

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

a ser descobertas em decorrência do objetivo (2). A investigação da relação estrutura-função de ZapA será executada por meio da criação de mutantes sítio-dirigidos e posterior análise de sua funcionalidade em dois tipos de ensaios. Um dos ensaios usará fusões a GFP e microscopia de fluorescência para determinar a capacidade de localização das proteínas mutantes. O segundo ensaio determinará se os diferentes mutantes ainda são capazes de promover a formação do anel Z e suprimir o fenótipo causado pela superexpressão de um inibidor de divisão. Para determinar se expressão e atividade de ZapA são reguladas durante o ciclo celular, será usada uma abordagem citológica, novamente baseada em fusões entre ZapA e GFP. A expressão de ZapA ao longo do ciclo celular deverá corresponder à fluorescência produzida pela porção GFP da fusão GFP-ZapA e será monitorada por microscopia quantitativa. Evidências de um controle no nível da atividade da proteína serão buscadas em experimentos de colocalização de ZapA e FtsZ ao longo do ciclo celular. Para esses experimentos, ZapA e FtsZ serão fundidas a variantes espectrais de GFP e o padrão de localização das duas proteínas será determinado simultaneamente em uma mesma célula. A existência de um período do ciclo celular no qual as proteínas não se colocalizam indicará que a interação entre elas não é sempre permitida e que moduladores positivos podem ter sua atividade regulada. Para a identificação de novas proteínas moduladoras da FtsZ, propõe-se a adoção de quatro abordagens, baseadas em estratégias genéticas, bioquímicas e de duplo-híbrido independentes. As estratégias genéticas incluem uma triagem para genes supressores do bloqueio de divisão causado por um alelo FtsZ sensível à temperatura e uma triagem para mutações letais sintéticas quando em combinação com mutação em ZapA. A estratégia bioquímica consistirá em identificar proteínas que copurifiquem com polímeros de FtsZ isolados de extratos proteicos totais. Finalmente, usaremos FtsZ como “isca” em um sistema duplo-híbrido em bactérias para tentar identificar parceiras da FtsZ a partir de bibliotecas de *B. subtilis* criadas no vetor “presa”. Prevê-se que o uso de abordagens diversas e complementares permita a amostragem exaustiva desses fatores no genoma/proteoma de *B. subtilis*. Estudos moleculares semelhantes aos propostos para ZapA serão então realizados para os novos moduladores que venham a ser identificados. Além do conhecimento básico gerado, espera-se que a identificação e a caracterização de novos moduladores da FtsZ também possam criar oportunidades para o desenvolvimento de novos antibióticos.

240

### Biogênese do citocromo c-oxidase e viabilidade celular

Mario Henrique de Barros  
Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade de São Paulo (USP)  
Processo 2002/10103-7  
Vigência: 1/5/2003 a 31/7/2007

Este projeto propõe colaborar no estudo da montagem do citocromo c-oxidase (COX), bem como de alterações funcionais em produtos gênicos relacionados com a atividade mitocondrial que podem alterar a viabilidade celular. Serão utilizados *Saccharomyces cerevisiae* e *Caenorhabditis elegans* como modelos. Dentre as 6 mil ORFs do genoma de levedura, cerca de 120 codificam para possíveis proteínas mitocondriais ainda não estudadas. Pretende-se selecionar, dessas 121 ORFs, as que afetem especificamente o COX. As ORFs selecionadas terão seus produtos gênicos caracterizados por meio da determinação da sua localização intracelular, análise espectral dos citocromos mitocondriais, bem como da análise de tradução, transcrição e processamento dos genes mitocondriais. *C. elegans*, por sua vez, servirá como modelo animal para o estudo de doenças humanas relacionadas a defeitos na atividade de COX. Pretende-se aqui desenvolver um sistema de mutagênese e busca de mutantes que permita a rápida identificação de mutantes de COX em *C. elegans*. Dos mutantes isolados, serão observados seus efeitos no estresse oxidativo, viabilidade da célula e metabolismo do DNA mitocondrial, considerando-se também o nível de heteroplasmia, assim como características mais gerais do desenvolvimento do verme que não poderiam ser observadas em organismos unicelulares como levedura.

241

### Evolução morfológica, biogeografia e sistemática em mamíferos neotropicais

Gabriel Henrique Marroig Zambonato  
Instituto de Biociências  
Universidade de São Paulo (USP)  
Processo 2002/05804-6  
Vigência: 1/12/2002 a 31/5/2005

A evolução de morfologias complexas (como o crânio dos mamíferos, por exemplo) assim como a diversificação (especiação) na América do Sul são temas centrais, interrelacionados e ao mesmo tempo mal compreendidos na biologia evolutiva. O estudo da variação, seja ela fenotípica ou genética, dentro e entre populações e espécies, é crucial para a forma como se dividiu e ordenou (sistemática) a diversidade da vida, assim como para o entendimento de como essa diversidade surge e é mantida. Consequentemente, este tipo de abordagem tem implicações para áreas que vão desde a conservação da natureza até a genética quantitativa e a evolução. Este projeto aborda, no sentido mais amplo, a diversificação dos mamíferos sul-americanos, diversificação aqui se referindo tanto à evolução de morfologias complexas (basicamente o crânio) como à especiação, particularmente em três grupos: