

131

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DO GENE (RV2232) QUE CODIFICA UMA PROVÁVEL 5'-NUCLEOTIDASE EM MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS H37RV.** *Jacqueline Gonçalves Rehm, Christopher Zandoná Schneider, Luiz Augusto Basso, Diogenes Santiago Santos (orient.)* (UFRGS).

Anualmente, cerca de 9 milhões de pessoas são infectadas com *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose. Destes, 2 milhões de casos são fatais. Mesmo não ocasionando o desenvolvimento da doença, *M. tuberculosis* pode permanecer em forma latente no homem. Assim, faz-se necessário o estudo de rotas metabólicas possivelmente envolvidas em mecanismos de latência do bacilo. Uma destas envolve o catabolismo de purinas, cujo primeiro passo é a hidrólise dos nucleotídeos AMP, IMP, XMP e GMP pela enzima 5'-nucleotidase, gerando o nucleosídeo correspondente e fosfato inorgânico. Neste trabalho, foram projetados oligonucleotídeos a fim de amplificar a seqüência que codifica uma provável 5'-nucleotidase (*Rv2232*) em *M. tuberculosis* H37Rv. Após a amplificação por PCR, um fragmento compatível com o tamanho esperado foi purificado em gel de agarose e ligado no vetor pCR-Blunt. Em seguida, as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* foram usadas na preparação do fragmento para posterior subclonagem no vetor pET-23a(+). Testes de expressão protéica foram realizados em diferentes condições, e uma proteína correspondente ao peso molecular teórico da 5'-nucleotidase foi observada na fração solúvel de duas cepas de *Escherichia coli* crescidas a 37°C, com e sem adição de IPTG ao meio de cultura. Atualmente, o fragmento clonado está em fase de seqüenciamento. Após o resultado deste e a otimização dos testes de expressão, a proteína será purificada e ensaiada quanto à atividade de nucleotidase. Futuramente, serão feitos estudos cinéticos e termodinâmicos para validar e caracterizar suas propriedades bioquímicas. Espera-se que este trabalho determine o papel biológico do gene *Rv2232*, abrindo a perspectiva de que novos estudos relacionados a mecanismos de latência sejam realizados.