

262

**AMPLIFICAÇÃO E CLONAGEM DO GENE *AROF* DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* E SUPEREXPRESSION DO SEU PRODUTO, A CORISMATO SINTASE.** *Fernanda Ely, Evelyn K. Schroeder, Luiz A. Basso, Diógenes S. Santos* (Grupo de Microbiologia Molecular e Funcional, Depto de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Biociências, UFRGS).

O problema das doenças infecto-contagiosas, dentre elas a tuberculose, tem se agravado nos últimos anos. Com a emergência de cepas multi-resistentes tornou-se fundamental o desenvolvimento de novos agentes anti-microbianos. Uma abordagem possível é o desenvolvimento de substâncias que visem atacar alvos específicos aos microorganismos que estejam ausentes no organismo humano, minimizando assim o efeito tóxico destas drogas. Um exemplo deste tipo de abordagem é a utilização da via do ácido chiquímico. Esta via biossintética utilizada por fungos, bactérias, alguns protozoários e plantas, mas não por mamíferos, leva a formação do ácido corísmico, o composto chave na biossíntese dos aminoácidos aromáticos, ácido *p*-aminobenzóico, ácido *p*-hidroxibenzóico, entre outros. Especificamente em *M. tuberculosis*, a presença dos genes codificantes das enzimas envolvidas na via do ácido chiquímico foi verificada com a publicação da seqüência de seu genoma. Logo, compostos com atividade anti-tuberculose talvez possam ser obtidos a partir da inibição das enzimas desta via. Seguindo esta abordagem, estamos trabalhando com a Corismato Sintase (CS), a última enzima da via do ácido chiquímico, que catalisa a conversão estereosseletiva do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato em corismato. O gene *aro F*, que codifica a CS, foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv e clonado no vetor pET23a(+). A transformação deste plasmídeo em células hospedeiras *E. coli* BL21(DE3) permitiu a super-expressão da CS (43 KDa) na forma solúvel. Entretanto, os resultados iniciais de super-expressão não foram reprodutíveis em larga escala. A fim de desenvolver um protocolo adequado para a super-expressão da proteína em forma solúvel diversas condições estão sendo testadas. Ensaio de atividade da CS também estão sendo desenvolvidos. (Apoio financeiro: CNPq).