

# Construção de mutantes condicionais e pontuais de *Mycobacterium tuberculosis* para validação da DNA girase como alvo molecular de novos candidatos a fármacos

Fernanda T. Subtil<sup>1</sup>; Anne D. Villela<sup>2</sup>; Diógenes S. Santos<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PPGBCM), 90619-900 Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Pesquisadora do Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) da PUCRS, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brasil. <sup>3</sup>Professor adjunto da PUCRS, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brasil. <sup>4</sup> Coordenador do CPBMF da PUCRS, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brasil

A DNA girase é uma enzima codificada pelos genes *gyrA* e *gyrB*. Esta enzima é o alvo molecular das quinolonas, uma das classes de medicamentos utilizada no tratamento da tuberculose. Devido ao surgimento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes ao tratamento, existe a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos. A estratégia de triagem fenotípica tem se mostrado promissora na descoberta de fármacos anti-tuberculose, sendo a determinação do alvo molecular uma etapa crucial. Assim, a construção de ferramentas laboratoriais que permitam fazer esta avaliação é essencial. Desta forma, o presente trabalho visa, através da técnica de *recombineering*, a construção de uma cepa mutante condicional para a DNA girase que possibilitará avaliar se diferentes níveis de expressão desta enzima afetam a concentração inibitória mínima de compostos e, a construção de duas cepas de *M. tuberculosis* contendo mutação pontual que confere resistência a quinolonas, sendo uma em GyrA (D94G) e outra em GyrB (N499D), buscando verificar a susceptibilidade destas cepas frente a novos candidatos a fármacos e avaliar a DNA girase como alvo molecular desses compostos. A construção dos plasmídeos para obtenção do mutante condicional foi finalizada com sucesso, e o processo de construção das cepas mutantes condicionais está em andamento. Quanto a seleção dos mutantes pontuais, *M. tuberculosis* foi transformado com plasmídeo que expressa as recombinases e com os oligonucleotídeos contendo as mutações pontuais. Colônias foram selecionadas para triagem por PCR onde foram encontrados dois mutantes de *gyrA* e nenhum de *gyrB*. O sequenciamento de DNA confirmou que a mutação está presente do gene *gyrA* nos mutantes selecionados, mostrando sucesso no emprego da técnica de *recombineering* para obtenção de mutantes pontuais em *M. tuberculosis*. Uma vez finalizada a construção das cepas mutantes condicionais, estas serão validadas e utilizadas para triagem fenotípica de novos candidatos a fármacos.

**Palavras-chave:** tuberculose, DNA girase, *recombineering*, validação de alvo