

Lista de ofertas de temas de dissertação de Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina

A admissão a projecto de dissertação de Mestrado pode estar condicionada ao preenchimento de requisitos mínimos

actualizado: 15.07.09

REF 1

a) Tema

Investigar as causas do atraso Mental ligado ao cromossoma X recorrendo a um grupo de doentes portugueses com os síndromes de Lujan-Fryns ou Opitz-Kaveggia.

b) Orientador

Paula Jorge

c) Enquadramento geral e objectivo(s) do estudo

Existe um elevado número de famílias portuguesas com atraso mental ligado ao cromossoma X (XLMR) clinicamente bem caracterizadas mas sem diagnóstico genético. De entre este grupo estão os doentes com as síndromes de Opitz-Kaveggia FGS [MIM 305450] e Lujan-Fryns (LF) [MIM 309520]. Estas síndromes são caracterizadas por uma levada heterogeneidade genética e variabilidade clínica. Mutações em diferentes genes têm vindo a ser associadas às síndromes LF e FGS mas num número muito restrito de famílias e sem grande homogeneidade clínica o que dificulta o estudo genético deste grupo de doentes. Até à data pelo menos 5 *loci* no cromossoma X, foram associados a este fenótipo: FGS1-MED12; FGS2-FLNA; FGS3-gene desconhecido; FGS4-CASK e FGS5-UPF3B.

Assim, propomos que este estudo se divida em três partes:

- i) Efectuar análise de co-segregação recorrendo a marcadores polimórficos localizados no cromossoma X. Esta fase do trabalho apenas será possível se existir material biológico/DNA de familiares afectados e não afectados em número suficiente para obter um resultado de associação estatisticamente válido.
- ii) Identificar e caracterizar as variantes presentes na região codificante e fronteiras intrão-exão do(s) gene(s) identificados como candidatos.
- iii) Num subgrupo de doentes clinicamente definidos como “fenótipo associado a MED12”, pesquisar mutações na região codificante do gene *MED12*, recorrendo a amostras de RNA.

Em termos gerais, este projecto visa contribuir para a caracterização do espectro mutacional dos doentes portugueses com síndromes de Opitz-Kaveggia and Lujan-Fryns.

d) Duração

6-12 meses

e) Local

Unidade de Genética Molecular,
Departamento de Genética
Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães, INSARJ
Praça Pedro Nunes, 88

4099-028 Porto

REF 2

Orientador:

Dezsö David, Ph., D.
Investigador Auxiliar,
Responsável pela Grupo de Trombose e Hemostase e
Doenças Genómicas,
Departamento de Genética
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge,
Av. Padre Cruz,
1649-016 Lisboa,
Portugal.
Fax: (+351) 217526410
Telephone: (+351) 217519322
e-mail: dezso.david@insa.min-saude.pt

Enquadramento geral e objectivo(s) do estudo:

O projecto enquadra-se no âmbito do estudo das patologias trombóticas.
O objectivo será a pesquisa e caracterização de alterações genómicas em patologias trombóticas.

Duração:

12 meses

Local:

Grupo de Trombose e Hemostase e
Doenças Genómicas,
Departamento de Genética
Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge,
Av. Padre Cruz,
1649-016 Lisboa,
Portugal.

REF 3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE HEMOGLOBINOPATIAS RARAS ASSOCIADAS AO AGRUPAMENTO GÊNICO DA BETA-GLOBINA

II. ENQUADRAMENTO GERAL E OBJECTIVOS DO ESTUDO:

A hemoglobina (Hb) sendo o transportador de oxigénio e um constituinte essencial do sangue tem sido ao longo dos anos uma das proteínas mais aprofundadamente estudadas. O estudo dos seus constituintes, as globinas, tanto normais como mutadas, tem também desempenhado um papel fundamental na história da genética médica, sendo que os conceitos e métodos desenvolvidos têm vindo a ser aplicados como modelo no estudo de outras doenças genéticas.

Os vertebrados produzem Hbs estruturalmente diferentes correspondendo a três períodos de desenvolvimento (embrionário, fetal e adulto) aos quais corresponde a síntese de Hbs diferentes – *switching* das Hbs. Em condições normais, a expressão dos diferentes genes globínicos é rigorosamente coordenada e diferencial no tempo. A regulação da transcrição desses genes ocorre, pelo menos em parte, através de interacções de factores transcricionais proteicos actuando em *trans* com sequências reguladoras actuando em *cis*, das quais se salienta a região de controlo do *locus*, regiões promotoras, silenciadoras e *enhancers*. As hemoglobinopatias são, habitualmente, consideradas como um grupo heterogéneo de doenças hereditárias da síntese da Hb onde existe uma ausência ou diminuição de síntese de uma cadeia globínica (talassémias) ou síntese de uma cadeia globínica estruturalmente anómala (variante de Hb) e têm, geralmente, como base molecular, lesões nos genes globínicos ou, por vezes, nas referidas regiões regulatórias.

O Departamento de Genética do INSA, para além de um papel importante no diagnóstico molecular pré-natal e pós-natal destas patologias, tem desenvolvido investigação aplicada nesta área o que nos tem permitido esclarecer associações genótipo/fenótipo atípicas, compreender a relação estrutura/função de hemoglobinas variantes, caracterizar funcionalmente novos mutantes naturais das globinas e estudar factores genéticos, globínicos e não-globínicos, moduladores dos fenótipos clínicos e hematológicos. No seguimento desta linha de trabalho pretende-se:

- Caracterizar a alteração genética responsável pelo nível anormalmente baixo de Hb A2 em portadores de beta-talassémia

A β -talassémia (β -tal) é uma anemia hereditária, de transmissão autossómica recessiva, originada por défice de cadeias β -globina, caracterizando-se, o heterozigoto, por ser clinicamente assintomático e por apresentar um fenótipo hematológico de alterações típicas nos índices hematimétricos (microcitose e hipocromia) assim como por um aumento do nível de Hb A2 (HbA2 >3,5%). A HbA2 constitui, portanto, um importante marcador da condição de heterozigotia para β -tal. Por conseguinte, a co-transmissão de alelos δ -talassémicos com a β -tal pode afectar o resultado do rastreio hematológico de portadores desta patologia, advindo daí falsos negativos. Assim, o conhecimento do espectro de mutações que provocam δ -talassémia facilita a identificação de duplos heterozigóticos para δ - e β -tal, e assume um papel importante na melhoria do aconselhamento genético em grupos populacionais de risco.

- Caracterizar a alteração genética responsável por níveis elevados de Hb fetal no adulto (Persistência Hereditária de Hemoglobina Fetal ou delta-beta-talassémia)

A Persistência Hereditária da Hemoglobina Fetal devido a defeito molecular não deleccional (ndHPFH) é uma condição caracterizada pela expressão anormalmente elevada dos genes G-gama e/ou A-gama-globina no período adulto. Os genes gama-globínicos são, habitualmente, expressos em nível elevado na vida fetal, sendo a sua expressão silenciada após o nascimento. O mecanismo de regulação da expressão dos genes globínicos ao longo do desenvolvimento pode ser alterado devido a mutações nas regiões promotoras desses genes. Essas mutações podem impedir ou dificultar a ligação de factores regulatórios silenciadores ou, por outro lado, facilitar a ligação de factores estimuladores da expressão génica. Por outro lado, grandes deleções que ocorram no agrupamento génico da beta-globina que impeçam o normal *switching* das hemoglobinas podem também dar origem a esse fenótipo.

- Caracterizar variantes raras da Hb

As hemoglobinopatias do tipo estrutural (as variantes de Hb) resultam de mutação na região codificante de um gene globínico, a qual dá origem à substituição de um aminoácido na cadeia globínica. A variante pode ser assintomática do ponto de vista clínico ou laboratorial. No entanto, estão descritos alguns casos de associação de variantes a fenótipos talassémicos sobretudo devido a alterações na afinidade da molécula de Hb para o oxigénio (que, quando aumentada, leva à ocorrência de eritrocitose) ou instabilidade da molécula variante com consequente eritropoiese ineficaz ou hemólise periférica.

Após a detecção por métodos bioquímicos de uma possível variante de Hb, nova ou rara, torna-se imprescindível a sua identificação por metodologias de biologia molecular para a identificação da mutação *missense* em causa o que indirectamente permitirá a previsão das características da variante.

Materiais

Serão analisados cerca de 20 indivíduos com fenótipo atípico de hemoglobinopatia: portadores de β -tal com níveis normais ou *borderline* de HbA2 (1,2%-3,5%), portadores de β -tal com níveis elevados de HbF, portadores de putativas variantes de Hb detectadas por métodos bioquímicos, indivíduos com fenótipo sugestivo de hemoglobinopatia não confirmada no diagnóstico convencional.

Métodos

- *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS) – para a pesquisa de mutações β -talassémicas comuns
- *Polymerase Chain Reaction* (PCR) - vários PCRs para amplificações específicas dos diferentes genes globínicos
- *PCR -Restriction Fragment Length Polymorphism* - para pesquisa de SNPs conhecidos (exemplo *Xmn I* a -158 de γ -globina)
- Gap-PCR – para pesquisa de deleções conhecidas (exemplo deleção Corfu; $\delta\beta$ -tal. espanhola)
- Purificação de produtos de PCR ou Gap-PCR recorrendo a kits comerciais.
- Sequenciação automática de DNA, baseada no método de Sanger, utilizando o kit BigDye Terminator V 1.1 Cycle Sequencing Kit e o aparelho Genetic Analyser 3130X, Abi Prism (Applied Biosystems)
- *Multiplex Ligation-dependent probe Assay* (MLPA) – para pesquisa de deleções não conhecidas no agrupamento génico da beta-globina – usando o kit SALSA MLPA P120 HBB que permite o estudo de 27 sequências no agrupamento génico da beta-globina. As sondas amplificadas serão separadas por electroforese capilar no aparelho de sequenciação automática, adicionando a cada reacção o marcador Gene Scan™ ROX™ Size Standard (Applied Biosystem). Os dados obtidos serão tratados no software de análise GeneMapper v.3.7 e exportados para uma folha de cálculo para análise posterior.
- Se forem detectadas mutações novas serão, se possível, efectuados estudos de expressão génica.
- Se forem detectadas deleções novas serão caracterizados os seus pontos de quebra.
- Sempre que se julgar necessário para a caracterização de novas mutações será calculada a razão de mRNAs α/β -globina por real-time-PCR, usando mRNA extraído dos reticulócitos do doente em causa.

III. ORIENTADOR:

Paula Faustino, PhD

e-mail: paula.faustino@insa.min-saude.pt; tel: 217508164

IV. DURAÇÃO: 1 ano (Setembro 2009-Setembro 2010)

V. LOCAL: Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Genética
Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge
Avenida Padre Cruz
1649-016 Lisboa

REF 4 Estudo das consequências da associação da HFE com o Receptor 2 da Transferrina na síntese da hepcidina e na homeostase do ferro

2. ENQUADRAMENTO GERAL E OBJECTIVOS DO ESTUDO

O ferro é um elemento essencial para uma grande parte dos processos metabólicos fundamentais em células e organismos. Contudo, em excesso é tóxico podendo levar à formação de espécies reactivas de oxigénio que podem estar na origem de diversas patologias, tais como inflamação crónica, neurodegeneração e falha cardíaca.

Os níveis fisiológicos de ferro circulante no plasma (na forma de complexo ligado à transferrina - Fe_2Tf), são mantidos, em parte, devido a um sistema de reciclagem dinâmico do ferro, no qual os macrófagos fagocitam os eritócitos senescentes, libertando o ferro que estava ligado à hemoglobina. Para além disso, existe um controlo na absorção intestinal do ferro sendo que uma deficiência nos níveis de ferro no organismo resulta num aumento da absorção intestinal, enquanto que uma sobrecarga em ferro diminui essa absorção. Há, ainda, um processo de libertação controlada, conforme as necessidades, do ferro armazenado no organismo.

A hepcidina, uma hormona circulante sintetizada pelo fígado, é actualmente considerada como o regulador central da homeostase do ferro no organismo (Ganz, 2001). As alterações patológicas da hepcidina resultam num espectro de doenças de sobrecarga em ferro, onde se incluem a hemocromatose, a anemia da inflamação e outras anemias com sobrecarga em ferro.

A expressão da hepcidina é influenciada por estímulos sistémicos tais como, reservas de ferro, nível da eritropoiese, inflamação, hipoxia e stress oxidativo. Estes estímulos controlam os níveis de síntese de hepcidina actuando em proteínas existentes na superfície celular dos hepatócitos tais como: HFE, receptor 2 da transferrina (TfR2), hemojuvelina, matriptase-2 e IL-6R (Darshan et al, 2009). As proteínas de superfície activam uma série de cascatas de transdução de sinal, cujos elementos participantes são, em grande parte ainda desconhecidos, de maneira a alterar (estimular ou reprimir) a transcrição do gene *HAMP*, o gene que codifica a hepcidina.

O papel da proteína HFE no metabolismo do ferro é ainda mal conhecido. Trata-se de uma molécula pertencente à classe I do complexo de histocompatibilidade principal, sem propriedades de transporte de ferro que, quando mutada, se encontra associada ao desenvolvimento de hemocromatose hereditária, uma patologia de sobrecarga em ferro (Feder et al, 1996). Sabe-se que a HFE interage com o receptor 1 da transferrina (TfR1), tendo sido sugerido que essa interacção servirá para sequestrar a HFE impedindo-a, assim, de participar numa cascata de sinalização conducente à estimulação da transcrição de *HAMP* (Schmidt et al 2008). A descoberta, muito recente, de que a HFE também poderá interagir com TfR2 levou à proposta que o complexo HFE-TfR2 poderá estar envolvido nesta estimulação da hepcidina. Foi sugerido que a interacção da holotransferrina com o TfR1 libertará a HFE que ficará disponível para interagir com o TfR2 e facilitará a transdução de sinal para a hepcidina (Gao et al, 2009). Se algum dos elementos HFE ou TfR2 se encontra mutado ou ausente, o complexo fica incapaz de “sentir” o aumento de saturação da transferrina sérica, e ocorre então a desregulação da homeostase do ferro. Sabe-se ainda que o TfR2 se localiza em domínios específicos da membrana plasmática designados jangadas lipídicas (*lipid rafts*) onde promove a sinalização via exossomas, actuando como mensageiro intracelular (Calzolari et al, 2006).

Neste estudo pretende-se estudar se a HFE se co-localiza com o TfR2 nas jangadas lipídicas da membrana das células HepG2 (uma linha celular humana de carcinoma hepatocelular), se essa associação responde quantitativamente a estímulos com holotransferrina e se essas interações se reflectem no nível de síntese de hepcidina, tendo, consequentemente implicações importantes na homeostase do ferro.

Métodos

- Estabelecimento de cultura da linha celular HepG2.
- Transfecção com o vector de expressão pEGFP+HFE (construção que permite a síntese da proteína HFE fundida à GFP permitindo visualizar a sua localização por microscopia confocal).
- Estimulação das células em cultura com concentrações variáveis de holotransferrina.
- Visualização e localização da HFE, do TfR2, e do complexo HFE-TfR2 por imunofluorescência e microscopia confocal. Serão usados anticorpos anti-hTfR2 e anti-CD81, (uma proteína característica dos domínios *lipid rafts*).
- Extracção de RNA das células e doseamento do mRNA da hepcidina por ensaios de real-time PCR, nas várias condições de cultura.
- Imunoprecipitação e imunodeteção por western-blotting, usando-se anticorpos anti-GFP, anti-hTfR2 e anti-tubulina.

3. ORIENTADOR:

Paula Faustino, PhD

e-mail: paula.faustino@insa.min-saude.pt; tel: 217508164

4. DURAÇÃO: 1 ano (Setembro 2009-Setembro 2010)

5. LOCAL:

Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Genética
Instituto Nacional de Saúde Dr Ricardo Jorge
Avenida Padre Cruz
1649-016 Lisboa

Referências

- Calzolari A et al. TfR2 localizes in lipid raft domains and is released in exosomes to activate signal transduction along the MAPK pathway. *J Cell Science* 2006; 119: 4486-98.
- Darshan D, Anderson GJ. Interaction signals in the control of hepcidin expression. *Biometals* 2009; 22:77-87.
- Feder JN et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* 1999; 13:399-09.
- Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001; 276:7806-10.
- Gao J et al. Interaction of the Hereditary Hemochromatosis protein HFE with Transferrin Receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression. *Cell Metab* 2009; 9:217-27.
- Schmidt PJ et al. The transferrin receptor modulates HFE-dependent regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* 2008; 7:205-14.

REF 5 Caracterização bioquímica e funcional da calpaína-3 em doentes LGMD2A

Orientador:

Márcia Oliveira, Unidade de Genética Molecular, Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães, INSA, IP.

Enquadramento geral e objectivo(s) do estudo:

As Distrofias Musculares das Cinturas (*Limb-Girdle Muscular Dystrophy*, LGMD) são doenças geneticamente e fenotipicamente heterogéneas, de transmissão autossómica recessiva ou dominante, e que afectam os músculos voluntários em redor dos ombros e da anca. As LGMDs são classificadas em diferentes tipos, de acordo com o gene afectado. As mutações detectadas nestes genes originam alterações funcionais das respectivas proteínas no músculo, que deixam de funcionar correctamente. Verifica-se, assim, nestes doentes uma perda progressiva da sua força muscular.

Alterações no gene *CAPN3* são responsáveis pela LGMD tipo 2A (LGMD2A), de transmissão autossómica recessiva. Este gene codifica a proteína citosólica calpaína-3, que é expressa predominantemente no músculo esquelético, onde se encontra associada à titina (uma proteína do citoesqueleto envolvida na contracção muscular). A LGMD2A tem origem num grande número de mutações, já descritas para o gene *CAPN3* (substituições, deleções, inserções/duplicações, duplicações e inserções; ver www.dmd.nl), e que se encontram distribuídas ao longo de todo este gene. Estruturalmente, a calpaína-3 é constituída por vários domínios funcionais: de regulação autocatalítica, com acção proteolítica e de ligação ao Ca^{2+} . Devido à presença deste último domínio, funcionalmente esta proteína foi associada à família de proteases activadas pelo Ca^{2+} .

Através de *immunoblotting*, verifica-se que a maioria dos doentes LGMD2A apresenta alterações na expressão da calpaína-3 em biópsias musculares (ausência/diminuição da expressão). Contudo, verifica-se também a existência de alguns doentes com uma expressão normal da calpaína-3 no músculo, cujas mutações no gene *CAPN3* se encontram frequentemente associadas à perda da função autocatalítica da proteína.

Objectivos do estudo: analisar a expressão em biópsias musculares (por *immunoblotting*) e testar a actividade autocatalítica (através de ensaio bioquímico) da calpaína-3 em doentes LGMD2A, diagnosticados molecularmente na Unidade de Genética Molecular.

Duração:

6-12 meses

Local:

Unidade de Genética Molecular, Centro de Genética Médica Doutor Jacinto Magalhães – Porto, Departamento de Genética, INSA, IP

REF 6 A função da tradução do mRNA na inibição do mecanismo de decaimento mediado por mutações *nonsense*

b) Orientador:

Luísa Romão

c) Enquadramento geral e objectivo(s) do estudo:

O processo de expressão génica envolve múltiplos passos, desde a transcrição à tradução, nos quais o RNA mensageiro (mRNA) é o intermediário fulcral. A maioria dos mRNAs eucarióticos possuem uma estrutura cap na extremidade 5' e uma cauda poli(A) na extremidade 3'. Na iniciação da tradução, o complexo eucariótico de factores de iniciação 4F (eIF4F) liga-se à estrutura cap através da subunidade eIF4E. Outros constituintes deste complexo são o factor eIF4A, uma ATPase e helicase dependente de RNA, e o factor eIF4G que se associa à subunidade ribossomal 40S através da interacção com a proteína eIF3. A proteína de ligação à cauda poli(A) (PABP) também interage com o factor eIF4G, o que resulta na circularização do mRNA. Actualmente, sabe-se que a complexidade do mecanismo bioquímico envolvido na tradução em eucariotas se reflecte em processos a montante, como por exemplo, no mecanismo de decaimento de mRNAs mediado por mutações *nonsense* (*nonsense-mediated mRNA decay*; NMD).

O mecanismo de NMD elimina rápida e selectivamente mRNAs portadores de codões de terminação da tradução prematuros (PTCs). Estes codões não codificam aminoácidos e a sua presença em transcritos impede a tradução de proteínas completas. Se sintetizadas, as proteínas truncadas resultantes serão, provavelmente, não funcionais ou poderão mesmo ter um efeito deletério no metabolismo celular. Aproximadamente 33% das doenças hereditárias e adquiridas resultam da presença de PTCs. Assim, o mecanismo de NMD, além de funcionar como um mecanismo postranscricional da regulação génica normal, desempenha um papel importante em patologias genéticas.

Uma questão fundamental relaciona-se com a discriminação entre um PTC e um codão de terminação natural. Recentemente, foi demonstrado que a distância física entre o codão de terminação e a proteína PABP é um determinante crucial na definição de PTCs. Foi por nós demonstrado que mRNAs portadores de codões de terminação próximos do AUG, i.e., portadores de uma pequena grelha de leitura (15 codões), apresentam resistência ao NMD devido a um efeito de aproximação do PTC à proteína PABP, como resultado da circularização do mRNA [como por nós ilustrado na capa da FEBS Letters, 58(3), 2009].

Presentemente, o objectivo deste projecto é investigar em detalhe as interacções proteicas de PABP envolvidas no mecanismo de inibição do NMD e no mecanismo de tradução, utilizando complexos de pré-iniciação, iniciação e terminação da tradução formados *in vitro* (lisados de reticulócitos de coelho) e *in vivo* (linha celular HeLa) num mRNA modelo da beta-globina humana com uma mutação *nonsense* no codão 15.

Este estudo envolve as seguintes metodologias: Clonagem de construções génicas, cultura de células e sua transfecção, análise e quantificação do mRNA por RT-PCR quantitativo, análise de interacções proteicas por imunoprecipitação e Western blot.

d) Duração:

1 Ano lectivo

e) Local:

Departamento de Genética do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Av. Padre Cruz, 1649-016 Lisboa

REF 7

Role of β -lactamase operon in the stabilization and expression of broad-spectrum β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*

Identificação do(s) orientador(es)

Duarte C. Oliveira, CREM, FCT/UNL

Local de realização

Centro de Recursos Microbiológicos, Departamento de Ciências da Vida, FCT/UNL

Plano de trabalho

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) are a leading cause of nosocomial infections worldwide and are also emerging as community pathogen (CA-MRSA) where it can cause lethal infections among otherwise healthy people. Besides cross-resistance to all β -lactams, most epidemic MRSA strains are resistant to virtually all classes of antimicrobial agents leaving clinicians with few therapeutic options.

Resistance to β -lactam antibiotics in *S. aureus* can be mediated by two mechanisms which were sequentially acquired by the bacteria in response to the antibiotic selective pressure: (i) the β -lactamase (*blaZ*) which confers resistance to penicillins only, and (ii) the *mecA* gene, which confers cross-resistance to all β -lactams, including methicillin, a semi-synthetic antibiotic designed for the treatment of infections caused by penicillin-resistant staphylococci. The *mecA* transcription can be controlled by its own regulators (*mecI-mecR1*) and also by the homologous *bla* regulatory genes (*blaI-blaR1*), although there is a remarkable difference in the induction efficiency: *blaI-blaR1* induces *mecA* expression in few minutes, whereas *mecI-mecR1* induction takes several hours. Based on these observations, it has been postulated, and later confirmed at least for some strains, that contemporary MRSA strains, highly resistant to β -lactams, should have non-functional *mecI-mecR1* regulatory system.

In the *S. aureus* population, there is a strong clonal restriction for the *mecA* acquisition: MRSA lineages are restricted to a few genetic backgrounds and the *in vitro* transfer of the *mecA* gene is more efficient for those lineages where *mecA* is naturally found. Interestingly, almost every contemporary MRSA strain is still positive for the *bla* genes, which is apparently not necessary for the resistant phenotype, and it has been shown that the presence of *bla* genes enhances dramatically the *mecA* domestication. Moreover, preliminary results in our laboratory suggest that the presence of *bla* genes is able to attenuate the *mecI*-mediated repression of the *mecA* gene and that the plasmid carrying the *bla* genes interferes with the cellular physiology of *S. aureus* (e.g. restriction to bacteriophage infection).

In this project we aim to explore the role of the *bla* genes in the stabilization and expression of the *mecA* gene in contemporary MRSA clinical strains and also its effects on the cellular physiology. In short, prototype MRSA clinical strains will be cured from the β -lactamase plasmid and the resulting mutant strains will be characterized in terms of the phenotypic expression of β -lactam resistance, *mecA* expression and efficiency of bacteriophage-mediated genetic transduction. In parallel, mutant strains for the *mecA* regulatory genes available in our laboratory will be transformed with prototype β -lactamase plasmids. The resulting recombinant strains will be also characterized in terms of phenotypic expression of β -lactam resistance and *mecA* expression.

REF 8

Exploring the mechanisms underlying the heterogeneous phenotypic expression of the broad-spectrum β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*

Identificação do(s) orientador(es)

Duarte C. Oliveira, CREM, FCT/UNL

Local de realização

Centro de Recursos Microbiológicos, Departamento de Ciências da Vida, FCT/UNL

Plano de trabalho

Antibiotic resistance is a complex phenomenon and cannot be regarded as just an accumulation of point mutations or acquisition of resistance determinants. In fact, the phenotypic expression of antibiotic resistance often involves a full re-adaptation of the cell to compensate for the fitness cost of resistance expression and/or to adjust metabolic networks to the antibiotic presence. Interestingly, for many antibiotics there is a hormesis response and, besides the clinically relevant high-dose inhibition, there is a plethora of stimulation effects at low-dose concentrations. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), a clinically important Gram-positive pathogen characterized by cross-resistance to all β -lactams encoded by the *mecA* gene, is a particularly interesting model to study the complexity of antibiotic resistance mechanisms.

Many MRSA strains have a heterogeneous phenotypic expression profile exhibiting sub-populations with increased resistance levels. Because, this phenotype is stable and strain specific, it may result from a (stochastic) phenotypic switch, which originates more tolerant cells. This phenomenon remains to be fully explained and sure deserves more investigation, as heterogeneous resistance may result in treatment failures. Tolerance mechanisms have been implicated in the decreased susceptibility to antibiotics in biofilms and recalcitrant chronic infections, two kinds of infections that can be attributable to *S. aureus*.

The bacterial cell-wall is an incredibly complex and highly-regulated cellular structure, so that, any perturbation to its structure and function, such as the presence of β -lactams which inactivate the PBP enzymes responsible for the last steps (cross-linking) of the cell-wall synthesis, originates a complex cellular stress-response. In fact, many conditional mutants for cell-wall synthesis genes with impaired phenotypic resistance expression have been described, demonstrating the requirement of a fully functional cell-wall for the optimal expression of β -lactam resistance. Moreover, even at subinhibitory concentrations, β -lactams originate a complex transcriptomic signature.

In this project we aim to explore the underlying mechanisms of the heterogeneous phenotypic expression of the *mecA*-mediated β -lactam resistance and its links with the cellular core metabolism. For this purpose, prototype MRSA strains and mutant strains for the *mecA* regulatory genes available at our laboratory will be characterized in terms of the phenotypic expression of β -lactam resistance in different growth conditions. Using gene reporter systems also available at our laboratory, the promoter activities of key determinants involved in the expression of resistance,

stress response and core metabolism, will be monitored upon the exposition to β -lactam antibiotics for the parental and recombinant strains.

REF 9 Transcription activation in folding-defective mutants

Period: 2009/2010 (one student, full-time)

Supervisor: Lisete Fernandes (lisete@igc.gulbenkian.pt; www.igc.gulbenkian.pt)

Local: GI-Yeast Stress, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras

The budding yeast cytoplasmatic GimC hetero-complex is composed of six different Gim subunits (Gim1-6). GimC major folding substrates are tubulin and actin. However, despite the biological relevance of both substrates, GIMs are not essential genes and Gim homologues exist in both archaeobacteria and eukaryotic cells.

The interaction between the Gim2 mammalian homologue and the VHL tumor suppressor, the suggestion on unconventional Gim protein as part of the transcriptional machinery, as well our data on oxidative stress phenotypes (PDCT/BIA-BCM/55501/2004; Coelho et al (2009) submitted for publication) in *Saccharomyces cerevisiae* unravels new/specific unknown function(s) of Gims in cells exposed to oxidative stimuli. This scenario correlates with the fact that Gim homologues exist in archaeobacteria, and pin-points even in yeast fundamental links between tumorigenesis and oxidative environments.

In order to understand the role of Gims under oxidative stimuli and map the new functions, we aim to identify Gims substrates for oxidative phenotypes and discriminate if these are shared by all subunits. Specifically, in this Master project:

- Yeast heterologous genes expressing the chimera *lexA-Gim(1;3-6)* will be constructed and confirmed by DNA sequencing;
- each chimera levels in vivo will be quantified by Western blot analyses;
- interaction of each chimera with pre-selected substrates-candidates will be quantified by yeast two-hybrid assays.

More details and information are available upon request.

This proposal is part of the project PDCT/BIA-BCM/55501/2004 funded by FCT/MCTES.

REF 10 Bridging cold and oxidative phenotypes

Period: 2009/2010 (one student, full-time)

Supervisor: Lisete Fernandes (lisete@igc.gulbenkian.pt; www.igc.gulbenkian.pt)

Local: GI-Yeast Stress, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras

Eukaryotic cells respond to both intrinsic (originating within the cytoplasm) and extrinsic (extracellular) stimuli like oxidative stress and temperature fluctuations. It has been demonstrated that cells undergoing stresses modulate gene expression and, transcriptional regulation has been strongly suggested as a key regulatory step in this event. The Yap family of transcriptional factors (DNA-binding proteins) in yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains eight members and it has been described as central player in cellular responses to stress challenges as well as in fungal survival to fungicides. Interestingly, some yap4 mutants display cold-resistance phenotypes but no transcriptional activation mediated by this DNA-binding factor was detected under such environments.

Cold-resistance is a phenotype of major economical (industrial) and medical impact, as the ability of all cells (including microorganisms) to survive under sub-optimal temperatures and to recover from freezing procedures is of extreme importance in the field of cryobiology.

In order to elucidate the exact function of Yap4 in cold phenotype, so far unknown, our previous work led to the selection of candidate genes (MA) involved in Yap4-mediated phenotypes. In particular, we selected MA candidates that interfere with yap4 mutant ability to proliferate under low temperatures.

Our previous characterization shows two main group of MA candidates: one with normal oxidative stress response, and other with increased oxidative stress tolerance. Analyses of the first group mutants suggest the involvement of a cell wall protein (CWP) in yap4/MA phenotype; second group of mutants remain to be analyzed. In this context, we aim to conclude the study of Cwp relevance in yap4/MA temperature phenotype, specifically by tracking the Cwp^{wt}-Gfp fusion and the Cwp^{mutant}-Gfp in wildtype and yap4-mutant background under oxidative and cold environments. Plann of work: (i) generate CWP-GFP alleles by PCR;

(ii) transform yeast to construct stable strains carrying different alleles, screen candidates by fluorescence microscopy and confirm by PCR; (iii) localize Cwp-Gfp by fluorescence microscopy and confirm chimera levels by Western analyses.

More details and information are available upon request.

REF 11 Protein Misfolding in Neurodegeneration

We are looking for a highly motivated and creative student to collaborate on our ongoing research project on the metallochaperone frataxin. Deficiency in this small mitochondrial protein is associated to the development of a neurodegenerative disease Friedreich's ataxia (FRDA). Some FRDA patients have missense mutations on the frataxin gene, leading to a protein with features different from the wild type.

Focusing on the effect that clinical point mutations have on to the protein conformation and stability, we aim at establishing a correlation between protein structural modifications and impaired biological function and also at gaining a better insight of the molecular mechanism behind FRDA. Additional information can be found in the papers Correia et al (2006) and Correia et al (2008) and at the National Ataxia Foudation.

The selected student will have a chance to be involved in a state-of-the-art research project and to come into contact with molecular, biophysical, biochemical and cell biology methodologies.

We are accepting applications from students of biochemistry, cell biology, biology, or related areas. A very good level of English is required. Admission may be immediate.

For informal enquiries and further information, please e-mail Cláudio Gomes

Claudio M. Gomes, Ph.D.
Assistant Researcher ITQB/UNL,
Group Leader Protein Biochemistry, Folding & Stability Laboratory
Instituto Tecnologia Quimica e Biologia (ITQB/UNL)
Universidade Nova de Lisboa

REF 12 NADPH-citocromo P450 reductase no Síndrome de Antley-Bixler:

Papel do citocromo b_5 no complexo enzimático do citocromo P450

Orientador: Doutor Michel Kranendonk e Prof. Doutor José Rueff

Instituição: Departamento de Genética da Faculdade de Ciências Médicas

UNL, Rua da Junqueira 96, 1349-008 Lisboa

Contacto: 213610297 (mkranendonk.gene@fcm.unl.pt)

Duração: 1 ano lectivo **Carga horária:** *full time* **Número de alunos:** 1

Projecto: O Síndrome de Antley-Bixler (**ABS**) caracteriza-se por alterações músculo-esqueléticas, craniofaciais e/ou urogenitais com ou sem esteroideogénese alterada e ambiguidade dos genitais. Esta doença rara está associada a mutações no gene *POR* que codifica para a NADPH-citocromo P450 oxidoreductase (**CYPOR**), a enzima auxiliar de 59 citocromo P450 (**CYP**) microsossomais, que catalisam reacções de endobióticos e do metabolismo de xenobióticos (fármacos, drogas, químicos).

