação necrosante pode evoluir a cavidades pulmonares, o que possibilita a disseminação de muitos bacilos para o ambiente externo por meio da tosse (BLOOM & MURRAY, 1992; YOUNG, 1998). Desta forma, pode-se dizer que a resposta imune do hospedeiro constitui seu principal mecanismo de defesa contra a infecção pelo bacilo da TB (DANIEL, 1997), ainda que esta esteja intrinsecamente associada a danos teciduais, pela formação de granulomas e necrose (EHLERS, 1999).

O processo patológico-inflamatório pulmonar induz sintomas tais como enfraquecimento, febre, perda de peso, sudorese noturna, consternação torácica,

insuficiência respiratória e tosse, ou mesmo hemoptíase (expectoração de sangue a partir de alguma via do trato respiratório, formando escarro sanguinolento) (BLOOM & MURRAY, 1992). Estes sintomas justificam o antigo termo “consumição”, utilizado no final do século XVII pelo médico inglês Richard Morton (Figura 1B) para referir-se especificamente à TB (CASTIGLIONI, 1993), visto que esta doença se desenvolve lentamente e com múltiplos sintomas, levando à gradativa debilidade e exaustão física.

#### 1.4. O bacilo de Koch

Dentro do gênero *Mycobacterium* existem cerca de 60 espécies conhecidas, sendo a grande maioria bactérias saprofíticas de solo, e existindo apenas algumas espécies patogênicas ao homem, que causam TB, como *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*, e lepra, como *Mycobacterium leprae* (JARLIER & NIKAIDO, 1994). O principal agente etiológico da TB, o *M. tuberculosis* (Figura 3), pertencente à família *Mycobacteriaceae*, é uma bactéria considerada fracamente Gram-positiva, em forma de bastão, que não possui flagelos, não forma esporos, não produz toxinas e não possui cápsula. O bacilo tem uma variação na largura de 0,3 a 0,6  $\mu\text{m}$ , e na altura de 1 a 4  $\mu\text{m}$ , e caracteriza-se por apresentar um crescimento muito lento (tempo de geração de 24 horas), envelope celular complexo, homogeneidade genética e parasitismo intracelular obrigatório (COLE *et al.*, 1998).

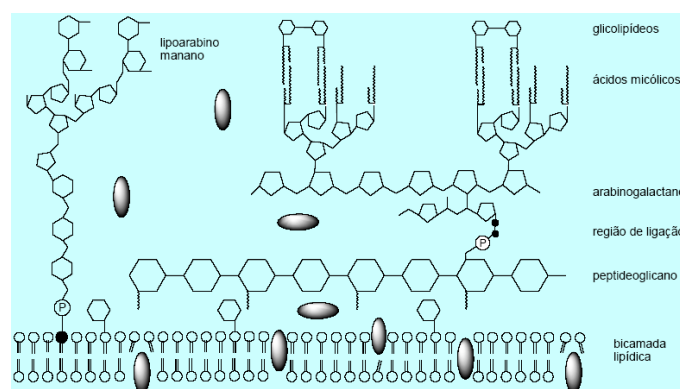


**Figura 3.** Análise por microscopia eletrônica de bacilos do *M. tuberculosis*, o agente etiológico da TB (adaptado de **YOUNG, 1998**).

A TB, como qualquer outra doença infecciosa, apresenta ciclos epidêmicos que podem, ainda que raramente, levar séculos para encerrar seu curso. Tem sido demonstrado historicamente que a virulência de organismos patogênicos pode sofrer uma gradual redução; além disto, pode ocorrer o favorecimento (seleção natural) de hospedeiros geneticamente menos susceptíveis à doença (**BLOOM & SMALL, 1998**). Ainda que os genes não influenciem o risco de infecção à exposição, eles determinam o risco de doença e de seu curso (**DANIEL, 1997**), e ainda que evidências de variabilidade genética na susceptibilidade humana à TB sejam difíceis de se obter, tem-se observado que a severidade da doença é maior entre negros do que brancos, há uma maior concordância entre gêmeos monozigóticos do que dizigóticos, e populações mais recentemente expostas ao bacilo têm maior propensão de desenvolver a doença em relação a populações que convivem com a mesma há séculos. A análise destes estudos indica que *M. tuberculosis* continua sendo um extraordinário patógeno, que exerce uma poderosa pressão seletiva no genoma humano (**BLOOM & SMALL, 1998**).

### 1.4.1. A parede celular micobacteriana

As diferentes espécies do gênero produzem o mesmo tipo de parede celular, sendo esta de estrutura extremamente incomum (Figura 4). A camada de peptídeoglicano contém ácido N-glicolilmurâmico ao invés de ácido N-acetilmurâmico, encontrado na maioria das outras bactérias. Uma característica ainda mais distinta é que cerca de 60% da parede celular micobacteriana é constituída de lipídeos que consistem basicamente em ácidos graxos de cadeia longa incomuns, denominados ácidos micólicos (BRENNAN & NIKAIKO, 1995). Uma terceira propriedade que as distingue das demais bactérias é que sua parede celular retém fucsina básica (corante) mesmo na presença de álcool e ácido (método de coração de Ziehl-Nielsen). A partir desta técnica, pode-se descorar a parede celular de qualquer tipo de bactéria, exceto micobacteriana; esta propriedade categorizou o gênero como sendo do tipo bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (GLICKMAN & JACOBS, 2001).



**Figura 4.** Esquema ilustrativo da parede celular micobacteriana, detalhando sua estrutura extremamente incomum.

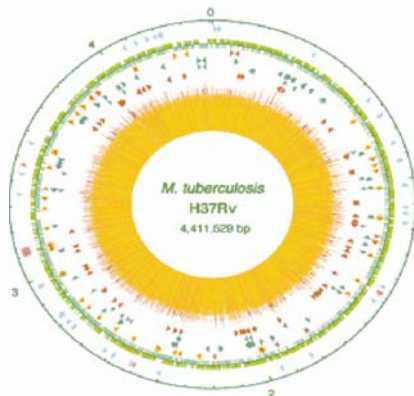
A parede celular extremamente incomum apresentada por este BAAR permite que o mesmo sobreviva dentro de macrófagos fagocíticos, além de conferir resistência a uma série de antibióticos (*NSB Editorial comment, 2000*). Uma vez que este patógeno é relativamente resistente à dessecação, álcalis e certos desinfetantes químicos, torna-se difícil prevenir a transmissão do mesmo em instituições e meios urbanos em geral. Pode-se alegar, portanto, que esta resistência, assim como a resistência a alguns agentes terapêuticos, estão intrinsecamente relacionadas à distinta estrutura da parede celular micobacteriana (*BRENNAN & NIKAIDO, 1995*).

A parede celular do *M. tuberculosis* tem atraído o interesse das mais recentes pesquisas direcionadas ao mecanismo de ação de várias drogas antigas e da busca de alvos para novas drogas (*BRENNAN & NIKAIDO, 1995*). Informações a respeito dos genes especificamente ligados à sua síntese revelar-se-ão fundamentais para a escolha de alvos potenciais de drogas (*YOUNG, 1998*).

#### **1.4.2. Análise genômica**

Baseados na análise do seqüenciamento completo do genoma da cepa micobacteriana mais bem caracterizada, o *M. tuberculosis* H37Rv (*Figura 5*), Stewart Cole e colaboradores caracterizaram a mesma por possuir um cromossomo circular com 4.411.529 pares de bases (pb), ao longo dos quais observa-se um conteúdo de G+C de 65,6%, porcentagem consideravelmente alta em relação a qualquer outra bactéria. Desde seu isolamento, em 1905, esta linhagem tem tido grande aplicação mundial na pesquisa biomédica devido à total retenção de virulência em modelos animais, além de ser susceptível a drogas e amena à manipulação genética (*COLE et al., 1998*).





**Figura 5.** Representação esquemática do genoma circular de *M. tuberculosis* H37Rv, com 4.411.529 pb e um conteúdo de G+C de 65,6% (adaptado de [COLE \*et al.\*, 1998](#)).

Apesar de seu genoma ser menor que o de *Escherichia coli*, é bastante versátil, codificando enzimas envolvidas na maioria das rotas anabólicas e catabólicas características das bactérias e na síntese e degradação de aminoácidos. Este aprofundado estudo genômico permitiu que fossem identificadas singularidades deste organismo, como a existência de 4.000 genes, majoritariamente destinados à codificação de enzimas envolvidas em lipólise e lipogênese; em questão, trata-se da degradação de lipídeos para sobrevivência intracelular, e da biossíntese de lipídeos destinados a construção do envelope celular, respectivamente. Cabe salientar que cerca de 59% dos genes deste microorganismo são transcritos no mesmo sentido da replicação, porcentagem consideravelmente menor que os 75% em *Bacillus subtilis*, o que provavelmente justifica seu crescimento lento e infreqüentes ciclos de replicação. A partir da inspeção genômica identificou-se que, além das várias funções envolvidas no metabolismo de lipídeos, estão também presentes enzimas envolvidas em glicólise, rota das pentoses, e ciclos do ácido tricarbóxico e

glioxilato, o que evidencia, portanto, o metabolismo dinâmico desta bactéria (COLE *et al.*, 1998).

### 1.5. Latência e reativação

A TB latente caracteriza-se como uma síndrome clínica decorrente de exposição ao *M. tuberculosis*, seguido do estabelecimento da infecção e geração de resposta imune celular do hospedeiro para controlar o bacilo, reduzindo seu metabolismo e forçando-o a um estado de quiescência no tecido infectado; o sistema imunocompetente humano tem geralmente a capacidade de conter, mas não de eliminar, a infecção. Entretanto, ao contrário da doença ativa, a TB latente não constitui uma doença infecciosa, não representando, portanto, um risco de saúde pública.

Sua sobrevivência intracelular está baseada na capacidade do bacilo em lidar com a acidificação fagossômica de macrófagos infectados e prevenir a fusão fagossomo-lisossomo. Na maioria dos indivíduos imunocompetentes infectados, ocorre o recrutamento de linfócitos T e macrófagos, e o estabelecimento de resposta imune secundária, resultando no controle da infecção. No entanto, condições de imunossupressão possibilitam uma reativação do bacilo até então dormente, levando-o a desenvolver TB ativa em seu hospedeiro, geralmente muitas décadas após a infecção inicial. Dentre os fatores responsáveis pela reativação de infecções latentes estão: co-infecção por HIV, subnutrição, aumento da idade, uso de drogas, câncer, diabetes, insuficiência renal crônica e quimioterapia imunossupressiva (PARRISH *et al.*, 1998).

