

Processo 1996/10373-1
Vigência: 1/5/1997 a 31/10/2001

Estudo da ação e da regulação hormonal da expressão de três genes cujas proteínas estão envolvidas no chamado transporte reverso de colesterol, processo pelo qual a HDL promove o fluxo de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado. São elas: a CETP a LCAT e a apoproteína AI. Para tanto, será usado o modelo dos camundongos transgênicos. O efeito isolado ou combinado destes genes sobre a aterogênese será investigado em animais normo e hiperlipidêmicos. A ação hormonal e seus mecanismos reguladores da expressão desses genes serão estudados *in vivo* e *in vitro*. Ainda pretende-se estabelecer uma relação genótipo-fenótipo em populações humanas normais dislipidêmicas.

158 Oxidação de proteínas e atividade antioxidante da enzima thiol-specific-antioxidant (TSA)

Luís Eduardo Soares Netto
Instituto de Biociências
Universidade de São Paulo (USP)
Processo 1995/09710-0
Vigência: 1/12/1996 a 30/6/2003

A oxidação de proteínas por radicais livres tem sido associada a vários processos patológicos como carcinogênese, envelhecimento e arteriosclerose. Thiol-specific-antioxidant (TSA) é uma proteína antioxidante recentemente isolada de *Saccharomyces cerevisiae*, cuja sequência de aminoácidos apresenta homologia com proteínas de diferentes grupos taxonômicos (bactérias, plantas e animais). Este projeto de pesquisa visa estudar diferentes tópicos relacionados com a atividade antioxidante de TSA e com a alteração de proteínas por radicais livres gerados em reações catalisadas por metais. Estudos realizados durante o meu programa de pós-doutorado no NIH demonstraram que as propriedades antioxidantes de TSA se devem ao fato de essa proteína possuir uma atividade peroxidática dependente de tiol. Pretende-se caracterizar essa atividade enzimática de TSA, determinando intermediários envolvidos no ciclo catalítico e os centros reativos da enzima. A maioria dos estudos realizados com TSA foi feita em sistemas enzimáticos. Para obter informações sobre a função celular de TSA, serão comparadas as linhagens selvagem e mutante de *Saccharomyces cerevisiae*, cujo gene para TSA foi interrompido. Serão medidas taxas de crescimento, formação de 8-oxoguanina e H_2O_2 intracelular como índices de estresse oxidativo nas duas linhagens de levedura. Em relação à oxidação de proteínas por radicais livres, pretende-se obter provas mais definitivas de que a inativação de glutamina sintetase por sistemas oxidantes catalisados por metais se dá por um processo

sítio-específico. O dano sítio-específico é um processo no qual espécies reativas como radical hidroxila são gerados por metais de transição complexados a biomoléculas. Dessa forma, essas espécies induzem dano proximamente ao local em que foram geradas. EDT A protege enzimas contra a inativação por remover metais complexados a proteínas, apesar de acelerar a formação de radicais livres durante a oxidação de tióis e ascorbato. Verificar-se-á se glutamina sintetase pode ser oxidada por reações catalisadas pelo complexo EDT A-Fe+3. E, ainda, a possibilidade de que 2-metil-histidina seja formada durante a interação de histidina com radicais metil. 2-metil-histidina poderá ser usada como marcadora da modificação de proteínas por radicais de carbono.

159 Caracterização molecular da produção de antocianinas visando à clonagem de um transposon ativo em soja (*Glycine max* L)

Eberson Sanches Calvo
Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)
Processo 1995/09660-3
Vigência: 1/12/1996 a 30/11/1999

Os transposons vêm-se afirmando como a ferramenta mais importante para identificar e clonar novos genes em plantas. No entanto, a soja, uma espécie de incontestável importância econômica para o Brasil, não tem desfrutado desse método. Isso porque até o presente momento não há nenhum elemento de transposição clonado de soja que atenda às necessidades básicas (altas taxas de mobilidade e de reinserção no genoma) para serem usados no processo de *gene tagging*. Este projeto de pesquisa tem por objetivos: 1) a caracterização molecular da produção de pigmentos de antocianinas em flores e hipocótilos de soja; e 2) a clonagem de um transposon presente no ateuo w4-mutável (w4-m) dessa via metabólica. Na sua primeira parte, o projeto irá caracterizar molecularmente a produção de antocianinas em linhagens isogênicas de soja com diferentes combinações de cinco dos seis locos (W1, W2, W3, W4, Wm, e Wp) já identificados geneticamente, e que controlam a produção desses pigmentos na espécie. Essa caracterização será feita por meio da análise cromatográfica (HPLC – High Performance Liquid Chromatography) e identificação dos pigmentos acumulados, da análise da expressão gênica por *Northern blots*, e da complementação de hipocótilos de plântulas carregando alelos mutantes por bombardeamento (usando-se o *particle gun*) de cDNAs heterólogos. Nesses dois últimos casos, explorar-se-á o fato de que a grande maioria dos genes envolvidos na síntese de antocianinas já foi clonada em outras espécies, permitindo então o uso de sondas heterólogas nessas análises. No conjunto, essas análises permitirão a identificação molecular dos vários locos, entre eles o W4. Na segunda parte do projeto será feita a clona-

gem e o sequenciamento do DNA dos alelos W4 e w4-m. A comparação das sequências desses alelos irá permitir a identificação do transposon presente no alelo w4-m. Esse transposon constitui o único transposon geneticamente caracterizado em soja que exibe altas taxas de mobilidade e capacidade de causar mutações em outros locos. Portanto, a clonagem desse elemento de transposição terá um grande impacto para a genética e biologia molecular da soja, pois irá permitir a identificação e clonagem de vários outros genes na espécie, entre eles os genes de interesse agrônomico já identificados geneticamente.

