

061

CLONAGEM, SEQÜENCIAMENTO E SUPEREXPRESSION DA ENZIMA DAHP SINTASE DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS H37RV. *Patricia Grotkowski Weber, Caroline Rizzi, Isabel Osório da Fonseca, Luiz Augusto Basso, Diógenes Santiago Santos, Jeverson Frazzon (orient.)* (Ciência dos Alimentos, ICTA, UFRGS).

No início do século XXI, a tuberculose (TB) ressurgiu como um problema de saúde global, matando por ano mais de 1, 8 milhões de pessoas. Estima-se que em torno de um terço da população mundial é portadora do agente etiológico da doença, o *Mycobacterium tuberculosis*. O ressurgimento da TB está relacionado com a epidemia de AIDS e ao aparecimento de linhagens multi-resistentes as drogas comercializadas, o que determina a procura de novos agentes antimicrobacterianos. Um alvo de interesse para o desenvolvimento de novas drogas é a via do ácido chiquímico, que está presente em *M. tuberculosis* mas ausente em humanos. A via é composta por uma série de 7 enzimas que darão origem a um precursor aromático comum, o corismato, composto fundamental no metabolismo dos aminoácidos aromáticos essenciais para a sobrevivência do microrganismo. A primeira etapa nesta via é a reação catalizada pela enzima DAHP sintase (3-Deoxi-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate syntase; E. C. 4.2.1.15) codificada pelo gene *aroG* em *M. tuberculosis*. O gene amplificado por PCR, a partir do DNA genômico, acrescido dos sítios de restrição *NdeI* e *BamHI* foi ligado no vetor de clonagem *pCR-Blunt*. Posteriormente, o fragmento clonado foi clivado com as enzimas de restrição citadas e religado ao vetor de expressão *pET-23a(+)*. O plasmídeo recombinante *pET-23a(+):aroG* foi seqüenciado através do método de Sanger. Para a superexpressão, o plasmídeo foi transformado em células *E. coli* Rosetta-gami(DE3) por eletroporação e então crescidas por 24 horas sem adição de IPTG. A expressão das frações foram analisadas em gel de SDS-PAGE. O seqüenciamento demonstrou a identidade do gene e a ausência de mutações. A análise do gel de SDS-PAGE revelou a superexpressão da proteína de aproximadamente 50 kDa na fração solúvel. A razão deste trabalho é a existência de um enorme potencial tecnológico para o desenvolvimento de drogas anti tuberculose de baixo custo e com curto período de tratamento através da utilização da tecnologia do DNA recombinante. (CNPq-Proj. Integrado).