

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA E EXPRESSÃO DE UM
GENE AMPLIFICADO NO PUFER DE DNA B-10 DE *Bradysia hygida*
(DÍPTERA, SCIARIDAE).

APARECIDA MARIA FONTES

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto/USP para a
obtenção do título de Doutor em
Ciências (Morfologia-Biologia Celular).

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Luisa Paçó-Larson

Ribeirão Preto
1996

DEDICO ESTE TRABALHO

***A meu pais
Orlando Fontes
Maria de Lourdes Dias Fontes***

***À quatro grandes Amigas que muito me
auxiliaram durante essa caminhada.***

***Maria Cristina Ramos Costa
Iara Sordi Joachim Bravo
Maura Helena Manfrim
Ângela de Castro Rezende***

***À querida afilhada
Ana Maria Joachim Bravo***

DEDICAÇÃO ESPECIAL

À Maria Luiza Paçó-Larson.

Quero exprimir aqui meus sinceros agradecimentos e fazer-lhe uma homenagem de reconhecimento por tudo o que você foi para mim durante todo este tempo desde a iniciação científica. Uma excelente mestra e pesquisadora, que não mede esforços para alcançar suas metas. Responsável, competente e incansável nos seus objetivos. É de pesquisadoras como você que nosso país precisa para obter maiores e melhores resultados em Ciência. Por tudo isso eu tenho por você, Maria Luiza, uma profunda admiração. Mais uma vez o meu muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

- Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela acolhida.*
- Ao grupo do laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto: Profs Jorge Cury de Almeida, Eduardo Miguel Laicine, Maurílio Antônio Ribeiro Alves e colegas Paulo Sérgio Rodrigues Coelho, Nádia Monesi, Luiz Basso Jr., José Antônio Silva Jr. (Fu), Cláudio Vasconcelos, Daniela Palermo de Carvalho, Cláudio Roberto Simon (Pork's), Maralice Elaine Conacci (Mara), pela amizade e companheirismo proporcionando alegres momentos no laboratório.*
- Ao Luiz Alberto M. de Andrade e Cláudia Regina Marangheti pela manutenção da cultura de Bradysia hygida e às técnicas Cirlei Aparecida Vani, Mara Silvia Alexandre Costa e Maria Luiza Orsi Mendes pela constante disposição em ajudar.*
- Ao Marcelo da Costa Gonçalves e João Kazuyuki Kajiwara pelo auxílio na utilização dos computadores e pela amizade construída.*
- Ao José Augusto pela realização das fotos durante toda a realização deste trabalho.*
- As secretárias do departamento Ângela e Lúcia pela disponibilidade.*
- Aos professores Roy E. Larson, Ângela K. Cruz e Renato H. Migliorini do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela utilização de equipamentos dos respectivos laboratórios.*
- À Marli Haydeé Tavella e Amélia Góes Araújo do laboratório do Prof Dr. Antônio Zago do Departamento de Clínica Médica da FMRP/USP, pelo auxílio nos primeiros experimentos de "primer extension" e por ter gentilmente sintetizado os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.*
- Ao Prof. Richard C. Garrat do Instituto de Física da USP-São Carlos, pelas sugestões nas análises da estrutura primária da proteína e por colaborar na elaboração do "dot plot".*
- Aos colegas de pós-graduação, em especial, Carmem Aparecida de Paula (Carminha), Evelin Capellari Cárnio, Freddy Bravo, Luiz Carlos Jr. Alcântara (Luizinho) e Milton Vieira Coelho (Miltinho), pelos momentos vividos e amizade adquirida entre nós.*
- A todos os meus parentes, em especial tia Fernanda, Leticia e Dircinha que mesmo de longe, estiveram sempre presentes.*
- Ao CNPq pela bolsa de estudo.*

"- O QUE OLHAS COM TANTA ATENÇÃO, CHIN AN LING?
- O VÔO DAS BORBOLETAS, MESTRE! CONFUNDEM-SE
COM A LEVEZA DO VENTO.
E COMO ELE ESPARRAMAM ALEGRIAS.
IMPOSSÍVEL VOAR COMO ELAS!
-ENGANA-TE! COM O TEU PENSAMENTO DE
FERVOR, ALCANÇARÁS ALTURAS INATINGÍVEIS
PARA AS BORBOLETAS!
- E COMO DESENVOLVER ESSA CAPACIDADE, MESTRE!
- DEVERÁS TRABALHAR O CHÃO BRUTO, DESPREOCUPADO
DOS VÔOS MAIS ALTOS. TRANSFORMANDO A TERRA EM
SEMENTEIRA DE AMOR, CRESCERÁS COMO AS FLORES E
GRANJEARÁS LEVEZA CONQUISTANDO A AMPLIDÃO."

Chei Ai Min

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
ESTUDOS EM EUCARIOTOS INFERIORES (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	3
ESTUDOS EM EUCARIOTOS SUPERIORES.....	5
MODELO DE ESTUDO	9
MATERIAIS E MÉTODOS	15
A. MATERIAL BIOLÓGICO	16
B. REAGENTES	20
C. MÉTODOS	24
1. Preparação de DNA e RNA	24
a) Extração de DNA e RNA de glândulas salivares.....	24
b) Mini-preparação do DNA de fago.....	25
c) Mini-preparação do DNA plasmidial.	25
d) Digestão com enzimas de restrição.	26
2. Propagação e manutenção de bactérias e fagos	26
a) Obtenção de colônia de bactéria isolada.....	26
b) Estoque de bactéria	26
c) Preparo da bactéria para plaqueamento	26
d) Plaqueamento do fago	26
e) Coleta de placas de lise	27
f) Amplificação do fago e preparo de estoque.....	27
3. Eletroforese em gel de agarose e de acrilamida	27
a) Gel de Agarose neutro.	27
b) Gel de Agarose desnaturante	27
c) Gel de poliacrilamida/uréia.	28
4. Transferência de DNA e RNA para filtros de nitrocelulose	28
a) Transferência das placas de lise para filtro de nitrocelulose.....	28
b) Transferência de RNA para filtros de nitrocelulose ("northern blot").....	28
c) Transferência de DNA para filtros de nitrocelulose ("Southern blot").....	29
5. Preparo das sondas	29
a) Preparo do fragmento de DNA para a marcação em gel de agarose.....	29
b) Marcação do DNA pela reação de "multiprime"	29
6. Hibridação em filtros de nitrocelulose	30

7. Sub-clonagem em plasmídeo.....	30
a) Preparação do DNA do vetor.....	30
b) Preparação do inserto de DNA.....	31
c) Reação de ligação.....	31
d) Preparação de bactérias competentes.....	31
e) Transformação	32
8. Deleção por exonuclease III.....	34
9. Seqüenciamento do cDNA e dos sub-fragmentos genômicos de 1,3 e 0,7 kb.....	38
a) Preparação do DNA simples fita dos clone recombinantes.....	38
b) Método de seqüenciamento segundo Sanger et al., 1977	38
10. Análise computadorizada de seqüências	39
11. Reação de "Primer-extension".....	39
a) Marcação da extremidade 5' do oligonucleotídeo sintético.....	39
b) Extensão do oligonucleotídeo com transcriptase reversa.	39
12. Reação com RNase-H para a obtenção de RNA poli A ⁻	40
RESULTADOS	41
I. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES DE cDNA RELATIVOS AO PUFE B10.....	42
II. ESTRUTURA DO GENE DO PUFE B10.....	49
A - Seqüenciamento do cDNA.....	49
B- Seqüenciamento do fragmento genômico	49
C - Caracterização das regiões 5' e 3' das mensagens	52
III. ANÁLISE DA SIMILARIDADE ENTRE SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO 5' DO GENE B_hB10 COM OUTROS GENES AMPLIFICADOS EM PUFES DE DNA E COM GENES DE <i>Drosophila</i> QUE RESPONDEM À ECDISONA.....	57
IV. ANÁLISES DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA PB10 DEDUZIDA DO cDNA.....	63
DISCUSSÃO	68
I. O GENE AMPLIFICADO NO PUFE DE DNA B10	69
II. PROTEÍNA DEDUZIDA DO cDNA RELATIVO AO PUFE B10	76