A **CYPOR** sustenta a actividade de **CYP**, necessária para as reacções realizadas por esta família de enzimas como a monooxigenação, desidrogenação, demetilação ou desidratação. No caso de mutações de *POR* verifica-se limitações na actividade de **CYP**, considerando-se ser a causa deste Síndrome. O objectivo deste grupo de trabalho é de elucidar os efeitos de mutações de *POR*, relacionadas com **ABS**, e no metabolismo dependente de **CYP**, por um lado para obter mais conhecimento sobre esta doença e por outro lado incrementar o conhecimento de funcionamento deste complexo enzimático no seu geral, com aplicações diversas, principalmente na indústria farmacêutica.

Objectivo Neste projecto pretende-se investigar o papel do **citocromo b_5** , outra proteína deste complexo enzimático, na sustentação da actividade de **CYP** na presença de mutantes de *POR* envolvidos em **ABS**. Para isso é usado um sistema celular simples (*E. coli*) co-expressando as várias proteínas humanas em estudo onde se avaliam os efeitos de mutações de *CYPOR* relacionados com **ABS** e o possível papel de **citocromo b_5** de mitigar as consequências de debilitação de *CYPOR*

Técnicas: A parte experimental deste projecto enquadra-se nas áreas de **medicina, biologia molecular, toxicologia genética, farmacocinética, microbiologia, e biotecnologia.**

- **Técnicas básicas de manipulação de DNA** (isolamento de DNA, electroforese, PCR, clonagem de DNA, transformação, etc.);
- **Expressão e quantificação de proteínas humanas em *E. coli*** (culturas bacterianas, espectrofotometria, SDS-PAGE, western-blot);
- **Isolamento de membranas/microsomas bacterianos**
- **Técnicas de cinética enzimática** (espectrofotométricas e de fluorescência)
- **Ensaio de bioactivação**

Calendário:

Outubro-Janeiro

Construção de vectores plasmídicos recombinantes.

Construção de estirpes bacterianas.

Avaliação de estirpes bacterianas.

Fevereiro-Março

Isolamento de microsomas bacterianos.

Caracterização e quantificação das diversas enzimas em estudos em células inteiras e microsomas.

Abril-Junho

Estudos de bioactivação em células inteiras.

Estudos cinéticos de CYP suportado pelas variantes CYPOR e citocromo b5 em microsomas.

Bibliografia de apoio:

Duarte MP e tal. (2005) *Mutagenesis*; Vol.20, No.3, pp. 199-208.

Hart SN and Zhong X (2008) *Review. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4(4), pp.439-452

Hassell S and Butler MG (1994) *Clin. Genet.* 46, pp.372-376. PubMed ID : [7889649](#)

Huang N *et al* (2005) *Am. J. Hum. Genet.* 76, pp.729-749. PubMed ID : [15793702](#)

Schenkman JB and Jansson Ingela (2003) *Pharmacology & Therapeutics* 97, 139-152

REF 13 Tema do projecto

Papel da cápsula de *Streptococcus pneumoniae* no reconhecimento do peptidoglicano pelo sistema imunitário inato do hospedeiro

2. Identificação do orientador

Sérgio Raposo Filipe, ITQB/UNL

3. Plano do projecto (tema e enquadramento geral)

Tema enquadrado no projecto “Contribuição da cápsula para a actividade inflamatória do peptidoglicano bacteriano” financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia com a referência PTDC/SAU-MII/75696/2006.

Uma característica essencial aos organismos superiores, desde o mais pequenos dos insectos aos mamíferos, para a sua própria sobrevivência é a capacidade de induzir uma resposta imunitária inata quando invadidos por um microrganismo. Dos vários componentes detectados pelo hospedeiro e assim capazes de induzir uma resposta inflamatória, o peptidoglicano é a molécula comum a quase todas as bactérias.

As bactérias gram-negativas têm uma camada fina de peptidoglicano, rodeada por uma membrana exterior constituída por fosfolípidos e LPS. Por outro lado, as bactérias gram-positivas têm uma camada espessa de peptidoglicano, o componente principal da sua parede celular, ao qual se associam de um modo covalente ou não-covalente outros polissacarídeos e proteínas. Um destes polissacarídeos é a cápsula que é um factor essencial de virulência em *Streptococcus pneumoniae*. Iremos usar como modelo de estudo esta bactéria gram-positiva que está associada a uma mortalidade anual nos EUA de valor semelhante à mortalidade causada por SIDA, cancro da mama e cancro da próstata.

Resumidamente pretendemos:

- Construir mutantes de *S. pneumoniae* em genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo da cápsula.
- Identificar o efeito da ausência destas proteínas no processo da síntese da cápsula.
- Purificar paredes e respectivos peptidoglicanos das diferentes estirpes capsuladas de *S. pneumoniae* e respectivos mutantes.
- Analisar a afinidade para a superfície celular dos diferentes mutantes de *S. pneumoniae* de uma proteína modelo capaz de detectar peptidoglicano bacteriano, PGRP-SA, usando SDS-Page e microscopia de fluorescência.

Esperamos no fim do projecto determinar se a cápsula de pneumococos poderá interferir com a capacidade de o hospedeiro detectar o peptidoglicano bacteriano.

4. Duração aproximada

1 ano lectivo.

5. Local de Realização

Laboratório de Patogénese e Superfícies Bacterianas - ITQB/UNL

6. Número de alunos por projecto

Um (1).

REF 14 O PAPEL DA BIOTRANSFORMAÇÃO E DO TRANSPORTE CELULAR NA RESISTÊNCIA AO IMATINIB

O Imatinib (IM) é o principal fármaco utilizado actualmente no tratamento de doentes com Leucemia Mielóide Crónica (LMC) e, embora a sua eficácia seja bastante elevada, alguns doentes apresentam resistência ao fármaco, seja adquirida ou primária.

A presença de mutações pontuais no domínio cinase do gene *BCR-ABL* (oncogene responsável pela doença) é a principal causa da resistência adquirida. A resistência primária afecta cerca de 20-25% dos doentes com LMC e o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pela mesma será determinante para melhorar a avaliação e intervenção terapêutica.

Entre os vários possíveis mecanismos subjacentes à resistência primária, encontram-se a actividade dos transportadores transmembranares e das enzimas de biotransformação. As proteínas transportadoras são responsáveis pelo efluxo e influxo de fármacos como o IM. Assim sendo, têm um papel preponderante na concentração intracelular que os fármacos atingem e a sua sobre- ou subexpressão tem sido frequentemente implicadas como causa de resistência. A principal enzima responsável pela metabolização do IM é a CYP3A e, variações na sua actividade podem ser determinantes na quantidade de metabolito activo gerado. Os “single-nucleotide polymorphisms” (SNPs) em genes que codificam as proteínas transportadoras ou em genes de biotransformação têm o potencial de alterar a função das proteínas e assim influenciar a eficácia dos fármacos. A identificação de SNPs com esse potencial poderá permitir prever a biodisponibilidade do IM e a optimização de dose para cada indivíduo.

Assim sendo, e no âmbito do projecto financiado pela FCT actualmente a decorrer no CIGMH intitulado “Mecanismos de Resistência ao Imatinib em Leucemia Mielóide Crónica”, os objectivos do trabalho proposto serão:

- Avaliação dos níveis de expressão e genótipo dos genes que codificam as proteínas transportadoras ABCB1, ABCC1, ABCG2, e hOCT1 em doentes com LMC;
- Determinação de polimorfismos e níveis de expressão dos principais genes de biotransformação CYP3A4, CYP3A5, CYP4F3, GSTM1, GSTT1, GSTM3, GSTP1 e UGT1A1, 1A6, 1A7 e 2B15 e seu papel na resistência.

No final serão comparados os polimorfismos e os níveis de expressão de enzimas envolvidas na biotransformação do IM e de proteínas transportadoras em doentes resistentes (com e sem mutações no BCR-ABL) e sensíveis ao IM. Amostras de indivíduos saudáveis serão usadas como controlo.

Orientadora: Doutora Marta Gromicho
Departamento de Genética
Rua da Junqueira 96

1349-008 Lisboa

Faculdade de Ciências Médicas/UNL

REF 15 Identification of type III secretion effectors of *Chlamydia trachomatis*

Supervisor: Luis Jaime Mota (jmota@itqb.unl.pt), ITQB, Infection Biology Laboratory (<http://www.itqb.unl.pt/research/biology/infection-biology>)

Start date: September 2009

Chlamydiae are a large group of obligate intracellular bacteria that cause a wide range of diseases in both animals and humans. Of particular concern, infections with *Chlamydia trachomatis* are the most prevalent cause of preventable infectious blindness in developing countries and the major bacterial cause of sexually transmitted infections worldwide.

There is no established method to genetically manipulate chlamydiae and, therefore, the knowledge of the mechanisms used by these bacteria to thwart host cells is poor. However, all chlamydiae express an active type III secretion system (T3SS) throughout the infectious cycle. T3SS are used by many bacterial pathogens to manipulate eukaryotic host cells by translocating effector proteins into the host cell cytoplasm. The identity of the complete set of chlamydial T3S effectors is elusive but studies using other bacteria as surrogate hosts suggest that *C. trachomatis* might encode for over 70 effectors. We are currently developing *Yersinia enterocolitica* as a surrogate host to specifically and reliably identify chlamydial T3S effectors.

The aim of this project is to identify new T3S effectors of *C. trachomatis*. About 20 putative effectors will be expressed as appropriate hybrid proteins in *Y. enterocolitica* and their capacity to engage on the T3S pathway will be analysed. The candidate T3S effectors identified will be expressed as His-tagged or GST-tagged proteins in *Escherichia coli* and the more relevant one(s) will be purified by affinity chromatography. The purified protein(s) will be used to raise antibodies. These antibodies will allow testing the subcellular localisation of the candidate effector(s) in human epithelial HeLa cells infected with *C. trachomatis*. In parallel, candidate T3S effectors will be ectopically expressed in mammalian cells and their subcellular localisation and possible phenotype will be analysed. Technically, this will involve PCR, DNA cloning into plasmid vectors, SDS-PAGE,

immunoblotting, protein expression and purification, mammalian cell culture, DNA transfection of mammalian cells, and immunofluorescence microscopy.

REF 16 The ecology of galactose utilization in *Saccharomyces kudriavzevii*

Descrição:

Galactose utilization in *Saccharomyces* is controlled by the *GAL* pathway, which is made up of structural genes coding for a permease (that mediates the entry of galactose into the cell), and for four enzymes necessary for galactose metabolism. In addition, three regulatory genes (a transcriptional activator, a co-inducer and a co-repressor) modulate the expression of the pathway in response to galactose availability. The molecular basis of this response is commonly referred to as the “*GAL* genetic switch” and is perhaps one of the best-studied regulatory pathways in eukaryotes.

S. kudriavzevii is the only species in the genus *Saccharomyces* unable to grow on galactose. Based on the degree of degeneration of multiple *GAL* pathway pseudogenes, Hittinger et al. (2004) proposed that pathway degeneration occurred early in the lineage leading to *S. kudriavzevii*. More recently, Sampaio and Gonçalves (2008) found and characterized new populations of *S. kudriavzevii*, a species previously known only from a few strains isolated in Japan in association with decaying plant leaves. The new populations occupy what seems to be a distinct ecological niche, the tree bark of certain oak species and, quite unexpectedly, are able to grow on galactose and have apparently functional *GAL* pathway genes. However, preliminary work indicates that the Portuguese *S. kudriavzevii* strains require a unusually long induction stage to start growing on galactose. A working hypothesis is that the Gal⁻ phenotype is caused by a delayed induction of the *GAL* genes caused by a (partial) malfunctioning of the induction mechanisms (e. g. one of the positive regulators is intrinsically less active or there is an imbalance between the positive and negative regulators). This might be somehow related to (or even have a causal relationship with) the pathway degeneration, since this partial phenotype should have some negative impact on fitness during growth on galactose. The proposed research project aims at investigating the ecological consequences of the variable utilization of galactose in *S. kudriavzevii* and the impact of this variability on the co-existence of *S. kudriavzevii* with other species, namely *S. cerevisiae*. We expect to derive new insights on the evolutionary aspects that underlie galactose utilization variability in *S. kudriavzevii* and to contribute to test whether or not ecological niche diversification is the cause of the observed discontinuities.

Hittinger, C.T., A. Rokas, and S.B. Carroll. 2004. Parallel inactivation of multiple *GAL* pathway genes and ecological diversification in yeasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 14144-14149.

Sampaio, J.P. and P.Gonçalves. 2008. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **74**: 2144-2152.

Local de realização:

Dep. Ciências da Vida, FCT/UNL

Orientadores:

José Paulo Sampaio e Paula Gonçalves

REF 17 Abordagens moleculares para a tipificação e detecção da aderência a células epiteliais pulmonares de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*

Enquadramento

Mycoplasma mycoides subsp. *mycoides* SC é o agente etiológico da Peripneumonia Contagiosa dos Bovinos (PPCB), uma doença grave que constitui uma das principais ameaças à produção de bovinos em África, onde tem vindo a causar graves prejuízos sócio-económicos. Esta doença está erradicada na Europa, sendo, no entanto, mantidas medidas apertadas de vigilância. O **Laboratório Nacional de Investigação Veterinária** (LNIV-INRB, I.P.) é **Laboratório de Referência Internacional da OIE** (*Office International des Épizooties*) para a PPCB, com a missão de contribuir para o diagnóstico e caracterização do respectivo agente etiológico e para o estudo da epidemiologia global desta doença, entre outros aspectos com ela relacionados.

Tema/Objectivos do Projecto

- Implementar um método molecular para a tipificação de estirpes de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC baseado na análise de VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) no genoma desta espécie
- Desenvolver um método baseado em FISH (*Fluorescence In Situ Hybridisation*) aplicado à detecção de *M. mycoides* subsp. *mycoides* aderentes a células epiteliais de pulmão de bovino

Plano de trabalho

Tarefa 1 Tipificação molecular de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* por análise de VNTRs

Introdução e Objectivos

A tipificação de microrganismos infecciosos é importante para detectar eventuais fontes de infecção, reconhecer estirpes particularmente virulentas e acompanhar programas de vacinação. O LNIV, como Laboratório de Referência Internacional da OIE para a PPCB, tem isolado centenas de estirpes *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC no âmbito do diagnóstico desta doença que têm vindo a ser caracterizadas por métodos convencionais e moleculares, sendo mantidas em colecção^(1,2). Pretende-se implementar e avaliar no LNIV um método recentemente descrito para a tipificação molecular de estirpes de *Mycoplasma*, incluindo de *M. mycoides* subsp. *mycoides*, baseado na análise de VNTRs no genoma desta espécie^(3,4,5).

¹ Botelho A.R.P. 2001. Caracterização e detecção moleculares de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, agente etiológico da peripneumonia contagiosa bovina, Dissertação de Doutoramento, UNL, Lisboa.

² Vilei E.M., Abdo E.-M., Nicolet J., Botelho A., Gonçalves R., Frey J. 2000. Genomic and antigenic differences between the European and African/Australian clusters of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Microbiology* 146: 477-486.

³ McAuliffe L., Ayling R.D., Nicholas R.A. 2007. Identification and characterization of variable-number repeat markers for the molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. *FEMS Microbiol. Lett.* 276: 181 – 188.

Metodologia

Será seleccionado um conjunto de estirpes representativas de vários genótipos de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC a partir das culturas mantidas na colecção do LNIV. O DNA genómico destas estirpes será extraído. Será optimizado um método baseado em PCR para a análise das VNTRs destas estirpes, adaptado de procedimentos já estabelecidos ⁽³⁾. Os resultados serão comparados com os de outros métodos de tipificação molecular ^(1,2).

Tarefa 2 Desenvolver um método baseado em FISH aplicado à detecção de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC aderentes a células epiteliais de pulmão de bovino

Introdução e Objectivos

A capacidade que um microrganismo patogénico tem de aderir às células do respectivo hospedeiro é um importante factor de virulência. Foi já demonstrado que *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC consegue aderir, *in vivo* e *in vitro*, à superfície das células do epitélio pulmonar de bovinos ⁽⁶⁾. A inibição desta adesão poderá constituir uma abordagem interessante para impedir o estabelecimento da infecção e conseqüentemente da doença, sendo assim promissor o desenvolvimento de vacinas para a PPCB baseadas em adesinas. Um estudo recente no LNIV avaliou o envolvimento das proteínas de superfície da membrana de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC no processo de adesão a células epiteliais de pulmão de bovino ⁽⁶⁾. A adesão das bactérias às células epiteliais foi neste estudo revelada por imunofluorescência indirecta (IFI). A técnica FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) possibilita a detecção de sequências alvo localizadas no rRNA de células individuais intactas ⁽⁷⁾. Pretende-se desenvolver um novo método simplificado que permita detectar e quantificar o número de células de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC que aderem à superfície de células epiteliais de pulmão de bovino, baseado na utilização de FISH e Citometria de Fluxo.

Metodologia

Culturas de células epiteliais de pulmão de bovino serão infectadas por uma estirpe seleccionada de *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC utilizando procedimentos já estabelecidos ⁽⁶⁾. Será optimizado um procedimento de FISH, utilizando uma sonda universal para bactérias, para detectar e quantificar as células bacterianas que aderiram à células epiteliais, usando citometria de fluxo. Os resultados serão comparados com os da técnica IFI.