## 1.6. Tuberculose resistente a múltiplas drogas

Define-se como tuberculose resistente a múltiplas drogas (MDR-TB) a resistência à pelo menos isoniazida e rifampicina, duas das drogas de primeira linha utilizadas no tratamento da doença ativa (TELENTI & ISEMAN, 2000).

A era dos antibióticos tem sido constantemente marcada por ciclos, consistindo na introdução de novos agentes antimicrobianos e uma subsequente emergência de resistência a estas drogas (SWARTZ, 2000). A história da resistência a drogas como um problema no tratamento de TB é quase tão velha quanto a introdução das primeiras drogas anti-TB no tratamento da doença. Sabe-se que os fenótipos resistentes e multi-resistentes são causados por mutações cromossômicas randômicas espontâneas (“resistência natural”) em diferentes genes deste microorganismo (PETRINI & HOFFNER, 1999). As taxas de mutação são diferentes para cada droga, equivalendo a  $10^{-6}$  para isoniazida e  $10^{-8}$  para rifampicina. Uma vez que uma lesão pulmonar cavitária pode abrigar até  $10^9$  organismos, é matematicamente possível ou mesmo provável que existam bacilos resistentes a pelo menos uma destas drogas. No entanto, o fato de a taxa de mutação para ambas as drogas ser de  $10^{-14}$  impossibilita virtualmente que o patógeno se torne espontaneamente resistente às duas drogas em pacientes corretamente tratados (RILEY, 1993). Uma vez tendo sido estabelecido que a monoterapia induz à seleção de populações resistentes à droga (“resistência adquirida”), torna-se necessária a utilização de terapias combinadas, visto que a probabilidade de uma linhagem bacteriana desenvolver resistência a duas ou mais drogas simultaneamente é extremamente baixa (PETRINI & HOFFNER, 1999).

A taxa de mortalidade por MDR-TB está estimada em 40-60%, equivalente à mortalidade entre pacientes com TB não tratada (BLOOM & MURRAY, 1992). Dentre os

fatores responsáveis pelo aumento na incidência de MDR-TB estão a pandemia de HIV/AIDS e o aumento na incidência de TB, especialmente entre populações de países desenvolvidos com fácil acesso a medicamentos (RILEY, 1993). Nestas nações podem ser algumas vezes identificados tratamentos completamente inadequados, baseados na utilização de uma única droga, combinações equivocadas de drogas, curtos períodos de tratamento devido à baixa adesão de pacientes, e à baixa absorção das drogas administradas. Estas condições expõem o patógeno a concentrações antibacterianas subletais, selecionando o crescimento de bacilos resistentes dentro da população originalmente susceptível (PETRINI & HOFFNER, 1999).

### **1.7. O sinergismo entre TB e AIDS**

A ligação entre a TB e o HIV foi bem documentada pela primeira vez em Nova Iorque, onde se estimou que o risco de desenvolver a doença ativa entre indivíduos co-infectados com HIV e *M. tuberculosis* era de 8% ao ano, comparado com 10% de risco ao longo da vida para aqueles infectados apenas pelo bacilo latente (BLOOM & MURRAY, 1992); estes dados alarmantes são resultantes do considerável enfraquecimento imunológico proporcionado pelo HIV, sendo responsável pelo aumento na probabilidade de desenvolvimento da TB em até 30 vezes (PASQUALOTO & FERREIRA, 2001). O aumento na susceptibilidade à TB está associado aos primeiros estágios da infecção por HIV, que por sua vez passa a acelerar a progressão da segunda para AIDS (YOUNG, 1998). Cabe destacar que, entre indivíduos aidéticos, podem ocorrer infecções oportunistas causadas pelas chamadas “micobactérias atípicas”, que incluem o complexo *M. avium*, *M.*

*kansasii*, *M. fortuitum* e *M. chelonae*, ainda que estas espécies sejam essencialmente saprofíticas (BRENNAN & NIKAIDO, 1995).

A incidência de casos de dupla infecção ocorre principalmente entre trabalhadores em idade de alta produtividade, abrangendo idades entre 15 e 59 anos (NARAIN *et al.*, 1992). Nas últimas décadas, tem-se observado um dramático aumento na incidência de TB na África, causado principalmente pela epidemia de HIV. Um estudo realizado neste continente demonstrou a existência de evidências que sugerem uma grande associação entre as duas infecções, como: a TB é a principal doença associada ao HIV, sendo a maior responsável pela mortalidade de pacientes soro positivos em hospitais; o aumento na incidência de TB coincidiu em época, local e população com o surgimento da AIDS; e, finalmente, a TB ativa está mais presente entre indivíduos HIV positivos que negativos (FÄTKENHEUER *et al.*, 1999). Segundo a OMS, um terço do aumento na incidência de TB nos últimos seis anos pode ser atribuída à co-infecção com HIV; portanto, o sinergismo criado entre o *M. tuberculosis* e o HIV representa um problema de efeito devastador tanto para pacientes infectados como para a população em geral.

Fica evidente que a epidemia de HIV favorece o surgimento de linhagens do bacilo da TB resistentes a drogas em pacientes co-infectados, visto que, nestes casos, observa-se um maior índice de abandono do tratamento, o que facilita uma rápida disseminação destas cepas entre indivíduos susceptíveis (BRENNAN, 1997). Entre pacientes soro positivos co-infectados por MDR-TB, observam-se índices de mortalidade frequentemente superiores a 80%, onde o intervalo entre o diagnóstico e a morte dos pacientes varia entre 4 e 16 semanas (RILEY, 1993); desta forma, MDR-TB passou a ser conhecida como “a mais maligna infecção oportunista associada à infecção por HIV” (NOLAN, 1997).

## 1.8. Métodos de diagnóstico

Dentre as técnicas utilizadas no diagnóstico da TB, o PPD, monitoramento epidemiológico mundialmente disseminado, constitui o único método capaz de identificar um possível contato prévio entre este patógeno e seu hospedeiro (BLOOM & MURRAY, 1992), evidenciando a infecção latente pelo bacilo de Koch a partir da indução de hipersensibilidade do tipo tardia contra antígenos micobacterianos (GLICKMAN & JACOBS, 2001). Entretanto, a vacinação por BCG também produz reatividade ao PPD, fazendo com que a utilização e confiabilidade deste teste diminuam com o aumento de crianças vacinadas (BLOOM & MURRAY, 1992). Diferentemente das cepas sensíveis, o diagnóstico de MDR-TB requer a execução de testes de sensibilidade bacilar às drogas anti-TB, a partir dos quais são utilizadas concentrações estabelecidas de fármacos. Alternativamente, o método de proporção identifica quais drogas e em que concentrações mínimas ocorre a inibição de pelo menos 99% do crescimento bacteriano (PETRINI & HOFFNER, 1999).

Ainda que o pequeno prestígio do diagnóstico molecular seja uma realidade, tem se observado uma clara tendência em direção à métodos moleculares de detecção de doenças humanas. Este direcionamento molecular se deve à era genômica, que disponibilizou a seqüência genética de organismos importantes, e ao descobrimento de alvos relevantes ao diagnóstico (FARKAS, 2002). O progresso destas técnicas permitirá o desenvolvimento de testes mais sensíveis e rápidos na detecção, identificação e monitoramento epidemiológico de micobactérias; muitas destas tecnologias já estão disponíveis no mercado, propondo uma sensibilidade e especificidade superior a 90%. Entretanto, o alto custo destas técnicas

torna seu estabelecimento desfavorável, restringindo seu uso a países desenvolvidos (CAWS & DROBNIIEWSKI, 2001; GILBERT, 2002; BLOOM & MURRAY, 1992).

### 1.9. Desenvolvimento de vacinas

O sistema imunológico mamífero pode atuar por intermédio de uma resposta celular ou humoral, mas, ainda que ambas envolvam células T auxiliares (Th), são guiadas por diferentes regras. A resposta imune do tipo Th-1 envolve linfócitos T CD4+, sendo de natureza celular. Ela atua contra doenças crônicas como parasitismo intracelular e câncer a partir da ativação de macrófagos, facilitando a detecção e lise de células doentes; este processo resulta na formação de um granuloma não-necrosante, que representa o paradigma da imunidade de proteção em doenças intracelulares, como um sinal de morte bacteriana e regressão da doença. Em contraposição, a resposta do tipo Th-2 envolve um conjunto diferente de linfócitos T CD4+, sendo de natureza humoral; pode tornar-se necessária para eliminar antígenos e parasitas extracelulares. Esta resposta pode também causar destruição tecidual e necrose, representando o fracasso da resposta imune em muitas doenças (LABIDI *et al.*, 2001).

Recentemente, esforços estão sendo focados no isolamento e desenvolvimento de antígenos ou epitopos individuais em vacinas (LABIDI *et al.*, 2001). Com o intuito de se induzir uma imunidade de proteção duradoura, novas vacinas deverão combinar antígenos selecionados com potentes adjuvantes, além de estimular a rota apropriada do sistema imune (GRANGE *et al.*, 1995). Para tanto, faz-se necessário um adjuvante micobacteriano que induza um aumento da resposta Th-1 e uma inibição da resposta Th-2. Desta forma,

considera-se como vacina ideal aquela que contenha imunógenos que induzam a formação de granulomas não-necrosantes.

Atualmente, a vacina mais utilizada no mundo para combater a TB é a BCG; a mesma oferece uma série de vantagens, uma vez que pode ser administrada via oral; requer uma única imunização, sendo geralmente eficaz na prevenção de TB meningeal infantil; e tem um baixo custo de produção (LABIDI *et al.*, 2001; ORME, 2001). Apesar das vantagens, sua eficácia varia entre 0 e 80% (COLDITZ *et al.*, 1994), além de não conferir proteção à TB pulmonar em adultos (ORME, 2001), o que incentivou muitos grupos de pesquisa a investir esforços no âmbito de desenvolver vacinas de maior imunogenicidade a partir do desenvolvimento de adjuvantes, induzindo uma maior hipersensibilidade mediada por células CD4+ (EHLERS, 1999).

Muitos tipos de vacinas têm sido testadas em camundongos e cobaias com o intuito de substituir a BCG em humanos, como vacinas recombinantes (rBCG) e vacinas auxotróficas, entre outras; entretanto, nenhuma destas têm apresentado resultados melhores que a própria BCG (ORME *et al.*, 2001). Outra área alternativamente explorada é a de vacinas de DNA, a partir da qual seqüências microbianas podem ser utilizadas como vacinas alvo (ORME, 2001); o volumoso esforço que tem sido investido nesta estratégia gerou uma grande expectativa de resultados promissores.

Ainda, visto que um terço da população mundial está infectada com *M. tuberculosis*, faz-se necessário o desenvolvimento de dois tipos de vacinas: um para prevenir a invasão do patógeno e outro para erradicar infecções já estabelecidas (latentes) (HESS & KAUFMANN, 1999).



## 1.10. Quimioterapia

"It happens then as it does to physicians in the treatment of consumption, which in the commencement is easy to cure and difficult to understand; but when it has neither been discovered in due time nor treated upon a proper principle, it becomes easy to understand and difficult to cure. The same thing happens in state affairs; by foreseeing them at a distance, which is only done by men of talents, the evils which might arise from them are soon cured; but when, from want of foresight, they are suffered to increase to such a height that they are perceptible to everyone, there is no longer any remedy", Nicolo Machiavelli, 1515, *in* The prince, Oxford University Press, p.178.

Estima-se que aproximadamente metade dos novos casos de TB seriam inevitáveis, uma consequência da história natural da doença e da co-infecção pelo HIV. Entretanto, muitos dos casos excedentes, resultantes do aumento de transmissão ativa, poderiam ter sido evitados a partir da implementação de programas efetivos de tratamento (BLOOM & MURRAY, 1992). A TB é uma doença grave, porém curável na maioria dos casos, desde que, uma vez diagnosticada, seja empregada a quimioterapia adequada, visto que um dos maiores riscos de mortalidade resulta da instituição tardia do tratamento.

O tratamento quimioterápico padrão atualmente recomendado pela OMS para o controle ou erradicação da TB no mundo, conhecido como terapia de curta duração de observação direta (DOTS), consiste na administração combinada de quatro drogas, isoniazida, rifampicina, pirazinamida e estreptomicina (ou etambutol), durante 2 meses, seguida pela combinação de duas drogas, isoniazida e rifampicina, por pelo menos mais 4 meses (NSB Editorial comment, 2000). Inicialmente, objetiva-se uma ação bacteriostática, inibindo a síntese de parede celular, ácidos nucléicos e proteínas micobacterianas, e eliminando rapidamente a maior parte dos bacilos infectantes. Posteriormente, objetiva-se uma ação bactericida, a partir da consolidação do tratamento pela eliminação dos bacilos remanescentes (TELENTI & ISEMAN, 2000). No entanto, a natural relutância humana em cumprir com o requisito de tratamento intensivo de 6 meses, resultante da longa duração quimioterápica e dos desagradáveis efeitos colaterais ocasionados pelas drogas

administradas (YOUNG, 1998) conduziram a OMS a investir em medidas de adesão universal ao tratamento. A versão mais atualizada de DOTS, que combina comprometimento político, serviços de microscopia, suprimentos de drogas, sistemas de monitoramento e observação direta do tratamento, previne a ocorrência de novas infecções e inviabiliza completamente o desenvolvimento de MDR-TB (PASQUALOTO & FERREIRA, 2001). Casos clínicos comprovam que MDR-TB requer a extensão do período de tratamento para cura, quando esta é possível, e a utilização de drogas de segunda ou até terceira linha, ainda que a maior toxicidade seja um fator limitante (TELENTI & ISEMAN, 2000), tornando o tratamento mais difícil e dispendioso. A dose ideal para qualquer paciente é aquela que produz o efeito terapêutico desejado com um nível aceitável de toxicidade; entretanto, quando um paciente está tendo sua vida ameaçada pela doença, pode ser necessário aceitar uma toxicidade adicional para cura (PELOQUIN, 2001). Além disto, em países industrializados, o tratamento completo da doença custa cerca de US\$ 2.000 por paciente, um valor substancialmente menor que os US\$ 250.000 investidos em pacientes com MDR-TB (PASQUALOTO & FERREIRA, 2001).

Segundo a OMS, nenhum tipo de tratamento tem esboçado resultados melhores que DOTS entre pacientes com TB ativa e no controle de MDR-TB. Análises recentes apontam que os índices de cura pós-DOTS apresentados por pacientes co-infectados com HIV e *M. tuberculosis* e pacientes infectados apenas pelo bacilo de Koch são muito semelhantes (FÄTKENHEUER *et al.*, 1999). Entretanto, estes mesmos resultados animadores não se aplicam para MDR-TB, visto que a simples confirmação de suspeita de resistência requer 8 semanas para ser diagnosticada, período maior do que o tempo médio de sobrevivência destes pacientes co-infectados (RILEY, 1993); um estudo realizado na Flórida com pacientes HIV positivos revelou que a duração média de sobrevivência é de

aproximadamente 45 dias entre casos de co-infecção por MDR-TB e de 430 dias entre casos de co-infecção por TB susceptível a drogas (FISCHL *et al.*, 1992).

### **1.11. A busca de alvos para o desenvolvimento de novas drogas**

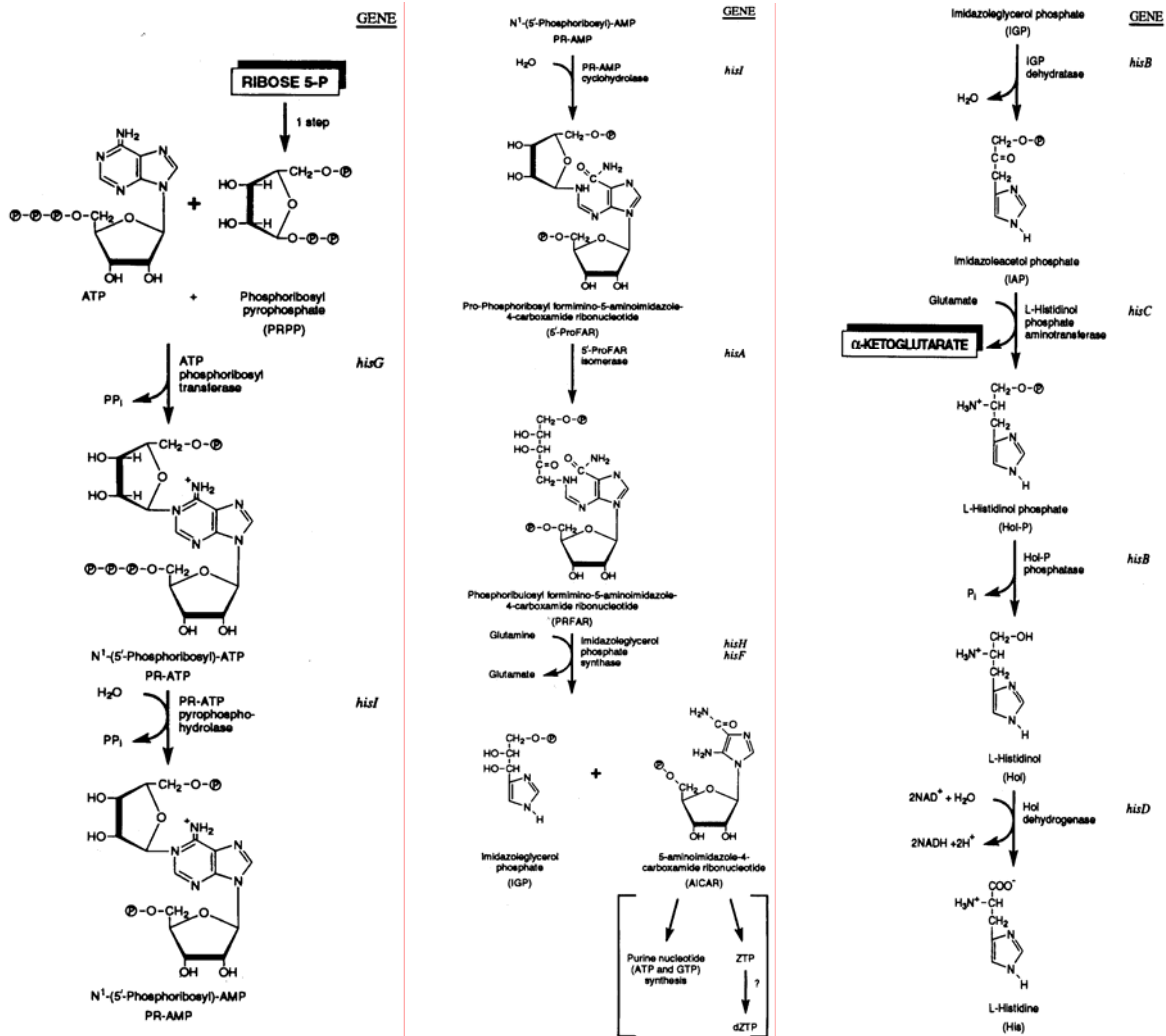
Um estudo realizado entre 1972 e 1998, que analisou o número de agentes antimicrobianos descritos na revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, publicada pela Sociedade Americana de Microbiologia, apresentou as seguintes porcentagens entre as categorias: 46% antibacteriana, 24% antiviral, 13% antiparasitária, 9% antifúngica e 8% antimicobacteriana. Ainda que a categoria de agentes antimicobacterianos possa estar sub-representada, uma vez que foram incluídas somente drogas descritas em artigos relacionando seu uso contra micobactérias, percebe-se que esta categoria tem tido o menor desenvolvimento ao longo dos anos (SWARTZ, 2000). Não houve qualquer descrição na literatura da identificação de novas drogas de primeira linha que possam substituir as atualmente utilizadas no combate ao bacilo causador da TB desde a metade da década de 80 (PETRINI & HOFFNER, 1999). O baixo interesse da indústria farmacêutica não se deve necessariamente ao alto investimento necessário para desenvolver um novo composto anti-TB, mas ao pequeno retorno financeiro esperado, uma vez que a grande maioria dos casos de TB ocorrem em países subdesenvolvidos (RUFFINO-NETTO, 2002).

A atual realidade epidemiológica e quimioterápica revelou uma urgente necessidade do desenvolvimento de agentes antimicobacterianos mais eficientes. Estes devem apresentar uma toxicidade seletiva, sendo ativos contra cepas resistentes e não-resistentes a drogas, assim como infecções latentes; além disto, devem requerer uma menor duração do tratamento para aumentar a adesão dos pacientes à quimioterapia.

Em princípio, a seqüência genômica de *M. tuberculosis* inclui informações sobre todos os possíveis alvos aos quais possam se direcionar novos agentes antimicobacterianos. Mais diretamente, informações estruturais e funcionais sobre um alvo protéico particular podem ser deduzidas pela seqüência do seu respectivo gene codificante. Uma maneira de explorar informações em programas de desenvolvimento de drogas é clonando e expressando genes que codificam enzimas biossintéticas específicas do patógeno, assim como validando a sua atividade biológica que havia sido inferida apenas por homologia de seqüência e não por demonstração experimental. As proteínas recombinantes podem ser usadas em ensaios funcionais na procura de inibidores, e, ao mesmo tempo, possibilitar a geração de informações estruturais para o desenvolvimento de drogas (YOUNG, 2001).

