

085

MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRECIONADA DO GENE GUAC E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MUTANTES. Paula Espellet Dockhorn, Bruna Pelegrim Selbach, Valnês da Silva Rodrigues-Junior, Diógenes Santiago Santos, Luiz Augusto Basso (orient.) (PUCRS).

A enzima guanosina monofosfato redutase (GMPR), EC 1.6.6.8, é importante na conversão de nucleotídeos derivados de guanina (G) e adenina (A), participando, assim, na manutenção do equilíbrio intracelular de nucleotídeos de purina. Como a GMPR, codificada pelo gene *guaC* de *Escherichia coli*, catalisa a deaminação irreversível, dependente de NADPH, da 5'-GMP para a IMP (inosina monofosfato), NH₃ e NADP⁺, ela desempenha uma função importante nesta conversão de derivados de G e A. O principal objetivo deste trabalho é realizar o estudo cinético e termodinâmico de proteínas mutantes da GMPR para a determinação do seu mecanismo catalítico. Foi realizado alinhamento múltiplo entre seqüências de proteínas homólogas, apontando os resíduos conservados e avaliando o grau de identidade e similaridade entre os aminoácidos de tais proteínas. Uma avaliação da estrutura tridimensional da proteína, baseada no modelo cristalográfico da GMPR humana, sugeriu possíveis resíduos do sítio catalítico como Ser270, Cys186, Thr188 e Asp219. Então, realizou-se o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores a fim de obter os mutantes C186A, C186S, S270A, T188A, D219A e D219N. A mutagênese sítio-direcionada foi feita através de uma técnica de amplificação por PCR. As seqüências modificadas foram seqüenciadas para confirmar a mutação desejada e assegurar que nenhuma mutação indesejada tenha sido inserida durante a amplificação. Logo depois, foram realizados testes de expressão e as proteínas mutantes foram obtidas na fração solúvel após crescimento em células *Escherichia coli* BL21(DE3) a 37°C. As perspectivas deste trabalho são a purificação por FPLC, estudo cinético e termodinâmico das proteínas mutantes para a determinação do mecanismo catalítico da enzima GMPR.