⁴ McAuliffe L., Churchward C.P., Lawes J.R., Loria G., Ayling R.D., Nicholas A.J. 2008. VNTR analysis reveals unexpected genetic diversity within *Mycoplasma agalactiae*, the main causative agent of contagious agalactia. BMC Microbiol. 8: 193

⁵ Dégrange S., Cazanave C., Charron A., Renaudin H., Bébéar C., Bébéar C.M. 2009. Development of Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat analysis for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 47: 914 – 923.

⁶ Carvalho C.I.C. 2008. Estudo da inibição da aderência de *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC a células epiteliais de pulmão de bovino. Dissertação de Mestrado, FMV/UTL, Lisboa.

⁷ Amann R.W., Ludwig W., Schleifer K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. 59:143-169.

Local de realização dos trabalhos

- Laboratório de Biologia Celular e Imunologia e Laboratório de Bacteriologia, do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (INRB, I. P. - LNIV), Estrada de Benfica 701, Lisboa

Orientadores

- **Ana Botelho** (Responsável do Laboratório de Bacteriologia; Inv. Auxiliar; LNIV–INRB, I.P.); Email: ana.botelho@Iniv.min-agricultura.pt; Tel. 217115339
- **Ivone Correia** (Técnico Superior; LNIV-INRB, I.P.); Email: ivone.correia@Iniv.min-agricultura.pt; Tel. 217115328
- **João Inácio** (Inv. Auxiliar; LNIV–INRB, I.P.); Email: joao.inacio@Iniv.min-agricultura.pt; Tel. 217115360

REF 18 Caracterização epidemiológica de *Toxoplasma gondii* na região de Lisboa

Enquadramento:

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório responsável por infecção no Homem e em animais de sangue quente. Este agente pode causar doença grave em crianças com infecções congénitas, incluindo retinocoroidite e deficiência mental. Nos doentes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana, a toxoplasmose é considerada uma das principais causas de morte. Para além da infecção transplacentária e da ingestão de tecidos animais contendo pseudoquistos, *T. gondii* pode ser transmitido pela ingestão de oocistos veiculados nos alimentos, água ou solos contaminados. As aves constituem um bom indicador de contaminação ambiental, uma vez que se alimentam directamente do solo. Os gatos e os pombos, ambos com elevada susceptibilidade à infecção por *T. gondii*, representam um grave problema de saúde pública em áreas urbanas, devido à sua elevada prolificidade e potencial como vectores de doenças transmissíveis ao Homem. Uma vez que os gatos se podem alimentar de pombos, pode assumir-se a existência de um ciclo urbano de transmissão, mantido entre estas espécies. As implicações deste ciclo em termos de risco para a saúde pública devido à contaminação ambiental e circulação de génotipos altamente virulentos são desconhecidas. O Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), em colaboração com o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) e a Câmara Municipal de Lisboa está a desenvolver um projecto de caracterização genética e epidemiológica de *T. gondii* na cidade de Lisboa, com o qual se pretende contribuir para uma melhor compreensão da estrutura genética e prevalência deste parasita em áreas urbanas, permitindo uma melhor avaliação e gestão de risco associado à contaminação ambiental.

Objectivos

O trabalho a realizar no LNIV tem como objectivo identificar áreas na região de Lisboa em risco de contaminação por oocistos de *T. gondii*, utilizando gatos e pombos como indicadores. Neste estudo utilizaremos gatos e pombos capturados pela Câmara Municipal de Lisboa em diferentes locais da cidade, no âmbito dos programas de controlo da população destes animais. O despiste da infecção nestas duas espécies será efectuado por serologia. Os tecidos infectados provenientes de animais positivos serão simultaneamente inoculados em ratinhos no INSA e em culturas de células no LNIV, para isolamento e posterior genotipagem de estirpes de *T. gondii*.

Plano de trabalho

Tarefa 1

Colheita e processamento de amostras:

Esta tarefa consiste na colheita e processamento semanal de amostras de sangue, cérebro e fezes destinadas respectivamente às provas serológicas, à inoculação em cultura celular e ao exame parasitológico.

Tarefa 2

Despiste serológico

Todas as amostras de sangue colhidas serão testadas pela prova de aglutinação directa para despiste de animais infectados.

Tarefa 3

Isolamento de estirpes de *T. gondii* em cultura de células

As metodologias *in vitro* para isolamento de protozoários são uma importante categoria de métodos alternativos à experimentação animal. Pretende-se com esta tarefa desenvolver e otimizar uma metodologia para isolamento e cultura de *T. gondii* em cultura de tecidos, comparando-a com a inoculação em ratinho, a realizar no INSA. Esta tarefa consiste na:

- a) manutenção e propagação de culturas celulares (células Vero)
- b) preparação de homogeneizados de cérebros colhidos de animais serologicamente positivos, utilizando metodologias descritas na literatura, como a digestão em pepsina e tripsina
- c) inoculação dos homogeneizados em cultura de células e monitorização do crescimento de *T. gondii* por observação microscópica e PCR

Tarefa 4

Análises coprológicas

Aplicação de técnicas coprológicas para pesquisa de oocistos de *T. gondii* nas fezes de gatos serologicamente positivos. Todas as amostras suspeitas serão testadas pela técnica de PCR para confirmação da espécie.

Local de realização do trabalho

Laboratório de Parasitologia, Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (INRB; I.P.-LNIV), Estrada de Benfica 701, Lisboa

Orientadores

Helga Waap (Técnica superior, LNIV-INRB, I.P.) Email: helga.waap@lniv.min-agricultura.pt

REF 19 - Estudo de rearranjos do cromossoma 3 associados a doenças

Aconselhado para:

Licenciado(a) que pretendesse desenvolver actividade em **bioinformática, genómica funcional e comparativa, base de dados, estabelecimento de correlação genótipo / fenótipo**. O projecto envolve pouco trabalho de bancada.

Enquadramento geral e objectivo(s) do estudo:

O projecto enquadra-se no âmbito do estudo de rearranjos cromossómicos associadas a doenças e, mais especificamente, no estudo de rearranjos que envolvem o cromossoma 3. O objectivo será o desenvolvimento de um base de dados dos rearranjos cromossómicos associados ou não a fenótipo que envolvem o cromossoma 3. Este será utilizado para o estudo comparativo (genómica comparativa) das regiões dos pontos de quebra destas alterações.

Duração:

12 meses

Orientador:

Dezsö David, Ph., D.
Investigador Auxiliar,
Responsável pela Grupo de Trombose e Hemostase e
Doenças Genómicas,
Departamento de Genética
Instituto Nacional de Saúde “Dr. Ricardo Jorge”,
Av. Padre Cruz,
1649-016 Lisboa,
Portugal.
Fax: (+351) 217526410
Telephone: (+351) 217519322
e-mail: dezso.david@insa.min-saude.pt

Local:

Grupo de Trombose e Hemostase e Doenças Genómicas,
Departamento de Genética
Instituto Nacional de Saúde “Dr. Ricardo Jorge”,
Av. Padre Cruz,
1649-016 Lisboa,
Portugal.

REF 20 - Estudo da expressão de um gene repórter num murganho transgénico

Aconselhado para:

Licenciado(a) que pretendesse desenvolver a actividade profissional nas áreas de **animais transgénicos, histologia, biologia molecular, embriologia e desenvolvimento.**

Enquadramento geral e objectivo(s) do estudo:

O projecto enquadra-se no âmbito do estudo de translocações cromossómicas associadas a doenças, e mais especificamente no estudo do efeito de posição e das sequencias conservadas não codificantes.

O objectivo será o estudo da expressão de um gene repórter num murganho transgénicos e caracterização da importância funcional de sítios de ligação de factores de transcrição conservadas (TFBs).

Orientador:

Dezsö David, Ph., D.

Investigador Auxiliar,

Responsável pela Grupo de Trombose e Hemostase e Doenças Genómicas,

Departamento de Genética

Instituto Nacional de Saúde “Dr. Ricardo Jorge”,

Av. Padre Cruz,

1649-016 Lisboa, Portugal.

Fax: (+351) 217526410

Telephone: (+351) 217519322

e-mail: dezso.david@insa.min-saude.pt

Duração:

12 meses

Local:

Grupo de Trombose e Hemostase e Doenças Genómicas,

Departamento de Genética

Instituto Nacional de Saúde “Dr. Ricardo Jorge”,

Av. Padre Cruz,

1649-016 Lisboa,

Portugal.

REF 21 - Virus and host cell requirements for bacteriophage DNA entry in Gram-positive bacteria

Project Theme Since their discovery bacteriophages have commonly been in the forefront of fundamental discoveries in molecular biology. Yet, the crucial step of phage genome injection into host bacterial cells at the beginning of infection remains poorly studied, particularly in Gram-positive systems. The proposed project aims to shed light to this phenomenon using as primary model system the *Bacillus subtilis* phage SPP1. The extending of these studies to phage infecting *Staphylococcus aureus* is also envisaged. The project aims to elucidate the molecular bases for phage specific binding to the bacterial surface and to identify viral and host cell effectors governing the transit of phage DNA across the bacterial cell envelope. The work will be carried out under the scope of a recently funded FCT project (PTDC/BIAMIC/66412/2006).

Supervisor Identification Carlos Jorge Sousa de São José, PhD Principal Investigator Institute of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Lisbon Av. Prof. Egas Moniz, Ed. Egas Moniz 1649-028 Lisboa, Portugal Email: cjose@fm.ul.pt; Tel. 00351217999411 (ext. 47230); Fax. 00351217999459

Detailed Project Planning

I) Identification of SPP1 tail components involved in YueB receptor binding Phage SPP1 starts to adsorb in a reversible way to glucosylated teichoic acids of the *B. subtilis* cell wall as a prelude to infection. Interaction with this primary receptor is essential for SPP1 recognition of a second receptor, the membrane protein YueB, to which the phage binds irreversibly (1,2). The interaction with receptor YueB triggers SPP1 DNA ejection that is followed by its translocation to the host cytoplasm (3). We are interested in identifying SPP1 tail components (RBP – Receptor Binding Proteins) that mediate SPP1/YueB interaction. To that end a classic genetic approach will be employed aiming the isolation of SPP1 thermosensitive mutants defective in YueB recognition. This work will involve three major stages:

- I.1 -Isolation of SPP1 thermo-sensitive mutants specifically affected in irreversible adsorption,
- I.2 -Sequence comparison of putative RBP genes in SPP1 wild type and selected mutants,
- I.3 -Restore of wild type adsorption phenotype by rescue of the mutations identified in SPP1 mutants.

II) Phage receptor activity of YueB homologues of *S. aureus* In the last few years we have been assisting to a renewed interest in phages as alternative antibacterial agents to combat multi-drug resistant bacteria. *S. aureus* has been selected as a target of phage therapy due to its clinical relevance. Fundamental knowledge on the interaction between *S. aureus* and potential therapeutic phages is therefore crucial in this context. No protein phage receptor has been identified so far in *S. aureus*. Interestingly, different strains of this bacterial pathogen encode homologues of the *B. subtilis* membrane protein YueB (the receptor for phage SPP1, see above) and it may happen that these homologues also function as receptors for *S. aureus* phages. To test this hypothesis the following work is planned:

- II.1 -Cloning and expression in *E. coli* of YueB-like proteins originating from *S. aureus* hosts;

- II.2** -Evaluation of the phage inactivation capacity of the expressed proteins towards *S. aureus* phages;
- II.3** -Confirmation of the phage receptor function by inactivation of the *S. aureus* genes encoding active YueB-like proteins

Duration and Time Required

Full time during 9 months. The different tasks of the project are planned according to the following schedule:

	Task (see above for designations)						
Months	I.1	I.2	I.3	Months	II.1	II.2	II.3
1-3	■	■		1-3	■		
4-6			■	4-6	■	■	
7-9			■	7-9		■	■

Local Technophage, S.A. Institute of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Lisbon Av. Prof. Egas Moniz, Ed. Egas Moniz, Lisbon, Portugal

References

- 1 São-José et al 2004. J. Bacteriol. 186: 8337-46.
- 2 Baptista et al 2008. J. Bacteriol. 190: 4989-96.
- 3 São-José et al 2006. J. Biol. Chem. 281: 11464-70.

REF 22 - Bacteriophage endolysins to combat Gram-positive bacteria causing infection diseases

Project Theme

The old concept of phage therapy has recently resurged as a potential route to control infection by antibiotic resistant, bacterial pathogens. Some relevant examples of multiresistant bacteria are penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, vancomycin-resistant enterococci (VRE) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In addition to the original idea of using the bacterial-killing properties of virus particles to control pathogenic bacteria, modern approaches include the use of phage-encoded endolysins as antibacterial agents (1). The proposed project aims to study the antibacterial properties of newly isolated lytic enzymes and to improve their features through genetic engineering. The work will be carried out under the scope of Technophage, S.A. R&D programs.

Supervisor Identification

Carlos Jorge Sousa de São José, PhD Principal Investigator Institute of Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Lisbon Av. Prof. Egas Moniz, Ed. Egas Moniz 1649-028 Lisboa, Portugal Email: cjose@fm.ul.pt; Tel. 00351217999411 (ext. 47230); Fax. 00351217999459

Detailed Project Planning

I) Heterologous expression and purification of phage endolysins

Phage endolysins are potent cell wall degrading enzymes (“enzybiotics”) that act at the end of the phage lytic cycle to burst host bacterial cells, releasing by this way the virion progeny to the media. Thus, lysins may be good anti-infective alternatives in an age of mounting antibiotic resistance. Phage lysins will be overproduced in *E. coli*, purified by chromatography techniques and their killing activity evaluated on bacterial pathogens isolated from clinical samples. This work will involve three major stages:

I.1 -Cloning of lysin genes in *E. coli* expression vectors aiming their overexpression;
I.2 -Enzyme purification by affinity chromatography on AKTA systems (GE Healthcare);

I.3 -Evaluation of the lytic activity of purified endolysins in a collection of bacterial isolates.

II) Improvement of endolysin properties

Typically, the endolysins designed to attack the cell wall of Gram-positive bacteria are composed of two distinct domains: an N-terminal, catalytic domain (CD) displaying peptidoglycan hydrolase activity and a C-terminal domain responsible for cell wall binding (CWBD). A major drawback of lysins exploitation is their propensity to become insoluble when produced at high concentrations. In addition, some bacterial species or strains display some resistance to the action of a given lysin when added exogenously. This may translate into a narrow spectrum of lytic activity. With the final goal of improving solubility, lytic activity and of tuning the spectrum of activity of lysins we want to implement methodologies for their systematic modification based both on site-directed and random mutagenesis. This work will involve two major steps:

II.1 -Endolysin modification by : site-directed or random mutagenesis of residues or regions selected after *in silico* analysis, deletion of enzyme segments or endolysin domain swapping;

II.2 -Study of the antibacterial activity of the mutated enzymes.

Duration and Time Required

Full time during 9 months. The different tasks of the project are planned according to the following schedule:

	Task (see above for designations)					
Months	I.1	I.2	I.3	Months	II.1	II.2
1-3	■			1-3	■	
4-6	■	■		4-6	■	
7-9		■	■	7-9		■

Local

Technophage, S.A. Institute of Molecular Medicine Faculty of Medicine, University of Lisbon Av. Prof. Egas Moniz, Ed. Egas Moniz, Lisbon, Portugal

References

1. Fischetti, 2008. Curr. Opin. Microbiol. 11: 393-400.

REF 23 - Mecanismos de Resistência à Insulina e de Indução de Apoptose no Fígado Gordo Não Alcoólico em Doentes com Obesidade Mórbida

Orientador: Cecília Rodrigues - cmprodrigues@ff.ul.pt

Local: Molecular and Cell Biology of Eukaryotic Systems, iMed.UL, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Restrições: Nota mínima de licenciatura/1º ciclo 15 valores.

REF 24 - Estudo do efeito antitumoral de pró-fármacos de triazenos em linhas celulares de melanoma

Local

Departamento de Imunologia- Faculdade de Ciências Médicas (FCM)

iMed- MedChem Group, Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa (iMed)

Responsáveis

Dr^a M^a de Jesus Perry (iMed)

Dr^a Paula Videira (FCM) (paula.videira@fcm.unl.pt)

Introdução

A Dacarbazina (DTIC) é, de entre todos os agentes quimioterápicos, o principal fármaco usado no tratamento do melanoma maligno metastático. Este composto, bem como outros 1-aryl-3,3-dimetiltriazenos (DMT) são fármacos anticancerosos e a sua acção biológica resulta da sua capacidade para alquilar as cadeias de DNA. Sabe-se que estes compostos necessitam de activação por oxidação metabólica (pelos enzimas do Cit P450) para se converterem nas espécies alquilantes – os monometiltriazenos (MMT) e que, apenas cerca 20% da dose de fármaco administrado é metabolizado e convertido no agente alquilante propriamente dito (Fig. 1).

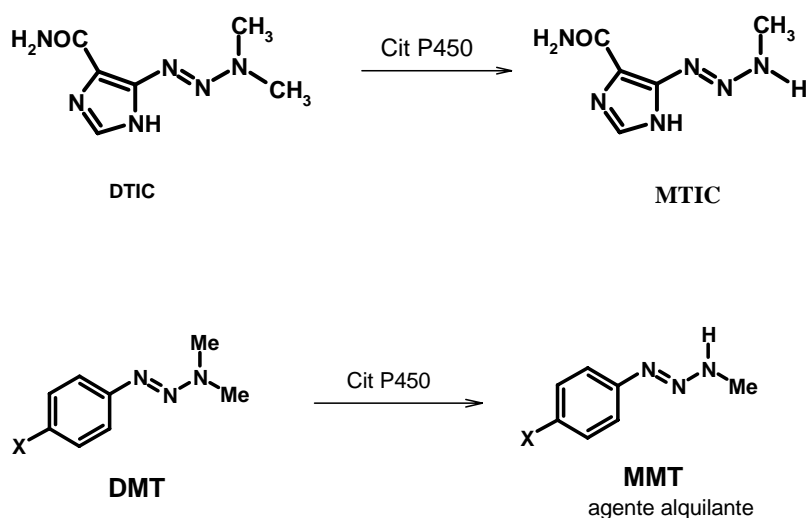
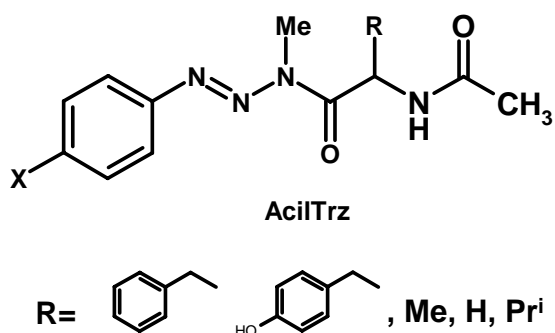


Figura 1- Activação por oxidação metabólica de Dacarbazina (DTIC) e 1-aryl-3,3-dimetiltriazenos (DMT)

Têm sido desenvolvidos pró-fármacos destes agentes terapêuticos, que são capazes de libertar o MMT em condições fisiológicas, sem necessitarem de activação metabólica. Tem também sido grande o interesse na obtenção de novos fármacos ou de novas abordagens terapêuticas, mais selectivas e direccionadas para o tumor.

Sintetizaram-se vários pró-fármacos de triazenos, os Acilamino-aciltriazenos (AcilTrz) que libertam o agente activo citotóxico, sem necessidade de activação metabólica e que usam como transportador acilamino-ácidos. Na preparação destes compostos procedeu-se à activação da função carboxílica do acilamino-ácido por reacção com carbodi-imidas (activação pelo método do DCC) e procedeu-se ao acoplamento do acilamino-ácido activado com a molécula do MMT, usando as metodologias usuais da síntese de péptidos. Estudou-se a estabilidade química e no plasma humano destes compostos. Eles mostraram ser substratos para as enzimas plasmáticas, libertando por hidrólise enzimática os correspondentes agentes alquilantes: os MMT. Além disso apresentam boas características de solubilidade em meio aquoso.



Um outro grupo de pró-fármacos de triazenos desenvolvidos procura aumentar a selectividade para as células tumorais, nomeadamente no tratamento do melanoma maligno. Uma dessas estratégias, designada por MDEPT (Melanocyte-Directed-Enzyme Prodrug Therapy), baseia-se no facto de existir uma elevada concentração de tirosinase nos

melanócitos, estando mesmo ausente em outras células. Deste modo, ao ligarmos o fármaco a um substrato de tirosinase, criamos um pró-fármaco que poderá ser um bom substrato para o enzima específico. Estes pró-fármacos ao atingirem o melanócito, por ação da tirosinase, libertam o fármaco “*in loco*”, reduzindo assim a citotoxicidade normalmente associada aos fármacos anti-tumorais e permitindo um *up-take* diferencial do fármaco citotóxico após activação pelas células de melanoma (Fig. 2).

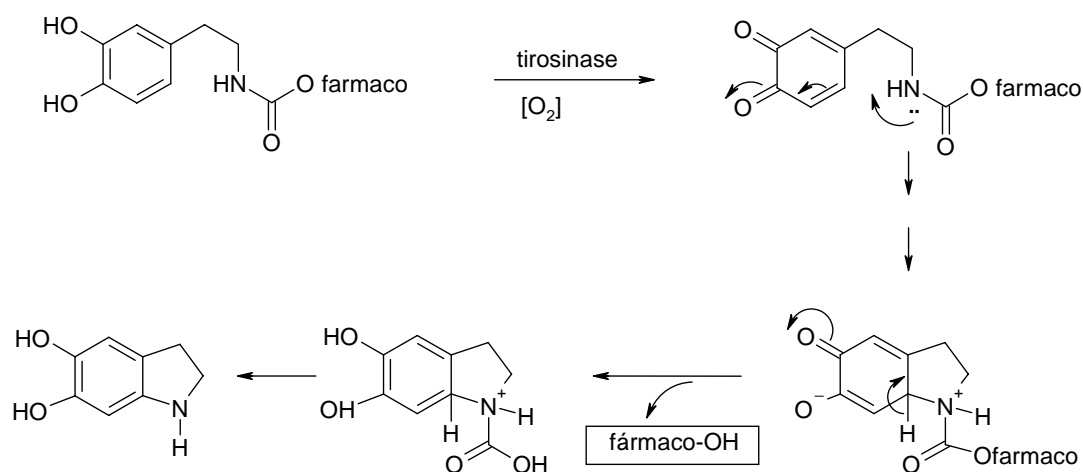
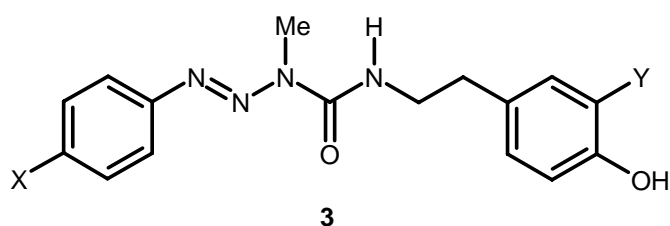


Figura 2- Mecanismo de libertação do fármaco mediado pela tirosinase

Foram já sintetizados alguns pró-fármacos de triazenos antitumorais (**3**) e avaliou-se a estabilidade química, plasmática e enzimática destes pró-fármacos.



Y= H (tiramina) ; OH (dopamina)

Objectivo do estágio

Avaliar a citotoxicidade de pró-fármacos de triazenos e o seu modo de actuação em linhas celulares de melanoma.

Plano de trabalho

Numa primeira fase deste trabalho pretende-se avaliar a citotoxicidade de um pró-fármaco (a deliberar), em diferentes concentrações, sobre células de melanoma. A viabilidade celular destas linhas cultivadas na ausência (controlo) ou na presença de concentrações crescentes do pró-fármaco em estudo será determinada após a análise da actividade da mitocôndria com base no método colorimétrico de redução do composto MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio)). Este método consiste na absorção do sal MTT e na sua redução, no interior da mitocôndria, a cristais de formazan, que podem ser quantificados espectrofotometricamente. Os valores de Absorvância a 570 nm são proporcionais à actividade das mitocôndrias e portanto dão-nos uma estimativa das células viáveis. Os parâmetros de avaliação observados serão a percentagem de morte celular e a IC50 (concentração da droga que inibe 50% do crescimento celular). O estudo da viabilidade celular das células expostas aos triazenos pode ainda ser complementado utilizando corantes de viabilidade, como o azul tripano, que só penetram nas células que apresentam disrupção da membrana plasmática.

Após aferida a gama de concentrações destas pró-fármacos que apresenta toxicidade sobre as células de melanoma pretende-se estudar o seu modo de acção. Em particular, iremos avaliar de que modo estes compostos afectam a actividade proliferativa das células de melanoma, perturbam o ciclo celular e/ou a induzem a entrada das células em apoptose. A proliferação celular pode ser quantificada através da análise da incorporação do BrDU (5'-bromo-2'-deoxyuridine) no DNA genómico das células em divisão. Quanto às perturbações no ciclo celular, pode-se avaliar como as diferentes fases da divisão celular (G0/G1, S e G2/M) são influenciadas pelos compostos em estudo, usando uma solução contendo o agente intercalante de DNA, iodeto de propídeo. Para detectar se as células entraram em

apoptose após sujeitas ao tratamento com a droga existem várias metodologias disponíveis, como a marcação com a Anexina V, avaliação da morfologia nuclear ou a análise da actividade das caspases. Os referidos métodos envolvem compostos fluorescentes que podem ser quantificados por citometria de fluxo e/ou microscopia confocal.

De modo a aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no efeito citotóxico destes pró-fármacos, numa fase posterior pode-se ainda investigar nas células de melanoma tratadas, a expressão de proteínas relacionadas com o ciclo celular ou apoptose, como a P53, a Bcl-2 e proteínas da família das ciclinas

Espera-se que os resultados deste estudo abram caminho para o estudo de outros pró-fármacos e para o planeamento, num futuro próximo, de ensaios *in vivo*, em que o efeito destes pró-fármacos possa ser testado em modelos animais.

REF 25 - Mecanismos Moleculares na Miocardiopatia Hipertrófica: um novo passo para a identificação de correlações genótipo-fenótipo

Local: Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa **Orientação:** Professora Doutora Alexandra Fernandes (alexandrancrfernandes@gmail.com)

A Miocardiopatia Hipertrófica (MCH), uma doença do miocárdio de origem genética relativamente comum (com prevalência 1:500), é a causa mais frequente de morte em jovens e em atletas [1]. A apresentação tardia e muito variável de sintomas dificulta o diagnóstico clínico anterior ao desenvolvimento de sintomas graves e, por vezes, fatais [1]. Sendo o prognóstico geralmente benigno [2] na ausência de factores de risco modificáveis e sob vigilância clínica, o diagnóstico precoce é importante. As dificuldades de implementar um teste genético para doentes com MCH, potencialmente útil para o diagnóstico, prendem-se com o grande número de genes e mutações associadas, muitas delas não caracterizadas como causadoras, e as falhas na ligação genótipo-fenótipo. O objectivo deste projecto é melhorar o diagnóstico de MCH a diferentes níveis: desde o aperfeiçoamento do teste genético de MCH, até ao estabelecimento de associações genótipo-fenótipo, através da análise de dados de expressão genética, entre outros, na busca de novos marcadores que elucidem os mecanismos patológicos responsáveis pelas variações desta associação. A construção de um sistema informático para armazenamento e processamento da informação clínica, genotípica, transcritómica, proteómica e de outros dados biológicos será uma das principais ferramentas e realizações deste projecto. O primeiro avanço será o acoplamento, optimização e validação para diagnóstico de duas recentes tecnologias analíticas de alto débito: a Genotipagem por Espectrometria de Massa para detecção de mutações conhecidas, e a Desnaturação de Alta Resolução para pesquisa de novas mutações. Resultados preliminares demonstram a utilidade desta abordagem, uma vez que permitiu a detecção de uma mutação conhecida no gene CSRP3 (que codifica a proteína LIM do músculo, não detectada por técnicas convencionais de diagnóstico genético), e 5 novas mutações (confirmadas por sequenciação) no gene MYBPC3 (que codifica a proteína C que liga à miosina). Com o objectivo de obter associações com o fenótipos de MCH, os resultados serão comparados com perfis transcritómicos e proteómicos de células de sangue de doentes com MCH, controlos saudáveis e atletas de competição (hipertrofia devida a esforço), usando técnicas computacionais avançadas. No âmbito geral, o objectivo central do projecto é a descoberta de novos marcadores da patobiologia de MCH com implicações no prognóstico e tratamento, que permitam o diagnóstico diferencial entre MCH fisiológica e patológica, e ainda responder à recorrente questão: porque doentes com a mesma mutação apresentam diferentes fenótipos? A elucidação dos mecanismos e vias moleculares subjacentes à MCH e insuficiência cardíaca num grupo de doentes portugueses com MCH pode

melhorar o diagnóstico, prognóstico, e resposta terapêutica, na tentativa de prevenir casos de morte súbita através da vigilância clínica e adequação de estilo de vida. Este projecto trará importantes contributos para o desempenho da comunidade médica e benefícios para os doentes, pois permitirá diagnósticos e prognósticos mais rápidos e exactos.

[1] Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB, Circulation. 2006, 113:1807-1816.

[2] Brito D. The enigmatic diversity of hypertrophic cardiomyopathy. Rev Port Cardiol. 24:1479-1484.

REF 26 - Miocardiopatia Hipertrofica: genética e mecanismos moleculares

Local: Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa e Laboratório de Investigação da Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Orientação: Professora Doutora Alexandra Fernandes
(alexandrancrfernandes@gmail.com)

A miocardiopatia hipertrófica (MCH), mais especificamente hipertrofia ventricular esquerda sem causa determinada, é uma disfunção do miocárdio provocada por mutações que afectam o funcionamento das estruturas contrácteis das células musculares do coração. A MCH é uma doença cardíaca genética autossómica dominante relativamente comum, mas heterogénea em termos de penetrância, expressão e prognóstico sendo o seu diagnóstico genético dificultado pelo facto de se conhecerem mutações causadoras desta patologia em dezanove genes distintos. A prevalência de MCH na população geral é estimada em 1:500 a partir de dados ecocardiográficos, sendo esta considerada subvalorizada, por não ter em conta indivíduos assintomáticos com mutação. A MCH é provavelmente a miocardiopatia mais frequente [1, 2]. Dados provenientes dos EUA indicam a MCH como a causa mais comum de morte súbita cardíaca nos jovens (incluindo atletas de competição), sendo ainda um factor relevante na insuficiência cardíaca em qualquer idade [3]. No âmbito deste projecto, foi realizada a caracterização genética de vários doentes Portugueses com MCH, tendo sido identificadas mutações cuja etiologia no prognóstico ainda permanece desconhecida. Deste modo, pretendese realizar a caracterização funcional da presença dessas mutações em genes associados a MCH, em particular nos genes MYBPC3, CRSP3, TNNT2, TNNI3 e MYH7, na estrutura do sarcómero e correlacionálas com a evolução da doença (correlações genótipofenótipo). Para tal, iremos usar como organismo modelo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Será realizada a amplificação de cDNA daqueles genes a partir de RNA total cardíaco e as mutações associadas a MCH serão introduzidas por mutagenese dirigida. Os fragmentos de cDNA com e sem as mutações em estudo serão introduzidos em vectores de expressão unicópia e multicópia, que conterão a proteína verde fluorescente (GFP) e introduzidos em *S. cerevisiae*. Será estudado por um lado o efeito da presença destas proteínas mutadas no crescimento da levedura e, por outro, o efeito destas mutações na localização subcelular dessas mesmas proteínas. Paralelamente ensaios de "two hybrid" em *S. cerevisiae* serão realizados de forma a caracterizar o efeito dessas mutações nas interações entre as várias proteínas que compõem o sarcómero cardíaco.

[1] Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, Moss AJ, Seidman CE, Young JB, Circulation. 2006, 113:1807-1816.

[2] Sanoudou D, Vafiadaki E, Demetrios A, Arvanitis, Kranias E, KontrogianniKonstantopoulos A. *Physiol Genomics* 2005, 21: 131-143.

[3] Maron BJ, Thompson PD, Ackerman MJ, Balady G, Berger S, Cohen D, Dimeff R, Douglas PS, Glover DW, Hutter AM, Jr, Krauss MD, Maron MS, Mitten MJ, Roberts WO, Puffer JC. *Circulation*. 2007, 115:1643-1655.

REF 27 - Resistência a drogas anti-tumor e seus alvos biológicos: abordagens pós-genómicas usando a levedura como sistema modelo

Local: Laboratório de Investigação da Faculdade de Engenharia e Ciências Naturais, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Orientação: Professora Doutora Alexandra Fernandes (alexandrancrfernandes@gmail.com);

Co-orientação: Professora Doutora Marta Martins

A elucidação dos mecanismos de resistência intrínseca ou adquirida a drogas anticancerígenas e a identificação dos alvos e modo de acção destas é essencial para o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes contra o cancro. Está provado que organismos modelo como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* são valiosas ferramentas no estudo dos mecanismos de acção de compostos com relevância clínica. Acresce que a elevada conservação existente entre a levedura e as células humanas permite utilizar os resultados de estudos de genómica funcional em *S. cerevisiae* na identificação de proteínas humanas envolvidas em doenças. De facto, estimase que 46% das proteínas humanas identificadas tenham homólogos em levedura. No presente projecto, tencionamos usar o modelo *S. cerevisiae* para orientar a pesquisa de mecanismos de resistência a várias drogas com potencial antitumor, em particular contra carcinoma nasofaríngeo, carcinoma gástrico, hepatocarcinoma e leucemia [1,2,3] e dos alvos destes compostos, no contexto desses tipos de tumores. Nos últimos anos, tem sido realizado um esforço enorme no sentido de encontrar novas drogas antitumor com elevada especificidade para células cancerígenas e com efeitos secundários baixos ou nulos nos doentes oncológicos. Neste projecto iremos pesquisar mecanismos de resistência a várias drogas com potencial antitumor, orientados pelos resultados dos estudos em levedura. A expressão/polimorfismos de genes humanos ortólogos dos genes de levedura, a seleccionar durante este projecto, em linhas celulares humanas tumorais, permitirão fornecer pistas e, expectavelmente, estabelecer uma correlação entre os genes candidatos relevantes e as diferentes susceptibilidades dos pacientes ao tratamento com estes fármacos. Pretendemos identificar estes genes por: i) análise do fenótipo do conjunto de mutantes da levedura em que todos os genes não essenciais foram individualmente eliminados com vista a identificação dos que apresentem uma susceptibilidade às drogas alterada; ii) comparação do transcrito e proteoma da levedura com vista à identificação de genes cuja expressão se altera por exposição a stresse causado por essas drogas; iii) homologia da sua sequência de nucleótidos com a de genes da levedura a identificar por todas as referidas abordagens pós-genómicas e análise dos seus níveis de expressão e polimorfismos em linhas

celulares tumorais; iv) expressão heteróloga na levedura para a realização de estudos funcionais detalhados, com particular ênfase na actividade biológica de eventuais bombas de efluxo de drogas. Estes estudos, recorrendo a linhas celulares tumorais (leucemia, linfoma, carcinoma de ovário, renal, cancro de mama, prostata, cólon e pulmão) e ao modelo eucariótico fundamental *S. cerevisiae*, permitirão acelerar a nossa compreensão dos mecanismos moleculares que governam a resistência a este tipo de drogas com potencial antitumor, com implicações importantes na terapia do cancro, e contribuir para a identificação de novos alvos interessantes para a terapia desses tumores e para as fases iniciais da caracterização de drogas alternativas às existentes actualmente.

[1] Qingshan Li, M. Fátima C. Guedes da Silva, e Armando J. L. Pombeiro. 2004. *Chem. Eur. J.* 10: 14561462.

[2] Qingshan Li, M. Fátima C. Guedes da Silva, Zhao Jinghua, Armando J.L. Pombeiro. 2004. *Journal of Organometallic Chemistry* 68

REF 28 - Avaliação da susceptibilidade de linhas celulares de cancro de bexiga a fármacos anti-tumorais e anti-angiogénicos

Local de Realização: Departamento de Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Lisboa em colaboração com o Instituto Português de Oncologia (IPO) do Porto

Orientadores: Paula Videira (paula.videira@fcm.unl.pt), Lúcio Lara Santos

Objectivo do estágio: Pretende-se avaliar a eficácia de diversos fármacos no tratamento do cancro de bexiga. Especificamente será feito um estudo *in vitro*, cujo objectivo é determinar a susceptibilidade de várias linhas celulares de cancro de bexiga a fármacos com conhecida acção anti-tumoral ou anti-angiogénica.

Plano de trabalho:

A incidência de cancro de bexiga tem vindo a aumentar durante os últimos anos. Além disso cerca de dois terços dos pacientes desenvolvem recorrência. Apesar do avanço que tem havido no tratamento deste tipo de neoplasia, nomeadamente a imunoterapia com *Bacillus Calmette-Guerrin* e o emprego de agentes quimioterapêuticos, até agora ainda não foi possível reduzir significativamente a progressão desta doença. Continua a ser necessário investir esforços no sentido de arranjar tratamentos mais eficazes para o cancro de bexiga, de modo a diminuir a elevada taxa de recorrência e melhorar a evolução clínica dos doentes. Existem vários fármacos, amplamente administrados contra vários tipos de cancro com relativo sucesso, mas cuja eficiência no tratamento do cancro de bexiga ainda não se encontra estudada. É o caso de alguns fármacos anti-angiogénicos, que inibem a formação de novos vasos sanguíneos necessários à progressão dos tumores ou de fármacos anti-tumorais que têm um efeito citotóxico, intervindo no ciclo celular das células cancerosas, impedindo a sua proliferação.

Neste estudo, pretende-se estudar qual o efeito de fármacos anti-angiogénicos ou anti-tumorais (cedidos pelo IPO/Porto) em linhas celulares de cancro de bexiga, tendo em vista a sua potencial eficiência no tratamento de cancro de bexiga.

Numa primeira fase será testada a citotoxicidade dos fármacos em diferentes concentrações, sobre linhas celulares derivadas de cancro de bexiga, invasivo (ex: T24, HT1376) ou não-musculo invasivo (5637). A viabilidade celular destas linhas cultivadas na ausência (controlo) ou na presença de concentrações crescentes do agente em estudo será determinada pela análise da actividade da mitocôndria com base no método colorimétrico de redução do composto MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio). Os valores dão uma estimativa da actividade das mitocôndrias e portanto das células viáveis. Os parâmetros de avaliação observados serão a percentagem de morte celular e o IC50 (concentração da droga que inibe 50% do crescimento celular). A susceptibilidade celular destas linhas expostas a um determinado fármaco pode ainda ser complementado utilizando corantes de viabilidade, como o azul tripano ou iodeto de propídeo, que só penetram nas células que apresentam disrupção da membrana plasmática.

Pretende-se ainda estudar o modo de acção destes fármacos, daí que após aferida a gama de concentrações do fármaco a que determinada linha celular é susceptível, será avaliado de que modo o agente em causa afecta a actividade proliferativa das células, perturba o ciclo celular e/ou a induz a entrada das células em apoptose. A proliferação celular pode ser quantificada através da análise da incorporação do BrDU (5'-bromo-2'-deoxyuridine) no DNA genómico das células em divisão. Quanto às perturbações no ciclo celular, pode-se avaliar como as diferentes fases da divisão celular (G0/G1, S e G2/M) são influenciadas pelos compostos em estudo, usando uma solução contendo o agente intercalante de DNA, iodeto de propídeo. Para detectar se as células entraram em apoptose após sujeitas ao tratamento com a droga existem várias metodologias disponíveis, como a marcação com a Anexina V, avaliação da morfologia nuclear ou a análise da actividade das caspases. Os referidos métodos envolvem compostos fluorescentes que podem ser quantificados por citometria de fluxo e/ou microscopia confocal.

Numa fase posterior pode-se ainda investigar nas células de cancro de bexiga tratadas, a expressão de proteínas relacionadas com o ciclo celular ou apoptose, como a proteína P53, a Bcl-2 e proteínas da família das ciclinas

Os ensaios referidos até ao momento serão realizados para cada fármaco individualmente ou para uma combinação de dois fármacos que se espere ter um efeito sinergista.

No caso específico de fármacos anti-angiogénicos, será também estudada a sua eficácia na inibição da formação dos novos vasos sanguíneos, no caso particular do cancro de bexiga. *In vitro*, este estudo serão realizados incubando células endoteliais (HUVEC) com os sobrenadantes das linhas celulares de cancro de bexiga, tratadas com o fármaco ou não tratadas (controlo). Os sobrenadantes destas linhas contêm factores de crescimento como por exemplo os VEGF, necessários à activação das células endoteliais, que poderão ser bloqueados pela presença do fármaco. A análise da expressão da molécula CD31 nas HUVEC, por citometria de fluxo, permitirá avaliar a eficiência de anti-angiogénico em estudo no impedimento da secreção de factores de crescimento por parte das linhas celulares de cancro de bexiga. Este trabalho servirá de plataforma para que num futuro próximo se desenhem experiências *in vivo*, e se teste o potencial terapêutico destes fármacos para o tratamento do cancro de bexiga, através de xenógrafos em modelos animais.

REF 29 - Targeting liver dysfunction: From bench to bedside

Orientadores: Prof Dora Brites (dbrites@ff.ul.pt) e Rui Silva
(rfmsilva@ff.ul.pt)

Local: iMed.UL, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

REF 30 - Whole genome comparison of the evolution rates of proteins in *Saccharomyces* - finding the genetic basis for phenotypic differences

Speciation is one of the least understood major features of evolution because of the number and complexity of the mechanisms that might lead to the evolution of distinct species. In spite of the extensive use of *Saccharomyces* yeasts as model organisms, and the fact that five species have had their genome completely sequenced, relatively little is known about their natural history. Recently an unprecedented diversity of *Saccharomyces sensu stricto* species associated with oak trees was found in Portugal. Among these, a European population of *S. kudriavzevii*, a species thus far thought to be endemic of Japan, was identified. Interestingly, at all the localities where this species was found, it co-existed with either *S. cerevisiae* or *S. paradoxus*. *Saccharomyces kudriavzevii*, like *S. uvarum* exhibited a strong preference for lower growth temperatures when compared with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. We hypothesize that temperature adaptation played a crucial role in the phenotypic evolution of sympatric *Saccharomyces sensu stricto* species, but other factors can be involved. To further investigate these issues, we devised a genomic approach aiming at identifying genes likely to be involved in phenotypic evolution via disruptive selection and character displacement. The ratios of nonsynonymous versus synonymous nucleotide substitutions (Ka/Ks) were used to perform genome-level pairwise comparisons of genetic differences. We found that while most genes appear to evolve at a comparable pace in all species, some exhibit striking differences between the different genomes studied. These differences can be perceived in plots of the Ka/Ks ratios against *S. cerevisiae* for the complete sets of orthologous gene ORFs and tested against the general trend. The significance of the differences detected in the rate of evolution can be assessed through the analysis of their annotation. This will involve large scale analysis of the related Gene Ontology classes and eventually the refinement of the current ORF annotation (Domain and Family characterization, synteny analysis, etc.). When present, paralogous genes/ORFs will be studied as well. Previous results identified glycolytic genes as a functional group exhibiting considerable differences in evolution rate when the various *sensu stricto* species are compared to *S. cerevisiae*. A possible relation between this observation and the kinetic profiles of the enzymes is currently being investigated.

Sampaio and Gonçalves. 2008. Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. AEM 74: 2144-2152.
Hong *et al.* 2008. Gene Ontology annotations at SGD: new data sources and annotation methods. Nucleic Acids Res. 2008 36:D577-D581.

Supervisors:

Almeida, J. M. F., Gonçalves P. M.

Work plan:

The work will involve the following stages:

- 1 Collection of the accession codes for the relevant ORFs (based on results from previous work)
- 2 Build a database with the relevant data (ORF sequences and existing annotation) to assist the subsequent analysis and accommodate its results
- 3 Supplement and refine the existing annotation for every ORF
- 4 Compute the evolution dynamics for each ORF in the context of *Saccharomyces sensu stricto*
- 5 Compare evolution dynamics against known phenotypic differences
- 6 Characterise the kinetics of a selected set of glycolytic enzymes in two *Saccharomyces* species at different temperatures.

Location:

Any place with a computer connected to the Internet and a WWW browser. Kinetic assays will be carried out at CREM premises.

REF 31 - Desenvolvimento de modelos in vitro de células humanas de cérebro para avaliação de vectores para terapia génica

Orientadores: Doutora Paula Marques Alves, Doutora Catarina Brito

Local: Laboratório de Tecnologia de Células Animais, ITQB-UNL/IBET

Duração da componente experimental: 1 ano

Enquadramento

A prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, estão ainda longe de se tornarem realidade. Embora as estratégias farmacológicas convencionais se tenham revelado pouco eficazes, resultados preliminares indicam que a terapia génica poderá ter grande potencial. Os vectores adenovirais baseados no serotipo canino 2 (CAV-2) transduzem preferencialmente neurónios e a sua expressão a longo prazo conduz a um eficiente transporte do material genético especificamente para neurónios. O projecto europeu BainCAV, no qual este estágio está integrado, propõe-se a utilizar o potencial de vectores CAV-2 para melhor compreender, e possivelmente tratar, a doença de Parkinson. A aplicação da terapia genica está dependente da resolução de uma série de questões ainda em aberto -em particular, a necessidade de avaliar a sua exequibilidade, eficácia e segurança. Conhecer as perturbações provocada na biologia da célula-alvo (ou seja, os mecanismos de infecção, a interacção com o vector, as alterações a nível transcricional) é indispensável para prever possíveis efeitos adversos. Tendo em vista a potencial aplicação dos vectores CAV-2 em ensaios clínicos, será necessário, numa primeira fase do projecto, avaliar estes efeitos em células do cérebro. Dada a complexidade do sistema nervoso central, nomeadamente a importância da interacção neurónio-astrócito, é difícil encontrar modelos celulares adequados. Adicionalmente, a utilização *in vitro* de células de origem humana, cujo comportamento será mais facilmente extrapolado para a situação *in vitro*, é limitada. Alternativas possíveis passam pela utilização de neurónios e células da glia diferenciadas a partir de células estaminais de origem humana. Por outro lado, há abordagens inovadoras, como os sistemas de cultura tridimensionais (3D), que se aproximam mais das condições *in vivo*, por exemplo em termos de interacção célula-célula e célula-matrix extracelular, que as culturas clássicas em monocamada.

Objectivos e Metodologias

Neste projecto, o principal objectivo será o desenvolvimento de um sistema celular modelo tridimensional (3D) de cérebro. Serão utilizadas células estaminais neuronais humanas (hNSCs), com capacidade de diferenciarem nas linhagens do sistema nervoso central, incluindo neurónios e células da glia (Storch *et. al.* 2001; Wegner *et. al.*, 2008). Fazendo uso da experiência do nosso grupo em tecnologia de bioreactores, no desenvolvimento de sistemas de cultura tridimensionais (3D) e na cultura de células estaminais (Santos *et. al.*, 2007; Serra *et. al.*, 2007, 2009), as células serão cultivadas em agregados (neurosferas) em tanques agitados. Serão optimizadas diversas variáveis que poderão afectar a diferenciação e a funcionalidade das células neuronais (formulação do meio de cultura, osmolaridade, pH, O₂, tensão de corte) e avaliadas novas abordagens para cultura 3D, nomeadamente modos de operação de cultura em perfusão. A performance metabólica da cultura será monitorizada pela determinação das taxas de consumo de glucose e glutamina e produção de lactato e amónia, bem como consumo de O₂. A caracterização das neurosferas em termos de composição celular implicará a utilização de metodologias como: microscopia de imunofluorescência, citometria de fluxo, Western Blot e RTPCR quantitativo. Numa fase final, o modelo celular 3D será transduzido com vectores CAV-2 codificando a proteína repórter GFP. Santos SS, Leite SB, Sonnewald U, Carrondo MJ and Alves PM (2007). Stirred vessel cultures of rat brain cells aggregates: characterization of major metabolic pathways and cell population dynamics. *J Neurosci Res* 85, 3386-3397. Serra M, Leite SB, Brito C, Costa J, Carrondo MJ and Alves PM (2007). Novel culture strategy for human stem cell proliferation and neuronal differentiation. *J Neurosci Res* 85, 3557-3566. Serra M, Brito C, Leite SB, Gorjup E, von Briesen H, Carrondo MJ and Alves PM (2009). Stirred bioreactors for the expansion of adult pancreatic stem cells. *Ann Anat* 191, 104-115. Storch A, Paul G, Csete M, Boehm BO, Carvey PM, Kupsch A, Schwarz J (2001). Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol*. 170, 317-25. Wegner F, Kraft R, Busse K, Härtig W, Schaarschmidt G, Schwarz SC, Schwarz J and Hevers W (2008). Functional and molecular analysis of GABA receptors in human midbrain-derived neural progenitor cells. *J Neurochem*. 107, 1056-69.

REF 32 - Linhas celulares para a produção de vectores retrovirais para terapia génica

Orientador: Doutora Ana Sofia Coroadinha (avalente@itqb.unl.pt)

Local: Laboratório de Tecnologia de Células Animais -ITQB/IBET (Av. da República (EAN), 2781-901 Oeiras). Web: [//tca.itqb.unl.pt](http://tca.itqb.unl.pt)

Resumo:

A terapia génica, o tratamento ou prevenção de doenças por transferência de genes, é considerada por muitos como uma revolução na medicina actual. Após 20 anos de investigação, a Terapia Génica começa a aparecer como uma realidade comercial. Em Março de 2009 a prescrição de Cerepro da Ark Therapeutics em certos pacientes foi autorizada em França. Após conclusão dos ensaios clínicos espera-se pela aprovação da entidade regulatória europeia EMEA. Cerepro é uma droga utilizada para o tratamento de tumores cerebrais operáveis, e basea-se na transferência de um gene suicida através de um vector adenoviral prevenindo o crescimento de células cancerosas após a remoção do tumor. O uso da terapia génica no tratamento de doenças começou a ganhar credibilidade em 1990 quando se realizou o primeiro ensaio clínico, usando retrovírus para o tratamento de SCID, uma imunodeficiência de origem hereditária. Após alguns reveses os avanços da tecnologia permitiram desenvolver ferramentas mais seguras e eficientes e recentemente foi demonstrado o sucesso no tratamento de SCID em 8 de 10 pacientes. A terapia génica começa assim a confirmar o seu potencial.

