

047

CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE UMA GLIOXAL OXIDASE DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. *Fernanda Regina Bresciani, Livia Kmetzsch Rosa e Silva, Charley Christian Staats, Augusto Schrank, Marilene Henning Vainstein (orient.) (UFRGS).*

Glioxal oxidases são metaloenzimas que catalisam a oxidação de aldeídos a ácido carboxílico produzindo peróxido de hidrogênio. Análises funcionais do gene que codifica uma glioxal oxidase (glo1) no fitopatógeno *Ustilago maydis* demonstraram que esta proteína está envolvida no processo de filamentação, e mutantes nulos para este gene foram avirulentos em modelo de infecção experimental, comprovando o envolvimento de glo1 na infecção. *Cryptococcus neoformans* é um fungo basidiomiceto e patógeno humano que infecta principalmente indivíduos imunocomprometidos. *C. neoformans* possui três genes que codificam glioxal oxidases, localizados em diferentes cromossomos (1, 5 e 6). Estudos do nosso grupo comprovaram que a glioxal oxidase de *C. neoformans* codificada pelo gene localizado no cromossomo 6 possui expressão aumentada em condições de cultivo na temperatura de infecção (37°C). O objetivo deste trabalho é clonar, expressar e purificar esta glioxal oxidase para posterior produção de anticorpos, que serão utilizados na caracterização funcional desta proteína. A partir da extração de RNA de *C. neoformans* cultivado a 37°C e síntese de cDNA, a seqüência correspondente a esta glioxal oxidase foi amplificada por PCR, com primers específicos. O produto de PCR será purificado para clonagem em vetor pET23d por recombinação in vivo em *Escherichia coli* KC8. Após seleção de colônias positivas, o vetor será purificado e clivado para a confirmação da construção. A linhagem de *E. coli* pLysS será utilizada para expressão, a qual será confirmada por análise em gel SDS-PAGE 12%. A purificação será realizada em coluna de afinidade a metal. A produção de anticorpos policlonais a partir da glioxal oxidase purificada irá contribuir para a caracterização funcional desta proteína em *C. neoformans*. (CNPq).