#### **1.11.1. A via de biossíntese de histidina e a enzima histidinol desidrogenase**

A via de biossíntese de histidina (Figura 6) foi muito bem descrita em *Salmonella typhimurium* e *E. coli*, onde foi demonstrado que esta é constituída por dez reações enzimáticas envolvendo oito genes, e formando uma ligação entre a biossíntese de aminoácidos e purinas (WINKLER, 1996).



**Figura 6.** Esquema ilustrativo da via de biossíntese de histidina, constituída por dez reações enzimáticas envolvendo oito genes, e formando uma ligação entre a biossíntese de aminoácidos e purinas (adaptado de WINKLER, 1996).

A última reação desta via (Figura 7 - Figura 1 do manuscrito na página 64), descrita pela primeira vez em *Arthrobacter histidinovorans* e *E. coli* (ADAMS, 1954), e em levedura (ADAMS, 1955), é catalisada pela enzima histidinol desidrogenase (HisD) (EC 1.1.1.23). Esta enzima catalisa a conversão NAD<sup>+</sup>- e Zn<sup>+2</sup>-dependente de L-histidinol a L-histidina, envolvendo o intermediário L-histidinaldeído (ADAMS, 1954; ADAMS, 1955; LOPER & ADAMS, 1965), com a concomitante redução de dois moles de NAD<sup>+</sup>.

Apesar da via de biossíntese de histidina estar presente em bactérias, arqueobactérias, organismos eucarióticos inferiores e plantas, a mesma encontra-se ausente em mamíferos (VOET & VOET, 1995) e, aparentemente, todos os organismos que sintetizam histidina utilizam-se desta mesma via. As enzimas de *E. coli*, *S. typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Brassica oleracea* apresentam aproximadamente 50% de identidade, sendo altamente conservadas estrutural e funcionalmente (NAGAI *et al.*, 1991), e têm essencialmente as mesmas propriedades. Visto que as enzimas homólogas descritas são homodímeros (LEE & GRUBMEYER, 1987; NAGAI *et al.*, 1992) contendo um  $Zn^{+2}$  por subunidade (LEE & GRUBMEYER, 1987), estas representam exemplos de metaloenzimas. Cabe salientar que são raros os casos de oxidoreductases ligadas a  $NAD^+$  que requerem a ligação de um metal para manterem a atividade biológica (GRUBMEYER *et al.*, 1989).

O seqüenciamento completo do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv revelou 3.924 fases de leitura aberta, sendo identificadas seqüências com alta identidade a genes de *M. smegmatis* para esta via biossintética; uma delas, Rv1599, apresenta 85% de identidade com o gene *hisD*, responsável pela codificação da enzima HisD. Em *M. tuberculosis*, o gene de 1317 pb codifica uma provável HisD, com 438 aminoácidos, massa molecular teórica de 45.346,10 Dalton (Da) e ponto isoelétrico de 4,63 (COLE *et al.*, 1998). A partir de experimentos onde foram avaliados tanto a habilidade de organismos auxotróficos para histidina em sobreviver a privação deste aminoácido (PARISH, 2003) como identificados os genes envolvidos no crescimento micobacteriano (SASSETTI *et al.*, 2003), pôde-se demonstrar que a via de biossíntese de histidina é essencial para a sobrevivência do *M. tuberculosis*. Mais especificamente, estudos com mutantes de *M. tuberculosis* com o gene *hisD* nocauteado, obtidos por recombinação homóloga, demonstraram a essencialidade da

proteína HisD (PARISH *et al.*, 1999). Entretanto, ainda não havia sido confirmado experimentalmente que o gene *hisD* codifica uma HisD ativa em *M. tuberculosis*.

Cinética enzimática e estudos estruturais representam importantes ferramentas no sentido do desenho racional de novos agentes antimicobacterianos. A expressão de proteínas na sua forma solúvel tem sido identificada como etapa essencial neste sentido (VICENTELLI *et al.*, 2003). Para tanto, o trabalho aqui apresentado descreve a amplificação, clonagem, seqüenciamento e expressão da proteína HisD de *M. tuberculosis* na forma solúvel em *E. coli*. A avaliação da atividade desta enzima vem a confirmar a função do gene estrutural como codificante da enzima HisD em *M. tuberculosis*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O trabalho iniciado aqui faz parte de um projeto mais amplo, que visa a busca de inibidores específicos da enzima HisD de *M. tuberculosis* H37Rv para que, posteriormente, possam ser introduzidas novas drogas no tratamento da TB.

### **2.2. Objetivos Específicos**

A primeira etapa deste trabalho visa uma caracterização inicial da enzima supracitada; para tanto, far-se-ão o desenho de primers com sítios de restrição para *NdeI* e *HindIII*, a amplificação do gene *hisD* a partir do DNA genômico, a clonagem do mesmo em sistema de expressão pET-23a(+), o seqüenciamento do fragmento subclonado, a expressão da enzima recombinante, e a determinação da sua atividade biológica.



### **3. MANUSCRITO**

A seguir, apresentar-se-á o manuscrito referente ao trabalho desenvolvido durante o curso de Mestrado, submetido e sob avaliação do periódico científico *Protein Expression and Purification*.

**Molecular cloning and expression of functional histidinol dehydrogenase (EC 1.1.1.23) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv**

Rodrigo G. Ducati<sup>†‡</sup>, Clotilde A. Pinto<sup>†</sup>, Luiz A. Basso<sup>†‡\*</sup> and Diógenes S. Santos<sup>†\*</sup>

<sup>†</sup> Laboratório de Microbiologia Molecular e Funcional, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 91501-970; <sup>‡</sup> Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil

\* To whom correspondence may be addressed: E-mails: [labasso@cbiot.ufrgs.br](mailto:labasso@cbiot.ufrgs.br) or [diogenes@pucrs.br](mailto:diogenes@pucrs.br), Phone: +55 51 33203629, Fax: +55 51 33191079.

Running Title: Histidinol dehydrogenase from *Mycobacterium tuberculosis*

## ABSTRACT

The aetiological agent of tuberculosis (TB), *Mycobacterium tuberculosis*, is responsible for approximately 1.8 million deaths in the year 2000. The increasing prevalence of TB, the emergence of multidrug-resistant strains of the tubercle bacillus, and the devastating effect of co-infection with human immunodeficiency virus have led to an urgent need for the development of new and more efficient antimycobacterial drugs. The biosynthesis of histidine is present in bacteria, archaeobacteria, lower eukaryotes and plants, but absent in mammals. Disruption of *M. tuberculosis* *hisD*-encoded L-histidinol dehydrogenase by homologous recombination resulted in mutants that were not viable under histidine deprivation. Thus, the gene products of the histidine pathway represent attractive targets for the development of antimycobacterial agents. Although analysis of the complete genome sequence of *M. tuberculosis* predicts that the locus-tag Rv1599 (*hisD*) codes for a probable histidinol dehydrogenase enzyme, experimental evidence was lacking. The *M. tuberculosis* *hisD* gene was PCR amplified, cloned, sequenced, and the recombinant protein was overexpressed in soluble form in *Escherichia coli* BL21(DE3). HisD enzyme activity measurements of soluble protein cellular extracts of recombinant protein demonstrated a 612-fold increase in specific activity as compared to control cell extracts. Furthermore, steady-state velocity of recombinant HisD showed a linear dependence on cell extract volume added to the reaction mixture. The results reported here validate the *hisD* as a structural gene that codes for histidinol dehydrogenase in *M. tuberculosis*, which is a crucial step towards purification of recombinant protein to provide material for structural and mechanistic studies aiming at the rational design of new anti-TB agents.

## ABBREVIATIONS USED

DMSO, dimethyl sulfoxide; DOTS, directly observed treatment short-course; HisD, histidinol dehydrogenase; IPTG, isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside; LB, Luria-Bertani; MDR, multidrug-resistant; Mtb, *Mycobacterium tuberculosis*; MtbHisD, *M. tuberculosis* HisD; NAD<sup>+</sup>, nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized form; NADH, nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form; TB, tuberculosis.

## INTRODUCTION

The 2005 global targets for case detection (70 %) and treatment success (85 %) of tuberculosis (TB) smear-positive cases set by the World Health Organization (WHO) might, once more, have to be re-set, as for 2000 [1]. The 69 % world population coverage of DOTS (the internationally recommended control strategy for TB), achieved by the end of 2002, was unable to detain the 8.8 million new cases (of which 3.9 million were smear-positive) of TB computed by epidemiologists in the same year [2]. Estimates have indicated that 1.7 billion people, as much as one third of the world's population, are infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the aetiological agent of TB. Mtb is responsible for more human deaths than any other single infectious agent throughout the centuries, accounting for 26 % of all preventable deaths and 7 % of all deaths [3]. Approximately 95 % of the cases occur in developing nations, which account for 98 % of the deaths worldwide [4]. The statistics are inevitable since these countries have very few resources available to ensure proper treatment and where human immunodeficiency virus (HIV) infection is common that wanes immunity, thereby reactivating the contained, but not eradicated, Mtb infection, both forging a deadly synergy [2, 5]. The distribution of TB cases has been shown to display a geographical concentration among 22 high-burden countries, which account for 80% of the world's TB incidence. The WHO African region and several countries of Eastern Europe have been reaching treatment success's substantially below (~70%) average due, in part, to the complications caused by HIV co-infection and multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB), respectively [2]. Some of the most common factors responsible for the resurgence of this chronic infectious airborne disease as a global public health emergency in developing and industrialized countries are:

the HIV/AIDS epidemic, the widespread emergence of drug-resistant and multidrug-resistant strains, patient non-compliance of treatment (usually due to toxicity of the administered drugs), an increasing number of injectable-drug users, increasing homeless population with adverse living conditions, problems caused by internal migration, and the decline of health care quality and structure [2, 6].

Isoniazid and rifampicin are the most prescribed and effective first-line antimycobacterial drugs [7]. MDR-TB, defined as strains resistant to isoniazid and rifampicin, are more difficult and expensive to treat, and more likely to be fatal [8]; thus leading to the use of second-line drugs, which are less effective, more toxic and more expensive [8, 9]. Unfortunately, no new first-line antimycobacterial agent has been identified in the last 25 years to replace the currently used drugs [10]. Although bacilli Calmette-Guérin (BCG) is still the most widely used vaccine against TB, the most prevalent form of TB, namely reactivation of latent infection in adults, cannot be prevented in a satisfactory way, since its prophylactic efficacy ranges from none to 80% [11]. There is thus an urgent need for the development of both better vaccines and new and more efficient antimycobacterial agents. These agents should have selective toxicity, be active against drug-resistant and non-resistant strains, and shorten the duration of short-course treatment to improve patient compliance.