A transferência de material genético nas células do paciente pode ser realizada utilizando diferentes métodos sendo que, os vectores virais apresentam geralmente uma elevada eficiência. Os vectores recombinantes derivados de retrovírus foram juntamente com os adenovirus dos primeiros vectores virais utilizados em terapia génica. Desde então, os retrovirus recombinantes têm sido extensivamente utilizados em centenas de ensaios clínicos no tratamento de cancro, doenças infecciosas, e doenças hereditárias monogénicas. A produção destes vectores apresenta no entanto várias dificuldades que se devem às baixas produtividades celulares e inerente instabilidade do vector. Por outro lado os protocolos para terapia génica requerem a administração de elevadas quantidades de preparações virais. Deste modo, torna-se indispensável o melhoramento dos processos de manufacturação dos vectores retrovirais para que a implementação destes nas aplicações clínicas de terapia génica seja bem sucedida assim como, economicamente viáveis. De modo a estabelecer uma plataforma de manufacturação de retrovírus para utilização em diversas terapias foi desenvolvida uma linha celular humana produtoras destes vírus no nosso laboratório denominada 293FLEX [1, 2]. Estas apresentam a vantagem de possuírem um sistema de recombinação que permite a rápida e eficiente troca do gene terapêutico. Este estágio de mestrado insere-se num projecto que visa a criação de novas linhas celulares produtoras dando continuidade ao desenvolvimento e melhoramento das 293FLEX. Para a produção de retrovírus é necessária a expressão balanceada de 3 componentes virais nas linhas celulares, gene terapêutico, gag-pol e envelope, tendo este último grande influencia na estabilidade e tropismo dos vectores. As 293FLEX previamente estabelecidas expressam o envelope GaLV (Gibbon Ape Leukaemia Virus), muito eficiente na transdução de células hematopoéticas, o objectivo deste trabalho será criar novas linha celulares com diferentes envelopes, nomeadamente com 10A1 e RD114 o que permitem expandir o tipo de células alvo que o vector é capaz de transduzir. A possibilidade de utilizar um segundo sistema de recombinação de troca de cassette (Cre/Lox) para inserir o envelope na linha produtora será testada de modo a

1

estabelecer uma linha celular ainda mais flexível que servirá de plataforma para a produção de retrovírus a usar na terapia de diversas doenças. As novas linhas celulares serão caracterizadas assim como os vectores virais por estas produzidos.

Metodologias: Cultura de células animais, manipulação de vectores retrovirais, real-time RTPCR, citometria de fluxo, biologia molecular, analíticos vários.

1. Coroadinha, A.S.; Schucht, R.; Gama-Norton, L; Wirth, D.; Hauser, H. and Carrondo, M.J.T. (2006) *The use of recombinase Cassette Exchange in retroviral Vector Producer Cell Lines: predictability and efficiency in transgene replacement*. J.Biotechnol., 124:1125-35

2. Carrondo, M.J.T.; Merten, O.-W.; Haury, M.; Alves, P.M. and Coroadinha, A.S. (2008) *Impact of retroviral vector components Stoichiometry on packaging cell lines: effects on productivity and vector quality*. Hum. Gene Ther., 19(2):199-210

Plano detalhado:

Fase I -Aprendizagem das técnicas de manipulação de células animais: trabalho em esterilidade, propagação de células, contagem de células, congelamento e descongelamento de células. Leitura bibliográfica sobre o trabalho.

Fase II -Aprendizagem das técnicas específicas à manipulação de vectores retrovirais: cultura de células produtoras de retrovirus em *t-flask* (cultura em monocamada), quantificação de partículas retrovirais totais e infecciosas. Caracterização do crescimento celular e produtividade viral. Estudos de estabilidade dos retrovirus produzidos. Análise do metabolismo energético primário das células pelo consumo de glucose e glutamina e produção dos respectivos metabolitos.

Fase III: Aprendizagem das técnicas específicas de biologia molecular e construção de plasmídeos com diferentes envelopes, nomeadamente 10A1 e RD114. Desenvolvimento de plasmídeos com o sistema de troca de cassette. Transfecção de células 293 que já contêm gag-pol e transgene com os plasmídeos contendo os diferentes envelopes.

Fase VI – Caracterização e comparação de várias linhas celulares produtoras: taxas específicas de crescimento, produtividade viral, estabilidade viral e eficiência de transdução de diferentes linhas celulares alvo.

Fase V – Elaboração da Tese de Mestrado.

Duração do estágio: 1 ano a tempo inteiro.

Planeamento das Fases de Estágio

	Mês											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fase I												
Fase II												
Fase III												
Fase IV												
Fase V												

Número de estagiários: 1*

*A admissão do Mestrando para o estágio está sujeita a entrevista prévia para escolha do mesmo.

REF 33 - Produção de vectores virais para terapia génica usando células derivadas de amniócitos humanos

Orientadores: Doutora Paula Marques Alves, Doutor Pedro Cruz

Local: Laboratório de Tecnologia de Células Animais, ITQB-UNL/IBET

Duração da componente experimental: 1 ano

Enquadramento e Objectivo

A investigação na área da terapia génica tem vindo a crescer exponencialmente nos últimos anos, e espera-se que num futuro próximo, este tipo de terapia seja a forma de tratamento de várias doenças, tais como o cancro, doenças infecciosas e neurodegenerativas. Os vectores virais, que são o veículo mais eficiente para a inserção de genes terapêuticos em células humanas, são produzidos em células de mamífero. Para os vários tipos de vectores virais há 3 estratégias possíveis para a sua produção: (i) infecção viral, (ii) transfecção com plasmídeos codificando para componentes virais específicos ou (iii) através de linhas celulares estáveis expressando os componentes virais necessários^(R). A maioria dos vírus para terapia génica são produzidos nas linhas celulares humanas 293 and PER.C6^(R). No entanto, a propensão das células 293 para produção de vírus com capacidade replicativa e os custos associados à utilização da linha celular PER.C6^(R), tornam essencial o desenvolvimento de novas linhas celulares.

Neste projecto, o principal objectivo é avaliar o potencial de uma nova linha celular derivada de amniócitos humanos, denominada CAP, para ser usada como alternativa às linhas celulares actualmente usadas na produção de vectores virais. A relevância deste trabalho resulta também da necessidade crescente de flexibilidade na produção industrial de biofármacos. Em concreto, a possibilidade de utilizar as mesmas células em vários processos de produção é importante para as empresas em duas perspectivas: (1) redução dos custos de desenvolvimento e validação e (2) redução do tempo de lançamento de novos produtos.

Metodologia

A robustez e flexibilidade da nova linha celular serão avaliadas na produção de dois tipos de vírus: AV e LV. Para obter um processo de produção seguro e de fácil aumento de escala, os melhores clones das células CAP serão adaptados a crescer em suspensão e em meio sem componentes de origem animal. Posteriormente, parâmetros críticos que influenciam a produção e a qualidade das partículas virais serão optimizados para cada tipo de vírus. Variáveis do bioprocessos, tais como a multiplicidade de infecção (MOI, razão entre o número de vírus por célula no momento da infecção), o tempo de cultura óptimo para a infecção (TOI), a concentração de células no momento da infecção (CCI), a concentração de plasmídeos e o método de transfecção serão optimizados. O screening para identificar os parâmetros óptimos que maximizam a produtividade será efectuado em erlenmeyers. A performance da nova linha celular será comparada com a linha celular 293, que tem sido usada no nosso laboratório para a produção dos dois tipos de vectores virais (Coroadinha et al., 2006; Ferreira et al. 2007). A quantidade de vírus infecciosos e vírus totais será determinada por citometria de fluxo e PCR quantitativo. O processo será posteriormente transferido para mini-biorreactores, onde para além de ser possível controlar de forma rigorosa parâmetros físicos como o pH, o oxigénio e a temperatura, há também a possibilidade de desenhar estratégias de alimentação de acordo com as taxas de consumo dos nutrientes essenciais e assim criar condições nutricionais favoráveis ao aumento da produtividade. Para estabelecer a composição e a taxa de alimentação da solução é essencial monitorizar o metabolismo celular durante a fase de crescimento e a fase de produção, determinando as taxas de consumo de glucose, amino ácidos e oxigénio e produção de lactato e amónia. No final do projecto, teremos estabelecido um processo alternativo, flexível, mais seguro e idealmente com productividades e razões partículas infecciosas partículas totais superiores às obtidas nos processos actualmente usados para a produção de vectores virais.

Coroadinha, A.S., et al., *Effect of osmotic pressure on the production of retroviral vectors: Enhancement in vector stability*. Biotechnol Bioeng, 2006. **94**(2): p. 322-9. Ferreira, T.B., M.J. Carrondo, and P.M. Alves, *Effect of ammonia production on intracellular pH: Consequent effect on adenovirus vector production*. J Biotechnol, 2007. **129**(3): p. 433-8.

REF 34 - Desenvolvimento de um método para screening de clones celulares hiper-produtores de anticorpos monoclonais usando fluorimetria bidimensional (2D)

Orientadores: Doutora Paula Marques Alves, Doutora Ana Teixeira

Local: Laboratório de Tecnologia de Células Animais, ITQB-UNL/IBET

Duração da componente experimental: 1 ano

Enquadramento e objectivo

Um crescente número de proteínas terapêuticas atinge a fase de testes clínicos, sendo a maior parte produzidas em células de mamífero devido à capacidade deste sistema biológico para efectuar correctamente modificações pós-traducionais [1]. Uma grande dificuldade no desenvolvimento de processos de células de mamífero é o processo de selecção de clones para identificar os que expressam a proteína recombinante de um modo estável e em grandes quantidades. Este passo é indispensável uma vez que a expressão do gene recombinante depende do sítio de integração no cromossoma e do número de cópias que foi integrado após transfecção [2]. Os métodos tradicionais para selecção de clones hiper-produtores são muito morosos limitando o número de clones que podem ser avaliados [2]. O mercado do produtos biofarmacêuticos derivados de células de mamífero está em crescente expansão, sendo portanto urgente desenvolver métodos de selecção mais eficientes. Neste projecto, pretende-se investigar a aplicação de fluorimetria bidimensional (2D) no processo de screening de clones com propriedades interessantes. Fluorimetria 2D é uma técnica com potencial para esta aplicação uma vez que muitos dos componentes biológicos exibem propriedades de fluorescência, incluindo amino ácidos, enzimas, cofactores e vitaminas. Um varrimento da cultura com esta técnica permite obter um mapa de fluorescência que contém informação de muitos fluoróforos, directa ou indirectamente reflectindo alterações nas concentrações de células, do produto e de compostos intra e extracelulares. A técnica tem sido muito usada para monitorização de culturas de microorganismos [3] e o nosso trabalho provou a sua capacidade para monitorizar células viáveis e proteína recombinante em culturas de células *Baby Hamster Kidney* (BHK) [4].

Metodologias

Para este trabalho, a companhia biofarmacêutica Lonza disponibilizou três clones de células *Chinese Hamster Ovary* (CHO) a expressar um anticorpo monoclonal (IgG4): um fraco, um médio e um elevado productivo. As fases de screening iniciais são preferencialmente desenvolvidas em sistemas de cultura de pequena escala, tais como placas de 96 poços. Assim, este sistema será usado para a cultura dos três clones e mapas de fluorescência de cada poço serão recolhidos e comparados para identificar as regiões do mapa que melhor se correlacionam com os diferentes níveis de expressão. Um plano experimental cuidadosamente desenhado será conduzido para gerar mapas de fluorescência e dados de concentrações de células e anticorpo numa vasta gama de concentrações para melhor simular um processo de screening. Depois de recolhido um grupo de dados representativo, métodos quimiométricos (tais como, regressão *partial least squares* (PLS)) serão usados para estabelecer correlações entre os dados de fluorescência e as concentrações de células e anticorpo (variáveis essenciais para a selecção dos clones com as taxas de produção específicas mais altas). Uma vez desenvolvido um modelo com elevada capacidade preditiva, a avaliação dos restantes clones é obtida recolhendo o mapa de fluorescência e alimentando essa informação ao modelo calcula a concentração de células e produto correspondentes. Por este motivo, a metodologia que propomos desenvolver possibilitará analisar em pequena escala, simultaneamente, um elevado número de clones não envolvendo passos preparativos de amostras. No final deste projecto teremos desenvolvido uma metodologia simples e de baixo custo para selecção de clones hiper-produtores com vantagens também em termos de tempo e número de clones que podem ser avaliados em relação aos métodos tradicionais morosos e trabalhosos. Assim, o sucesso deste trabalho terá elevado impacto na indústria farmacêutica.

Referências Bibliográficas

- 1 Walsh G: Biopharmaceutical benchmarks 2006. *Nature Biotech* 2006, 24(7):769-776.
- 2 Browne SM, Al-Rubeai M: Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol* 2007, 25(9):425-432.
- 3 Wolf G, Almeida JS, Crespo JG, Reis MA: An improved method for two-dimensional fluorescence monitoring of complex bioreactors. *J Biotechnol* 2007, 128(4):801-812.
- 4 Teixeira AP, Portugal CA, Carinhas N, Dias JM, Crespo JP, Alves PM, Carrondo MJ, Oliveira R: In situ 2D fluorometry and chemometric monitoring of mammalian cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 2009, 102(4):1098-1106.

REF 35 - Caracterização Fenotípica e Molecular de estirpes patogénicas de *Haemophilus influenzae*, isoladas de infecções respiratórias, em Portugal. Avaliação dos serótipos e dos mecanismos de resistência aos antibióticos no período pós vacinal.

ORIENTADOR: *Maria Paula Ramalho Bajanca Lavado*

Investigadora auxiliar do Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde, Lisboa

Responsável pelo Laboratório Nacional de Referência de Infecções Respiratórias a agentes bacterianos

Introdução ao tema do projecto de estágio:

O *Haemophilus influenzae* e a vacina: O *Haemophilus influenzae* (*Hi*) é um microrganismo Gram negativo cujo nicho ecológico é o tracto respiratório humano. Para além de colonizarem a nasofarínge de pessoas saudáveis, o *Hi* é normalmente responsável por infecções respiratórias como bronquite, pneumonia sinusite, conjuntivite, otite média aguda, e ainda infecções invasivas graves como a meningite e septicemia, principalmente nas crianças. As estirpes capsuladas, nomeadamente as de serótipo b (*Hib*) estão envolvidas na maior parte destas infecções, com graves repercussões em Saúde Pública. O desenvolvimento de uma vacina para o *Hib* e a sua introdução no Plano Nacional de Vacinação (PNV) da maior parte dos países desenvolvidos, demonstrou a elevada eficácia desta vacina, levando à quase total erradicação do serótipo b. Em Portugal, a vacina é comercializada desde 1994, fazendo parte do PNV desde 2000.

De acordo com o que se tem vindo a verificar noutros países, esperam-se alterações da epidemiologia da infecção por *Hi* como, por exemplo, 1) alteração dos serótipos, nomeadamente emergência de estirpes não capsuladas (NC), principalmente nas infecções invasivas, 2) alteração da patogenicidade dos diferentes serótipos, 3) podendo vir a caracterizar-se novos serótipos em *Hi*.

O *Haemophilus influenzae* e a resistência aos antibióticos: A terapêutica com antibióticos é de grande utilidade nas infecções por *Hi*. No entanto, a sua eficácia fica comprometida com a detecção de novos mecanismos de resistência e concomitante emergência de estirpes resistentes. A produção de beta-lactamases causando inactivação enzimática dos antibióticos, em especial dos beta-lactâmicos, e a crescente detecção de estirpes de *Hi* resistentes por um mecanismo não enzimático, são preocupação crescente em Saúde Pública.

A investigação da resistência aos antibióticos em infecções por *Hi*, nas várias regiões de Portugal, constitui uma área importante, pois urge conhecer os mecanismos envolvidos na resistência quer enzimática quer não enzimática deste patogénico, considerando: (1) a gravidade do problema por falências terapêuticas, (2) a ausência de estudos no país sobre as bases bioquímicas e moleculares da resistência, (3) e a expansão crescente destes mecanismos em todo o mundo.

Objectivos

- O principal objectivo deste projecto é o de avaliar os serótipos circulantes de estirpes de *Hi* responsáveis por infecções respiratórias, no período após a introdução da vacina no PNV.

Nomeadamente pretende-se analisar as possíveis alterações que surgem sempre que começa a ser utilizada uma determinada vacina, como sejam, por exemplo, a substituição do serótipo b pelos outros serótipos existentes (a, c, d, e ou f) e por estirpes não capsuladas (NC); um aumento de virulência das estirpes não-b e ainda das NC;

- Pretende-se, ainda, contribuir para um melhor esclarecimento da epidemiologia da infecção a *Hi* em Portugal;
- E demonstrar a importância do *Hi* NC em infecções como a otite média e a pneumonia, principalmente nas crianças, sugerindo a necessidade de desenvolver uma vacina contra estas estirpes.
- Estudar a susceptibilidade aos antibióticos dos isolados clínicos de *Hi*, de modo a formular terapias empíricas eficazes e adequadas à realidade do nosso país.

PLANO DE TRABALHO:

Ponto 1: Recolha de estirpes de *Hi* e confirmação da identificação

Pretende-se estudar uma amostragem de estirpes isoladas de infecção respiratória, nos anos de 2008 e 2009. As estirpes a estudar inserem-se num programa de Vigilância da Infecção a *Haemophilus influenzae* e serão colectadas pelos Laboratórios de diversas Unidades de Saúde Hospitalares, em diversas áreas geográficas de Portugal. Estes Laboratórios Hospitalares já colaboram connosco no envio das estirpes aí isoladas.

