

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 Raser 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