

Os objetivos deste projeto são identificar e caracterizar polipeptídeos hormonais em plantas de cana-de-açúcar que funcionem como sinais intra e intercelulares associados à defesa e ao desenvolvimento vegetal. A sistemina, um polipeptídeo de 18 aminoácidos envolvido na transdução de sinais em resposta à injúria, foi identificada em várias solanáceas. No entanto, em fumo, a sistemina só foi encontrada com a utilização do ensaio de alcalinização. Este ensaio tem-se mostrado útil na identificação de novos polipeptídeos tais como o Ralf. Além das sisteminas e do Ralf, outros polipeptídeos (por exemplo, fitossulfoquinas, Enod40, Clavata3 e SCRs) foram identificados em plantas. Embora o projeto Sucest tenha revelado apenas a existência de homólogos ao Enod40, a presença de homólogos envolvidos na via de sinalização em resposta à injúria e a ubiquidade de alguns polipeptídeos (por exemplo, fitossulfoquinas e Ralf) sugerem a existência de polipeptídeos semelhantes em cana-de-açúcar. O número crescente de polipeptídeos e a diversidade dos processos fisiológicos em que eles estão envolvidos são provas da sua importância e das potenciais aplicações de tais descobertas no melhoramento vegetal. O plano de trabalho a ser adotado envolve o estabelecimento do ensaio de alcalinização, o isolamento de polipeptídeos e a caracterização funcional dos genes precursores dos polipeptídeos em cana-de-açúcar.

135

### Controle redox de expressão gênica: caracterização de redes regulatórias e seu envolvimento na diferenciação de células-tronco (*stem cells*)

Oswaldo Keith Okamoto

Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein  
Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein  
(Sibibae)

Processo 2002/01826-5

Vigência: 1/12/2002 a 30/11/2006

Neste projeto, pretende-se investigar os eventos moleculares associados à perpetuação e diferenciação de células-tronco (*stem cells*) em estudos de genômica funcional. Uma vez que essa diferenciação é modulada pelo estado redox celular, parte-se do princípio de que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN) ativam vias de sinalização e/ou eventos transcricionais específicos, culminando na regulação da expressão de grupos de genes (*regulons*), os quais podem exercer importante função nesse processo celular. Assim, propomos a caracterização de padrões globais de expressão gênica em células indiferenciadas e diferenciadas, expostas a ERO e ERN, visando à identificação de genes cuja expressão é alterada nas distintas condições experimentais. Esse papel sinalizador das ERO/N será investigado por meio das oscilações que estas causam no transcriptoma de células-tronco, como as derivadas de cordão umbilical e tecido germinativo em-

brionário, utilizando cDNA *microarrays*. Propomos ainda uma análise dos promotores dos genes redox-regulados na busca de elementos cis associados a fatores de transcrição que, juntamente com seus genes-alvo, servirão de substrato para a elaboração de redes regulatórias transcricionais. Essa organização hierárquica auxiliará na compreensão dos sinais de ativação, elementos regulatórios e genes envolvidos na diferenciação de células-tronco.

136

### Desenho racional de inibidores contra DHODH (diidroorotato desidrogenase) e aplicações no tratamento da doença de Chagas e no combate à praga do amarelinho

Maria Cristina Nonato

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
Universidade de São Paulo (USP)

Processo 2001/14583-0

Vigência: 1/7/2002 a 31/8/2007

O presente projeto visa à determinação da estrutura cristalográfica e a modelagem de inibidores da enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH) proveniente de dois diferentes organismos: *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH), parasita causador da doença de Chagas, e *Xylella fastidiosa* (XfDHODH), uma bactéria fitopatogênica responsável pela “Praga do amarelinho”. DHODH pertence a um dos mais antigos processos metabólicos, a via de síntese de novo de nucleotídeo de pirimidinas, fundamental não somente na síntese de DNA e RNA, mas também em glicólise e biossíntese de lipídeos de membrana. DHODH atua no quarto passo dessa via metabólica e é responsável pela conversão de diidroorotato em orotato. DHODH utiliza o mononucleotídeo flavina (FMN, C17H21N4O9P1) como cofator, para promover a oxidação de diidroorotato, enquanto FMN é reduzido. A enzima DHODH foi identificada como sendo o alvo farmacológico de uma série de compostos químicos e naturais, tais como isoxazol, triazina, ácido cinchonínico e derivados de quinona. Estes compostos interferem em reações descontroladas do sistema imune, auxiliam no combate de infecções parasitárias, como malária, e em terapias antivirais através da diminuição da concentração intracelular de nucleotídeos de pirimidinas. No presente momento, existe um grande interesse em investigar inibidores de DHODH como agentes terapêuticos no tratamento de doenças que envolvem grande proliferação celular e/ou parasitária. Neste contexto, o projeto propõe a modelagem racional de inibidores baseado na estrutura cristalográfica de dois novos membros das DHODHs: diidroorotato desidrogenase do parasita *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH) e da bactéria *Xylella fastidiosa* (XfDHODH). A presença da via de biossíntese de novo de pirimidinas em ambos os organismos foi recentemente identificada e a inibição da mesma pode ser uma importante arma no combate à pro-

liferação desses organismos patogênicos. Até o presente momento, as estruturas cristalográficas de dois membros dessa classe de proteínas foram determinadas: DHODH de *Lactococcus lactis* (LHOHODH) e DHODH humana (HsDHODH). Em termos gerais, as enzimas apresentam uma estrutura terciária similar. Uma diferença marcante entre as estruturas conhecidas é a região N-terminal, na qual, na enzima humana, existe um motivo adicional composto de duas hélices, responsável pela interação com a membrana mitocondrial e que se encontra ausente na estrutura de LIDHODH. Além do domínio de interação com a membrana, as enzimas humanas e bacterianas divergem quanto à forma de oligomerização. A LIDHODH é dimérica, enquanto a enzima humana é monomérica. Como consequência, diferenças são encontradas entre as duas estruturas e estão localizadas entre as regiões de interação entre os domínios catalíticos e de interação com a membrana e na região de contato entre os dois monômeros na enzima bacteriana. As etapas do projeto podem ser sumarizadas como segue: 1) Expressão de TcDHODH e XfDHODH em *E. Coli* e otimização das condições de purificação. As enzimas TcDHODH e XfDHODH foram recentemente clonadas em *E. Coli*. DNA genômico de *T. cruzi* foi gentilmente cedido pelo prof. dr. Otávio Thiemman, do Instituto de Física de São Carlos, USP de São Carlos, e o cosmídeo contendo o gene de DHODH de *Xylella fastidiosa* foi enviado pelo prof. Jesus Ferro, da Unesp de Jaboticabal, mediante um acordo assinado com a FAPESP. Ambas as enzimas serão expressas em *E. Coli* usando um sistema de fusão com uma cauda de histidina (6xHis), uma construção similar à usada com sucesso na expressão de DHODH humana. A presença da cauda de histidina deverá facilitar a purificação da enzima; mas não podemos descartar a possibilidade da utilização de outras etapas de purificação, como foi necessária durante os experimentos de obtenção da enzima humana e de *Plasmodium falciparum* [resultados não publicados]. 2) Caracterização estrutural das enzimas TcDHODH e XfDHODH por meio das técnicas de difração de raios X em monocristais. Ensaio de cristalização serão realizados utilizando métodos de cristalização de macromoléculas convencionais, como difusão de vapor, *microbatch*, diálise e interface líquido-líquido. Análise da estrutura primária de XfDHODH sugere que esta possua o domínio de interação com a membrana e, como consequência, experimentos de cristalização em presença de detergente serão realizados. Os experimentos de difração de raios X a alta resolução serão realizados na linha de cristalografia de proteínas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). As estruturas de ambas as enzimas TcDHODH e XfDHODH poderão ser resolvidas por meio da técnica de substituição molecular. TcOHOOH e XfDHOOH são altamente homólogas às enzimas LIDHODH e HsDHODH, respectivamente, cujas estruturas tridimensionais se encontram disponíveis no banco de dados de proteínas

(<http://www.rcsb.org>). 3) Planejamento de inibidores específicos baseado em suas estruturas tridimensionais. Esta etapa do projeto será realizada utilizando diferentes abordagens: a) triagem de produtos naturais – colaboração da profa. dra Monica T. Puppó, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, de Ribeirão Preto, USP; b) triagem utilizando a biblioteca de inibidores de DHODH de *Plasmodium falciparum* (PfDHODH) e DHODH humana (HsDHODH) – colaboração do prof. Jon Clardy, da Universidade de Cornell, EUA, que trabalha no estudo cristalográfico da enzima DHODH de *Plasmodium falciparum* (PfDHODH), agente causador da malária (projeto financiado pela Burroughs-Wellcome Fund), além da síntese de inibidores de PfDHODH; c) buscas *ab initio* de compostos de partida serão também realizadas mediante a utilização do programa DOCK; 4) modelagem e síntese de novos inibidores para XfDHODH e TcDHODH. Uma vez que potenciais inibidores sejam selecionados na etapa precedente, estes, chamados compostos de partida, deverão ser melhorados para aumentar sua capacidade inibitória e seletividade com relação aos seus alvos. A determinação da estrutura de XfDHODH e PfDHODH em complexo com estes compostos de partida, por meio de técnicas bem estabelecidas de cocristalização e *soaking* e a comparação com a estrutura da enzima humana permitirão a identificação de regiões e/ou diferenças estruturais a serem exploradas para a modelagem de inibidores específicos. A proposta de adição e/ou mudança de grupos químicos desses compostos de partida será feita em um trabalho interativo com pesquisadores do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFRP-USP, para a viabilização da síntese de uma nova geração de inibidores específicos. É importante ressaltar que este projeto propõe a formação de um novo laboratório de cristalografia de proteínas e desenho de fármacos baseado em estrutura no Estado de São Paulo. O *campus* da USP de Ribeirão Preto apresenta todas as características essenciais para a formação de um novo centro nessa área de pesquisa, com destaque tanto para o seu alto grau de interdisciplinaridade, caracterizado por unidades de pesquisa nas áreas de física, química, biologia e ciências médicas, quanto pela tradição em ciências farmacêuticas, dentro da qual os objetivos específicos do presente trabalho se encaixam. A presença do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, com uma linha dedicada exclusivamente à cristalografia de proteínas, e a existência do conhecimento gerado pela primeira etapa do sequenciamento, aliados à biodiversidade de produtos naturais existentes no Brasil, faz com que tenhamos a infraestrutura ideal para este tipo de projeto. A proposta visa a um uso extenso da tecnologia e conhecimento disponíveis para o estudo de problemas nacionais e dá continuidade à caracterização da bactéria *Xylella fastidiosa*, iniciada com o pioneiro trabalho de sequenciamento do seu genoma.