III. RELAÇÃO ENTRE OS PROCESSOS DE FORMAÇÃO DOS PUFES DE DNA, AMPLIFICAÇÃO E TRANSCRIÇÃO GÊNICA.....	79
SUMÁRIO	81
SUMARY	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
GLOSSÁRIO E ABREVIATURAS.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – ESTÁGIOS DO DESENVOLVIMENTO DE <i>B. hygida</i>	17
Figura 2 - PADRÃO DE DESENVOLVIMENTO DO PUFÉ DE DNA B-10, NO FINAL DO 4º ESTÁGIO LARVAL	18
Figura 3 - GLÂNDULA SALIVAR DE <i>B. hygida</i> NO 4º ESTÁGIO LARVAL	18
Figura 4 - AUTORADIOGRAFIA DE CROMOSSOMOS POLITÊNICOS B DAS REGIÕES GLANDULARES S1, S2 E S3, DEPOIS DE 15 MINUTOS DE INCORPORAÇÃO DE (³H)-TIMIDINA.	19
Figura 5 - SUB-CLONAGEM DO cDNA DE 1,0 kb E DOS SUB-FRAGMENTOS GENÔMICOS (1,3 e 0,7 kb) NO VETOR DE SEQUENCIAMENTO pT7T3-18U.	33
Figura 6 - ESTRATÉGIA DE SEQÜENCIAMENTO DO cDNA DE CERCA DE 1,0 kb.	35
Figura 7 - ESTRATÉGIA DE SEQÜENCIAMENTO DO SUB-FRAGMENTO GENÔMICO DE 1,3 kb.	36
Figura 8 - ESTRATÉGIA DE SEQÜENCIAMENTO DO SUB-FRAGMENTO GENÔMICO DE 0,7 kb.	37
Figura 9 - OS 24 CLONES DE cDNA ISOLADOS APRESENTAM UM INSERTO DE CERCA DE 1,0 kb, O QUE CORRESPONDE AO TAMANHO DA MENSAGEM MENOR	44
Figura 10 - O CLONE λcDNA-2 REVELA DUAS MENSAGENS DE MESMO TAMANHO E PERFIL DE EXPRESSÃO DO DETECTADO PELO FRAGMENTO GENÔMICO DE 2 kb.	45
Figura 11 - O FRAGMENTO GENÔMICO DE 2 kb CONTÉM 1 kb DE UMA UNIDADE DE TRANSCRIÇÃO.....	46
Figura 12 - AS DUAS MENSAGENS RELATIVAS AO PUFÉ B10 ESTÃO PRESENTES NAS TRÊS REGIÕES GLANDULARES, DE ACORDO COM O MESMO PADRÃO DE EXPRESSÃO.....	48
Figura 13 - A SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E A SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUZIDA DO cDNA RELATIVO AO PUFÉ B-10 DE <i>B. hygida</i>	51
Figura 14 - ALINHAMENTO ENTRE AS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO cDNA E DO FRAGMENTO GENÔMICO <i>ECORI</i> /2 kb.	54
Figura 15 - A TRANSCRIÇÃO DOS mRNAs DE 1,3 kb E 1,1 kb INICIA-SE NO MESMO SÍTIO.	55
Figura 16 - OS mRNAs DE 1,1 kb E 1,3 kb CORRESPONDEM A MESMA MENSAGEM QUE DURANTE O DESENVOLVIMENTO SOFRE UM ENCURTAMENTO DA CAUDA ..	56
Figura 17 - ESTRUTURA PRIMÁRIA DA PROTEÍNA DEDUZIDA DO CDNA DE 1,0 kb RELATIVO AO PUFÉ B-10.....	66

Figura 18 - DOT PLOT DA PROTEÍNA PB10.....	67
Figura 19 - ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA PRIMÁRIA DA PROTEÍNA PB10.	67
Figura 20 - ALINHAMENTO DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE DUAS REGIÕES DA PROTEÍNA PB10.....	72
Figura 21 - HIPÓTESE DA DUPLICAÇÃO GÊNICA.....	78

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I - SIMILARIDADE ENTRE A SEQÜÊNCIA DA REGIÃO DE INÍCIO DE TRANSCRIÇÃO DE B h B10 E OUTROS CINCO GENES AMPLIFICADOS EM PUFES DE DNA.	58
Tabela I - SIMILARIDADE ENTRE A SEQÜÊNCIA DA REGIÃO DE INÍCIO DA TRADUÇÃO DE B h B10 E OUTROS QUATRO GENES AMPLIFICADOS EM PUFES DE DNA.	58
Tabela III - SIMILARIDADE DA SEQÜÊNCIA DE B h B10 E DE OUTROS QUATRO GENES AMPLIFICADOS EM PUFES DE DNA COM AS SEQÜÊNCIAS ECRE DE <i>hsp27</i> , <i>Eip28/29</i> E <i>P1</i> DE <i>Drosophila</i>	60
Tabela IV - SIMILARIDADE DA SEQÜÊNCIA DE B h B10, E DE OUTROS SEIS GENES AMPLIFICADOS DE PUFES DE DNA, COM UMA SEQÜÊNCIA CONSENSO DE 20 pb, RICA EM ADENINA E PRESENTE NO PROMOTOR DE DIVERSOS GENES DE <i>Drosophila</i> QUE RESPONDEM À ECDISONA.	61
Tabela V - SIMILARIDADE DA SEQÜÊNCIA DE B h B10 E DE OUTROS QUATRO GENES AMPLIFICADOS EM PUFES DE DNA, COM O ELEMENTO ACS, DE 11 pb, DA SEQÜÊNCIA <i>ARS</i> DE LEVEDURA.....	62
Tabela VI - SIMILARIDADE DA REGIÃO INTRÔNICA ENTRE OS GENES AMPLIFICADOS EM PUFES DE DNA.....	63

INTRODUÇÃO

A replicação do DNA e a transcrição gênica são eventos cruciais para a manutenção da informação genética e do estado diferenciado da célula eucariótica. Há décadas já é conhecido que domínios cromossômicos que apresentam uma alta densidade de genes ativos transcricionalmente são replicados no início da fase S, enquanto que regiões heterocromáticas inativas transcricionalmente são replicadas tardiamente na fase S, sugerindo que o controle temporal da replicação pode ser utilizado para organizar a cromatina ativa ou inativa transcricionalmente (GOLDMAN et al., 1984). A complexidade da estrutura cromatínica na célula eucariótica tem dificultado esclarecimentos sobre a relação que possa existir entre esses processos. A hipótese de que a replicação do DNA é um pré-requisito para a ativação transcricional é favorecida em vários casos, como por exemplo: genes codificadores para rRNA 5S de *Xenopus*, são ativos transcricionalmente e replicados no início da fase S, em células somáticas, enquanto, em ovócitos são inativos e apresentam uma replicação tardia (WOLFFE e BROWN, 1988), ou ainda genes codificadores para β -globina, que apresentam uma replicação inicial em eritrócitos, onde são expressos, e replicação tardia em células linfocíticas, onde são inativos transcricionalmente (DHAR et al., 1989) e genes codificadores para profilinas P e A em *Physarum*, onde foi demonstrado que apenas o gene para profilina P, o qual apresenta uma replicação inicial, é transcrito em um estágio específico do desenvolvimento, enquanto que o gene da profilina A, não é expresso nesse estágio do desenvolvimento e apresenta replicação tardia (BERNARD e PIERRON., 1992). Nesse caso, foi ainda observado uma associação física entre origem de replicação e região promotora. Para o gene da profilina P, foi mapeado uma origem de replicação 1-1,5 kb do sítio de iniciação da transcrição do gene, enquanto que para o gene da profilina A, a origem de replicação está distante cerca de 15 kb do gene (BERNARD e PIERRON, 1992). Entretanto, o fato por exemplo, do cromossomo X apresentar genes replicados no início da fase S e inativos transcricionalmente sugere que a replicação por si não é suficiente para a ativação da transcrição. Além disso, existem evidências de ativação transcricional na ausência de replicação do DNA. Por exemplo, CHIU e

BLAU (1984) mostraram a expressão de genes específicos de células musculares na presença do inibidores da replicação do DNA.

Recentemente, a associação entre o controle temporal da replicação e da transcrição foi refinada em estudos do *locus* da síndrome de Prader-Willi em humanos. Neste caso é mostrado que um segmento de 5-30 kb contendo o terminal 5' do primeiro exon do gene SNRPN ("Small Nuclear Ribonucleoprotein-associated Polypeptide N") associado com essa síndrome é responsável pela regulação alelo-específica do tempo de replicação e da expressão no cérebro (GUNARATNE et al., 1995).

A melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação da replicação do DNA ou da transcrição gênica em cromossomos de eucariotos depende da identificação e caracterização dos eventos moleculares envolvidos na ativação desses processos. No caso da transcrição gênica, os mecanismos envolvidos já foram bastante dissecados, diversos elementos e fatores que participam da maquinaria da transcrição foram isolados e hoje pode-se generalizar um mecanismo básico de ativação da transcrição entre todos os eucariotos (para rev. ver GOODRICH e TJIAN, 1994). Entretanto, no caso da iniciação da replicação do DNA a dissecção da maquinaria envolvida está em fase inicial (para rev. ver HEINTZ et al., 1992).

Esse descompasso é, em grande parte, resultado da dificuldade em se isolar sítios de origem de replicação, dada a complexidade do genoma e também a inexistência de mutantes genéticos que permitam averiguar sobre a funcionalidade de elementos do DNA candidatos a se comportarem como origens de replicação. Abaixo abordaremos alguns sistemas mais amplamente investigados a esse respeito

ESTUDOS EM EUCARIOTOS INFERIORES (*Saccharomyces cerevisiae*)

O primeiro sistema eucariótico onde origens de replicação do DNA puderam ser investigadas a nível molecular foi *S. cerevisiae*, com a descoberta, em 1979, de seqüências cromossômicas que conferiam a plasmídeos destituídos de origem a capacidade de se replicarem (STINHCOMB et al., 1979). Devido a essa propriedade, essas seqüências, nomeadas ARS ("autonomously

replicating sequence”) colocavam-se como excelentes candidatas a conterem origens de replicação e foram extensivamente estudadas durante a década de 80. A dissecção molecular dessas regiões cromossômicas resultou no mapeamento físico da região de iniciação da replicação do DNA em uma região conservada entre os distintos ARS, nomeada ACS (“ARS consensus sequence”, PALZKILL e NEWLON, 1988), e o isolamento de um complexo proteico, denominado ORC (“origin recognition complex”) que se liga a ACS (BELL e STILLMAN, 1992). Nesses estudos ficou demonstrado também o envolvimento de seqüências flanqueadoras ao elemento ACS, nomeadas B1, B2 e B3, que atuam aumentando a eficiência da atividade ARS como origem de replicação. O papel exato desses elementos ainda permanece desconhecido. Até o momento, sabe-se apenas que ao elemento B3 se liga o fator de transcrição ABF1 (“ARS binding factor 1”, DIFFLEY e COCKER, 1992 e BELL, 1995). Recentemente, esses estudos se tornaram ainda mais excitantes devido a confluência com uma outra linha de investigação que visava a caracterização de proteínas cuja expressão é regulada durante o ciclo celular, e que são essenciais para a entrada da célula na fase S (para rev. ver BARINAGA, 1994). Esses estudos levaram ao isolamento de uma família de proteínas quinases dependentes de ciclina, nomeada Cdc (“Cell division cycle”), dentre elas a Cdc7. Entretanto, a associação entre essas proteínas, essenciais para a síntese do DNA na fase S, e a ativação de sítios de origem de replicação começou a ser estabelecida somente há dois anos atrás com a caracterização de uma proteína nomeada DBF4, a qual é ativadora e ligante da quinase Cdc7 e ligante do complexo ORC (DOWELL et al., 1994). Esse dado, associado a observação de que o ORC permanece ligado à origem durante todo o ciclo celular vem colocar a proteína quinase Cdc 7 como uma possível ativadora da iniciação da replicação mediante a fosforilação de proteínas desse complexo ou de outras proteínas ainda não identificadas. A ativação da região de origem provocaria desespiralização e separação das fitas de DNA na região flanqueadora rica em A-T, permitindo assim a entrada das demais proteínas do complexo replicador, como a primase e DNA polimerase, necessárias para a síntese das cadeias complementares.

A natureza modular da seqüência replicadora de levedura assemelha-se em certos aspectos com a estrutura dos promotores de células eucarióticas. De um modo geral, os promotores que controlam a transcrição de genes eucarióticos compreendem seqüências localizadas próximas ao início de transcrição, como por exemplo a seqüência TATA box, que funciona como ponto para a ligação da maquinaria básica da transcrição. A transcrição basal, por sua vez, é controlada por outros fatores que se ligam a seqüências ativadoras e que interagem com a maquinaria basal ativando a transcrição. Mutações pontuais nessas seqüências ativadoras não necessariamente abolem a função promotora, devido a redundância desses elementos. Essa redundância, por sua vez, fornece flexibilidade necessária para controlar a função promotora durante o desenvolvimento e nos diferentes tipos celulares. No caso da replicação do DNA de levedura, a seqüência ACS, onde se liga o complexo ORC, poderia ser um elemento análogo aos elementos que garantem a transcrição basal e possivelmente atrairia a maquinaria básica para a replicação do DNA. Os sub-elementos B, por sua vez, participariam na regulação do replicador durante o ciclo celular e/ou na ativação do replicador em diferentes tipos celulares, papel este similar ao desempenhado pelos elementos reguladores da transcrição básica nos promotores. A observação de que ao elemento B3 de ARS se liga o fator transcricional ABF1, além da observação de que em vírus de eucariotos ocorre a participação de fatores transcricionais na ativação da origem de replicação, enfatiza a similaridade entre promotores transcricionais e os replicadores (para rev. ver BELL et al., 1993 a, b e BELL, 1995).

ESTUDOS EM EUCARIOTOS SUPERIORES

No caso dos organismos multicelulares, seqüências replicadoras com características semelhantes a promotores poderiam conduzir a uma replicação diferencial nos distintos tipos celulares durante o desenvolvimento. Entretanto, apesar dos grandes esforços concentrados nessa área, ainda não foi possível estabelecer se a iniciação da replicação envolve o reconhecimento de seqüências específicas (para rev. ver HEINTZ et al., 1992; BENBOW et al., 1992 e HAMLIN e DIJKWEL, 1995).