160

1) Clonagem do gene do receptor Fc Alfa; 2) produção de modelo experimental de autoimunidade em camundongos transgênicos por anticorpo antilinfócito

Renato Costa Monteiro Filho
Faculdade de Medicina
Universidade de São Paulo (USP)
Processo 1995/09348-0
Vigência: 1/1/1997 a 30/9/2001

A clonagem do gene receptor Fc das IgA e da sua região promotora permitirá um estudo sistemático de genes dos pacientes com anomalias das IgA séricas, como a nefropatia por IgA, a cirrose alcoólica e a Aids. Essas doenças estão associadas a um defeito de expressão desse receptor em nível proteico. A clonagem do gene receptor Fc das IgA no camundongo será importante para permitir a construção de animais deficientes em receptor Fc alfa *knockout* e/ou animais transgênicos (superexpressão do gene com promotor a ser definido). A produção de camundongos transgênicos por anticorpo antilinfócito T tem como objetivo o desenvolvimento do repertório de linfócitos T e as repercussões autoimunes em animais com estimulação exacerbada. Anticorpos antilinfócito T estão presentes em soro de pacientes com lúpus e com artrite reumatoide.

161

Modulação dos eventos de translação/translocação e processamento de moléculas de colágeno tipo 1 por HSP47 e outras proteínas do retículo endoplasmático em fibroblastos de fibromatose gengival

Luciano Resende Ferreira
Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)
Processo 1995/09339-0
Vigência: 1/9/1996 a 31/8/2000

A hipótese apresentada neste projeto é que a modulação dos eventos de translação/translocação e processamento de colágeno tipo I em fibroblastos de fibromatose gengival (FG) é realizada por HSP47 e por outras prote-

ínas residentes no retículo endoplasmático (RE). Fibroblastos da condição hereditária de FG produzem quantidade excessiva de colágeno, fornecendo um modelo adequado para o estudo da interação do colágeno tipo I produzido por essas células com HSP47 e outras proteínas do RE. O colágeno tipo I é normalmente uma molécula heterotrimérica composta de duas cadeias pró- $\alpha 1$ (I) idênticas e uma cadeia distinta pró- $\alpha 2$ (I) fornecendo a seguinte estequiometria [2 pró- $\alpha 1$ (I), 1 pró- $\alpha 2$ (I)]. Um colágeno homotrimérico do tipo I pode também ser encontrado na matrix extracelular de alguns tecidos (condições inflamatórias, tecidos de reparo, fibrose etc.) e é composto de três cadeias pró- $\alpha 1$ com a seguinte estequiometria [3 pró- $\alpha 1$ (I)]. Pretendemos demonstrar, por meio de experimentos de imunoprecipitação e *Western blot* por ECL, a interação de chaperones moleculares do RE, como HSP47, HTP78 e HTP94, com as cadeias nascentes de colágeno I em condições de homeostase e em condições alteradas do ambiente celular (tratamentos que causam uma estimulação ou inibição da produção de colágeno). Subsequentemente, vamos verificar a estequiometria (heterotrimérica ou homotrimérica) do colágeno tipo I produzido por fibroblastos de FG e investigar se a estequiometria encontrada está associada com os níveis de produção de chaperones moleculares. Vamos também investigar se o tratamento de oligonucleotídeos antissensos para HSP47 inibe a síntese de HSP47 dos outros chaperones e de colágeno. Finalmente, vamos verificar a expressão genética (por meio de análise de PCR) de HSP47 e colágeno em condições normais e alteradas. É proposto neste projeto que HSP47 compõe uma porção de um complexo distinto e sucessivo de translação/translocação composto de chaperones moleculares que garante a translocação e processamento de cadeias nascentes de colágeno I. Coletivamente, essa cascata de interações proteína-proteína garante a síntese constitutiva de pró-colágeno tipo I e, portanto, constitui a base para a tolerância de estresse em tecidos conectivos. Estes estudos fornecerão informação importante no mecanismo de controle de eventos patológicos e reativos como os vistos em fibrose, queloide e várias condições genéticas que afetam a estrutura e a formação de colágeno como FG e osteogênese imperfeita.

162

Isolamento e caracterização estrutural de N-oligosacarídeos obtidos de glicoproteína de origem vegetal

Maria de Lourdes Corradi Custódio da Silva
Faculdade de Ciências e Tecnologia de Presidente Prudente
Universidade Estadual Paulista (Unesp)
Processo 1995/09316-0
Vigência: 1/9/1996 a 31/8/2000

Este projeto tem por objetivo a obtenção de oligossacarídeos N-ligados a glicoproteínas de origem vegetal. Os