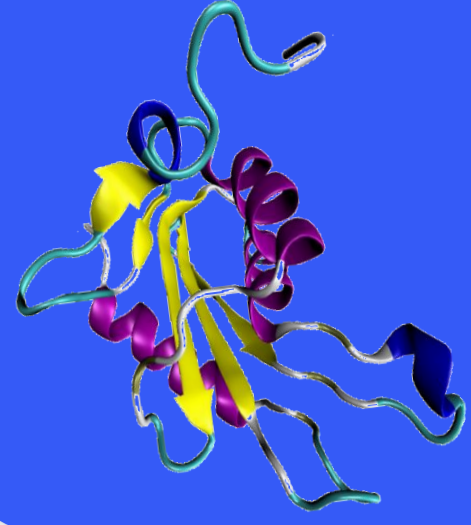


CITIDINA 5'-TRIFOSFATO SINTASE DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO RACIONAL DE NOVAS DROGAS ANTI-TB



Jacqueline Gonçalves Rehm^{1,2}, Diógenes Santos¹, Luiz Basso¹

¹Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Instituto de Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, PUCRS, Porto Alegre, RS, BRASIL

²Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, BRASIL

E-mail: jacquehgr@hotmail.com, diogenes@pucrs.br, luiz.basso@pucrs.br

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecto contagiosa causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) e que acomete cerca de 9 milhões de pessoas no mundo, a cada ano (Figura 1). Destas, cerca de 2 milhões vão a óbito e aproximadamente 14,8 % são co-infectadas com HIV [1]. Os altos índices de mortalidade da doença aliados à co-infecção HIV-TB e também o surgimento de linhagens resistentes aos medicamentos utilizados no tratamento levam à urgente necessidade do desenvolvimento de novas drogas anti-TB que sejam mais efetivas e menos tóxicas.

Inibidores de enzimas correspondem a aproximadamente 25% dos medicamentos comercializados no Estados Unidos [2]. Desse modo, é importante considerar enzimas como alvos em potencial para o desenvolvimento de fármacos. As enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos são boas candidatas para esse propósito, visto que são essenciais para a biossíntese de ácidos ribo e desoxinucleico.

A enzima citidina 5'-trifosfato sintase (CTPS) de *M. tuberculosis*, codificada pelo gene *pyrG*, é um atrativo alvo molecular, pois catalisa uma etapa crítica na via *de novo* de pirimidinas: a conversão ATP-dependente de CTP a partir de UTP, utilizando L-glutamina ou amônia como fonte de nitrogênio [3] (Figura 2).

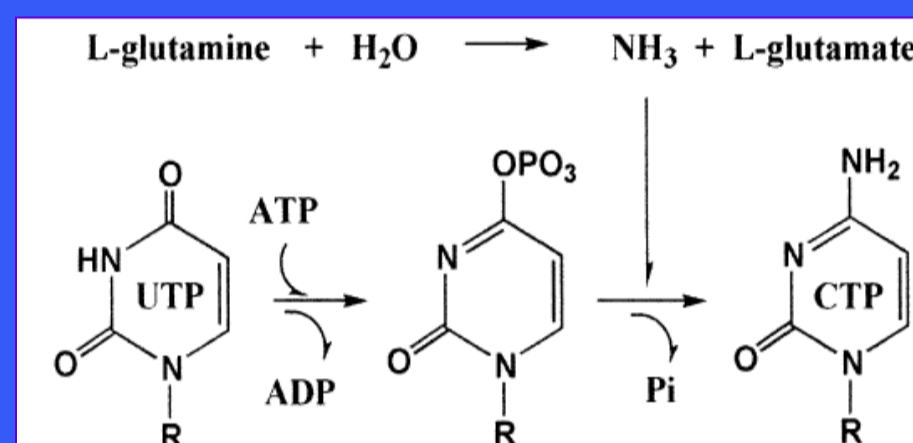


Fig. 2. Reação ATP-dependente catalizada pela CTPS.

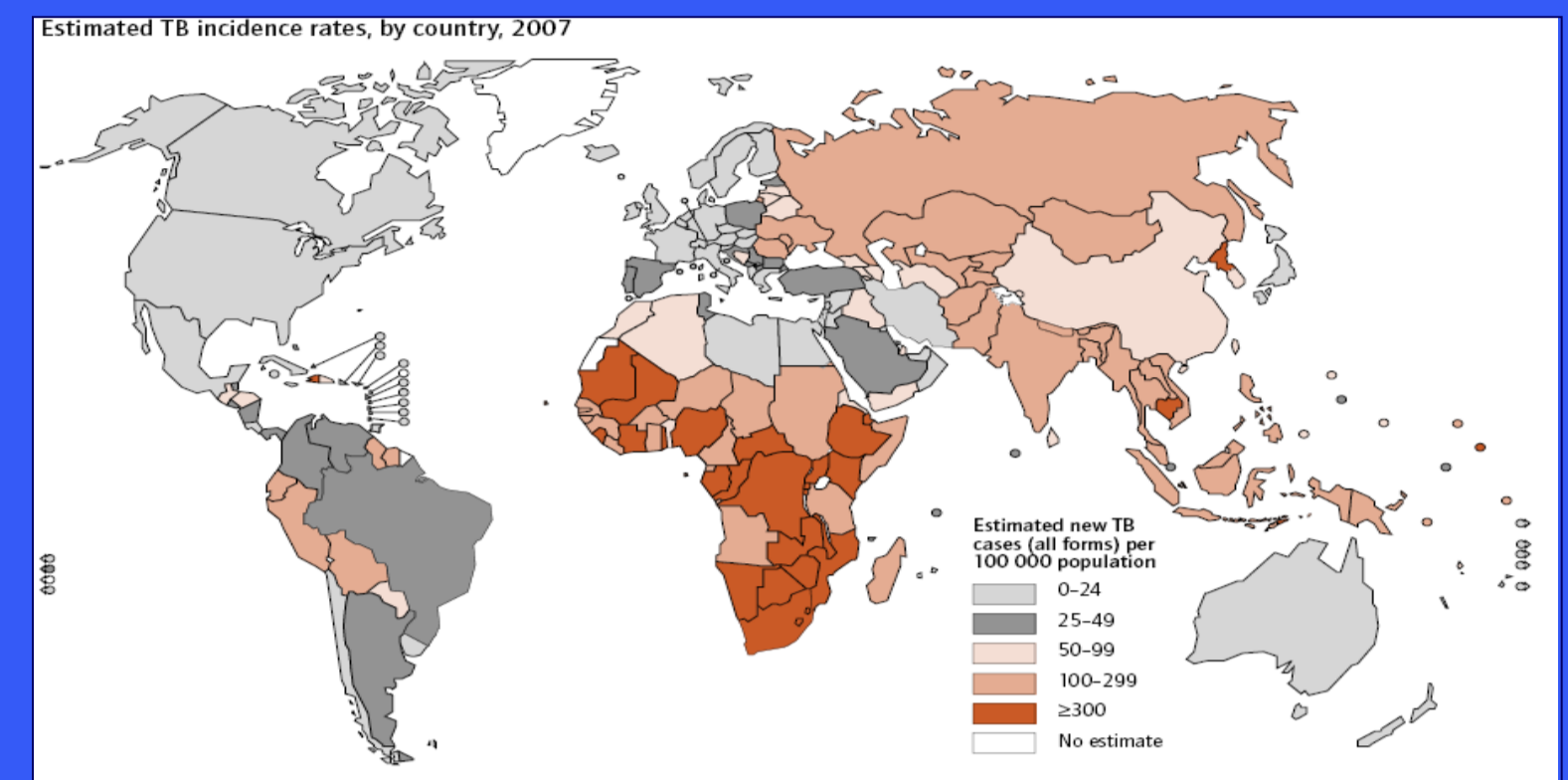


Fig. 1. Incidência estimada dos novos casos de TB em 2007 (OMS-2009).

OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é o estudo molecular, cinético e estrutural da enzima CTPS de *M. tuberculosis*, visando o desenvolvimento racional de novos agentes anti-TB.

METODOLOGIA

Oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados e sintetizados (Invitrogen) de acordo com a sequência do gene *pyrG* publicado. A amplificação foi realizada por PCR onde o DNA genômico de *Mtb* serviu como molde. O produto de PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose e em seguida purificado, clonado em vetor pCR-Blunt (Invitrogen) e subclonado em vetor de expressão pET-23a(+) (Novagen). Foi realizado o sequenciamento automático de DNA (Ludwig) para confirmação da identidade e integridade do gene clonado. Posteriormente, testes de expressão protéica, utilizando cepas de *E. coli*, foram realizados em diferentes condições experimentais. Após determinação de melhor condição de expressão, testes de purificação da proteína recombinante obtida foram realizados por FPLC, através do sistema Äkta (GE-Healthcare). Para determinação dos parâmetros cinéticos, a atividade enzimática da CTPS será monitorada diretamente em espectrofotômetro, onde é possível observar o acréscimo de absorvância a 291nm, devido a conversão de UTP a CTP [4].

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise da eletroforese em gel de agarose mostrou a amplificação de produto compatível com o tamanho esperado do gene *pyrG* (1761 pb) (Figura 3). Após a purificação do amplicon o gene foi clonado e sub-clonado com sucesso nos vetores pCR-Blunt e pET23a(+) respectivamente. O sequenciamento do fragmento clonado comprovou a identidade e integridade do gene *pyrG* de *Mtb*.

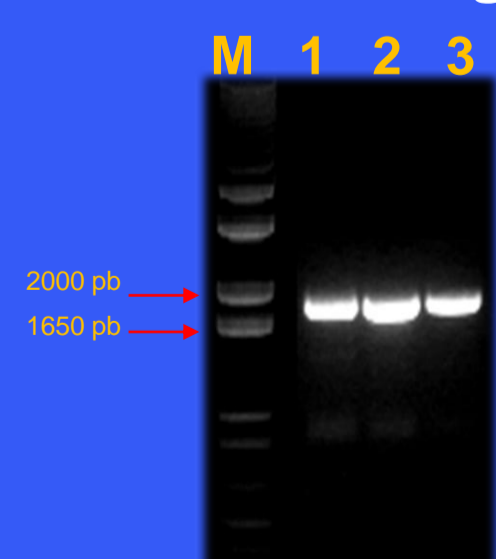


Fig. 3. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a amplificação do gene *pyrG* de *Mtb*. M: 1kb Plus DNA Ladder. 1: produto amplificado com 5% de DMSO. 2: produto amplificado com 10% de DMSO. 3: produto amplificado sem adição de DMSO na reação.

A proteína CTPS foi expressa na forma solúvel em *E. coli* BL21(DE3), transformadas com o plasmídeo pET-23a(+):*pyrG*, na condição de 30°C, meio Terrific Broth (Invitrogen), 24 horas após células alcançarem densidade óptica de 0.4 (600nm). Análise SDS-PAGE indicou uma quantidade significativa de proteína expressa com o peso molecular aparente da CTPS de *Mtb* (63.60 kDa) (Figura 4).

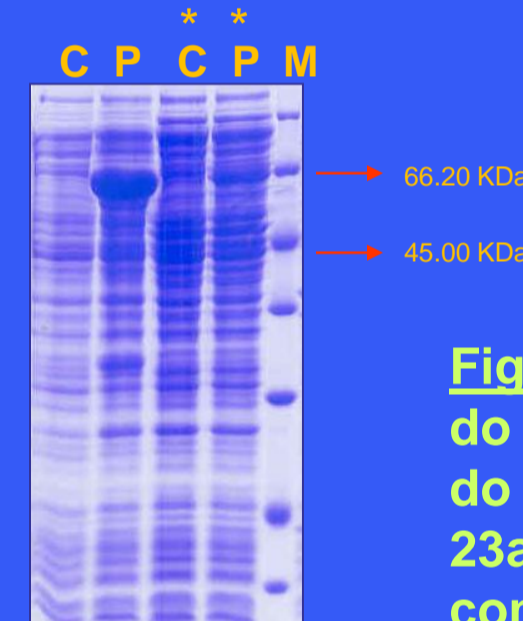


Fig. 4. Análise SDS-PAGE mostrando o produto de expressão do gene *pyrG* de *Mtb*. M: marcador Protein Marker. C: controle do teste (pET-23a(+)) somente o plasmídeo. P: pET-23a(+):*pyrG* (plasmídeo transformado). * Frações induzidas com 1mM IPTG.

Para purificação da proteína recombinante CTPS do extrato bruto de células *E. coli*, foram testadas diferentes colunas cromatográficas e protocolos de purificação. A forma pura da proteína foi obtida em apenas duas etapas cromatográficas, utilizando as colunas Q Sepharose Fast Flow e Butyl High Performance (GE-Healthcare). Na última coluna foram eluídas duas proteínas com aparentemente o mesmo peso molecular mas em picos diferentes, no entanto nós acreditamos tratar-se da mesma proteína em formas oligoméricas distintas (Figura 5). Estas duas proteínas serão submetidas a protocolo de digestão com tripsina para posterior análise por espectrometria de massas, que irá determinar a identidade das proteínas purificadas.

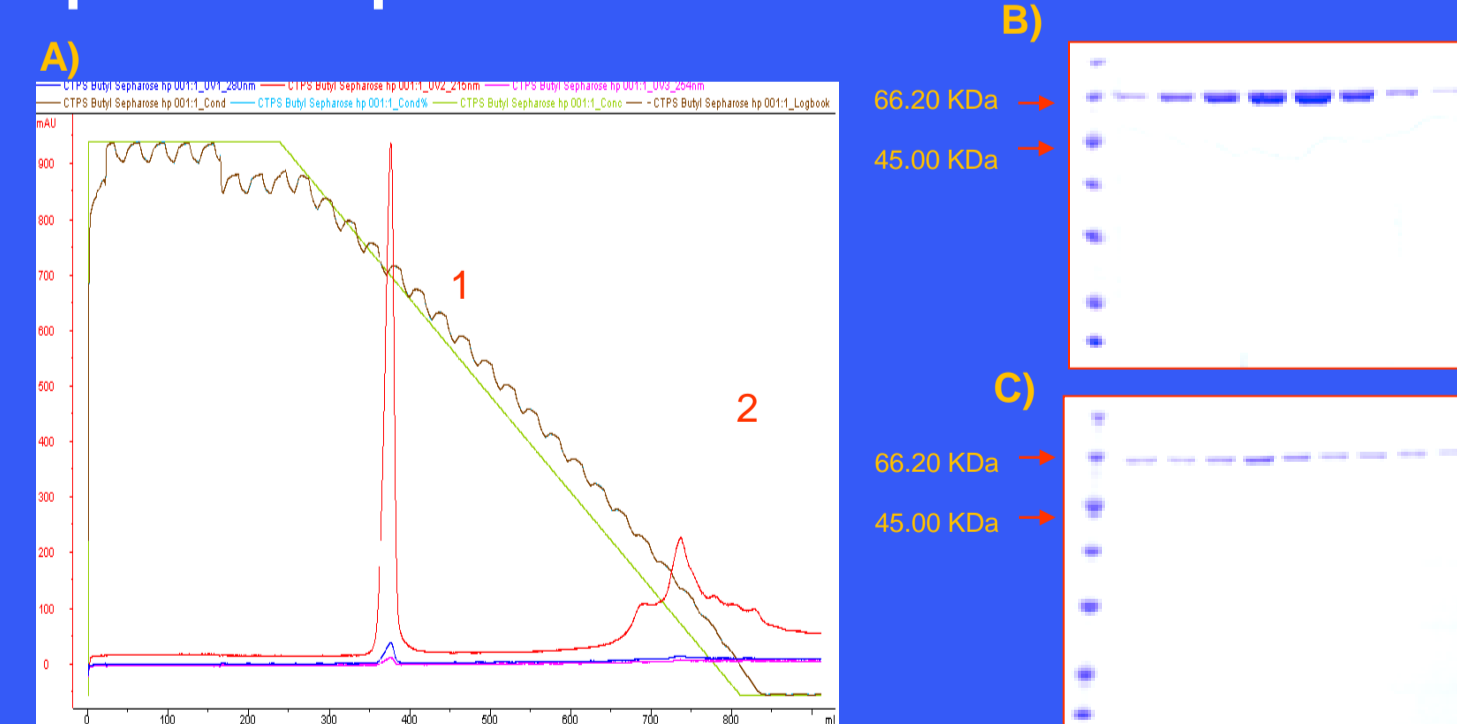


Fig. 5.A) Cromatograma da coluna Butyl HP.

B) SDS-PAGE do pico "1" eluído da coluna Butyl HP.

C) SDS-PAGE do pico "2" eluído da coluna Butyl HP.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O gene *pyrG* de *M. tuberculosis* H37Rv foi amplificado, clonado e expresso com sucesso em *E. coli* BL21(DE3). O protocolo de purificação protéica foi determinado utilizando duas etapas cromatográficas. Estudos cinéticos estão sendo realizados para a caracterização das propriedades da enzima e, após, testes de cristalografia serão feitos para promover estudos estruturais.

Este trabalho irá validar o papel bioquímico do produto do gene *pyrG* de *Mtb*, e estes dados poderão auxiliar o desenho racional de inibidores da enzima CTPS, objetivando assim a obtenção de novas drogas anti-TB.