Em células de mamíferos, o primeiro sítio de iniciação de replicação foi identificado pelo grupo da Dra. Hamlin, durante o início da década de 80, no *locus* que contém o gene para DHFR (dihidrofolato redutase, para rev. ver HAMLIN, 1992). Esses pesquisadores isolaram linhagens celulares estáveis, derivadas do ovário de hamster chinês, contendo cerca de 1000 cópias do gene que codifica a DHFR, colocando esse sistema como uma rara oportunidade para o isolamento e caracterização de sítios de iniciação da replicação em cromossomos de mamíferos. Entretanto, nesse sistema a caracterização de região de origem de replicação utilizando diferentes métodos tem mostrado resultados contraditórios. O mapeamento físico por eletroforese em géis bidimensionais indica que a replicação inicia-se em diversos pontos ao longo de uma região de 55 kb, situada a jusante do gene DHFR (VAUGHN et al., 1990, DIJKWEL e HAMLIN, 1992), enquanto que métodos que empregam precursores radioativos para a identificação das fitas nascentes de DNA têm sugerido a ocorrência de seqüências fixas de iniciação da replicação. Por exemplo, em estudos realizados por ANACHOVA e HAMLIN (1989) foi mostrado que fragmentos de DNA (de 1 a 5 kb), enriquecidos em origens, hibridam preferencialmente, em "Southern blots", com dois fragmentos genômicos de 6.1 e 11 kb que mapeam dentro da região de 55 kb do amplicon DHFR. Esses dados sugeriram a ocorrência de duas origens de replicação nomeadas por ori- β e ori- γ mapeadas cerca de 15 e 35 kb, respectivamente, a jusante do terminal 3' do gene. Em outros estudos, que envolveram caracterizar a distribuição dos fragmentos de Okazaki ao longo de todo amplicon DHFR, foi detectado um único sítio onde há a transição da síntese descontínua para a síntese contínua de DNA, em um fragmento de 450 bp situado dentro da região ori- β . Esses dados sugerem a ocorrência de um sítio único de iniciação da replicação neste amplicon (BURHANS et al., 1990). Essa controvérsia pode ser devida as abordagens enfocarem etapas diferentes da iniciação da replicação do DNA. O emprego de novas técnicas, a caracterização de cada intermediário de replicação com relação a estrutura, abundância, taxa de "turnover" e comprimento e posição das fitas nascentes permitirá o esclarecimento e a

compreensão da iniciação da replicação nesse domínio cromossômico (para rev. ver LINSKENS e HUBERMAN, 1990, HAMLIN, 1992).

Como mencionamos acima, um dos principais problemas enfrentados para a identificação de origens de replicação do DNA em eucariotos superiores é a dificuldade de identificá-las por análises genéticas. Entretanto, recentemente, esse tipo de verificação foi possível no *locus* da β -globina. Nesse *locus*, através da análise da distribuição dos fragmentos de Okazaki para mapear a região de transição entre síntese contínua e descontínua de DNA, foi identificado um sítio de iniciação de replicação bidirecional, em um fragmento de 2 kb localizado a montante do gene. Entretanto, em pacientes talassêmicos, onde há uma deleção de 8 kb englobando esse fragmento de 2 kb, a atividade de origem de replicação é perdida. Nesses indivíduos a replicação dessa região passa a ser unidirecional, a partir de uma outra origem localizada externamente ao *locus*. Portanto, esse é um exemplo em cromossomos de células de mamíferos, onde, uma seqüência candidata a conter uma origem de replicação foi funcionalmente comprovada por evidências genéticas (KITSBERG et al., 1993).

O *locus* coriônico no cromossomo III de células do folículo ovariano de *Drosophila*, que é amplificado no final da ovogênese é outro sistema que tem permitido o mapeamento de regiões de origens por métodos físicos e abordagens genéticas. Em estudos envolvendo transformação mediada pelo elemento P, incluindo mutações dirigidas, foi possível identificar um elemento de 320 pb, localizado cerca de 120 pb a montante do gene *s18* desse *locus*, essencial para a amplificação, e denominado ACE3 (“amplification control element/third chromosome”, ORR-WEAVER e SPRADLING 1986; ORR-WEAVER et al., 1989), e quatro outros elementos, requeridos para a manutenção de altos níveis de amplificação, denominados AER (“amplification-enhancing region”): AER-a [2.2 kb], AER-b [1,3 kb], AER-c [0.9 kb] e AER-d [0,4 kb] localizados a jusante do elemento ACE3 e entre os quatro genes coriônicos mapeados nessa região (DELIDAKIS e KAFATOS, 1987; DELIDAKIS e KAFATOS, 1989). O papel exato desses elementos na amplificação do *locus*

coriônico ainda não foi esclarecido e, interessante, o elemento ACE3, candidato a conter origem de amplificação e/ou replicação, é bastante conservado apresentando 8 blocos de seqüências (>5pb) com 100% de identidade entre quatro espécies de *Drosophila* (MARTINEZ-CRUZADO et al., 1988; SWIMMER et al., 1992). Neste sistema, o emprego de técnicas para a análise de forquilhas de replicação em géis bidimensionais neutro/neutro detectou a presença de diversas origens de replicação dentro de uma região de 7.7 kb, sugerindo a ocorrência de diversos sítios de início de replicação, sendo que em algumas regiões, como no elemento ARE-d, a replicação se iniciaria mais frequentemente (70-80%) quando comparada a outras, como por exemplo no elemento ACE3 (DELIDAKIS e KAFATOS, 1989 e HECK e SPRADLING, 1990). Portanto, nesse caso, se imaginarmos uma região de origem de replicação similar a observada em levedura, o elemento ACE3 poderia representar a região onde se ligaria o complexo ativador da replicação e o elemento AER-d a região onde ocorreria a abertura das fitas para instalação do complexo replicador.

O locus coriônico de *Drosophila* está sendo bastante investigado também quanto ao mecanismo de regulação da transcrição gênica. Esses estudos mostraram que os elementos controladores da transcrição são distintos dos elementos controladores da replicação. Entre eles, o hexâmero 5'-TCACGT-3', localizado cerca de 60 nt a montante do início de transcrição, é conservado entre todos os genes coriônicos e é essencial para a expressão regulada desses genes (MARIANI et al., 1988 e TOLIAS e KAFATOS, 1990). Portanto, na transcrição dos genes coriônicos estaria envolvida a seqüência TATA box, responsável pela transcrição basal, e o hexâmero conservado que participa na intensa ativação da transcrição. Nesse sistema a possível correlação entre amplificação e transcrição ainda permanece obscura.

No que diz respeito à iniciação da replicação em cromossomos eucarióticos convém ressaltar ainda que nos últimos quatro anos houve um grande avanço nessa área e atualmente com o emprego de uma grande diversidade de abordagens experimentais estão sendo caracterizadas regiões

de origem de replicação do DNA em pelo menos cerca de 20 *loci* cromossômicos (para rev. HAMLIN e DIJKWELL, 1995). Entre eles os mais intensivamente investigados são: o *locus* rDNA em *Tetrahymena thermophila* (DU et al., 1995), o *locus* da rodopsina em hamster chinês (GALE et al., 1992), o *locus* da histona H5 em *Gallus gallus* (ADAMS e WORKMAN, 1993) e o *locus* *c-myc* em células humanas (LEFFAK e JAMES, 1989). A análise comparativa da seqüência de nucleotídeos dessas diversas regiões de origem de replicação mostra a conservação de algumas características, como por exemplo: a presença de um ou mais elementos de desespirilação do DNA (DUE - "DNA unwinding element"); diversos elementos de ligação à matriz nuclear (MAR "matrix attachment region", também denominado SAR "scaffold associated region"); seqüência consenso de ARS (ACS); trechos de pirimidina; uma seqüência conservada de 21 pb WAWTTDDWWWHDHWGWHMAWTT, onde W=A/T, D=A/G/T, H= A/C/T e M=A/C; sítios de ligação de fatores de transcrição e uma riqueza em AT (DOBBS et al., 1994). Embora essas similaridades possam sugerir uma conservação na maquinaria básica da replicação do DNA, desde *S. cerevisiae* até eucariotos superiores, tal afirmativa depende de maior dissecação dessas seqüências em ensaios moleculares e funcionais.

O MODELO DE ESTUDO

Dentro desse contexto, os pufes de DNA, estruturas que aparecem como uma visível descompactação da cromatina em sítios específicos dos cromossomos politênicos da glândula salivar de Sciarídeos, no final do último estágio larval, representam um sistema interessante para investigar os processos de replicação do DNA e transcrição gênica. A descompactação da cromatina que acontece nos pufes de DNA está correlacionada com a intensa atividade transcricional de genes amplificados nesses sítios (FONTES et al., 1992; PAÇÓ-LARSON et al., 1992; WU et al., 1993) e, provavelmente, é necessária para acomodar a maquinaria de transcrição e replicação que atuam simultaneamente nesses *loci* cromossômicos (SANTELLI et al., 1991; COELHO et al., 1993). A peculiaridade dessa estrutura cromossômica, onde ocorre síntese adicional de DNA e uma intensa atividade transcricional de modo

regulado no desenvolvimento, a tornou bastante atrativa desde sua descoberta em 1955 por Breuer e Pavan.

A metodologia disponível naquela época, e até o final da década de 70, permitiu demonstrar a ocorrência de síntese adicional de DNA e uma intensa atividade de transcrição nesses sítios cromossômicos (FICQ e PAVAN, 1957; GABRUSEWYCZ-GARCIA, 1964; SAUAIA et al., 1971; RIBEIRO, 1975; LAICINE et al., 1984) e correlacionar temporalmente frações polipeptídicas da glândula salivar com determinados pufes de DNA (WINTER et al 1977; deTOLEDO e LARA, 1978; LAICINE et al., 1984). Estudos de citofotometria, embora fornecendo sub-estimativas do valor real, demonstraram claramente a ocorrência de amplificação de DNA nesses pufes (CROUSE e KEYL, 1968; RASCH, 1970; PAÇÓ-LARSON, 1982).

A partir da década de 80, com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, os pufes de DNA começaram a ser investigados a nível molecular, condição básica para a real compreensão dos mecanismos e das relações entre os processos de amplificação, transcrição e formação dos pufes de DNA. A caracterização molecular de regiões formadoras desses *loci* cromossômicos iniciou-se com o isolamento e caracterização de clones genômicos e de cDNAs de pufes de DNA de diversos Sciarídeos, como dos pufes B10 e C4 de *Bradysia hygida* (FONTES et al., 1992, PAÇÓ-LARSON et al., 1992 e MONESI et al., 1995), pufes B2, C3 e C8 de *Rhynchosciara americana* (GLOVER et al., 1982; rev. LARA, 1988; rev. LARA et al., 1991; FRYDMAN et al., 1993; SOARES, 1995), pufes II/9A e II/2B de *Sciara coprophila* (DIBARTOLOMEIS e GERBI, 1989; WU et al., 1993) e pufe C4B de *Trichosia pubescens* (COSTA, 1995). Nesses estudos foi demonstrado diretamente a ocorrência de seqüências gênicas amplificadas durante o desenvolvimento da glândula salivar, atingindo níveis de amplificação de cerca de 10-21X (em *B. hygida*, FONTES et al., 1992 e MONESI et al., 1995), 8-32X (em *R. americana*, GLOVER et al., 1982, SOARES, 1995), 17-18X (em *S. coprophila*, WU et al., 1993) e 50X (em *T. pubescens*, COSTA, 1995). Embora a estrutura de pelo menos cinco desses genes amplificados em pufes de DNA tenha sido definida molecularmente, a caracterização molecular da região inteira do pufe de DNA

ainda não foi resolvida, devido em grande parte a presença de seqüências repetidas nessas regiões, como foi mostrado nas porções a 5' e 3' do gene do pufe C4 de *B. hygida* (MONESI et al., 1995) e nas porções a 3' do gene dos pufes C3 e C8 de *R. americana* (SANTELLI et al., 1991). Interessantemente, em quatro desses pufes, C4 de *B. hygida*, C3 e C8 de *R. americana* e C4B de *T. pubescens*, onde foram caracterizados 18 kb, 55kb, 54 kb e 42 kb respectivamente, de cada amplicon, observou-se que níveis máximos de amplificação ocorrem na região onde foi mapeada uma unidade de transcrição e diminui gradualmente de modo simétrico (no caso do amplicon C4B e C8) ou assimétrico (no caso do amplicon C4 e C3), a partir dessa região (CADAVID, 1993; MONESI et al., 1995; COSTA, 1995 e SOARES, 1995). Em *B. hygida*, esses estudos sobre a caracterização molecular de pufes de DNA foram refinados e observou-se que podem existir genes expressos antes da abertura do pufe (como é o caso do mRNA de 1.8 kb, complementar a um fragmento 1.2 kb do pufe C5) ou quando os mesmos se encontram regredidos (como é o caso dos mRNAs de 1.8 e 3.8 kb complementares a um fragmento de 2.3 kb do pufe C4). Esses genes, entretanto, apresentam níveis muito baixos de amplificação que não excedem 3-4X (COELHO, 1993; COELHO et al., 1993). Em conjunto, esses dados permitem esclarecer dois pontos importantes sobre a natureza dos pufes de DNA. O primeiro diz respeito ao mecanismo de amplificação, indicando que a replicação que leva a amplificação ocorre de modo desigual ao longo da região amplificada, sugerindo um gradiente de amplificação similar ao que ocorre no domínio coriônico em células do folículo ovariano de *D. melanogaster* (SPRADLING, 1981). O segundo, diz respeito a organização da estrutura do pufe de DNA, sugerindo a presença de diversos genes expressos em diferentes épocas do desenvolvimento, sendo que os genes cuja expressão acompanha o desenvolvimento do pufe apresenta os maiores níveis de amplificação, quando comparados a genes expressos antes ou após a regressão do mesmo.

Outro ponto interessante investigado em pufes de DNA diz respeito a identificação física de sítios de início da replicação. Através da análise dos intermediários de replicação em géis de agarose de dupla dimensão foi possível o mapeamento de região de origem de replicação bidirecional, inicialmente em

Sciara (LIANG et al., 1993), e recentemente em *Rhynchosciara* (YOKOSAWA, 1995). Em *Sciara* essa região foi identificada em um fragmento de cerca de 1 kb localizado 2.3 kb a montante do gene II/9-1 e em *Rhynchosciara* em um fragmento de 8-9 kb localizado na região flangeadora a 5' do gene C3-22. Ensaio funcionais dessas regiões são necessárias para avaliar a atividade desses elementos como origens de replicação.

Os pufes de DNA também são bastante investigados quanto a regulação da expressão gênica (SANTELLI et al., 1991; COELHO et al., 1993 e WU et al., 1993). Em dípteros, de uma maneira geral, foi bastante investigada a participação do hormônio ecdisona como substância ativadora ou inibidora da transcrição. Particularmente, os pufes que se formam nos cromossomos politênicos, caracterizados como manifestações morfológicas da atividade gênica, foram muito utilizados nesse estudo. Durante as décadas de 60-70, foram feitos numerosos estudos citológicos sobre a participação da ecdisona no desenvolvimento dos pufes de RNA de *Drosophila* (ASHBURNER et al., 1974 e ASHBURNER e RICHARDS, 1976). Esses sítios diferem dos pufes de DNA por não apresentarem síntese adicional de DNA, apenas uma intensa atividade transcricional e são de ocorrência geral em dípteros. Nesses estudos os pufes de RNA foram divididos em duas classes: a primeira classe seria representada pelos pufes induzidos diretamente pela ecdisona, nomeados por pufes iniciais, e a segunda classe incluiria os pufes induzidos indiretamente pela ecdisona, nomeados pufes tardios (ASHBURNER e RICHARDS, 1976). Em sciarídeos, o efeito da ecdisona sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA também foi investigado. Experimentos envolvendo a injeção de ecdisona em larvas jovens, realizados em *S. coprophila* (CROUSE, 1968), *R. americana* (STOCKER e PAVAN, 1974 e BERENDES e LARA, 1975), *Trichosia* (AMABIS e AMABIS, 1984a) e *B. hygida* (FONTES, 1988); ou a ligadura do corpo da larva para o bloqueio da passagem dos hormônios produzidos pelas glândulas endócrinas, realizados em *R. americana* (AMABIS e CABRAL, 1970) e em *Trichosia* (AMABIS e AMABIS, 1984b) ou, ainda, transplantes de glândulas salivares realizados em *R. americana* (AMABIS e SIMÕES, 1971) e incubação de glândulas salivares em meio contendo o hormônio ecdisona (ALVARENGA et

al., 1979) mostraram a necessidade da ecdisona no programa de desenvolvimento dos pufes de DNA. Esses estudos mostraram ainda a dependência da síntese proteica para a indução da formação dos pufes de DNA, colocando-os como eventos análogos aos pufes de RNA tardios de *Drosophila*. Em *B. hygida*, esses estudos se estenderam a nível molecular e mostraram por análises em “northern” e “Southern blot” que a ecdisona induz a amplificação e transcrição de genes dos pufes C4 e B10 (FONTES et al., 1991).

A inexistência de um sistema para a transformação de sciarídeos é uma limitação nos estudos para avaliação do mecanismo molecular da regulação da transcrição e amplificação. Tendo em vista essa limitação, recentemente, estão sendo produzidas linhagens de *Drosophila* transgênicas contendo seqüências promotoras de genes amplificados em pufes de DNA. Bienz-Tadmor e cols. (1991) demonstraram que uma região de 718 pb da região promotora de um gene do pufe de DNA II9-A de *S. coprophila* é capaz de dirigir a expressão de um gene reporter em linhagens transgênicas de *Drosophila*, de modo regulado temporal e tecidualmente semelhante ao que ocorre em *S. coprophila*. Estudos “*in vitro*” da glândula salivar desses animais transgênicos mostraram que a ecdisona é capaz de induzir rapidamente (30-60 min.) a atividade do gene reporter, sugerindo um controle direto da transcrição pelo receptor da ecdisona. A existência nesse fragmento de 718 pb de três seqüências palindrômicas homólogas ao elemento de ligação do receptor de ecdisona (EcRE) de *Drosophila* reforça a noção de que a transcrição do gene II/9-1 de *S. coprophila* seja diretamente controlado pelo receptor de ecdisona. Apesar da baixa similaridade (39-62%) dessas três seqüências de *S. coprophila* com o elemento EcRE de *Drosophila*, ensaios de migração retardada em gel, indicam a sua ligação com proteínas do extrato da glândula salivar do período de desenvolvimento dos pufes de DNA. Anticorpo policlonal contra receptor da ecdisona reconhece essas proteínas, sugerindo assim a ligação direta de complexos Ecdisona + Receptor com genes amplificados em pufes de DNA (GERBI et al., 1993, dados não mostrados). Essa ligação direta também é sugerida em *R. americana* e *T. pubescens* onde foi mostrado que anticorpo policlonal contra o receptor de ecdisona, isolado de *Chironomus*, reconhece

sítios formadores de pufes de DNA (STOCKER, et al., 1995). O isolamento e caracterização de proteínas ligantes às seqüências candidatas a se comportarem como EcRE do gene II/9-1 de *S. coprophila*, e de outros genes amplificados em pufes de DNA, bem como o isolamento do receptor de ecdisona desses sciarídeos permitirá obter dados conclusivos sobre a participação da ecdisona no desenvolvimento dos pufes de DNA.

Com vistas a contribuir com informações e reagentes importantes para estudos dos mecanismos moleculares envolvidos na transcrição e amplificação gênica em pufes de DNA, neste trabalho clonamos e caracterizamos a nível de seqüência de nucleotídeos um gene amplificado no pufe B10 de *B. hygida*. A caracterização desse gene envolveu também estudos sobre as mensagens por ele codificadas, produzindo informações interessantes acerca da regulação da expressão gênica a nível do mRNA.

MATERIAIS E MÉTODOS

A. MATERIAL BIOLÓGICO

1. *Bradysia hygida*

Foram utilizados imagos e larvas fêmeas do Sciarídeo *Bradysia hygida* (SAUAIA e ALVES, 1968) mantido no laboratório desde 1967. Seu ciclo de vida dura cerca de 36 dias, a 20 °C. Durante o estágio larval ocorrem mudas que delimitam quatro estágios. No fim do sexto dia após a terceira muda inicia-se a formação das manchas oculares. Essas manchas mudam de tamanho, forma e posição durante o desenvolvimento, sendo por isto um marcador útil para se determinar a idade larval e conseqüentemente o padrão de desenvolvimento dos pufes que ocorrem nos cromossomos politênicos das glândulas salivares (**Figuras 1 e 2**, LAICINE et al., 1984).

Essas larvas possuem um par de glândulas salivares com cerca de 10 cm de comprimento, formadas por duas fileiras de células que delimitam uma luz central e percorrem todo o corpo larval até a extremidade posterior. Cada glândula contém cerca de 190 células (SAUAIA, 1971; PAÇÓ-LARSON, 1976) que diferem quanto suas características morfológicas, permitindo a fácil distinção de três regiões: S1, S2 e S3 (**Figura 3**). Os núcleos das células contêm quatro cromossomos politênicos nomeados A, B, C e X (SAUAIA, 1971), cujos padrões de pufes diferem segundo a região glandular. A formação dos primórdios dos pufes de DNA ocorre quando as manchas oculares apresentam o padrão E3 (fim do 7° dia do quarto estágio). Em E7 expande-se o 1° grupo de pufes de DNA. Doze horas após E7 ocorre a expansão de um 2° grupo. O pufe B-10 é um pufe intermediário, entre o primeiro e o segundo grupo, e se encontra em máxima expansão por volta de E7 + 8 horas (**Figura 2**). O pufe de DNA B-10 ocorre apenas nas regiões S1 e S3. Na região S2 esse pufe não se forma (**Figura 4**, ALVES, 1975). Na muda prepupal, que ocorre cerca de 26 horas após E7, todos os pufes de DNA, com exceção do B-3de, se apresentam regredidos.

Neste trabalho foram utilizados imagos e larvas fêmeas no final do 4° estágio larval, em idades E1 (antes do início da formação dos pufes de DNA), E3, E7, E7+8 e E7+16 horas.

2. Biblioteca de cDNA

A biblioteca de cDNA utilizada já estava disponível em nosso laboratório e foi construída em λ gt10, utilizando cDNAs sintetizados a partir de RNA poly A⁺ extraído de glândulas salivares no período em que os pufes de DNA são formados (E7- E7+16 horas) (MONESI et al., 1995).

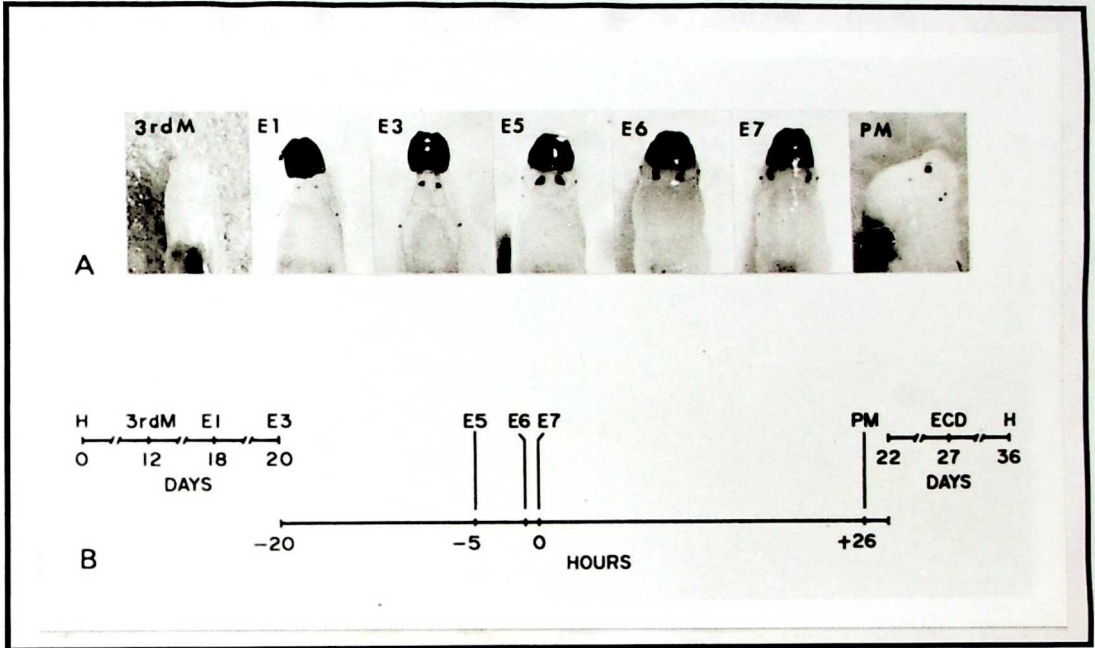


Figura 1 - A. Estágios do desenvolvimento de *B. hygida*. Fotografia de larvas na 3ª muda (3rdM), no quarto estágio larval com seus padrões de manchas oculares (vista dorsal) e na muda pupal (PM) (vista lateral). **B. Ciclo de vida.** A larva passa pela terceira muda 12 dias após a eclosão (H). Durante o 18º dia após a eclosão (6º dia do 4º estágio) tem início o aparecimento das manchas oculares (E1). Essas manchas mudam de forma tamanho e posição fornecendo um marcador útil do estágio de desenvolvimento, na segunda metade do 4º estágio larval. O padrão E3 coincide com o período em que as larvas abandonam a comida e começam a construir o casulo. Nas 46 horas que se seguem ocorrem mudanças claras no padrão dos pufes nos cromossomos politênicos da glândula salivar. Os pufes de DNA se desenvolvem neste período. O padrão de mancha ocular E7 dura apenas duas horas sendo bem confiável para a predição do padrão de pufes. Por isso a determinação de idades após este período é feita por horas após E7 (retirado de LAICINE et al., 1984).

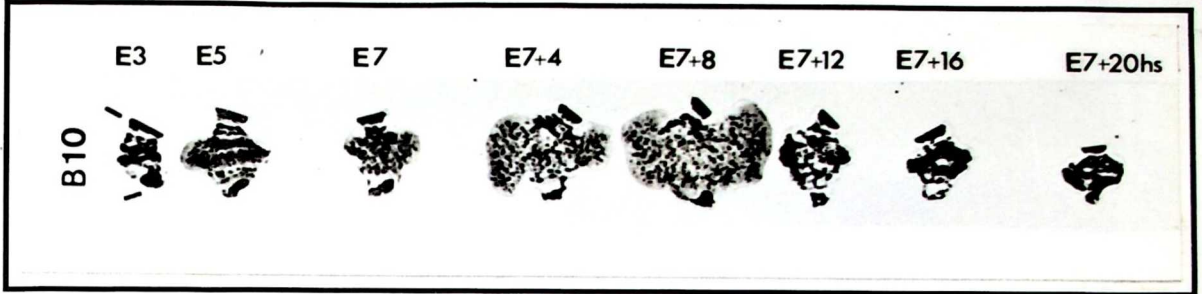


Figura 2 - Padrão de desenvolvimento do pufe de DNA B-10, no final do 4º estágio larval. O pufe de DNA B-10 apresenta máxima expansão em E7 + 8 horas e em E7 + 16 horas se encontra regredido (retirado de LAICINE et al., 1984).

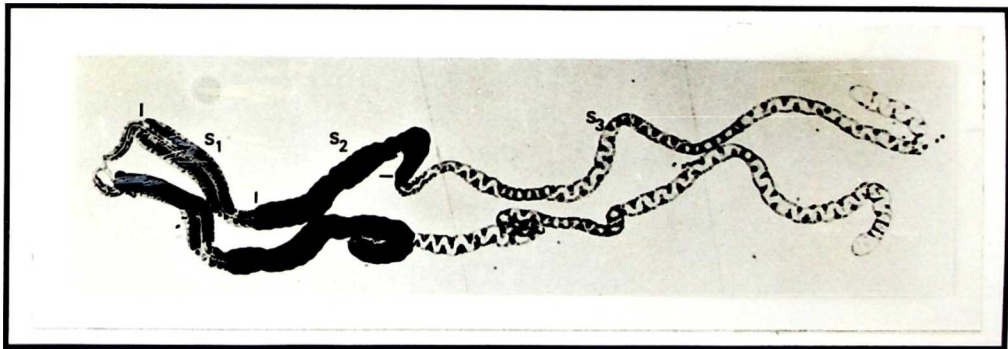


Figura 3 - Glândula salivar de *B. hygida* no 4º estágio larval. S1 - região anterior; S2 - região granulosa e S3 - região mucosa.



Figura 4 - Autorradiografia de cromossomos politênicos B das regiões glandulares S1, S2 e S3, depois de 15 minutos de incorporação de (³H)-timidina. Note que nas regiões S1 e S3 os sítios B-10 estão intensamente marcados, quando comparado com a região S2. Na região S2 esse pufe não se forma. (retirado de ALVES, dissertação de mestrado FMRP/USP, 1975).

3. Vetores e bactérias hospedeiras

3.1. Plasmídeos

- **pUC 19** - vetor utilizado para a sub-clonagem do fragmento genômico de 2 kb. Esse vetor contém o gene que confere resistência a ampicilina, a origem de replicação derivada de pBR322, e uma porção do gene *lacZ* de *E. coli* (*lacZ'*). Inserido neste gene há o "polylinker" com vários sítios para endonucleases de restrição. Após a clonagem de um segmento de DNA neste sítio o gene *lacZ'* é inativado permitindo a seleção pela cor de colônias portadoras de plasmídeos recombinantes (colônias brancas) e não recombinantes (colônias azuis) em placas contendo IPTG e XGal.

- **fagomídeo pT7T3 18 U** - vetor de seqüenciamento. Esse vetor contém: o gene *lacZ'*, que conforme descrito acima para o vetor pUC 19 permite a seleção pela cor de colônias portadoras de plasmídeos recombinantes em placas contendo IPTG e XGal, um "polylinker" com vários sítios para endonucleases de restrição derivado do pUC18 e os promotores T7 e T3 diametricamente opostos, flanqueando o "polylinker". Esse vetor contém ainda o gene de resistência a ampicilina, a origem de replicação do plasmídeo pBR322, permitindo que seja mantido como plasmídeo dupla fita em *E. coli*, e a origem de replicação do fago

f1 permitindo a obtenção de DNA fita simples, após a infecção das bactérias com o fago "helper" M13KO7 (ver figura 5).

Plasmídeos recombinantes:

- **pBB10**, contém o fragmento genômico de 2 kb no plasmídeo pUC 19, transfectado em *E. coli* linhagem TB-1 (FONTES et al., 1992).
- **pcB10**, contém o cDNA relativo ao pufe B10 no vetor de seqüenciamento pT7T3-18U, transfectado em *E. coli* linhagem XLBlue-I.
- **pgB10-(0,7) e pgB10-(1,3)**, contém os sub-fragmentos genômicos de 0,7 e 1,3 kb, no vetor de seqüenciamento pT7T3-18U, transfectado em *E. coli* linhagem XLBlue-I.

Foram utilizadas as linhagens de *E. coli*:

- **XL-Blue-1**: *supE⁺, lac⁻, hsdR17, recA1, F'(proAB⁺ lacI^q lacZΔM15)*. Hospedeira deficiente em recombinação. O F' permite a seleção de colônias brancas/azuis na presença do substrato X-gal e a super-infecção do bacteriófago M13. Contém ainda o epissoma que confere resistência a tetraciclina.
- **NM522**: *supE, thi, Δ(hsdMS-mcrB)5, Δ(lac-proAB), F'(proAB⁺ lacI^q lacZΔM15)*. Hospedeira deficiente em recombinação usada para a propagação do fago λgt10.
- **C600**: *supE44, hsdR, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, hflA150 [chr:Tn10 (tet^r)*. Hospedeira para o crescimento de fagos.
- **Q358**: *supE, hsdR, trpr, lacY*. Hospedeira para o crescimento de fagos.