The histidine biosynthetic pathway has been studied in detail in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. There are ten enzymatic reactions carried out by eight genes in the unbranched pathway that include several complex and unusual reactions, and form a critical link between amino acid and purine biosynthesis [12]. The final reaction, first described enzymatically in *Arthrobacter histidinovorans* and *E. coli* [13], and in yeast [14], is catalyzed by Histidinol Dehydrogenase (HisD) [L-histidinol:NAD oxidoreductase

(EC 1.1.1.23)]. HisD catalyzes the NAD<sup>+</sup>- and Zn<sup>+2</sup>-dependent conversion of L-histidinol to L-histidine through an L-histidinaldehyde intermediate [13-15], with the concomitant reduction of 2 moles of NAD<sup>+</sup> (Fig. 1).

Available data suggest that the same pathway is used in all organisms that synthesize histidine. The enzymes from *E. coli*, *S. typhimurium*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica oleracea* (cabbage) show about 50% identity, are both structurally and functionally highly conserved [16], and have essentially the same properties. Since the described homologous active enzymes are homodimers [17, 18] containing one Zn<sup>+2</sup> per subunit [17], they are therefore examples of metalloenzymes. Interestingly, it has been pointed out that relatively few other NAD<sup>+</sup>-linked oxidoreductases seem to require a bound metal for activity [19].

The histidine biosynthetic pathway is present in bacteria, archaeobacteria, lower eukaryotes and plants, but absent in mammals [20]. The complete genome sequence of the best characterized strain, H37Rv, of *M. tuberculosis* identified 3,924 open reading frames, and homologues to enzymes of the histidine biosynthetic pathway have been identified [21]. Measurements of the ability of histidine auxotrophs to survive starvation [22] and identification of genes required for mycobacterial growth [23] have demonstrated that the histidine biosynthetic pathway is essential for survival of *M. tuberculosis*. In particular, studies on *M. tuberculosis hisD* knockout mutants obtained by homologous recombination have proved the essentiality of histidine dehydrogenase protein [24]. However, it has not been shown yet that the *hisD* gene codes for a histidine dehydrogenase activity; that is, the correct assignment to the structural gene encoding HisD enzyme activity has not been confirmed in *M. tuberculosis*.

Enzyme kinetics and structural studies provide a framework on which to base the rational design of new agents with antitubercular activity. However, the availability of sufficient amounts of proteins of *M. tuberculosis* still remains an essential and laborious step. Unfortunately, even when a genome can be sequenced, only up to 20 % of the protein targets can produce soluble proteins under very basic experimental conditions [25]. Thus, expression of proteins in soluble form has been identified as an important bottleneck in efforts to determine biological activity and crystal structure of *M. tuberculosis* proteins [26].

Here we describe the PCR amplification, cloning, sequencing, and expression of *M. tuberculosis* HisD soluble protein in *Escherichia coli*. Measurement of activity of the soluble enzyme confirms the correct assignment to the structural gene encoding HisD in *M. tuberculosis*. To the best of our knowledge, this is the first report of cloning and expression of soluble and active *M. tuberculosis* HisD. The purification of soluble *M. tuberculosis* HisD will provide protein in quantities necessary for structural and enzymological studies, which should help the design of enzyme inhibitors to be tested as antimycobacterial agents.



## MATERIALS AND METHODS

### *PCR amplification and cloning of M. tuberculosis hisD structural gene*

Synthetic oligonucleotide primers (5'-**ccat***atg*cctaccggtatcgacttgcggggag-3' and 5'-*tcaagctt*gtcatcgctcgaacctccgccgtac-3') were designed based on the complete genome sequence of *M. tuberculosis* H37Rv [21]. These primers were complementary, respectively, to the amino-terminal coding and carboxy-terminal noncoding strands of the *hisD* gene containing 5' *Nde*I and 3' *Hind*III restriction sites, which are in bold characters; the start and stop codons are shown in italics. These primers were used to amplify the *M. tuberculosis hisD* structural gene (1317 bp) from genomic DNA using standard PCR conditions (Perkin-Elmer) with a hot start at 99°C for 10 min. The *Pfu* turbo DNA Polymerase (Stratagene), which is a thermostable polymerase that exhibits low error rate, was used to increase the likelihood that unwanted mutation be not introduced by the DNA amplification step [27, 28]. The cosolvent dimethyl sulfoxide (DMSO) was added at a concentration of 10% in the reaction mixture to improve the yield of the PCR product. The amplified fragment was purified by electrophoresis on low-melting agarose with CONCERT Nucleic Acid Purification System (Gibco BRL), digested with *Nde*I (Invitrogen) and *Hind*III (Gibco BRL), and ligated into a pET-23a(+) expression vector (Novagen), which had previously been digested with the same restriction enzymes. The DNA sequence of the *M. tuberculosis hisD* structural gene was determined using an ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) to both confirm the identity of the cloned DNA and ensure that no mutations were introduced by the PCR amplification step.

### *Overexpression of recombinant HisD*

The pET-23a(+):*hisD* recombinant plasmid was transformed into electrocompetent *E. coli* BL21(DE3) host cells and selected on Luria-Bertani (LB) agar plates containing 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  carbenicillin [29]. Control experiments were performed under the same experimental conditions, except that transformed *E. coli* BL21(DE3) cells harbored the expression vector lacking the target DNA insert. Single colonies were used to inoculate 200 mL of LB medium containing 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  carbenicillin, grown at 37°C and 180 rpm to an OD<sub>600nm</sub> of 0.4 - 0.6, and induced with 1 mM isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG). Cells were grown for additional 48 hours at 37°C in shaker flasks and harvested (at specific times) by centrifugation at 17,300 *g* for 15 min at 4°C and stored at -20°C. For protein overexpression analysis, the stored cells were suspended in 600  $\mu\text{L}$  of 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), disrupted by sonication using three 10-sec pulses, and cell debris was removed from the soluble fraction by centrifugation at 20,800 *g* for 30 min at 4°C. The Protein content was analyzed by SDS-PAGE [30]. The proportion of HisD to total soluble proteins in SDS-PAGE gels was estimated using a GS-700 imaging densitometer (Bio-Rad).

### *Protein determination*

Protein concentration was determined by the method of Bradford *et al.* [31] using the Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad) and bovine serum albumin as standard.

### *Histidinol dehydrogenase assay*

Histidinol dehydrogenase catalyzes the sequential NAD<sup>+</sup>-dependent oxidations of L-histidinol to L-histidinaldehyde and then to L-histidine. The enzymatic activity was assayed in the forward direction by continuously monitoring the increase in absorbance at 340 nm due to the conversion of NAD<sup>+</sup> to NADH ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [32]. All reactions were carried out in a SPECTRONIC GENESYS 2 Spectrophotometer (Spectronic Instruments) at 25°C and initiated with the addition of either cloned MtbHisD or control extracts to the reaction mixture. The reaction mixture (0.5 mL) contained 50 mM Bis-Tris propane-HCl (pH 7.2), 0.5 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.5 mM  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> (all purchased from Sigma) and 0.25 mM L-histidinol dihydrochloride (Acros). The initial steady-state kinetic rates were calculated from the linear portion of the reaction curve. One unit of enzyme activity (U) corresponds to the amount of enzyme catalyzing the conversion of 1  $\mu$ mol of substrate per minute in one-centimeter pathlength cuvette.

## RESULTS AND DISCUSSION

The probable *hisD* structural gene was amplified from *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA (Fig. 2). The presence of 10% DMSO in the reaction mixture proved to be necessary to obtain a PCR product. The cosolvent DMSO helps overcome polymerase extension difficulties due to DNA secondary structures and improves the denaturation of GC-rich DNA [33], which is consistent with the 65.6% G + C content of *M. tuberculosis* genomic DNA [21].

The PCR product was cloned into pET-23a(+) expression vector between *Nde*I and *Hind*III restriction sites. The nucleotide sequence analysis of the cloned PCR product confirmed the identity of the insert as *M. tuberculosis hisD* structural gene coding sequence (1317 bp) and demonstrated that no mutations were introduced by the PCR amplification step.

Histidinol dehydrogenase from *M. tuberculosis* H37Rv was overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) electrocompetent cells transformed with pET-23a(+):*hisD* recombinant plasmid. In order to evaluate mycobacterial HisD expression as a function of time, cell growth was tested for 3, 6, 12, 18, 24, and 48 h at 37°C either with or without IPTG induction. SDS-PAGE analysis revealed a higher yield of soluble recombinant protein in the absence of IPTG for cells grown for 18 hours (Fig. 3). It should be pointed out that part of the recombinant protein remained in the insoluble fraction. Attempts to improve its solubility by cultivation temperature reduction [34] were not effective. Nevertheless, analysis of Coomassie blue-stained SDS-PAGE indicated that the soluble cell extracts contained a significant amount of recombinant protein with subunit molecular weight (MW) of 45 kDa in agreement with the one expected for MtbHisD (45,346.10 Da). SDS-

PAGE protein band densitometric quantification analysis showed that MtbHisD constitutes approximately 9% of total protein present in the soluble cell extract under the experimental conditions used.

It should be pointed out that the recombinant protein overexpression was achieved with no addition of the inducer. The pET system makes use of a highly processive T7 RNA polymerase under control of the IPTG-inducible *lacUV5* promoter for the transcription of target genes of interest [35]. Recent reports have demonstrated that high levels of protein production can be obtained in the stationary phase of cell growth in the absence of IPTG [36-38]. It has been proposed that leaky protein expression occurs for *lac*-controlled systems when cells approach stationary phase in complex medium and that cyclic AMP, acetate and low pH are required to effect expression in the absence of IPTG induction [39].

Enzyme activity measurements demonstrated a 612-fold increase in Histidinol dehydrogenase specific activity in soluble protein cellular extracts expressing the recombinant *M. tuberculosis hisD* gene product as compared to control cell extracts (Table 1). Furthermore, measurements of steady-state velocity of MtbHisD showed a linear dependence on cell extract volume added to the reaction mixture (Fig. 4).