Ponto 2: Caracterização fenotípica

A caracterização fenotípica compreende duas etapas: uma relativa à e caracterização do serótipo capsular e outra à determinação da resistência aos antibióticos: Assim,

1) A determinação do serótipo será realizada para todas as estirpes utilizando a técnica de PCR, com um primer específico para a detecção de cápsula. Nas estirpes capsuladas, o tipo capsular será caracterizado por aglutinação, com antisoros específicos para cada um dos seis tipos de cápsula e confirmado por PCR, utilizando “*primers*” específicos para cada um dos genes *cap*. Pretende-se, ainda utilizar uma técnica de PCR multiplex que detecte simultaneamente as estirpes capsuladas e não capsuladas, para além das estirpes serótipo b, podendo discriminar-se entre o serótipo b e o b- (estirpes que entretanto perderam a cápsula mas que têm a mesma virulência das Hib).

2) A susceptibilidade aos antibióticos, será realizada determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM mg/L) para cada antibiótico estudado (método de microdiluição em meio líquido, de acordo com o preconizado pelo CLSI): ampicilina, associação amoxicilina/ácido clavulânico,

cefaclor, cefuroxima, cefotaxima, cefepime, meropenem, cloranfenicol, tetraciclina, ciprofloxacina, rifampicina, sulfametoxazol e azitromicina.

Ponto 3) Epidemiologia molecular e caracterização genotípica

A caracterização genotípica será realizada pela técnica de Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), o que permitirá avaliar as possíveis relações de clonalidade existentes entre as estirpes, assim como a disseminação de determinados clones.

Ponto 4) Análise de resultados e preparação de dissertação

Após a análise dos resultados a aluna de mestrado elaborará uma dissertação conducente à obtenção do grau de Mestre.

REF 36 - Plasticidade da resistência às fluoroquinolonas mediada por plasmídeos em bactérias de Gram negativo

- a) Identificação do orientador: **Manuela Caniça**
Identificação do co-orientador: **Eugénia Ferreira**
- b) Local de realização:
Laboratório de Resistência aos Antimicrobianos, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.
- c) Plano de trabalho / objectivos:

A emergência de novos mecanismos de resistência em antibióticos usados com frequência em medicina constitui uma ameaça não negligenciável.

O presente trabalho permitirá: 1) explorar a dimensão da presença simultânea da resistência plasmídica às fluoroquinolonas (RPF) com outros elementos genéticos móveis – tais como transposões, integrões, sequências de inserção, nomeadamente ISCR (insertion sequence common region); 2) compreender a contribuição da mobilidade genética para a emergência e evolução temporal da resistência às fluoroquinolonas e da multirresistência entre as bactérias de Gram-negativo; 3) prever a possibilidade de emergência de um novo mecanismo de RPF (determinantes Qep-tipo) em bactérias patogénicas; 4) compreender se a selecção de genes de resistência aos antibióticos e a sua transferência são particularmente relevantes através da exploração do contexto genético dos genes implicados na RPF.

Para atingir os objectivos propostos, serão usados métodos fenotípicos e, predominantemente, métodos genotípicos.

As tarefas complementares deste trabalho permitirão prever os intervenientes na rápida disseminação dos mecanismos de resistência às fluoroquinolonas que têm surgido recentemente entre bactérias de Gram-negativo, o que será de extrema importância para o controlo da resistência aos antibióticos.

Requisitos mínimos: média de licenciatura de 15 ou superior

REF 37 - Avaliação da relação genética e caracterização molecular de isolados multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*

a) Identificação do orientador: **Manuela Caniça e Eugénia Ferreira**

c) Local de realização:

Laboratório de Resistência aos Antimicrobianos, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

b) Plano de trabalho / objectivos:

A facilidade de *Acinetobacter baumannii* adquirir multirresistência aos antibióticos e a sua elevada capacidade de sobrevivência em superfícies ambientais levou a um aumento preocupante de infecções nosocomiais causadas por este patogénico. Propõe-se o estudo dos mecanismos de resistência aos antibióticos em *A. baumannii*, com base no fenótipo e no genótipo de isolados de diferentes origens. Serão identificadas e caracterizadas novas beta-lactamases produzidas por *A. baumannii*: os genes que codificam carbapenemases serão clonados e as propriedades bioquímicas das enzimas (K_m , k_{cat} , K_m/k_{cat}) serão determinadas. O conhecimento das regiões adjacentes dos genes que codificam carbapenemases serão analisadas por métodos de biologia molecular e permitirão compreender os mecanismos responsáveis pela propagação da resistência aos carbapenémicos. As relações filogenéticas dos isolados produtores de carbapenemases será avaliada por *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE).

A emergência da resistência de isolados produtores de carbapenemases – com o conseqüente impacto na diminuição do arsenal terapêutico – e a capacidade de transferência dos determinantes de resistência envolvidos a outros agentes patogénicos, demonstra a urgência de uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência de *A. baumannii*.

Requisitos mínimos: média de licenciatura de 15 ou superior

REF 38 - Identificação e caracterização de beta-lactamases AmpC mediadas por plasmídeos em isolados clínicos de Gram negativo

a) Identificação do orientador: **Manuela Caniça**
Identificação do co-orientador: **Eugénia Ferreira**

d) Local de realização:
Laboratório de Resistência aos Antimicrobianos, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

c) Plano de trabalho / objectivos:

As infecções causadas por bactérias patogénicas de Gram negativo produtoras de beta-lactamases AmpC mediadas por plasmídeos têm aumentado em todo o mundo. A identificação de isolados produtores de AmpC plasmídicas tem significado epidemiológico e clínico relevante, pois estas enzimas podem disseminar-se muito eficazmente em ambiente hospitalar, sugerindo medidas de controle de infecção importantes.

O presente estudo propõe a pesquisa e caracterização de genes responsáveis pela expressão de beta-lactamases da família AmpC mediadas por plasmídeos, utilizando métodos moleculares, os quais complementarão métodos fenotípicos, nomeadamente em patogénicos que expressem enzima AmpC cromossómica. A classificação daqueles genes com base na sua relação genética permitirá avaliar sobre a origem deste mecanismo de resistência, de acordo com a subclasse. Eventuais novas enzimas serão caracterizadas do ponto de vista bioquímico (determinação de K_m , k_{cat} , K_m/k_{cat}). Os métodos a utilizar neste estudo permitirão detectar e identificar com maior precisão este mecanismo de resistência cada vez mais complexo, resultando no aperfeiçoamento dos estudos de vigilância, controle de infecção, e opções terapêuticas disponíveis.

Requisitos mínimos: média de licenciatura de 15 ou superior

.

REF 39 - Caracterização de nanossondas de ouro funcionalizadas com RNA

Candidato:

Orientador Científico: Doutora Margarida Moreira dos Santos

Local de Realização: Centro de Investigação em Genética Molecular Humana,
Departamento de Ciências da Vida, FCT/UNL

OBJECTIVO

Optimizar a funcionalização de nanossondas de ouro com RNA e caracterizar o sistema
Especificamente pretende-se:

- A. Optimizar o protocolo de funcionalização de nanossondas de ouro com RNA através do grupo amina
- B. Caracterizar as nanossondas quanto ao número de oligos à superfície e à capacidade para hibridar com DNA complementar
- C. Comparação das nanossondas funcionalizadas com RNA com sondas preparadas em tudo da mesma forma, excepto pela substituição do RNA por DNA

DESCRIÇÃO do PROJECTO

Seguir-se-á a seguinte estratégia:

1. Funcionalização de nanopartículas coloidais com oligonucleotídeos de RNA aminados específicos; elaboração de um protocolo para este tipo de funcionalização
2. Caracterização das sondas sintetizadas; serão feitos ensaios de estabilidade em função da força iónica, pH, temperatura, e estudos da estabilização das nanossondas com DNA/RNA complementar (oligos de síntese e posteriormente produtos PCR, amostras biológicas)
3. Determinação da eficiência de funcionalização (número de oligos à superfície da partícula); a interacção RNA-partícula será desligada quimicamente, as partículas serão separadas por centrifugação e o RNA quantificado (método do Oligreen, fluorescência, espectroscopia UV/Vis, qRT-PCR)
4. Determinação da capacidade de hibridação das nanossondas com DNA/RNA complementar (oligos de síntese); as nanossondas serão hibridadas com um oligo de DNA complementar na presença de um oligo complementar a esse e marcado com uma fluoresceína; o excesso de oligos será removido por centrifugação e após desnaturação e remoção das nanopartículas, a quantidade de oligo que hibridou será quantificada por emissão de fluorescência; utilização de amostras biológicas (RNA purificado, DNA genómico com e sem tratamento por ultra-sons, produtos de PCR) em reacções de hibridação
5. Sondas em que o RNA é substituído por DNA da mesma sequência serão sintetizadas com o mesmo protocolo e caracterizadas de acordo com os pontos 2 a 4

O Projecto de Investigação será orientado pela Doutora Margarida Moreira dos Santos (margarida.santos@fct.unl.pt), Investigadora Auxiliar do Departamento das Ciências Vivas da Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa

REF 40 - Avaliação da capacidade de reparação de quebras de dupla cadeia de DNA em linhas celulares resistentes ao fármaco Imatinib e em doentes com leucemia mielóide crónica.

Entidade Proponente: Centro de Investigação em genética Molecular Humana (CIGMH)
Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, UNL

Local de trabalho: Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas
Rua da Junqueira, 96
Lisboa.

Duração: 9-12 meses

Nº de alunos neste projecto: 1

Orientadores: Eng^a Joana Dinis
Prof. Doutor António Sebastião Rodrigues

Introdução

A leucemia mielóide crónica (CML) é caracterizada pela presença do gene de fusão, BCR-ABL, com uma actividade de tirosina cinase constitutiva. A terapêutica de eleição é o fármaco Imatinib (IM), um inibidor específico desta tirosina cinase. Vários estudos indicaram que a expressão do BCR-ABL aumenta a geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS), podendo estas ser responsáveis por uma instabilidade cromosómica e acumulação de mutações, incluindo quebras de cadeia dupla no DNA, que levarão eventualmente à resistência à terapêutica como à progressão da doença, chegando à crise blástica (1,2,3). Por outro lado foi também observado que o tratamento de células de CML podem modificar a reparação de quebras de dupla cadeia.

No âmbito de um projecto financiado pela FCT, desenvolvemos linhas celulares leucémicas K562, usadas como um modelo para a CML *in vitro*, resistentes ao fármaco IM. Estas linhas celulares apresentam uma resistência à indução de lesões e de apoptose por agentes genotóxicos clássicos. Um mecanismo de resistência já identificado pelo nosso laboratório nestas linhas é a sobre expressão do transportador ABCB1, que no entanto regride na linha resistente a doses mais elevadas de IM. Já identificámos pelo ensaio de genotoxicidade Comet um nº de lesões inferior em linhas resistentes quando comparadas com linhas não resistentes, o que pode indiciar a aquisição de uma melhor eficiência de reparação. O objectivo seguinte será identificar as vias de reparação com eficiência aumentada, focando em particular na reparação de quebras de cadeia dupla, ou por Non Homologous end-joining (NHEJ) ou por Homologous recombination (HR).

Objectivos

Iremos medir a indução de translocações por genotóxicos clássicos nas diversas linhas por FISH, para avaliar o envolvimento da HR na reparação. A expressão da proteína de reparação RAD51 nas diversas linhas será avaliada por RT-PCR e western blot, enquanto que outras proteínas importantes na HR e NHEJ também serão avaliadas por western blot. Para avaliar os checkpoints celulares de paragem celular, iremos utilizar citometria de fluxo. A cinética da fosforilação da histona H2AX como sinal de quebra de dupla cadeia e sinalização de reparação será seguida após exposição a genotóxicos (4). Em casos que o determinam usaremos RNAi para efectuar o silenciamento de genes específicos, para avaliar o efeito na resistência ao IM e à apoptose.

Finalmente o objectivo será avaliar a capacidade de reparação em doentes com CML, resistentes ao IM, em comparação com doentes que respondem ao tratamento.

(1) Dierov, J. et al., *Leukemia*, 23: 279-286 (2008).

(2) Sallmyr, A., et al., *Cancer Lett.*, 270: 1-9 (2008).

(3) Sallmyr, A., *Blood*, 112:1413-1423 (2008).

(4) Bonner, W. M., *Nat Rev Cancer.*, 8: 957-67 (2008).

REF 41 - Avaliação da SURVIVINA como bioindicador de resistência ao fármaco Imatinib em leucemia mielóide crónica.

Entidade Proponente: Centro de Investigação em Genética Molecular Humana (CIGMH)
Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas, UNL

Local de trabalho: Departamento de Genética, Faculdade de Ciências Médicas
Rua da Junqueira, 96
Lisboa.

Duração: 9-12 meses

Nº de alunos neste projecto: 1

Orientadores: Eng^a Célia Martins
Prof. Doutor António Sebastião Rodrigues

Introdução

A SURVIVINA é o membro mais pequeno da família dos Inibidores de Apoptose (IAP), e apresenta actividade antiapoptótica, além de ser regulador da divisão celular e da angiogénese (1,2,3). Esta proteína apresenta uma expressão elevada durante a mitose, com uma localização celular nos componentes do aparelho mitótico. A sua localização celular e expressão indica que tem um papel importante na divisão celular. Alguns estudos indicam que a SURVIVINA regula a proliferação celular promovendo a segregação correcta das cromátides irmãs e a sua estabilização durante a mitose, regulando desta forma a divisão celular.

Num estudo do transcriptoma humano global, comparando genes expressos em tecidos tumorais e tecidos normais, a SURVIVINA é uma das proteínas que é sobre-expressa sistematicamente em tecidos tumorais, enquanto a sua expressão é baixa em tecidos normais (4). Adicionalmente, enquanto que em tecidos normais a sua localização é predominantemente citoplasmática, em tecidos tumorais é sua localização é também nuclear. Estes dados sugerem que a SURVIVINA seja um bom biomarcador tumoral, o que tem sido confirmado principalmente para o cancro da bexiga. Vários estudos mostraram que tanto a proteína como o mRNA é detectável na urina de indivíduos com cancro da bexiga (5), e já existem dados que comprovam ser um bom marcador para outros tipos de tumor (3).

A sobre-expressão de SURVIVINA foi identificada como um factor prognóstico negativo em relação à resistência à terapêutica e sobrevivência em alguns cancros, incluindo a leucemia aguda e linfoma das células B. (6). Um estudo recente mostrou que a sobre-expressão da SURVIVINA pode desempenhar um papel na progressão da doença, em particular à progressão à crise blástica na leucemia mielóide crónica (CML).

Na leucemia mielóide crónica, a terapêutica de eleição é o Imatinib (IM), um inibidor da tirosina cinase específico para a proteína de fusão BCR-ABL, formada por translocação do gene BCR no cromosoma 9, para o gene ABL no cromosoma 22. Apesar da comprovada eficácia deste fármaco na remissão em doentes com CML, 20% de doentes são primariamente resistentes ou adquirem resistência ao IM ao longo do tratamento. As causas da resistência incluem a presença de mutações no domínio da cinase da proteína de fusão, a sobre-expressão de proteínas de transporte, da família das ATP binding cassette, e vias antiapoptóticas aumentadas.

Objectivos

O objectivo primário deste projecto é avaliar a SURVIVINA como biomarcador de resistência ao IM em leucemia mielóide crónica.

No âmbito de um projecto financiado pela FCT, desenvolvemos linhas celulares leucémicas K562, usadas como um modelo para a CML *in vitro*, resistentes ao fármaco IM. Estas linhas celulares apresentam uma resistência à indução de lesões e de apoptose por agentes genotóxicos clássicos. Um mecanismo de resistência já identificado pelo nosso laboratório nestas linhas é a sobre expressão do transportador ABCB1, que no entanto regride na linha resistente a doses mais elevadas de IM. Uma vez que identificamos uma maior resistência a apoptose, uma das hipóteses é que haja uma maior sobre-expressão de proteínas antiapoptóticas nestas linhas, em particular da SURVIVINA. O objectivo seguinte será avaliar a expressão desta proteína em amostras de doentes com CML, resistentes ao IM, em comparação com doentes que respondem ao tratamento.

Iremos utilizar a técnica de RT-PCR, imunocitoquímica e western-blot para avaliar a expressão da SURVIVINA, e para avaliar a expressão em células K562. Iremos montar técnicas de microscopia fluorescente normal e confocal para avaliar a localização intracelular desta proteína, e utilizaremos técnicas

clássicas de apoptose para avaliar mecanismos de apoptose nas linhas celulares. Usaremos RNAi para efectuar o silenciamento do gene, para avaliar o efeito na resistência ao IM e à apoptose.

- (1) Altieri, D.C., *Nature Rev. Cancer*, 8: 61-70 (2008).
- (2) Duffy, M.J., *et al.*, *Cancer Lett.*, 249: 49-60 (2007).
- (3) Altieri, D.C., *Oncogene*, 22: 8581-8589 (2003).
- (4) Velculescu, V.E., *et al.*, *Nature Genetics*, 23: 387-388 (1999).
- (5) Adida, C. *et al.*, *Br. J. Haematology*, 111: 196-203 (2000).
- (6) Song *et al.* *Molecular Biology of the Cell* 15:1287-1296 (2004).
- (7) Hernandez-Boluda JC *et al.* *Leuk Lymphoma* 2005; 46(5):717-722.