

105

**PURIFICAÇÃO DA ENZIMA DEIDROQUINATO SINTASE DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS H37RV E A COMPLEMENTAÇÃO GÊNICA DE MUTANTES AROB- DE ESCHERICHIA COLI.** Jordana Dutra de Mendonça, Fernanda Ely, Luiz Augusto Basso, Diógenes*Santiago Santos, Jeverson Frazzon (orient.) (UFRGS).*

A Tuberculose (TB) tem preocupado as autoridades de saúde. A emergência de linhagens multi-resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* e o aumento da co-infecção TB-HIV criam a necessidade de novas terapias para o combate desse problema. Uma alternativa é o desenvolvimento de drogas que inibam alvos específicos vitais para o patógeno, como a via do Ácido Chiquímico, responsável pela biossíntese de aminoácidos aromáticos. Estando presente em plantas, fungos e bactérias, mas ausente em mamíferos. Assim, suas enzimas tornam-se alvos para o desenvolvimento de drogas antimicrobianas. A segunda enzima da via, Deidroquinato sintase (DQS), é codificada pelo gene *aroB*. O gene *aroB* foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv, clonado em vetor de expressão pET23a(+) (Novagen) e superexpresso em células *E. coli* BL21(DE3) (Novagen). A ausência de mutações introduzida pelo PCR foi confirmada por seqüenciamento automático de DNA. Gel SDS-PAGE revelou a superexpressão de proteína na fase solúvel com o peso molecular esperado (38, 1 KDa). A proteína foi purificada de extrato bruto por sistema FPLC. Dados estruturais e cinéticos da enzima são essenciais para o desenho de inibidores específicos, porém nem substrato e produto da DQS são disponíveis comercialmente. A complementação gênica foi usada para comprovar a funcionalidade da enzima. O gene *aroB* foi subclonado em vetor de expressão pKK223-3 (NCCB3190). A complementação de mutantes *E. coli* AB2847 (Genetic Stock Center), knockout para gene *aroB*, com pKK223-3::*aroB* tornará os mutantes capazes de crescer em meio mínimo sem suplementação de compostos aromáticos. Esses resultados justificam os estudos da DQS, que são essenciais para o desenho de inibidores específicos e que poderão ser usados no tratamento de TB.