

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-oligossacarídeos 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

oligos serão isolados da parte proteica mediante métodos enzimáticos e purificados por cromatografia de troca iônica, filtração em gel, HPAEC e RP-HPLC. Uma vez isolados, os oligossacarídeos serão caracterizados estruturalmente por métodos químicos como metilação, enzimático e por técnicas avançadas no estudo da química de carboidratos, como ressonância magnética nuclear de prótons e FAB-MS.

163

### Estudo das interações entre aminoácidos e ligantes na determinação das propriedades catalíticas das enzimas

Ana Cláudia Rasesa da Silva  
Instituto de Química  
Universidade de São Paulo (USP)  
Processo 1995/09307-1  
Vigência: 1/2/1997 a 30/6/2003

Os avanços técnicos na área de biologia molecular forneceram as ferramentas para a produção de proteínas com qualquer sequência desejada, permitindo o desenvolvimento de novas proteínas que atenderiam a necessidades específicas. Contudo, este grande potencial perde parte de sua aplicabilidade devido a nossa inabilidade de prever as características funcionais de uma proteína a partir de sua estrutura primária. Assim, deve-se primeiro entender como as interações entre os aminoácidos contribuem para a formação das propriedades funcionais e como essas interações determinam a especificidade para a ligação de outras moléculas para depois desenharmos novas proteínas. O objetivo principal deste projeto é estudar o papel das interações entre aminoácidos no mecanismo de especificidade biológica. Para alcançar este objetivo, pretende-se, utilizando experiência anterior em biologia molecular e engenharia de proteína, realizar mutações e produção de proteínas quiméricas com a finalidade de alterar a especificidade de uma enzima. As modificações serão baseadas em estudos comparativos entre as várias estruturas primárias e terciárias dos membros de uma família de enzimas. Como modelo experimental, escolheu-se trabalhar com a família das amilases, pelo fato de essa família atender aos seguintes pré-requisitos: a) variabilidade de especificidade para ligação de substrato e para reação; b) disponibilidade da estrutura cristalina de membros da família; c) clonagem e expressão em sistema heterólogo de alguns membros da família. Inicialmente, deseja-se estudar os determinantes estruturais das diferenças de especificidade entre as *a*-amilases produzidas por bacilos e as produzidas por fungos. Com base em estudos comparativos entre as estruturas tridimensionais da amilase de *Bacillus licheniformis* e do fungo *Aspergillus oryzae* (Taka-amilase), será modificada a estrutura da amilase de *B. stearothermophilus* com o intuito de entender como as diferenças estruturais afe-

tam a sua especificidade. Outro projeto proposto é modificar o padrão de endo para exohidrolase da *a*-amilase de *B. stearothermophilus* baseado na estrutura cristalina da *a*-amilase *P. stutzeri* (exo-amilase) e de várias endo-amilases já cristalizadas. Os mutantes serão produzidos em *E. coli* e analisados quanto ao tipo de produto formado durante a hidrólise do amido e aos seus parâmetros cinéticos. E, para aumentar a eficiência de expressão em sistemas heterólogos, pretende-se também, utilizando nossa experiência anterior com o sistema de chaperonas, desenvolver um sistema de expressão que coexpresse o complexo GroEL/GroES em conjunto com a proteína exógena. Dados anteriormente publicados mostraram que a coexpressão do complexo GroEL/GroES melhora a eficiência de expressão de proteínas exógenas em *E. coli*.

164

### Expressão de metaloproteínas recombinantes de veneno de serpente com potencial de uso terapêutico

Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)  
Processo 1995/09300-7  
Vigência: 1/9/1996 a 31/8/2000

Metaloproteínas de veneno de serpentes têm sido demonstradas como ferramentas extremamente úteis para compreensão de processos de adesão entre células e célula-matriz extracelular. Metaloproteínas contendo um domínio de disintegrina, ou disintegrinas isoladas, são potentes inibidores da agregação plaquetária e efetivos agentes no tratamento clínico de trombose. As disintegrinas também têm sido demonstradas como inibidores de crescimento de metástases. Metaloproteínas fibrinolíticas também têm-se mostrado promissoras no tratamento de trombose. Embora existam vários trabalhos sobre clonagem e sequenciamento de cDNAs para metaloproteínas, são bem raros os trabalhos envolvendo expressão dessas proteínas recombinantes. Como os venenos de serpentes e sanguessugas são a única fonte das disintegrinas, a expressão dessas proteínas recombinantes representa uma excelente alternativa para a obtenção das mesmas em grande quantidade visando a uma possível aplicação clínica. Para tanto, pretende-se obter a expressão de dois clones de cDNA para metaloproteínas isolados de uma biblioteca de cDNA feita a partir das glândulas veneníferas de *Agkistrodon contortrix laticinctus*. Um desses clones codifica uma provável metaloproteínase com um domínio de disintegrina e o segundo codifica uma metaloproteínase fibrinolítica com elevada homologia com fibrolase, metaloproteínase fibrinolítica não hemorrágica. Este projeto propõe a expressão inicial em bactéria desses clones já isolados, utilizando-se o vetor pET. Como ensaios de atividade biológica das proteínas recombinantes