

células tumorais humanas e apresenta funções nucleares desconhecidas em focos de reparo de DNA induzidos por radiação ionizante. Após irradiação das células com raios gama e luz UVC detectamos a co-localização de VHR com pH2AX, pATF2, pJNK e com Mre11, integrante do complexo MRN de reparo de DNA. O paralelismo destes dados (alguns já publicados) e seu cruzamento com a literatura atual nos leva a este projeto, que propõe respostas para as seguintes hipóteses: 1) que VHR e as GTPases RhoA/Rac1/Cdc42 estão envolvidos na manutenção da instabilidade genômica promovida por agentes genotóxicos (radiação) causadores de senescência ou apoptose; 2) que existem mecanismos moleculares precisos e pouco conhecidos, envolvendo física e quimicamente essas enzimas, após lesão celular causada pela radiação, para que haja o acionamento de maquinarias de reparo do DNA. Esta investigação será conduzida em duas linhagens celulares humanas transformadas (HeLa e MeWo) submetidas a radiações ionizantes gama e UVC e a abordagem experimental incluirá técnicas de microscopia de fluorescência, bioquímica, proteômica, bioinformática, biologia molecular e celular. Pretende-se, assim, mostrar que citoesqueleto e tirosinafosfatases também são componentes da complexa rede funcional por trás da difícil manutenção genômica.

106

Geração de biblioteca para conversão enzimática de biomassa a partir de metagenoma do solo

Fabio Marcio Squina

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)

Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron (ABTLuS)

Ministério da Ciência e Tecnologia

Processo 2008/58037-9

Vigência: 1/5/2009 a 30/4/2013

A mudança gradual do petróleo para recursos de biomassa renováveis é geralmente vista como uma importante contribuição para o desenvolvimento de uma sociedade industrial sustentável e o manejo eficaz de emissões de gases de efeito estufa. Materiais lignocelulósicos são fontes abundantes e baratas de energia armazenada na biosfera. Assim, a conversão de biomassa em açúcares como matéria-prima avançou para a linha de frente da indústria de biocombustíveis. No entanto, a sacarificação de biomassa vegetal é um processo complexo e demorado, principalmente em razão da recalcitrância inerente e da heterogeneidade complexa dos polímeros que formam as paredes das células vegetais. A biomassa lignocelulósica precisa passar por uma etapa de pré-tratamento intensivo, após a qual enzimas são usadas para quebrar a biomassa polissacarídica em açúcar simples adequado para a fermentação e a produção de etanol. Visando a exploração

total dos polissacarídeos da parede da célula vegetal como uma fonte de energia ambientalmente renovável, um extenso repertório de enzimas hidrolíticas desempenharia importante papel para a produção de biocombustíveis. O objetivo desta proposta é a geração de um *kit* de ferramentas de enzimas lignocelulósicas com uma ampla gama de aplicações biotecnológicas, incluindo seu uso como atores para o desenvolvimento de estratégias para a produção de etanol de segunda geração. A prospecção dessas enzimas será feita a partir do metagenoma do solo, que contempla uma estratégia pioneira para a prospecção de enzimas de conversão de biomassa a partir de microrganismos não convencionalmente cultiváveis. Adicionalmente, este estudo pode contribuir intensivamente para o desenvolvimento do campo da bioenergia ao melhorar técnicas para a rápida detecção de hidrólise usando eletroforese capilar e implementando a expressão de genes heterólogos em fungos filamentosos.

107

Identificação de novos marcadores moleculares da retina angiogênica e desenho racional de novos agentes terapêuticos para doenças oculares com um componente vascular

Ricardo José Giordano

Instituto de Química

Universidade de São Paulo (USP)

Processo 2008/54806-8

Vigência: 1/11/2008 a 31/5/2010

Apesar do ceticismo inicial e quase unânime da comunidade científica com relação à ideia apresentada por Judah Folkman, de que terapias antiangiogênicas se tornariam uma forma efetiva para o tratamento do câncer, hoje este conceito é amplamente aceito e forma a base não apenas para a terapia de tumores, mas também de um número cada vez maior de doenças não neoplásicas, às quais Folkman cunhou como “doenças dependentes de angiogênese”. Atualmente, terapias antiangiogênicas dirigidas contra o fator molecular central desse processo, o VEGF, são úteis, mas não ideais, devido aos efeitos colaterais e sua eficácia relativa. Este projeto propõe-se a desenvolver uma nova geração de agentes antiangiogênicos, utilizando metodologia que dominamos e que já rendeu agentes inibidores desse processo. Os objetivos do projeto são: 1) descobrir e desenvolver novos compostos peptidomiméticos, tendo como alvo VEGF e seus receptores; 2) descobrir novos alvos terapêuticos para doenças da retina com um componente angiogênico; e 3) desenvolver novos agentes para o controle terapêutico de doenças da retina com um componente angiogênico. Esses novos agentes seriam seletivos para vasos patológicos, inibindo seu crescimento ou destruindo-os, sem afetar os vasos sanguíneos normais. O objetivo maior

é o de entender e inibir a angiogênese patológica, utilizando modelos experimentais na retina de camundongos, com a expectativa de que esses resultados sejam extrapolados rapidamente para o tratamento de doenças que causam a cegueira em humanos. A relevância deste estudo, portanto, é a de buscar alternativas terapêuticas, seguras e eficazes, contra doenças que mais causam a perda de visão: a retinopatia da prematuridade, a degeneração macular relacionada à idade e a retinopatia diabética.

108 Estudo de genes envolvidos na relação parasita-hospedeiro na esquistossomose

Ricardo De Marco

Instituto de Física de São Carlos
Universidade de São Paulo (USP)
Processo 2008/03181-8
Vigência: 1/9/2008 a 31/8/2012

Este projeto tem como objetivo estudar genes que codificam proteínas que se encontram na interface parasita-hospedeiro ou são secretadas. Inicialmente, será realizado um estudo de sequenciamento em larga escala, buscando caracterizar transcritos enriquecidos nos tecidos da superfície do parasita. Para isso, se estabelecerá um protocolo para extração diferencial de RNA e sequenciamento em larga escala de RNA de frações de superfície do parasita adulto, macho e fêmea. Comparação destes dados com os obtidos para vermes inteiros permitirá a determinação de transcritos enriquecidos na superfície do parasita. Paralelamente, será realizado o sequenciamento direcionado dos transcritos gerados a partir de genes de microexons, uma nova classe de genes em *Schistosoma mansoni* ainda não caracterizada. Estes genes são compostos de exons extremamente curtos e codificam proteínas secretadas. A caracterização preliminar, realizada por nós, indica que esses genes geram uma grande variedade de transcritos por meio de *splicing* alternativo. Desse modo, serão realizados experimentos de RT-PCR com *primers* específicos e sequenciamento utilizando RNA de diversos estágios do parasita, com o objetivo de caracterizar a expressão diferencial de formas alternativas desses transcritos ao longo do ciclo de vida do parasita. Depois disso, se realizará a expressão das principais isoformas de algumas PCMs (proteínas codificadas por microexon genes) em sistema heterólogo para caracterização de propriedades biofísicas, ensaios para esclarecer a função destas proteínas, e ensaios de *Western blot* e imunolocalização para a confirmação da localização dessas proteínas no tegumento do parasita adulto. A implementação deste projeto permitirá o estabelecimento de uma linha de estudo de transcriptomas no Departamento de Física e Informática do IFSC-USP. Essa linha de pesquisa permitirá a descrição de transcritos de interesse no estudo da esquistossomose, cujos produtos

proteicos poderão ser futuramente estudados através de colaborações com outros membros do departamento, que possui uma tradição na expressão heteróloga e estudos estruturais de proteínas.

109 Estudo e desenvolvimento de proteínas de fusão para o transporte intracelular de vetores não virais por meio de proteínas motoras

Adriano Rodrigues Azzoni

Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)
Processo 2007/58323-9
Vigência: 1/7/2008 a 30/6/2012

A baixa eficiência de transferência gênica é um problema recorrente na utilização de vetores não virais em estudos de terapia gênica e vacinação por DNA. Essa limitação provém principalmente da dificuldade de transporte do DNA estrangeiro do exterior para o núcleo das células-alvo, devido à presença de inúmeras barreiras físicas, enzimáticas e difusionais. O principal objetivo do projeto aqui proposto é o desenvolvimento de proteínas recombinantes de fusão capazes de interagir e facilitar o transporte intracelular de vetores plasmídicos (pDNA), explorando-se a capacidade natural de proteínas motoras (como a dineína) para o transporte de cargas da periferia para o interior (centrossoma) de células de mamífero. Proteínas de fusão contendo domínios N-terminais de ligação às dineínas e domínios ou sequências C-terminais de ligação ao DNA (5 a 16 resíduos de aminoácidos básicos) serão primeiramente clonadas e produzidas em *E. coli*. As interações proteínas de fusão-pDNA serão então avaliadas em ensaios *in vitro* e por transfecções de células de mamífero em cultura, por meio da quantificação da expressão do gene repórter GFP por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. O tráfego intracelular dos complexos será estudado por hibridização *in situ* de fluorescência (Fish), avaliando-se a capacidade das proteínas de fusão de facilitar o tráfego intracelular do pDNA por meio de interações com dineínas, além da translocação do pDNA para o núcleo favorecido pela porção C-terminal da proteína. Uma consequência esperada deste projeto é o desenvolvimento de carreadores proteicos capazes de reduzir o *gap* que diferencia atualmente os vetores não virais dos virais, além de proporcionar melhor compreensão do papel de proteínas motoras como a dineína no tráfego intracelular de transgenes.

110 Estudo da regeneração celular pós-lesão no sistema nervoso e avaliação da contribuição e dos aspectos funcionais de genes ligados à resposta imune inata