

056

CLONAGEM, SUPER-EXPRESSIONE E PURIFICAÇÃO DAS ENZIMAS CORISMATO SINTASE E DEIDROQUINATO SINTASE DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. *Fernanda Ely, Evelyn Koeche Schroeder, Luiz Augusto Basso, Jeverson Frazzon, Diogenes Santiago Santos (orient.)* (Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, UFRGS).

O aumento da população imunodeficiente, como os HIV-positivos, e o surgimento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multi-resistentes tornou fundamental o estudo de novas alternativas para o combate da tuberculose. Uma abordagem possível é o desenvolvimento de substâncias que ataquem alvos específicos ao microrganismo e que estejam ausentes no organismo humano, minimizando assim o efeito tóxico destes fármacos. Uma possibilidade para este tipo de abordagem é a utilização das enzimas Deidroquinato Sintase (DQS) e Corismato Sintase (CS) que catalisam, respectivamente, a segunda e sétima reação da via do chiquimato. Análises filogenéticas preliminares demonstraram que a CS e a DQS em *M. tuberculosis* se conjugam com a flavina redutase formando um heterotrímero trifuncional. Os genes *aroF* e *aroB* de *M. tuberculosis* que codificam CS e DQS, respectivamente, foram amplificados por PCR e clonados em vetor de expressão pET23a(+) (Novagen). Os plasmídeos contendo os genes *aroF* e *aroB* foram transformados em células hospedeiras *Escherichia coli* Rosetta(DE3) e *E. coli* BL21(DE3) (Novagen), respectivamente, permitindo a super-expressão da CS e DQS sem indução com IPTG. Análises de expressão proteica por SDS-PAGE revelaram proteínas solúveis e com o peso molecular esperado: CS (41,7 kDa) e DQS (38,1 kDa). As proteínas foram purificadas a partir do extrato bruto por FPLC. A purificação da CS foi realizada em colunas MonoQ HR16/10 e Phenil Sepharose FF 16/10. A DQS foi purificada em colunas Q-Sepharose Fast Flow e Sephacryl S-200 HR (Pharmacia). As enzimas CS e DQS estão sendo submetidas a estudos de cinética enzimática e análise de estrutura tri-dimensional através de cristalografia. Os dados estruturais e cinéticos do complexo heterotrímérico tornará possível o desenho racional de inibidores que mimetizem o substrato, produto ou estado de transição destas enzimas e que possam ser usados no tratamento da tuberculose.