

022

SUPEREXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA NIF/ISCA DE AZOTOBACTER VINELANDII. *Maria Julia Ledur Alles, Giovana Domeneghini Mercali, Jeverson Frazzon (orient.)*
(Departamento de Ciências dos Alimentos, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, UFRGS).

Agrupamentos [Fe-S] são estruturas inorgânicas quimicamente versáteis que estão ligadas a várias proteínas, atuando como cofatores. As chamadas proteínas [Fe-S] estão onipresentes na natureza, possuem ampla diversidade funcional e participam de várias funções celulares vitais, como respiração, fotossíntese e fixação de nitrogênio. A formação e inserção desses agrupamentos dentro das proteínas é um processo biológico complexo, que começou a ser compreendido devido ao estudo de genes fixadores de nitrogênio (*nif*) da bactéria *Azotobacter vinelandii*, que codificam as proteínas NifS e NifU; também foram encontrados genes homólogos no cromossoma do microrganismo que foram denominados *isc* (iron-sulfur cluster), os genes presentes neste operon não estão envolvidos com a fixação do nitrogênio, mas codificam proteínas similares denominadas *IscS* e *IscU*. Posteriormente os genes *isc* foram caracterizados em uma variedade enorme de organismos que vai de bactérias, leveduras, fungos, a plantas e humanos. NifS e *IscS* catalisam a dessulfuração do substrato L-cisteína para a obtenção do enxofre que será incorporado na síntese do agrupamento [Fe-S]. NifU e *IscU* servem como o local para a associação do agrupamento, além de fornecer o Fe. Estudos sobre uma outra enzima codificada no operon *nif*, como NifIscA, também presente no operon *isc* denominada *IscA*, indicam que esta enzima serve como um suporte alternativo para a biossíntese do agrupamento [Fe-S]. O gene NifIscA de *A. vinelandii* foi amplificado usando o método de PCR e inserido dentro do plasmídeo PT7-7. Este plasmídeo, designado pDB570 foi transformado na célula hospedeira *Escherichia coli* BL21(DE3) e induzido a altos níveis de expressão de NifIscA. Para a purificação a NifIscA produzida heterogeneamente foi submetida ao protocolo anteriormente descrito por Krebs et al., 2001. A razão deste trabalho é produzir a proteína NifIscA em níveis suficientes e com alto grau de pureza que permita que a sua estrutura cristalográfica seja determinada.