

### 140 Estratégias de regulação transcricional em produção e expressão de retrovírus

Bryan Eric Strauss

Instituto do Coração (InCor)

Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina/USP

Processo 2000/12156-5

Vigência: 1/11/2001 a 31/10/2007

A terapia genética é um método de tratamento promissor, mas fugidio, que pode se mostrar capaz de interromper a progressão de tumores. Vetores retrovirais foram desenvolvidos como agentes de transferência genética, pois são seguros, não provocam uma resposta imunológica e são facilmente modificados. O estudo e o desenvolvimento contínuo desses vetores são necessários para superar dificuldades associadas à produção e à expressão de vírus. Pretendo desenvolver um sistema de produção de vírus que protegerá a linhagem celular produtora de vírus dos ataques de um gene citostático ou citotóxico viralmente codificado e evitará a mutação para esse gene, enquanto permite o crescimento dessas células em grandes quantidades e por períodos prolongados de tempo. Isso será concretizado pelo desenvolvimento de um sistema de produção de vírus induzível. A segunda área deste projeto é desenvolver um vetor retroviral que tenha expressão *in vivo* direcionada e aumentada. Pretendo desenvolver vetores retrovirais que contenham elementos reguladores modificados na região U3 do LTR, de modo que a expressão viral seja dirigida por fatores característicos da célula-alvo (expressão regulada) por um fator codificado no próprio vírus (expressão aumentada). Um objetivo futuro deste projeto é combinar essas ideias para a produção e expressão de vírus. Se forem bem-sucedidas, essas modificações de produção e expressão retroviral poderão ser desenvolvidas em testes clínicos para o tratamento de câncer.

### 141 Mosquitos geneticamente modificados: possíveis aplicações no controle da transmissão de malária e dengue

Margareth de Lara Capurro Guimarães

Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade de São Paulo (USP)

Processo 2000/12138-7

Vigência: 1/6/2001 a 31/3/2006

O projeto trabalha com a hipótese de que mosquitos geneticamente manipulados podem ser utilizados no bloqueio ou na redução da transmissão de doenças transmitidas pelos mesmos. O objetivo desta estratégia é aumentar a frequência, em uma população de mosquitos, de um gene que interfira no desenvolvimento ou na propagação das enfermidades. Como resultado, espera-se a redução ou eliminação da transmissão dos patógenos ao hospedeiro

humano. Utilizar-se-ão ferramentas de biologia molecular na síntese de genes que, incorporados no genoma do mosquito, resultarão em mosquitos refratários e/ou não transmissores dos patógenos. O projeto apresentado tem os seguintes objetivos gerais: 1) clonagem e caracterização de genes expressos em corpos gordurosos de *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* e *Anopheles darlingi*, assim como de suas regiões promotoras e regulatórias; 2) análise e caracterização de proteínas de hemolinfa de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis* e *An. darlingi* que possam interferir na interação parasita-hospedeiro; 3) obtenção de anticorpos recombinantes com atividade de bloqueio da transmissão de malária humana; 4) modelagem de anticorpos recombinantes com atividade de bloqueio da transmissão da dengue.

### 142 Estudo do bloqueio do fator de início de tradução de eucariotos 5A (eIF5A): abordagem estrutural e bioquímica

Claudio Miguel da Costa Neto

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo (USP)

Processo 2000/11397-9

Vigência: 1/5/2001 a 31/7/2006

O fator de início de tradução de eucariotos (eIF5A) é a única proteína conhecida que contém o aminoácido hipusina. A função de eIF5A ainda não é bem conhecida, mas este fator está associado com o início de tradução, trânsito nucleocitoplasmático, decaimento de mRNA e proliferação celular. A enzima Pkc1p de *S. cerevisiae* está envolvida na fosforilação da desoxi-hipusina sintase, responsável pelo primeiro passo da formação pós-traducional de hipusina. Pkc1p está associada ainda com a regulação do ciclo celular e controle negativo da formação de ribossomos, ação coordenada por receptores de membrana WSCs. A expressão em alto número de cópias dos genes de Pkc1p e de receptores WSCs suprimiu o fenótipo temperatura-sensível de um mutante de eIF5A em leveduras. Neste estudo, pretende-se determinar a primeira estrutura cristalográfica de eIF5A de eucariotos e realizar estudos conformacionais do peptídeo que contém o sítio de hipusinação. A interação genética entre os genes de Pkc1p e eIF5A também será investigada. Por último, será analisado o efeito sinérgico de inibidores de hipusinação combinados com drogas de ação anticancerígena. Espera-se contribuir para a compreensão das vias de ação de eIF5A e, logo, dos mecanismos envolvidos no controle da proliferação celular.

### 143 Estudo das regiões do promotor do P450c17 humano que contém sequências de reconhecimento do NF1 e do SF1: análise dos determinantes da atividade funcional e as implicações na especificidade

Chin Jia Lin

Hospital das Clínicas

Faculdade de Medicina/USP

Processo 2000/11362-0

Vigência: 1/3/2001 a 31/8/2006

A enzima citocromal P450c17 é a chave-reguladora qualitativa da cadeia da esteroidogênese e apresenta uma especificidade da expressão tissular peculiar dentre as enzimas esteroidogênicas. O presente projeto visa à identificação dos determinantes da especificidade da expressão do gene do P450c17 (CYP17) no córtex da adrenal humana e se concentrará na análise da interação dos fatores da família dos NF1 e 2 de suas sequências de reconhecimento presentes nas bases -107/-85 (FP1) e -178/-152 (FP2) da região promotora do gene do CYP17 humano, bem como na caracterização do(s) fator(es) nuclear(es) presente(s) nas células NCI-H295A que se liga(m) às sequências -70/-33, que contém uma suposta sequência de reconhecimento do SF-1 e de fatores da família Gata. As abordagens experimentais serão a clonagem dos fatores NF1 expressos na adrenal humana por PCR e pelo sistema de um-híbrido de leveduras (*yeast one-hybrid system*), estudo da expressão das isoformas do NF-1 nas camadas do córtex adrenal, identificação das famílias de NF1 que se ligam especificamente aos sítios FP1 e FP2 e análise do efeito da orientação e da posição desses sítios na transição CYP17 humano. Os fatores que se ligam à sequência -70/-33 do CYP17 humano serão caracterizados por meio das técnicas clássicas de análise da interação DNA-proteína (*footprint* com radical hidroxila e ensaios de interferência).

#### 144 Determinação da estrutura tridimensional das proteínas TRIP-1 e INT6 e caracterização da função da INT6 no controle da proliferação celular e na iniciação da tradução

Nilson Ivo Tonin Zanchin

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)

Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron (ABTLuS)

Ministério da Ciência e Tecnologia

Processo 2000/02788-4

Vigência: 1/7/2000 a 31/10/2006

Os mecanismos de regulação da tradução envolvem principalmente o controle da atividade dos fatores de iniciação da tradução, que, quando alterada, pode resultar em transformação maligna. O mecanismo de ação da maioria dos fatores de iniciação da tradução não está estabelecido. A maioria desses fatores é formada por várias subunidades e até o momento foi determinada a estrutura tridimensional de apenas dois deles, o eIF1 e o eIF4E. Este projeto envolve o estudo da estrutura e função de fatores de tradução, visando estudar especificamente as

subunidades TRIP-1 e INT6 do fator eIF3. A TRIP-1 e sua homóloga de *S. cerevisiae*, Tif34p, pertencem à família de proteínas WD-domain, cuja sequência é formada por repetições de um domínio que contém o dipeptídeo WD no seu C-terminal. A INT6 contém o domínio PCI/PINT encontrado também em subunidades dos complexos proteossomo e COP9/signalosome. Além de participar da tradução, essas proteínas têm atividade relacionada com transdução de sinal e controle da proliferação e divisão celulares. A inserção do vírus de tumor mamário no gene da INT6 resulta em formação de câncer em camundongo. Por isso, além de desenvolver experimentos que contribuirão para o entendimento da estrutura da TRIP-1 e INT6, este projeto visa também determinar se a INT6 está diretamente envolvida na transformação celular maligna.

#### 145 Correlação estrutura-função de proteínas e peptídeos

Thelma de Aguiar Pertinhez

Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS)

Associação Brasileira de Tecnologia de Luz Síncrotron (ABTLuS)

Ministério da Ciência e Tecnologia

Processo 2000/02026-7

Vigência: 1/10/2000 a 31/10/2005

O entendimento das funções biológicas, no nível molecular, requer o conhecimento da estrutura tridimensional e das propriedades dinâmicas das proteínas envolvidas. Atualmente, as técnicas capazes de fornecer detalhes da estrutura de proteínas, no nível atômico, são: a cristalografia de raios X e a ressonância magnética nuclear (RMN). A vantagem da RMN, nesse caso, reside na possibilidade de se obter informações de caráter dinâmico em condições similares às fisiológicas. Neste projeto, pretende-se empregar as técnicas espectroscópicas de RMN de alta resolução e dicroísmo circular e modelagem molecular para descrever os detalhes estruturais e processos dinâmicos, como enovelamento e flexibilidade dos peptídeos e proteínas, e correlacionar essas informações com suas atividades biológicas. Os sistemas de estudos serão: 1) os peptídeos antimicrobianos (FLSFPTTKTYFPHFDL-SHGSAQVKGHGAK, correspondente ao fragmento 33-61 da alfa-bemoglobina bovina e mutante da gomesina ZCRRLCYKQRCVTCRGR); 2) fragmento do canal de sódio de cérebro (KGIRTLFLMMSLPALFNIG resíduos 1644-1664, correspondente à alça citoplasmática entre S4 e S5 do domínio IV); e 3) a proteína metalotioneína da cianobactéria *Synechococcus* PCC 7942. O projeto científico será desenvolvido no Centro de Biologia Molecular Estrutural, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, em Campinas, e contará com a colaboração de pesquisadores de diversos centros de pesquisa do Estado de São Paulo.