

Disciplina QBQ 2504

Laboratórios Disponíveis

para Estágios no

Departamento de

Bioquímica

QBQ2504

ESTUDO DE INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS EM SÍNTESE DE RIBOSSOMOS

Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira

Laboratório de Controle Pós-Transcricional de Expressão Gênica

Instituto de Química – Universidade de São Paulo

Introdução

A biogênese da maquinaria celular responsável pela síntese de proteínas, os ribossomos, é um processo muito complexo em eucariotos que envolve pelo menos 200 fatores, além dos quatro RNA ribossomais (rRNAs) e das 80 proteínas ribossomais (r-proteínas). Esse processo tem que ser muito bem regulado, pois a síntese de ribossomos defeituosos pode ser bastante deletéria para a célula e causar várias doenças em humanos. As etapas de síntese de ribossomos envolvem interações específicas proteína-proteína, RNA-proteína e RNA-RNA que são essenciais para o controle de expressão gênica.

Através de estudos anteriores em nosso laboratório, identificamos e caracterizamos as funções de várias proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* envolvidas em diferentes etapas de processamento de rRNA, dentre elas, Nop8p, Nop17p e Cwc24p, que participam de degradação de rRNAs ou conectam splicing e processamento de pré-rRNAs (Santos et al., 2011; Gonzales et al., 2005; Goldfeder and Oliveira, 2008).

Nop8p controla o complexo de RNases denominado de exossomo e sofre fosforilação, modificação pós-traducional que deve regular a atividade desta proteína (Santos et al., 2011). Nop17p interage com uma proteína *chaperone* e participa da modificação conformacional de proteínas durante a montagem de um grupo específico de complexos de ribonucleoproteínas, os snoRNPs de box C/D (Gonzales et al., 2005; Prieto et al., em preparação). Através de sua interação com Nop17p, Cwc24p deve ser recrutada co-transcricionalmente para os pré-snoRNAs de box C/D que contêm introns, e participa do splicing desses RNAs (Goldfeder and Oliveira, 2008; Coltri et al., em preparação).

Nestes projetos, que podem ser desenvolvidos por três alunos diferentes, pretendemos utilizar métodos de estudo de interação entre proteínas para a identificação de novos fatores envolvidos em diferentes etapas de maturação de ribossomos. Cada aluno de iniciação trabalhará com um dos métodos para identificar proteínas interagindo com um dos alvos.

Métodos

Os métodos de interação entre proteínas a serem utilizados já foram padronizados no laboratório.

São eles:

- Duplo-híbrido de levedura que permite o estudo de interação entre proteínas *in vivo*;
- Co-purificação (*pull-down*) de proteínas que permite a determinação de interação direta entre proteínas recombinantes expressas em *Escherichia coli*;

- Co-imunoprecipitação de proteínas através da metodologia do *TAP-tag* que permite a análise de complexos protéicos que podem ser formados por várias subunidades.

Relevância

A identificação de proteínas interagindo com os alvos propostos pode trazer informação nova sobre novos fatores envolvidos em maturação de ribossomos, ou fatores regulatórios deste processo. A metodologia proposta permite o aprendizado de métodos de ponta de bioquímica e de biologia molecular que podem ser aplicados depois em diferentes áreas do conhecimento.

Há também a possibilidade de continuação do projeto na caracterização funcional das novas proteínas encontradas.

Professor Responsável: Fábio Luís Forti

1. Linha de Pesquisa: "Identificação dos efeitos redox na atividade e capacidade de ligação da proteína quinase Csk"

2. Professor Responsável: Fábio Luís Forti

3. Número de Vagas: 01 (uma)

4. Introdução:

"A proteína tirosina quinase Csk é a principal reguladora negativa endógena da oncoproteína Src, cuja super expressão e/ou mutação leva a inúmeros tipos de cânceres humanos de alta incidência. Recentemente foi mostrado que Csk possui uma ponte dissulfeto num de seus domínios de ligação a Src. O estado de oxidação desta ponte afeta a atividade desta enzima in vitro, mas in vivo este efeito ainda é desconhecido. Pretendemos neste trabalho analisar como o estado redox de Csk está afetando sua interação com outras proteínas in vivo e como um mutante de Csk na ponte dissulfeto poderia se comportar enzimaticamente"

5. Principais técnicas Utilizadas:

Cultura de bactérias, cultura de células, eletroforese, Western blot, Espectroscopia UV/Vis, etc.

6. Cronograma das Atividades:

- a) preparação de plasmídeos em bactérias
- b) expressão, produção e purificação da proteína em bactérias
- c) análise por eletroforese e espectroscopia
- d) tratamento das proteínas com agentes oxidantes e análise por espectroscopia
- e) Cultura de células de mamíferos, estimulação com agentes oxidantes e preparação de lisados
- f) Experimentos de pull-down e western blot de proteínas que interagem com Csk

7. Relevância do Projeto:

Este projeto responderá perguntas importantes e inéditas na literatura sobre se a translocação de Csk sentido citoplasma-membrana é dependente ou não do estado redox da proteína e como isto afeta a via de sinalização da proteína Src. Este projeto tem financiamento CNPq e colaboração com a Profa. Patricia Jennings da UCSD.

Professor responsável: Iolanda Midea Cuccovia

1-Linha de Pesquisa: Estudos de reatividade química em Modelos de Membrana e Interações com peptídios biologicamente ativos

2- Professor responsável: Iolanda Midea Cuccovia

3- Número de vagas: 2

4- Introdução

Temos usado micelas, vesículas e reações intramoleculares como modelos para investigar o efeito de interfaces em reatividade química e biológica. Catalise enzimática, reconhecimento, bio-transformação de energia, transporte de íons e mudanças de forma em membranas tem em comum relações topológicas precisas entre componentes de interfaces. Nestes projetos estudaremos as propriedades de vesículas preparadas com anfifílicos sintéticos e micelas na velocidade de reações e capacidade de interação com peptídeos biologicamente ativos.

5 -Principais técnicas que serão utilizadas . Só citar, não precisa descrever captura química, calorimetria, espectrofotometria, fluorescência, tensão superficial, espalhamento de luz.

6- Cronograma das principais atividades.

Projeto 1-

- a) Familiarização com as técnicas a serem empregadas
- b) Preparação de vesículas, incorporação de compostos fluorescentes no compartimento aquoso interno e verificação da permeabilidade das vesículas em diferentes frente à adição de agentes permeabilizantes.

Projeto 2-

- a) Familiarização com as técnicas a serem empregadas
- b) Estudo de reações biologicamente relevantes em sistemas biomiméticos (micelas e lipossomas)

7- Relevância dos projetos

Projeto 1- O estudo da interação de peptídios e membranas modelos permite entender com mais detalhe as leis que regem a estruturação e interação de proteínas com em membranas biológicas.

Projeto 2- O estudo de reações em modelos de membranas permite avançar no conhecimento de propriedades fundamentais que podem ser estendidas a reações enzimáticas.

Professor responsável: Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira (bolsista FAPESP), **(Mari Cleide Sogayar)**

1-Linha de Pesquisa: Clonagem, expressão e caracterização funcional de fatores peptídicos de crescimento associados com Reprodução e Inflamação.

2- Professor responsável: Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira (bolsista FAPESP), c/ minha supervisão.

3- Número de vagas: 2

4- Introdução (1 parágrafo): Nosso grupo NUCEL (Núcleo de Terapia Celular e Molecular) atua na área de pesquisa translacional, gerando conhecimentos básicos e buscando formas de transformar estes conhecimentos em produtos e processos de interesse biotecnológico, os quais são transferidos para empresas do setor farmacêutico e biotecnológico para exploração comercial e benefício do Sistema Único de Saúde. Os bolsistas estarão envolvidos em projetos de produção de Biofármacos (fatores peptídicos de crescimento e diferenciação celular), utilizando sistemas de procaríotos (E. coli) e de eucariotos (células de mamíferos e de inseto).

5 -Principais técnicas que serão utilizadas . Só citar, não precisa descrever – Técnicas de DNA recombinante (preparação e digestão de DNA plasmídeo, clonagem molecular, transformação bacteriana com plasmídeos recombinantes, cultura de células e diversos bioensaios (proliferação, diferenciação, morte celular).

6- Cronograma das principais atividades. Os projetos já estão em andamento, com apoio das agências financiadoras (a Dra. Ana Claudia tem um projeto PIPE da FAPESP em parceria com a empresa Farmacore).

7- Relevância do projeto (não obrigatório) – a Medicina Regenerativa e a Engenharia de Tecidos depende da disponibilidade de fatores peptídicos de crescimento e diferenciação celular, os quais agem como indutores de proliferação e diferenciação celular.

Docente responsável: Marisa Helena Gennari de Mkedeiros

Título do Projeto: Danos em biomoléculas promovidos por sistemas redox. Estudo de mecanismos e desenvolvimento de biomarcadores sensíveis.

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Marisa H. G. Medeiros

Instituição: Instituto de Química- Universidade de São Paulo
Departamento de Bioquímica

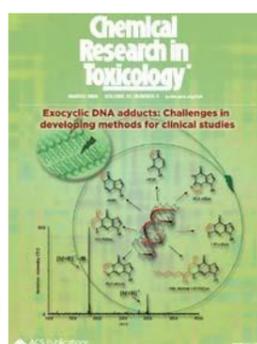
Número de vagas= 2

Resumo:

Estudos têm associado processos redox com diversas patologias incluindo o câncer. Uma grande limitação do estudo de processos na sua quantificação em sistemas



Models



redox diz respeito às dificuldades biológicas. Processos redox podem levar a danos diretos e indiretos em biomoléculas. Já está bem estabelecido que produtos da lipoperoxidação como acroleína, crotonaldeído, *trans*-2-hexenal, *trans*, *trans*-2,4-decadienal, and *trans*-4-hydroxi-2-nonenal podem alquilar DNA e proteínas produzindo adutos. Os estudos

mundiais sobre a capacidade dessas moléculas reagirem com biomoléculas produzindo efeitos citotóxicos estão ainda no início. O objetivo do presente projeto é investigar os mecanismos e os

Science **264** (1994) 1663-1664

produtos de processos redox em biomoléculas utilizando métodos ultra sensíveis. Os adutos produzidos são detectados e quantificados *in vitro*, em cultura de células e *in vivo*, ratos transgênicos com SOD1 mutada, modelo para esclerose lateral amiotrófica e em ratos expostos a poluição urbana. Os possíveis mecanismos da formação dos adutos, assim como o efeito de antioxidantes também serão investigados.

Métodos:

As principais metodologias empregadas são:

Ressonância Magnética Nuclear

Espectrometria de Massa

Cromatografia Líquida (HPLC)

Ensaio Cometa (Eletroforese em Gel de Célula Única)

Cultura de células

Genotipagem de animais transgênicos

Plano de Atividades

1- Caracterizar modificações em biomoléculas induzidas por estresse redox.

2- Quantificar por espectrometria de massa biomarcadores de estresse redox em células em cultura e em tecidos de animais modelo para esclerose lateral amiotrófica ou expostos a poluição urbana.

Professor responsável: Nadja C. de Souza Pinto

1. *Linha de Pesquisa:* O papel de lesões oxidativas em DNA mitocondrial no mecanismo tóxico de manganês para células de mamíferos
2. Professor responsável: Nadja C. de Souza Pinto
3. *Número de vagas:* 01
4. *Introdução:* O manganês (Mn) é essencial para seres vivos, desempenhando um papel importante na função do sistema nervoso, mineralização dos ossos, no metabolismo energético e de proteínas, regulação metabólica e proteção celular. Entretanto, a exposição crônica a este metal, principalmente durante estágios embrionários ou pós-natais, pode induzir diversos eventos tóxicos, onde o sistema nervoso central é o alvo principal. Alta exposição ao manganês tem sido associada a doenças tais como Alzheimer's, esclerose lateral amiotrófica, Parkinson's, esquizofrenia, e autismo. Algumas dessas doenças aumentam com o envelhecimento e conseqüentemente o custo dos programas de saúde pública tem aumentado também. Numerosas hipóteses têm sido levantadas para explicar a atividade neurotóxica do manganês, e um papel central para alterações em função mitocondrial e metabolismo energético foram propostos. Entretanto, os dados experimentais existentes neste momento para suportar essa hipótese ainda são escassos, assim como o papel da especiação do Mn como determinante da sua toxicidade mitocondrial e da sua neurotoxicidade permanecem sem serem resolvidos satisfatoriamente. Desta forma, nós propomos que a exposição crônica para as diferentes espécies químicas do manganês pode induzir alterações no genoma mitocondrial, levando ao desregulamento do metabolismo energético, seguido de estresse oxidativo e conseqüentemente eventos apoptóticos e/ou necróticos. Por essa razão, propomos estudar o efeito das várias espécies biodisponíveis de manganês sobre a integridade mitocondrial, usando enfoques bioquímicos e de toxicogenômica. Os dados gerados por este projeto devem melhorar o conhecimento sobre os mecanismos da toxicidade do manganês e possibilitaram o emprego de melhores alternativas terapêuticas para a intoxicação com manganês.
5. *Principais técnicas que serão utilizadas:*
 - Cultura de células de mamíferos
 - Testes de viabilidade celular
 - Q-LX-PCR para detecção de lesões em DNA nuclear e mitocondrial
 - Fracionamento celular
 - Western blotting e RT-PCR para detecção de expressão de proteínas
 - Imunofluorescência
 - Bioenergetica mitocondrial
6. *Cronograma das principais atividades:*
 - Medir a formação de lesões oxidativas em mtDNA e n DNA em células tratadas com concentrações tóxicas de MnCl₂ e Mn-citrato
 - Medir a expressão de DNA glicosilases envolvidas no reparo de lesões oxidativas em frações mitocôndrias e totais de células expostas a esses agentes
 - Medir a função mitocondrial nessas células através de ensaios de consumo de oxigênio e formação de potencial de membrana mitocondrial

Docente responsável: Prof. Dr. Paolo Di Mascio



Lesão em biomoléculas

O objetivo da nossa pesquisa é investigar os aspectos fundamentais da química e bioquímica de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, particularmente, uma forma eletronicamente ativada do oxigênio molecular, o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), implicado em vários processos fisiológicos e patológicos. Com o intuito de desvendar os mecanismos, sintetizamos fontes apropriadas de $^1\text{O}_2$ isotopicamente marcado com oxigênio-18 molecular. Também, hidroperóxidos marcados de lipídios, proteínas e DNA, ($\text{R}_{18}\text{O}_{18}\text{OH}$) estão sendo utilizados para estudar mecanismos químicos pelos quais os hidroperóxidos causam danos em biomoléculas. Proteínas, lipídios insaturados e DNA são alvos biológicos preferenciais destas espécies, disparando respostas biológicas normais ou deletérias. O objetivo da nossa pesquisa é investigar os aspectos fundamentais da química e bioquímica de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, particularmente, uma forma eletronicamente ativada do oxigênio molecular, o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), implicado em vários processos fisiológicos e patológicos. Com o intuito de desvendar os mecanismos, sintetizamos fontes apropriadas de $^1\text{O}_2$ isotopicamente marcado com oxigênio-18 molecular. Também, hidroperóxidos marcados de lipídios, proteínas e DNA, ($\text{R}_{18}\text{O}_{18}\text{OH}$) estão sendo utilizados para estudar mecanismos químicos pelos quais os hidroperóxidos causam danos em biomoléculas. Proteínas, lipídios insaturados e DNA são alvos biológicos preferenciais destas espécies, disparando respostas biológicas normais ou deletérias.

Com este intuito serão desenvolvidas metodologias para a detecção e quantificação, baseadas em HPLC-MS/MS utilizando compostos marcados isotopicamente como padrões internos. Também será efetuada a síntese e caracterização de biomoléculas modificadas.

Cronograma das principais atividades:

- 1- Síntese e caracterização de biomoléculas modificadas .
- 2- Desenvolvimento de metodologia sensível por espectrometria de massa, medidas de emissão de luz , e outros.
- 3- Quantificação dessas lesões em sistemas químicos e biológicos.



Docente responsável: Regina Lúcia Baldini

Linha de Pesquisa: Regulação da expressão gênica e estudos funcionais em bactérias.

Número de vagas: 1

Pseudomonas aeruginosa é uma proteobactéria do grupo gama, comumente encontrada em solo e água, mas que também pode se comportar como patógeno oportunista, dificilmente combatido com o uso de antibióticos. Em humanos, é uma das principais causas de infecção hospitalar e coloniza os pulmões de portadores de fibrose cística, provocando um quadro acentuado de inflamação, que culmina em falência pulmonar. Além dos aspectos diretamente ligados a patogenicidade, como a secreção, regulação e modo de ação de fatores de virulência, *P. aeruginosa* tem sido um modelo de pesquisa bastante explorado no que diz respeito a alta resistência intrínseca a antibióticos, em fenômenos ligados a comunicação célula-a-célula, a adesão e formação de biofilmes e em diversos estudos de diversidade e variabilidade genética, bem como expressão gênica e metabolismo. Nosso laboratório estuda a função e expressão de genes e proteínas envolvidos com a patogenicidade de *P. aeruginosa*.

Técnicas utilizadas

O estagiário tomará contato com as seguintes técnicas, podendo executar todas ou a maioria delas, de acordo com o andamento do projeto:

- Técnicas básicas de biologia molecular, como PCR, clonagem de DNA, sequenciamento e outras.
- Técnicas de genética bacteriana e microbiologia: construção de linhagens recombinantes com uso de plasmídeos ou de recombinação; transformação e conjugação; caracterização genotípica de mutantes por deleção ou por inserção de transposons; caracterização fenotípica (morfologia, motilidade, formação de biofilme e curvas de crescimento em várias condições).
- Técnicas de análise de expressão gênica, como o uso de genes repórteres, RT-PCR quantitativo, etc.
- Expressão, purificação e análise de proteínas recombinantes em *E. coli* e análise do perfil protéico de culturas de *P. aeruginosa*: cromatografia de afinidade, eletroforese desnaturante, detecção por immunoblots.

Cronograma

Atividade/mês	Março	Abril	Maio	Junho
PCR, clonagem e sequenciamento	x	x		
Construção de linhagens recombinantes		x	x	
Análise das linhagens recombinantes			x	x

Docentes responsáveis: Bettina Malnic e Shaker Chuck Farah

Contato: bmalnic@iq.usp.br, chsfarah@iq.usp.br

Projeto: Expressão, purificação e cristalização da proteína Ric-8B recombinante

Número de vagas: 01

Introdução

A proteína Golf está envolvida na transdução de sinal de odorantes em neurônios olfatórios e é composta de três subunidades, a subunidade α , denominada de α_{olf} , uma subunidade β e uma γ . Ric-8B é uma GEF (fator trocador de nucleotídeo de guanina) que interage com a subunidade $G\alpha_{olf}$ da proteína G, ativando-a. A estrutura tridimensional de Ric-8B é desconhecida. O objetivo deste projeto é obter quantidades suficientes de proteína Ric-8B recombinante para a formação de cristais que poderão ser utilizados na determinação da estrutura de Ric-8B.

Principais técnicas que serão utilizadas .

- Transformação de *E.coli* com plasmídeos.
- Indução da expressão de proteína recombinante em *E. coli* utilizando IPTG.
- Purificação de proteína recombinante a partir de extrato total de *E. coli*, utilizando etiquetas GST e poli-histidine.
- Cristalização de proteínas

Cronograma das principais atividades.

Mês 1 e 2: Determinação das condições para expressão de Ric-8B recombinante em larga escala.
Mês 3, 4 e 5: Purificação de Ric-8B recombinante em grandes quantidades e com alto grau de pureza.
Mês 5 e 6: Ensaio de cristalização de Ric-8B. Se cristais forem obtidos, dados de difração de raios X podem ser coletados.

Relevância do projeto

Diferentes proteínas GEF já tiveram suas estruturas tridimensionais elucidadas, e todas apresentaram *fold*s distintos. É possível que Ric-8B apresente um novo tipo de estrutura. Ric-8B é um regulador de proteína G, que apresenta um papel central em uma série de processos fisiológicos.

Linha de Pesquisa: **Lipídeos modificados e suas implicações biológicas**

Projeto de pesquisa:

Estudo de produtos de oxidação de fosfolipídeos utilizando técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas

Professor responsável: Sayuri Miyamoto (Bloco 10, Sala 1074) Email: miyamoto@iq.usp.br

Número de vagas: 1

Introdução

Os ácidos graxos poliinsaturados são os principais componentes dos lipídeos encontrados em sistema biológico e na dieta. Devido à presença de várias insaturações em sua estrutura, estes compostos são alvos susceptíveis ao ataque por espécies altamente eletrófilas como os radicais livres e espécies reativas derivadas de oxigênio e de nitrogênio. Nessa reação são formados produtos oxidados e/ou nitrados/nitrosilados com potencial atividade biológica. Esses produtos podem alterar a homeostase celular por meio de modificações covalentes e não covalentes de importantes constituintes celulares. Considerando que ácidos graxos poliinsaturados encontram-se principalmente esterificados a fosfolipídeos de membranas celulares, o objetivo deste projeto é desenvolver uma técnica abrangente de análise de fosfolipídeos oxidados por cromatografia em camada delgada acoplada à espectrometria de massas.

Principais técnicas que serão utilizadas

O projeto envolve a utilização de diversas técnicas cromatográficas, entre elas HPLC e TLC acopladas à espectrometria de massas.

Cronograma das principais atividades:

- Síntese de produtos de oxidação de fosfolipídeos (hidroperóxidos)
- Purificação dos hidroperóxidos por cromatografia em coluna e HPLC.
- Estabelecimento de condições de separação e análise dos fosfolipídeos oxidados por TLC acoplado à espectrometria de massas
- Aplicação da metodologia estabelecida para análise de fosfolipídeos oxidados em amostras biológicas

Relevância do projeto

A oxidação de lipídeos está envolvida em diversas condições patológicas. O desenvolvimento de técnicas sensíveis e específicas que permitam caracterizar de forma detalhada os principais produtos oxidados formados em meio biológico é essencial para esclarecer a relevância e o papel de lipídeos oxidados no desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas.

1- Linha de Pesquisa: *Química, Estrutura e Função de Peptídeos*

2- Professor responsável: *Profa. Dra. Maria Teresa Machini*

3- Número de vagas: *1*

4- Introdução (1 parágrafo): *O estudo da possibilidade de remoção do grupo protetor Z (benziloxycarbonil) de Z-peptídeos usando nanocatalisador de paládio magneticamente recuperável será realizado com o intuito de facilitar a separação do catalisador dos meios reacionais e evitar o uso arriscado do carvão paladiado, catalisador geralmente empregado nos laboratórios de síntese de peptídeos nacionais e internacionais para tal função. Esta proposição é inédita e tem relevância científica e prática.*

5- Principais técnicas que serão utilizadas . Só citar, não precisa descrever: *Sínteses líquida e em fase sólida de peptídeos, Síntese de nanocatalisadores superparamagnéticos; Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), Análise de aminoácidos com detecção direta, Filtração, Centrifugação, Liofilização, Separação Magnética, HPLC acoplada a Espectometria de Massas.*

6- Cronograma das principais atividades: *Durante todo o período Fev-Jun 2012 as atividades de realização das reações de remoção do grupo Z serão feitas, monitoradas, os nanocatalisadores insolúveis serão separados dos meios reacionais e, através de análise, os rendimentos das mesmas serão determinados.*

7- Relevância do projeto (não obrigatório): *Desenvolver catalisador com qualidades superiores às dos catalisadores usuais.*

1. **Linha de Pesquisa:** Caracterização dos produtos do dano fotoinduzido em membranas lipídicas

2. **Professores responsáveis:** Mauricio S. Baptista

3. **Número de vagas:** 01 (uma).

4. **Introdução (1 parágrafo):** A modificação de biomoléculas por espécies fotoinduzidas é a base da chamada Terapia Fotodinâmica. No caso de lipídeos, os produtos mais freqüentes são os hidroperóxidos, que sabidamente promovem modificações estruturais em membranas – tais como mudanças na mobilidade lipídica, na área ocupada por lipídeo, na organização destes em domínios e na interação de proteínas de superfícies com membranas. Valendo-se do acoplamento entre cromatografia em camada delgada (TLC) e espectrometria de massas (MALDI-TOF), pretende-se caracterizar as espécies oxidadas formadas em membranas modelo quando tratadas com fotossensibilizadores na presença de luz.

Referências:

1. Riske,K.A.;Sudbrack,T.,Uchoa, A.F.,Schroder,A.P.,Marques, C.M.,Baptista,M.S.; Itri, R. Giant vesicles under oxidative stress induced by a membrane-anchored photosensitizer. *Biophys J* 2009, 97, 1362.

2. Haluska, C.K.; Baptista,M.S.; Fernandes,A.U.; Schroder,A.P.; Marques, C.M; Itri, R. Photo-activated phase separation in giant vesicles made from different lipid mixtures. *BBA-Biomembranes in press*.

3. Suraniti,E.; Tumolo,T.; Baptista,M.S.; Livache,T.; Calemczuk,R. Construction of hybrid bilayer membrane (HBM) biochips and characterization of the cooperative binding between cytochrome-c and HBM. *Langmuir* 2007, 23, 6835-6842.

5. **Principais técnicas que serão utilizadas:** produção de vesículas de composição lipídica a ser definida; irradiação das vesículas na presença de fotossensibilizadores fenotiazínicos; caracterização dos produtos do dano fotoinduzido por TLC acoplada a MALDI-TOF.

6. **Cronograma das principais atividades:**

- a) Familiarização com as técnicas escolhidas e desenvolvimento de metodologia;
- b) Caracterização dos produtos do dano fotoinduzido nas membranas lipídicas produzidas.
- c) Avaliação do efeito do tipo de membrana e da estrutura molecular do fotossensibilizador.

7. **Relevância do projeto:** *vide introdução*.

1. **Linha de Pesquisa:** Relação entre dano fotoinduzido e permeabilização em membranas lipídicas

2. **Professores responsáveis:** Mauricio S. Baptista

3. **Número de vagas:** 01 (uma).

4. **Introdução (1 parágrafo):** A modificação de biomoléculas por espécies fotoinduzidas é a base da chamada Terapia Fotodinâmica. No caso de lipídeos, os produtos mais frequentes são os hidroperóxidos, que sabidamente promovem modificações estruturais em membranas – tais como mudanças na mobilidade lipídica, na área ocupada por lipídeo, na organização destes em domínios e na interação de proteínas de superfície com membranas. Na disciplina de Estágio em Bioquímica I, identificamos por HPLC-MS a formação de hidroperóxidos em membranas de DOPC irradiadas na presença do fotossensibilizador fenotiazínico DO15. Não sabemos ao certo, porém, se os hidroperóxidos são os verdadeiros responsáveis pela permeabilização da membrana dos lipossomos. Nesta segunda etapa do projeto, gostaríamos de estudar fotossensibilizadores que promovam diferentes cinéticas de permeabilização da membrana, e compará-las às respectivas curvas de formação de hidroperóxidos em função do tempo de irradiação. Esperamos que essa análise permita aprimorar o conhecimento sobre como as modificações químicas em membrana conduzem à perda da impermeabilidade frente a alguns solutos.

Referências:

1. Riske, K.A.; Sudbrack, T.; Uchoa, A.F.; Schroder, A.P.; Marques, C.M.; Baptista, M.S.; Itri, R. Giant vesicles under oxidative stress induced by a membrane-anchored photosensitizer. *Biophys J* 2009, 97, 1362.

2. Haluska, C.K.; Baptista, M.S.; Fernandes, A.U.; Schroder, A.P.; Marques, C.M.; Itri, R. Photo-activated phase separation in giant vesicles made from different lipid mixtures. *BBA-Biomembranes in press*.

3. Girotti, A.W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001, 63, 103.

5. **Principais técnicas que serão utilizadas:** produção de lipossomos de composição lipídica a ser definida; irradiação dos lipossomos na presença de fotossensibilizadores fenotiazínicos; monitoramento da cinética de permeabilização da membrana por vazamento de uma sonda fluorescente; caracterização dos produtos do dano fotoinduzido por HPLC-MS.

6. Cronograma das principais atividades:

a) Familiarização com as técnicas escolhidas e desenvolvimento de metodologia;

b) Avaliação do efeito do fotossensibilizador na cinética de formação de hidroperóxidos e na permeabilização da membrana;

c) Proposição de modelos utilizando os dados do item (b) ou, sendo refutado o papel dos hidroperóxidos na permeabilização da membrana, busca por outros lipídeos modificados capazes de alterar a permeabilidade da bicamada lipídica.

7. **Relevância do projeto:** vide introdução.

1. **Linha de Pesquisa:** Mecanismos Moleculares de Citoproteção

2. **Professores responsáveis:** Profa. Dra. Leticia Labriola

3. **Número de vagas:** 1.

4. **Introdução (1 parágrafo):**

O câncer de mama apresenta-se como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo por ser, entre as mulheres, o primeiro em incidência e o segundo em número de óbitos. A causa de morte, na maioria dos casos, se deve à metástase da doença e as estratégias de tratamento nesse estágio comprometem a qualidade de vida das pacientes. Uma promissora alternativa de tratamento é a terapia fotodinâmica (PDT – do inglês *Fotodynamic Therapy*), que consiste na destruição do tecido neoplásico pela luz visível em presença de uma substância fotossensibilizadora e oxigênio. No entanto, os mecanismos que levam à morte das células tumorais, assim como a eficácia da PDT em tumores mamários, ainda não estão esclarecidos. Dessa forma, o presente projeto tem por objetivo estudar as vias de sinalização mediadoras dos efeitos citotóxicos da PDT utilizando diferentes agentes fotossensibilizadores, em células de tumores mamários humanos, cultivadas em duas e três dimensões. Para tal estudo será avaliada a presença de marcadores dos diferentes tipos de morte celular, assim como as atividades de algumas das enzimas chaves em cada processo de morte avaliado. Os resultados desse trabalho irão contribuir para esclarecer mecanismos ainda desconhecidos de atuação dos agentes fotossensibilizadores em PDT, fundamentais para o desenvolvimento e viabilização dessa estratégia para o tratamento de tumores mais agressivos.

5. **Principais técnicas que serão utilizadas:** microscopia de fluorescência, microscopia de contraste de fases, cultura celular, ensaios de atividade enzimática, Western blot.

6. **Cronograma das principais atividades:**

Atividades	Mês 1	Mês 2	Mês 3	Mês 4
1. Manutenção de culturas de células	X	X	X	X
2. Avaliação dos efeitos citotóxicos da PDT em cultura de células de tumores mamários humanos				
<i>Tratamento com fotossensibilizador e fotoirradiação</i>	X	X	X	x
<i>Microscopias</i>	X	X		
<i>Atividade caspases</i>			X	X
<i>Western blotting</i>			x	X

7. **Relevância do projeto:**

Apesar dos muitos progressos em prevenção, diagnóstico e tratamento para o câncer de mama, as taxas de mortalidade e de pessoas que sofrem com essa doença ainda são crescentes. Por isso, muitos grupos de pesquisa têm focalizado os seus estudos em novas terapias que apresentam mais eficácia e menos efeitos colaterais para os pacientes. Nesse sentido, a compreensão dos mecanismos e das alterações nos componentes das vias de morte celular e sua correlação com o desenvolvimento do câncer é fundamental para a evolução de terapias e métodos de prevenção.

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma alternativa promissora para o tratamento de alguns tipos de tumores e já está bem documentada na literatura sua utilização como tratamento paliativo, especialmente para o câncer de pele e tumores de pequena extensão. Porém, a resistência em difundir essa terapia para os demais tipos de câncer reside no alto custo dos medicamentos e no pouco conhecimento sobre seus mecanismos de ação. Além disso, a utilização incorreta da PDT pode provocar danos às células normais, causando maiores prejuízos para o paciente. Diante do exposto, justifica-se a necessidade de estudos básicos com a PDT visando aprimorar a eficácia e segurança do tratamento.

O aluno será treinado nas seguintes técnicas: cultura de células humanas, extração de proteínas totais a partir de lisados celulares, avaliação por microscopia de viabilidade celular, dosagem de atividades enzimáticas por fluorimetria, dosagem de quantidades de algumas proteínas chave para identificar diferentes mecanismos moleculares de morte celular.

Disciplina de Estágio em Bioquímica e Biologia Molecular

Linha de Pesquisa: Bioquímica redox

Projeto de pesquisa: Os projetos do laboratório focam nos circuitos fisiológicos e patológicos que envolvem oxidantes e radicais livres (processos redox), caracterizando os oxidantes e radicais livres envolvidos, estudando suas reatividades com biomoléculas e elucidando como essas reações e seus produtos são traduzidos em respostas celulares e teciduais. Os projetos em desenvolvimento priorizam: (i) Papel de reações redox na toxicidade do dióxido de carbono (CO₂); (ii) Ligações cruzadas proteína-proteína formadas por mecanismos radicalares; (iii) Papéis de ligações cruzadas em doenças humanas que envolvem agregação de proteínas (ex. doenças neurodegenerativas; catarata).

Professor responsável: Ohara Augusto

Número de vagas: 2

Introdução.

Oxidantes e radicais livres são formados em organismos vivos por processos redox, os quais ocorrem continuamente durante o metabolismo e durante as interações com o meio ambiente. Por outro lado, evidências acumuladas indicam que organismos saudáveis dependem do ajuste preciso de seus processos redox e que a desregulação de processos redox pode levar a patologias. Entretanto, os mecanismos pelos quais os processos redox são regulados ou desregulados permanecem pouco compreendidos, constituindo um dos maiores desafios do campo biomédico.

Principais técnicas que serão utilizadas. Expressão e purificação de proteínas recombinantes; cromatografia; espectroscopia UV-Vis e fluorescência; espectroscopia de EPR; cinética rápida (stopped-flow); espectrometria de massas; SDS-PAGE; western blots.

Relevância do projeto

Como colocado acima, entender como os mecanismos redox são regulados ou desregulados em células permanece com um grande desafio da área biomédica e esse é um desafio que o nosso laboratório tem contribuído para suplantar. Dentre nossas contribuições recentes, está a demonstração que reações redox são importantes para a toxicidade do CO₂, o qual além de um poluente moderno é, junto com bicarbonato (HCO₃⁻/CO₂), o principal tampão fisiológico. Também, destaca-se a nossa caracterização de uma nova modificação oxidativa pós-tradução de proteínas, a ligação cruzada ditriptofano. Os nossos projeto atuais dão continuidade a essas descobertas.