Isolation of histidine-requiring auxotrophs of *M. smegmatis* (a fast-growing mycobacterial species) and complementation studies allowed identification of the start of an operon containing the *hisD* and part of the *hisC* gene [40]. However, no experimental evidence has been presented to show that this gene codes for a histidine dehydrogenase activity. To the best of our knowledge, the results presented here represent the first report of cloning, sequencing, and expression of soluble and active histidinol dehydrogenase from *M. tuberculosis*. The development of a purification protocol for MtbHisD should provide sufficient homogeneous protein for kinetic studies, enzyme immobilization on colloidal

gold support for interaction studies with plant extract components (*Plasmon Surface Resonance*), and crystallization trials aiming at structure determination by X-ray diffraction. The three-dimensional structure of *E. coli* HisD has been determined by X-ray diffraction in the apo state as well as complexes with substrate,  $Zn^{+2}$  and  $NAD^{+}$  at 1.70 Å resolution [41] may be used as template for MtbHisD structure determination. Structural and enzymological studies should provide a framework on which to base the rational design of inhibitors of MtbHisD enzyme activity to be tested as antimycobacterial agents.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

Financial support for this work was provided by Millennium Initiative Program MCT-CNPq, Ministry of Health-Secretary of Health Policy (Brazil) to D.S.S. and L.A.B. D.S.S. and L.A.B. also acknowledge grants awarded by CNPq, FINEP and DECIT-MS. D.S.S. (CNPq, 304051/1975-06) and L.A.B. (CNPq, 520182/99-5) are researchers awardees from the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil. We thank Giancarlo Pasquali for his important assistance in nucleotide sequence analysis.

## REFERENCES

- [1] World Health Organization, Fifty-third World Health Assembly, Stop Tuberculosis Initiative, Report by the Director General, A53/5, 5 (2000).
- [2] World Health Organization, Global Tuberculosis Control, WHO Report 2004, Geneva, Switzerland, WHO/HTM/TB/2004.331.
- [3] D.A. Enarson, J.F. Murray, Global epidemiology of tuberculosis, in: W.M Rom and S. Garay (Eds.) Tuberculosis, Little, Brown and Co., Boston, MA, 1996, pp. 57-75.
- [4] World Health Organization, Global Tuberculosis Control, WHO Report 1998, WHO/TB/98.237.
- [5] D.B. Young, Blueprint for the white plague, *Nature* 393 (1998) 515-516.
- [6] B.R. Bloom, C.J.L. Murray, Tuberculosis: commentary on a reemergent killer, *Science* 257 (1992) 1055-1064.
- [7] L.A. Basso, J.S. Blanchard, Resistance to antitubercular drugs, *Adv. Exp. Med. Biol.* 456 (1998) 115–144.
- [8] WHO Global tuberculosis programme – Tuberculosis Fact Sheet, 1998. [<http://www.who.int/gtb/publications/index.htm#Reports>].



- [9] World Health Organization, World Health Organization press release: drug resistant tuberculosis levels ten times higher in Eastern Europe and Central Asia, Saudi. Med. J. 25 (2004) 1139-1140.
- [10] B. Petrini, S. Hoffner, Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli, Int. J. Antimicrob. Agents 13 (1999) 93-97.
- [11] G.A. Colditz, T.F. Brewer, C.S. Berkey, M.E. Wilson, E. Burdick, H.V. Fineberg, F. Mosteller, Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature, J. Am. Med. Assoc. 271 (1994) 698–702.
- [12] M.E. Winkler, Biosynthesis of Histidine, in: F.C. Neidhardt (Ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, ASM Press, Washington, DC, 1996, pp. 485-505.
- [13] E. Adams, The enzymatic synthesis of histidine from histidinol, J. Biol. Chem. 209 (1954) 829-846.
- [14] E. Adams, L-Histidinal, a biosynthetic precursor of histidine, J. Biol. Chem. 217 (1955) 325-344.
- [15] J.C. Loper, E. Adams, Purification and properties of histidinol dehydrogenase from *Salmonella typhimurium*, J. Biol. Chem. 240 (1965) 788-795.

- [16] A. Nagai, E. Ward, J. Beck, S. Tada, J.Y. Chang, A. Scheidegger, J. Ryals, Structural and functional conservation of histidinol dehydrogenase between plants and microbes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 4133-4137.
- [17] S.Y. Lee, C.T. Grubmeyer, Purification and in vitro complementation of mutant histidinol dehydrogenases, *J. Bacteriol.* 169 (1987) 3938-3944.
- [18] A. Nagai, K. Suzuki, E. Ward, M. Moyer, M. Hashimoto, J. Mano, D. Ohta, A. Scheidegger, Overexpression of plant histidinol dehydrogenase using a baculovirus expression vector system, *Arch. Biochem. Biophys.* 295 (1992) 235-239.
- [19] C. Grubmeyer, M. Skiadopoulou, A.E. Senior, L-histidinol dehydrogenase, a  $Zn^{2+}$ -metalloenzyme, *Arch. Biochem. Biophys.* 272 (1989) 311-317.
- [20] D. Voet, J.D. Voet, Amino acid metabolism, in: D. Voet, J.D. Voet (Eds.), *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., USA, 1995, pp. 727-784.
- [21] S.T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry III, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, B.G. Barrell, Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, *Nature* 393 (1998) 537-544.

- [22] T. Parish, Starvation survival response of *Mycobacterium tuberculosis*, J. Bacteriol. 185 (2003) 6702-6706.
- [23] C.M. Sasseti, D.H. Boyd, E.J. Rubin, Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis, Mol. Microbiol. 48 (2003) 77-84.
- [24] T. Parish, B.G. Gordhan, R.A. McAdam, K. Duncan, V. Mizrahi, N.G. Stoker, Production of mutants in amino acid biosynthesis genes of *Mycobacterium tuberculosis* by homologous recombination, Microbiology 145 (1999) 3497-3503.
- [25] S.A. Lesley, P. Kuhn, A. Godzik, A.M. Deacon, I. Mathews, A. Kreusch, G. Spraggon, H.E. Klock, D. McMullan, T. Shin, J. Vincent, A. Robb, L.S. Brinen, M.D. Miller, T.M. McPhillips, M.A. Miller, D. Scheibe, J.M. Canaves, C. Guda, L. Jaroszewski, T.L. Selby, M.A. Elsliger, J. Wooley, S.S. Taylor, K.O. Hodgson, I.A. Wilson, P.G. Schultz, R.C. Stevens, Structural genomics of the *Thermotoga maritime* proteome implemented in a high-throughput structure determination pipeline, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 11664-11669.
- [26] R. Vicentelli, C. Bignon, A. Gruez, S. Canaan, G. Sulzenbacher, M. Tegoni, V. Campanacci, C. Cambillau, Medium-scale structural genomics: strategies for protein expression and crystallization, Acc. Chem. Res. 36 (2003) 165-172.

- [27] K.S. Lundberg, D.D. Shoemaker, M.W. Adams, J.M. Short, J.A. Sorge, E.J. Mathur, High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*, *Gene* 108 (1991) 1-6.
- [28] J. Cline, J.C. Braman, H.H. Hogrefe, PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases, *Nucleic Acids Res.*, 24 (1996) 3546–3551.
- [29] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, in: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, p. A.1.
- [30] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [31] M.M. Bradford, R.A. McRorie, W.L. Williams, 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.
- [32] A. Kheiriloom, J. Mano, A. Nagai, A. Ogawa, G. Iwasaki, D. Ohta, Steady-state kinetics of cabbage histidinol dehydrogenase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 312 (1994) 493-500.
- [33] P.R. Winship, An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 1266.

- [34] G. Hannig, S.C. Makrides, Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*, Trends Biotechnol. 16 (1998) 54–60.
- [35] K.C. Kelley, K.J. Huestis, D.A. Austen, C.T. Sanderson, M.A. Donoghue, S.K. Stickel, E.S. Kawasaki, M.S. Osburne, Regulation of CD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in *Escherichia coli*, Gene 156 (1995) 33–36.
- [36] J.S. Oliveira, C.A. Pinto, L.A. Basso, D.S. Santos, Cloning and Overexpression in Soluble Form of Functional Shikimate Kinase and 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase Enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*, Protein Express. Purif. 22 (2001) 430–435.
- [37] M.L. Magalhaes, C.P. Pereira, L.A. Basso, D.S. Santos, Cloning and expression of functional shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.25) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, Protein Express. Purif. 26 (2002) 59–64.
- [38] R.G. Silva, L.P. Carvalho, J.S. Oliveira, C.A. Pinto, M.A. Mendes, M.S. Palma, L.A. Basso, D.S. Santos, Cloning, overexpression, and purification of functional human purine nucleoside phosphorylase, Protein Express. Purif. 27 (2003) 158–164.
- [39] T.H. Grossman, E.S. Kawasaki, S.R. Punreddy, M.S. Osburne, Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability, Gene 209 (1998) 95–103.

[40] S. Hinshelwood, N.G. Stoker, Cloning of mycobacterial histidine synthesis genes by complementation of a *Mycobacterium smegmatis* auxotroph, *Mol. Microbiol.* 6 (1992) 2887-2895.

[41] J.A. Barbosa, J. Sivaraman, Y. Li, R. Larocque, A. Matte, J.D. Schrag, M. Cygler, Mechanism of action and NAD<sup>+</sup>-binding mode revealed by the crystal structure of L-histidinol dehydrogenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (2002) 1859-1864.

## FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. HisD catalyzes the  $\text{NAD}^+$ - and  $\text{Zn}^{+2}$ -dependent conversion of L-histidinol to L-histidine through an L-histidinaldehyde intermediate [13-15], with the concomitant reduction of 2 moles of  $\text{NAD}^+$ .

FIGURE 2. Agarose gel (1.0%) electrophoresis of PCR product amplified from *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA. Lane 1: molecular marker  $\phi\text{X174}$  RF DNA/*Hae*III Fragments (Invitrogen); Lane 2: PCR amplification product (~1317 bp).

FIGURE 3. 12% SDS-PAGE analysis of soluble protein fraction of crude extracts. Expression of MtbHisD after 18 hours of cell growth (additional time after  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  value ranging between 0.4 and 0.6) in 200 mL LB medium ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  carbenicillin) without addition of IPTG. 25  $\mu\text{g}$  of total protein were loaded into each lane. Lane 1: MW marker “High range” (Gibco BRL); Lane 2: *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a(+)] (control); Lane 3: *E. coli* BL21(DE3) [pET-23a(+):*hisD*].

FIGURE 4. Linear dependence of MtbHisD activity on soluble cellular extract volume. The rates of enzyme activity were carried out in the forward direction by continuously monitoring  $\text{NAD}^+$  reduction through the increase in absorbance at 340 nm.

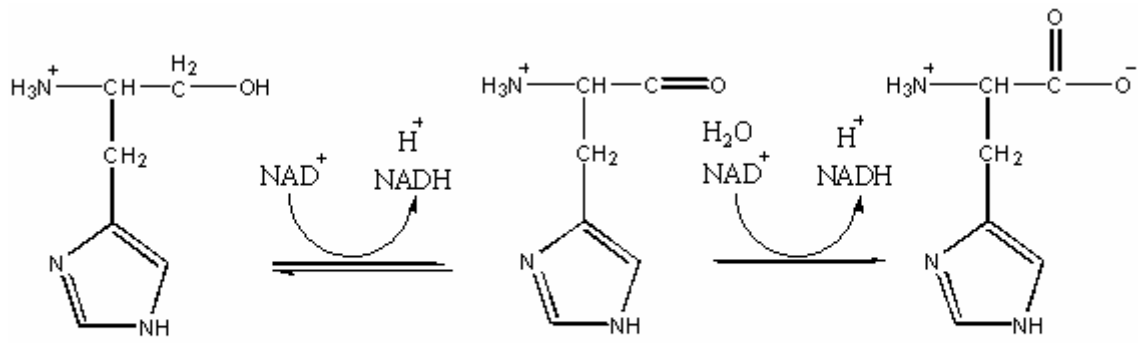


Fig. 1



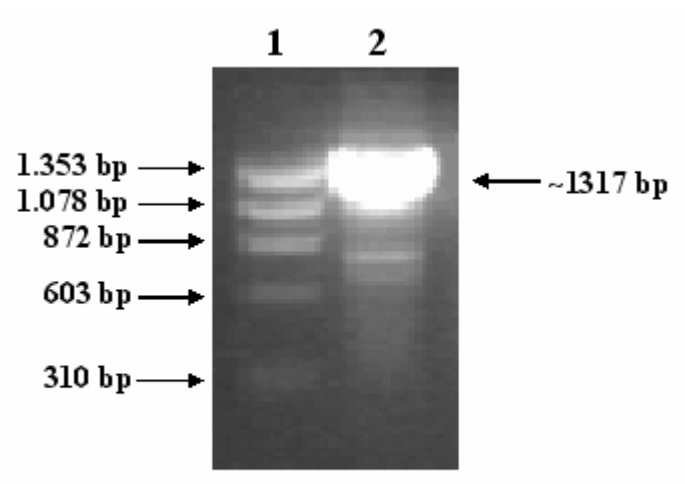


Fig 2

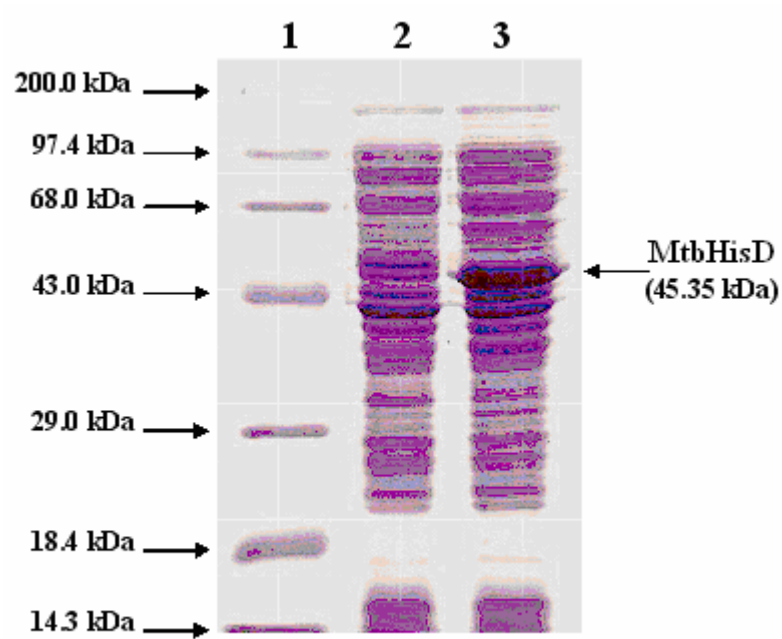


Fig. 3

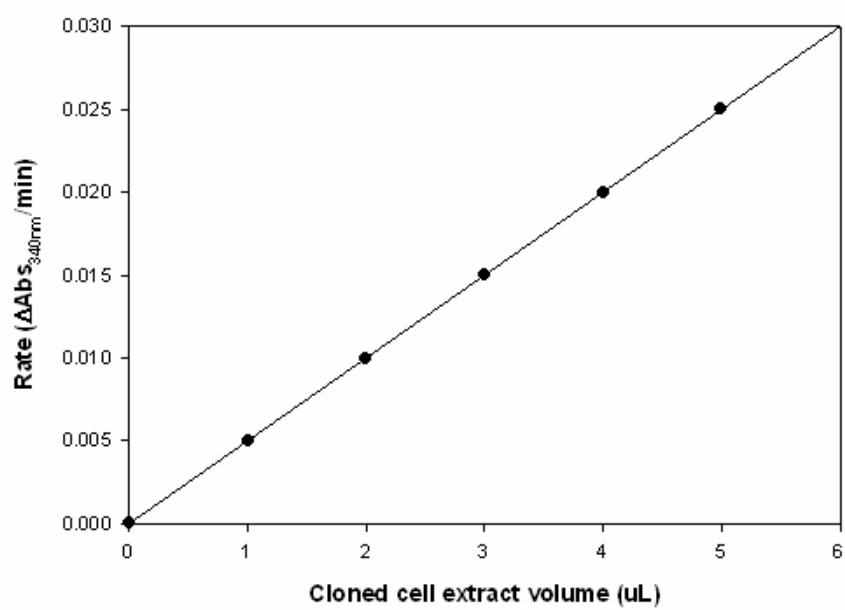


Fig. 4

Table 1

Measurements of *M. tuberculosis* histidinol dehydrogenase enzyme activity

Soluble cellular extract <sup>a</sup>	Specific activity <sup>b</sup>	
	(SA, U mg <sup>-1</sup> )	SA cloned/SA control
Control	0.0001254	1.00
HisD	0.0768	612.44

<sup>a</sup> Crude cellular extract in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

<sup>b</sup> U mL<sup>-1</sup>/mg mL<sup>-1</sup>

#### 4. DISCUSSÃO

Baseando-se nos objetivos específicos propostos e nos resultados obtidos (supracitados no manuscrito), podemos afirmar que a primeira etapa deste projeto foi concluída com êxito. O provável gene estrutural *hisD* de *M. tuberculosis* H37Rv foi amplificado a partir do DNA genômico por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Figura 8 - Figura 2 do manuscrito na página 65), fazendo-se necessária a adição de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) à mistura de reação. Este co-solvente auxilia em sobrepujar as dificuldades de extensão da polimerase resultantes de estruturas secundárias de DNA e otimiza a desnaturação de seqüências ricas em GC (WINSHIP, 1989), o que é coerente com as propriedades genômicas desta cepa micobacteriana (COLE *et al.*, 1998). O produto de PCR foi clonado em vetor de expressão pET-23a(+) entre os sítios de restrição para *Nde*I e *Hind*III. O seqüenciamento do fragmento clonado confirmou a identidade do inserto como a seqüência do gene estrutural *hisD* de *M. tuberculosis* (1317 pb) e demonstrou que não houve a introdução de nenhuma mutação a partir do passo de amplificação por PCR.

A enzima HisD de *M. tuberculosis* H37Rv foi superexpressa em células eletrocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo recombinante pET-23a(+):*hisD*. Visando avaliar a expressão da enzima recombinante micobacteriana em função do tempo, foram testados diferentes intervalos de tempo dentro do período de 48 horas de crescimento celular à 37°C tanto na presença como na ausência de indução por adição de isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) ao meio de cultura. A partir das análises por SDS-PAGE das amostras coletadas no período experimental, pôde-se identificar um maior rendimento de proteína recombinante solúvel expressa em 18 horas na ausência de indutor (Figura 9 - Figura 3 do manuscrito na página 66). Ainda que uma

grande quantidade de proteína recombinante estivesse presente na fração solúvel, existe uma considerável porcentagem da mesma na fração insolúvel; entretanto, o investimento em estratégias de solubilização como a redução da temperatura de cultivo (HANNIG & MAKRIDES, 1998) não aumentaram sua solubilidade. De qualquer forma, evidenciou-se que os extratos celulares solúveis continham uma quantidade significativa de proteína recombinante com uma massa molecular de subunidade de aproximadamente 45 kDa, valor coerente com o esperado para a enzima HisD de *M. tuberculosis* (45.346, 10 Da). A quantificação densitométrica da expressão diferencial demonstrou que esta enzima constitui aproximadamente 9% do total de proteínas presentes no extrato bruto. O ensaio de atividade enzimática revelou um aumento de 612 vezes na atividade específica da enzima recombinante expressa em relação ao controle negativo (Tabela 1 - Tabela 1 do manuscrito na página 68), e a análise da velocidade de reação em estado estacionário demonstrou uma dependência linear de volume de extrato celular adicionado à mistura de reação (Figura 10 - Figura 4 do manuscrito na página 67).

Cabe salientar que a superexpressão da proteína recombinante foi obtida sem a adição de indutor. O sistema pET utiliza uma T7 RNA polimerase com alta processividade que encontra-se sob controle do promotor induzível por IPTG *lacUV5* para transcrever genes alvos de interesse (KELLEY *et al.*, 1995). Trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que podem ser obtidos altos níveis de produção protéica na fase estacionária do crescimento celular na ausência de IPTG (OLIVEIRA *et al.*, 2001; MAGALHAES *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2003). Tem sido proposto que ocorra a expressão protéica em nível basal em sistemas controlados por *lac* quando células atingem a fase estacionária em meios de cultura complexos e que adenosina monofosfato cíclica, acetato e baixo pH são necessários para permitir a expressão na ausência de indução por

IPTG. Apesar de este efeito ser baixo, qualquer estímulo passa a ser amplificado, uma vez que o gene de interesse encontra-se em um plasmídeo multicópia que é transcrito de forma eficiente pela T7 RNA polimerase (GROSSMAN *et al.*, 1998).

Apesar de o gene *hisD* já ter sido identificado em *M. smegmatis* (HINSHELWOOD & STOKER, 1992), uma espécie micobacteriana não patogênica, não havia evidência experimental atribuindo ao gene a codificação de uma HisD. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho são inéditos e vem por sua vez confirmar a região de homologia do gene *hisD* como sendo responsável pela codificação da proteína HisD em *M. tuberculosis*. O estabelecimento de um protocolo de purificação da enzima recombinante expressa proverá proteína em estado homogêneo suficiente para realização de estudos cinéticos, imobilização enzimológica em superfície de ouro coloidal para estudos de interação com compostos de extratos vegetais (*Plasmon Surface Resonance*), e testes de cristalização para determinação de estrutura tridimensional por difração de raios-X. Uma vez que a estrutura da enzima HisD de *E. coli* foi determinada (em 1,70 Å de resolução) tanto no estado apo como complexada com  $Zn^{+2}$  e  $NAD^{+}$  (BARBOSA *et al.*, 2002) e apresenta mais de 30% de identidade de seqüência de aminoácidos com a enzima de *M. tuberculosis*, a primeira pode ser utilizada como molde para determinação da estrutura da enzima micobacteriana por substituição molecular.

A combinação entre a crescente lista de genomas seqüenciados e a utilização da bioinformática possibilitou trilhar novos caminhos no descobrimento de novos alvos e no desenho racional de drogas. A disponibilidade de estruturas tridimensionais de uma biomacromolécula introduz a possibilidade de desenhar drogas baseado em um modelo detalhado do sítio de ligação do alvo. A modelagem molecular é necessária para usar esta informação para o desenho de drogas. O desenho racional de novos agentes, utilizando

modelagem molecular, baseado na estrutura das enzimas envolvidas nesta rota biossintética, é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de drogas contra a TB. As drogas atualmente disponíveis no combate à TB foram identificadas a partir de prospecção tradicional, ao acaso. Considerando que a cristalografia de raios-X pode determinar a estrutura cristalina em resolução quase atômica para qualquer proteína de interesse terapêutico, o conhecimento da proteína alvo do tipo selvagem e mutante em detalhes até atômicos, pode auxiliar no desenho de um novo ligante para o sítio de ligação do receptor que bloqueie a síntese de histidina em linhagens sensíveis e resistentes.



## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams E (1954) The enzymatic synthesis of histidine from histidinol. *J Biol Chem* 209: 829-846.
- Adams E (1955) L-Histidinal, a biosynthetic precursor of histidine. *J Biol Chem* 217: 325-344.
- Barbosa JA, Sivaraman J, Li Y, Larocque R, Matte A, Schrag JD and Cygler M (2002) Mechanism of action and NAD<sup>+</sup>-binding mode revealed by the crystal structure of L-histidinol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1859-1864.
- Bloom BR and Murray CJL (1992) Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 257: 1055-1064.
- Bloom BR and Small PM (1998) The evolving relation between humans and *Mycobacterium tuberculosis*. *N Engl J Med* 338: 677-678.
- Brennan PJ (1997) Tuberculosis in the context of emerging and reemerging diseases. *FEMS Immunol Med Microbiol* 18: 263-269.
- Brennan PJ and Nikaido H (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 64: 29-63.
- Calmette A (1927) La vaccination préventive contre la tuberculose par BCG. 1er édition. Masson et Cie, Paris.
- Castiglioni A (1993) History of tuberculosis. Medical Life Press, New York.
- Caws M and Drobniewski FA (2001) Molecular techniques in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* and the detection of drug resistance. *Ann N Y Acad Sci* 953: 138-145.
- Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F (1994) Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 271: 698-702.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream M-A, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S and Barrell BG (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.

Daniel TM (1997) Captain of death: the story of tuberculosis. 1st edition. University of Rochester Press, New York.

Ehlers S (1999) Immunity to tuberculosis: a delicate balance between protection and pathology. FEMS Immunol Med Microbiol 23: 149-158.

Enarson DA and Murray JF (1996) Global epidemiology of tuberculosis. In: Rom WM and Garay S (eds) Tuberculosis. Little, Brown and Co., Boston, MA, pp 57-75.

Farkas DH (2002) Molecular diagnostics: the best is yet to come. Trends Mol Med 8: 245.

Fätkenheuer G, Taelman H, Lepage P, Schwenk A and Wenzel R (1999) The return of tuberculosis. Diagn Microbiol Infect Dis 34: 139-146.

Fischl MA, Daikos GL, Uttamchandani RB, Poblete RB, Moreno JN, Reyes RR, Boota AM, Thompson LM, Cleary TJ, Oldham SA, *et al.* (1992) Clinical presentation and outcome of patients with HIV infection and tuberculosis caused by multiple-drug-resistant bacilli. Ann Intern Med 117: 184-190.

Gilbert GL (2002) Molecular diagnostics in infectious diseases and public health microbiology: cottage industry to postgenomics. Trends Mol Med 8: 280-287.

Glickman MS and Jacobs WR Jr. (2001) Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. Cell 104: 477-485.

Grange JM, Stanford JL and Rook GA (1995) Tuberculosis and cancer: parallels in host responses and therapeutic approaches? Lancet 345: 1350-1352.

Grossman TH, Kawasaki ES, Punreddy SR and Osburne MS (1998) Spontaneous cAMP-dependent derepression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. Gene 209: 95-103.

Grubmeyer C, Skiadopoulou M and Senior AE (1989) L-histidinol dehydrogenase, a Zn<sup>2+</sup>-metalloenzyme. Arch Biochem Biophys 272: 311-317.

Hannig G and Makrides SC (1998) Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. Trends Biotechnol 16: 54-60.

Hess J and Kaufmann SHE (1999) Development of novel tuberculosis vaccines. C R Acad Sci III 322: 953-958.

Hinshelwood S and Stoker NG (1992) Cloning of mycobacterial histidine synthesis genes by complementation of a *Mycobacterium smegmatis* auxotroph. Mol Microbiol 6: 2887-2895.

Jagirdar J and Zagzag D (1996) Pathology and insights into pathogenesis of tuberculosis. In: Rom WM and Garay S (eds) Tuberculosis. Little, Brown and Co., Boston, MA, pp 467-482.

Jarlier V and Nikaido H (1994) Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 123: 11-18.

Kelley KC, Huestis KJ, Austen DA, Sanderson CT, Donoghue MA, Stickel SK, Kawasaki ES and Osburne MS (1995) Regulation of CD4-183 gene expression from phage-T7-based vectors in *Escherichia coli*. *Gene* 156: 33-36.

Koch R (1882) The aetiology of tuberculosis. *Berlin Klin Wochenschr* 19: 221-230.

Labidi AH, Estes RC, David HL and Bollon AP (2001) Mycobacterium recombinant vaccines. *Tunis Med* 79: 65-81.

Lee SY and Grubmeyer CT (1987) Purification and in vitro complementation of mutant histidinol dehydrogenases. *J Bacteriol* 169: 3938-3944.

Loper JC and Adams E (1965) Purification and properties of histidinol dehydrogenase from *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 240: 788-795.

Magalhães ML, Pereira CP, Basso LA and Santos DS (2002) Cloning and expression of functional shikimate dehydrogenase (EC 1.1.1.25) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Protein Expr Purif* 26: 59-64.

Nagai A, Suzuki K, Ward E, Moyer M, Hashimoto M, Mano J, Ohta D and Scheidegger A (1992) Overexpression of plant histidinol dehydrogenase using a baculovirus expression vector system. *Arch Biochem Biophys* 295: 235-239.

Nagai A, Ward E, Beck J, Tada S, Chang JY, Scheidegger A and Ryals J (1991) Structural and functional conservation of histidinol dehydrogenase between plants and microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4133-4137.

Narain JP, Raviglione MC and Kochi A (1992) HIV-associated tuberculosis in developing countries: epidemiology and strategies for prevention. *Tuber Lung Dis* 73: 311-321.

Nolan CM (1997) Nosocomial multidrug-resistant tuberculosis: global spread of the third epidemic. *J Infect Dis* 176: 748-751.

NSB editorial (2000) Taming tuberculosis-again. *Nat Struct Biol* 7: 87-88.

Oliveira JS, Pinto CA, Basso LA and Santos DS (2001) Cloning and Overexpression in Soluble Form of Functional Shikimate Kinase and 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase Enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr Purif* 22: 430-435.

Orme IM (2001) The search for new vaccines against tuberculosis. *J Leukoc Biol* 70: 1-10.

Orme IM, McMurray DN and Belisle JT (2001) Tuberculosis vaccine development: recent progress. *Trends Microbiol* 9: 115-118.

Pablos-Mendez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F, Cohn DL, Lambregts-van Weezenbeek CSB, Kim SJ, Chaulet P and Nunn P (1998) Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. *N Engl J Med* 338: 1641-1649.

Parish T (2003) Starvation survival response of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 185: 6702-6706.

Parish T, Gordhan BG, McAdam RA, Duncan K, Mizrahi V and Stoker NG (1999) Production of mutants in amino acid biosynthesis genes of *Mycobacterium tuberculosis* by homologous recombination. *Microbiology* 145: 3497-3503.

Parrish NM, Dick JD and Bishai WR (1998) Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 6: 107-112.

Pasqualoto KFM and Ferreira EI (2001) An approach for the rational design of new antituberculosis agents. *Curr Drug Targets* 2: 427-437.

Peloquin CA (2001) Pharmacological issues in the treatment of tuberculosis. *Ann N Y Acad Sci* 953: 157-164.

Petrini B and Hoffner S (1999) Drug-resistant and multidrug-resistant tubercle bacilli. *Int J Antimicrob Agents* 13: 93-97.

Riley LW (1993) Drug-resistant tuberculosis. *Clin Infect Dis* 17: S442-446.

Ruffino-Netto A (2002) Tuberculosis: the neglected calamity. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 51-58.

Sasseti CM, Boyd DH and Rubin EJ (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* 48: 77-84.

Silva RG, Carvalho LP, Oliveira JS, Pinto CA, Mendes MA, Palma MS, Basso LA and Santos DS (2003) Cloning, overexpression, and purification of functional human purine nucleoside phosphorylase. *Protein Expr Purif* 27: 158-164.

Swartz MN (2000) Impact of antimicrobial agents and chemotherapy from 1972 to 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2009-2016.

Telenti A and Iseman M (2000) Drug-resistant tuberculosis: what do we do now? *Drugs* 59: 171-179.

Villemin JA (1865) *C R Acad Sci* 61: 1012.

Vincentelli R, Bignon C, Gruez A, Canaan S, Sulzenbacher G, Tegoni M, Campanacci V and Cambillau C (2003) Medium-scale structural genomics: strategies for protein expression and crystallization. *Acc Chem Res* 36: 165-172.

Voet D and Voet JD (1995) Amino acid metabolism. In: Voet D and Voet JD (eds) Biochemistry. John Wiley & Sons, Inc., USA, pp 727-784.

Winkler ME (1996) Biosynthesis of Histidine. In: Neidhardt FC (ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press, Washington, DC, pp 485-505.

Winship PR (1989) An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. Nucleic Acids Res 17: 1266.

World Health Organization (1998) Global Tuberculosis Control. WHO Report 1998, Geneva, Switzerland, WHO/TB/98.237.

Young D (2001) Letting the genome out of the bottle: prospects for new drug development. Ann N Y Acad Sci 953: 146-150.

Young DB (1998) Blueprint for the white plague. Nature 393: 515-516.