

a ser descobertas em decorrência do objetivo (2). A investigação da relação estrutura-função de ZapA será executada por meio da criação de mutantes sítio-dirigidos e posterior análise de sua funcionalidade em dois tipos de ensaios. Um dos ensaios usará fusões a GFP e microscopia de fluorescência para determinar a capacidade de localização das proteínas mutantes. O segundo ensaio determinará se os diferentes mutantes ainda são capazes de promover a formação do anel Z e suprimir o fenótipo causado pela superexpressão de um inibidor de divisão. Para determinar se expressão e atividade de ZapA são reguladas durante o ciclo celular, será usada uma abordagem citológica, novamente baseada em fusões entre ZapA e GFP. A expressão de ZapA ao longo do ciclo celular deverá corresponder à fluorescência produzida pela porção GFP da fusão GFP-ZapA e será monitorada por microscopia quantitativa. Evidências de um controle no nível da atividade da proteína serão buscadas em experimentos de colocalização de ZapA e FtsZ ao longo do ciclo celular. Para esses experimentos, ZapA e FtsZ serão fundidas a variantes espectrais de GFP e o padrão de localização das duas proteínas será determinado simultaneamente em uma mesma célula. A existência de um período do ciclo celular no qual as proteínas não se colocalizam indicará que a interação entre elas não é sempre permitida e que moduladores positivos podem ter sua atividade regulada. Para a identificação de novas proteínas moduladoras da FtsZ, propõe-se a adoção de quatro abordagens, baseadas em estratégias genéticas, bioquímicas e de duplo-híbrido independentes. As estratégias genéticas incluem uma triagem para genes supressores do bloqueio de divisão causado por um alelo FtsZ sensível à temperatura e uma triagem para mutações letais sintéticas quando em combinação com mutação em ZapA. A estratégia bioquímica consistirá em identificar proteínas que copurifiquem com polímeros de FtsZ isolados de extratos proteicos totais. Finalmente, usaremos FtsZ como “isca” em um sistema duplo-híbrido em bactérias para tentar identificar parceiras da FtsZ a partir de bibliotecas de *B. subtilis* criadas no vetor “presa”. Prevê-se que o uso de abordagens diversas e complementares permita a amostragem exaustiva desses fatores no genoma/proteoma de *B. subtilis*. Estudos moleculares semelhantes aos propostos para ZapA serão então realizados para os novos moduladores que venham a ser identificados. Além do conhecimento básico gerado, espera-se que a identificação e a caracterização de novos moduladores da FtsZ também possam criar oportunidades para o desenvolvimento de novos antibióticos.

240

Biogênese do citocromo c-oxidase e viabilidade celular

Mario Henrique de Barros
Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade de São Paulo (USP)
Processo 2002/10103-7
Vigência: 1/5/2003 a 31/7/2007

Este projeto propõe colaborar no estudo da montagem do citocromo c-oxidase (COX), bem como de alterações funcionais em produtos gênicos relacionados com a atividade mitocondrial que podem alterar a viabilidade celular. Serão utilizados *Saccharomyces cerevisiae* e *Caenorhabditis elegans* como modelos. Dentre as 6 mil ORFs do genoma de levedura, cerca de 120 codificam para possíveis proteínas mitocondriais ainda não estudadas. Pretende-se selecionar, dessas 121 ORFs, as que afetem especificamente o COX. As ORFs selecionadas terão seus produtos gênicos caracterizados por meio da determinação da sua localização intracelular, análise espectral dos citocromos mitocondriais, bem como da análise de tradução, transcrição e processamento dos genes mitocondriais. *C. elegans*, por sua vez, servirá como modelo animal para o estudo de doenças humanas relacionadas a defeitos na atividade de COX. Pretende-se aqui desenvolver um sistema de mutagênese e busca de mutantes que permita a rápida identificação de mutantes de COX em *C. elegans*. Dos mutantes isolados, serão observados seus efeitos no estresse oxidativo, viabilidade da célula e metabolismo do DNA mitocondrial, considerando-se também o nível de heteroplasmia, assim como características mais gerais do desenvolvimento do verme que não poderiam ser observadas em organismos unicelulares como levedura.

241

Evolução morfológica, biogeografia e sistemática em mamíferos neotropicais

Gabriel Henrique Marroig Zambonato
Instituto de Biociências
Universidade de São Paulo (USP)
Processo 2002/05804-6
Vigência: 1/12/2002 a 31/5/2005

A evolução de morfologias complexas (como o crânio dos mamíferos, por exemplo) assim como a diversificação (especiação) na América do Sul são temas centrais, interrelacionados e ao mesmo tempo mal compreendidos na biologia evolutiva. O estudo da variação, seja ela fenotípica ou genética, dentro e entre populações e espécies, é crucial para a forma como se dividiu e ordenou (sistemática) a diversidade da vida, assim como para o entendimento de como essa diversidade surge e é mantida. Consequentemente, este tipo de abordagem tem implicações para áreas que vão desde a conservação da natureza até a genética quantitativa e a evolução. Este projeto aborda, no sentido mais amplo, a diversificação dos mamíferos sul-americanos, diversificação aqui se referindo tanto à evolução de morfologias complexas (basicamente o crânio) como à especiação, particularmente em três grupos: