

238

Mutagênese em larga escala mediada por transposon no fungo patogênico *Candida albicans*

Paulo Sérgio Rodrigues Coelho
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo (USP)
Processo 2003/01440-2
Vigência: 1/10/2003 a 31/1/2008

Candida albicans é a principal causa de infecções hospitalares causadas por fungos, tanto em indivíduos normais quanto em indivíduos imunocomprometidos. Pretendemos analisar genes codificadores de fatores de virulência e genes importantes para o crescimento filamentosos em *C. albicans* pelo uso de uma metodologia de mutagênese por inserção mediada por transposon, em larga escala. Um minitransposon será criado e conterá um gene-repórter para a análise da expressão gênica, localização celular e fenótipos de mutantes. Por se tratar de um diploide obrigatório, o minitransposon também possuirá dois novos marcadores dominantes que permitirão a mutagênese dos dois alelos de cada gene, numa única transformação. Após a mutagênese *in vitro* de bibliotecas genômicas, minipreparações de plasmídeos serão realizadas e os insertos linearizados serão usados para a transformação de *C. albicans*. As cepas de leveduras assim como as cepas de bactérias serão estocadas e servirão para a identificação do gene mutado. A análise da função gênica em larga escala envolverá duas estratégias experimentais: 1) Varredura dos genes expressos durante a morfogênese. Inserções que resultarem em produção de proteína de fusão (beta-galactosidase ou GFP) em meios indutores de filamentação serão identificadas. A identidade do gene será revelada pelo sequenciamento da região flanqueadora da inserção do transposon e pela comparação desta sequência com o genoma de *C. albicans*, presente em bancos de dados. A caracterização adicional desses genes envolverá o *knockout* gênico para a produção de mutações nulas e caracterização fenotípica *in vitro* e *in vivo*. 2) Testes de virulência. Inseriremos no transposon “barras de identificação ou código de barras” (em inglês, *bar codes*) que são pequenas sequências de DNA que rotulam cada mutante e permitem a execução de experimentos de competição de mutantes *in vivo*. As cepas de levedura transformantes serão combinadas em um *pool* de transformantes para posterior inóculo em camundongos. Após infecção dos camundongos com as cepas de leveduras mutantes, os rótulos serão amplificados via PCR e hibridados contra filtros contendo um *array* das correspondentes barras de identificação. A comparação dos sinais de hibridação do DNA proveniente das cepas presentes antes do inóculo ou recuperadas do animal dias após o inóculo identificarão mutações em genes necessários para a sobrevivência e crescimento no hospedeiro, ou seja, genes que potencial-

mente codificam fatores de virulência. Em conjunto, neste trabalho será criado um banco de mutantes de inserção, que permitirá a identificação em larga escala dos genes codificadores de fatores de virulência bem como aqueles expressos durante a filamentação. Os dados serão úteis no estabelecimento de novas estratégias terapêuticas para o combate dessa micose.

239

Estudo molecular de proteínas moduladoras da polimerização da FtsZ e seu papel no controle da divisão celular bacteriana

Frederico José Gueiros Filho
Instituto de Química
Universidade de São Paulo (USP)
Processo 2002/10616-4
Vigência: 1/7/2003 a 31/12/2008

A etapa-chave da formação do septo de divisão em bactérias é a polimerização da proteína FtsZ, a tubulina procariótica, em uma estrutura chamada anel Z. É o anel Z que define onde e quando o novo septo será formado e sua formação é decorrência tanto da tendência intrínseca da FtsZ de polimerizar-se como da ação de proteínas moduladoras capazes de estimular ou inibir a polimerização da FtsZ. Recentemente, foi usada uma estratégia genética para identificar um novo modulador da formação do anel Z, que batizamos de ZapA. ZapA é uma proteína de 85 aminoácidos que se localiza no complexo de divisão e exerce um efeito positivo na formação do anel Z. Estudos bioquímicos iniciais demonstraram que ZapA é capaz de interagir com FtsZ diretamente e promover a sua auto-associação em polímeros complexos. A identificação e a caracterização inicial de ZapA propiciam o entendimento do processo de formação do anel Z. Ao mesmo tempo, geram questões importantes a respeito do mecanismo de ação desses fatores e sobre a possibilidade de que existam outros moduladores da FtsZ que ainda não foram descobertos. Só a partir do entendimento detalhado de como é controlada a formação do anel Z se poderá desvendar os mecanismos de regulação espaço-temporal da divisão celular bacteriana. Nesse sentido, será importante expandir o conhecimento das proteínas que são capazes de modular a formação do anel Z, assim como investigar os mecanismos pelos quais elas exercem seus efeitos. Assim, o projeto proposto apresenta os seguintes objetivos: 1) aprofundamento do estudo molecular da função de ZapA; 1.1) estudo da relação estrutura-função em ZapA; 1.2) estudo da regulação da expressão e atividade de ZapA ao longo do ciclo celular; 2) identificação sistemática de novas proteínas moduladoras da polimerização da FtsZ em *B. subtilis*, por meio de abordagens exaustivas e complementares; 3) estudo molecular das novas proteínas moduladoras da polimerização de FtsZ que venham