3.2. Fagos

- **λcBB10-2**, fago recombinante, resultado da ligação do cDNA de cerca de 1,0 kb, relativo ao pufe B-10, em λgt10. Esse fago é propagado em *E. coli*, linhagem Q358.
- **M13KO7**, fago "helper" para a produção de fitas simples de DNA.

B. REAGENTES

1. Oligonucleotídeos sintéticos

O oligonucleotídeo utilizado no ensaio de "primer extension" foi gentilmente sintetizado pela técnica Marli Haydee Tavela, no laboratório do professor Dr Zago, Depto de Clínica Médica, FMRP/USP.

No ensaio com a RNase-H, para a caracterização do terminal 3' dos mRNAs, foi utilizado o oligonucleotídeo pd(T)12-18 (Pharmacia).

2. Padrões de peso molecular

- φX-174RFI (Pharmacia): digerido com *HaeIII*
- λDNA (Pharmacia): digerido com *HindIII*

- RNA 16S e 23 S (Boehringer)
- 1 kb ladder (BRL)

3. DNAs e RNAs carregadores

- DNA de salmão (Pharmacia, Sigma)
- DNA de *Calf thymus* (Sigma)
- RNA de levedura (Sigma)

4. Enzimas

- Deoxiribonuclease (DNase I) (Sigma)
- DNA polimerase-I (fragmento Klenow) (Pharmacia)
- Fosfatase alcalina (CIAP) (Gibco-BRL)
- Lisozima (Sigma)
- Proteinase K (Boehringer)
- Enzimas de restrição (Pharmacia, Amersham, Boehringer)
- Ribonuclease H (Gibco-BRL)
- Ribonuclease (RNase) (Sigma)
- RNasin (inibidor de RNase) (Pharmacia)
- T4-DNA ligase (Gibco-BRL)
- T4 polinucleotídeo Kinase (Gibco-BRL, Boehringer)
- Transcriptase reversa (M-MLV) (Gibco-BRL)

5. Reagentes Químicos

a) ácidos

- ácido acético (Merck)
- ácido bórico (Sigma)
- ácido clorídrico (HCl) (Merck)
- ácido tricloroacético (TCA) (Merck)

b) álcoois

- Etanol (Merck)
- glicerol (Merck)
- Isoamílico (Merck)
- Isopropanol (Merck)

c) antibióticos

- ampicilina (Sigma)
- kanamicina (Gibco/BRL)
- tetraciclina (Sanyal)

d) Corantes

- Azul de bromofenol (Merck)
- Brometo de etídio (Sigma)
- Cianol de xileno (Pharmacia)
- Hoeschst (H33258) (Boehringer)

e) Detergentes

CTAB	(Sigma)
Sarcosil	(TCI/Kasei)
SDS	(Merck)
Triton X-100	(Sigma)

f) Precursores radioativos

α - ³² P-deoxicitina-trifosfato	(Amersham).
α - ³⁵ S-deoxiadadina-trifosfato	(Amersham).
γ - ³² P-deoxiadenina-trifosfato	(Amersham).

g) Precursores não radioativos

deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP) (Pharmacia, GIBCO-BRL)
dideoxinucleotídeos-trifosfatados (ddNTP) (Pharmacia)

h) Resinas

DEAE-celulose	(Sigma)
Sephadex G-50	(Pharmacia)

i) Sais

Acetato de amônia	(Merck)
Acetato de sódio	(Baker)
Citrato-trissódico 2-hidratado	(Merck)
Cloreto de cálcio	(Merck)
Cloreto de magnésio	(Merck)
Cloreto de potássio	(Merck)
Cloreto de sódio	(Merck)
Fosfato monobásico de sódio	(Carlo Erba)
Fosfato dissódico	(Merck)
Sulfato de magnésio	(Merck)

j) Outros

Acrilamida	(Sigma)
Agarose	(Seakem, Gibco, Sigma)
Agarose LGT	(Nakalai Tesque)
BSA	(Sigma)
Bisacrilamida	(Sigma)
β -Mercaptoetanol	(Sigma)
Clorofórmio	(Merck)
Dimethyldiclorosilane	(LKB-Bromma)
Ditiotreitol	(Sigma)
DNA de esperma de salmão	(Sigma)
EDTA	(Merck, Baker)
Espermidina	(Sigma)
Éter	(Reagem)
Fenol	(Merck)
Ficoll 400	(Pharmacia)
Fluído de cintilação(6g PPO/l toluol)	(Sigma)

Formaldeído	(Merck)
Formamida	(Gibco/BRL, Merck)
Gelatina	(Difco)
Hidróxido de Sódio	(Merck)
8-hidroxiquinolina	(Merck)
Isopropil-thio- β -D-galactoside (IPTG)	(Sigma)
Isotiocianato de guanidina	(Sigma)
MOPS	(Sigma)
Persulfato de Amônia	(Sigma)
PIPES	(Sigma)
Polivinilpirrolidona	(Sigma)
TEMED	(Sigma)
Trizma	(Sigma)
Uréia	(Gibco-BRL)
X-gal	(Sigma)

k) "Kits"

- marcação do DNA por "random-primer" (Gibco/BRL)
- deleção do DNA para o seqüenciamento - (Pharmacia)
- seqüenciamento do DNA (T7 sequencing) (Pharmacia)

6) Meios de cultura

6.1) Meio Líquido

a) LB (Luria/Bertani) por litro

Bacto-triptona 10 g; extrato de levedura 5 g; NaCl 10 g. Acertar o pH para 7,5 com NaOH 4 N.

b) NZCYM por litro

Peptona caseína 10 g; extrato de levedura 5 g; NaCl 5 g; MgSO₄ 7H₂O 2 g. Acertar o pH para 7,5 com NaOH 4N.

c) 2XYT por litro

Bacto-triptona 16 g; extrato de levedura 10 g; NaCl 5 g. Acertar o pH para 7,0 com NaOH 5 N.

6.2) Meio de cultura contendo agar

a) 15 g/l de meio - agar para placas

b) 7,5 g/l de meio - agar para plaqueamento de fagos

6.3) Meio para estoque de fagos

a) SM por litro: NaCl 4,2g; MgSO₄ 7H₂O 2g; Tris-HCl 1M, pH 7,5, 5 ml e gelatina (2%) 5ml.

C. MÉTODOS

1. PREPARAÇÃO DE DNA E RNA

a) Extração de DNA e RNA de glândulas salivares

Método 1 - através da digestão com proteinase K.

Após dissecação, seguida da remoção do corpo gorduroso, as glândulas são fixadas em etanol 70% por aproximadamente 1 hora, no gelo, e armazenadas, a -70 °C, em tubo Eppendorf contendo glicerol e etanol (1:1). Após centrifugação a 12.000 rpm (microcentrifuga), por 2 min., o sobrenadante é descartado e as glândulas são lavadas com etanol, seguido de nova centrifugação, para a eliminação do glicerol remanescente. As glândulas são transferidas para tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, SDS 0,5% e 0,5 mg/ml de proteinase K) e submetidas a leve agitação, a temperatura ambiente, por 30 min. É acrescentado NaCl (para concentração final de 0,1M) e realizada a extração com fenol por uma vez, fenol e clorofórmio (1:1) por duas vezes e clorofórmio por uma vez. O DNA presente na fase aquosa é precipitado com a adição de 1/10 de volume de acetato de sódio 2M e 2 volumes de etanol absoluto. A fibra de DNA é retirada e transferida para solução de etanol 70% e o RNA deixado precipitar por uma noite, a -70 °C. Após recuperação por centrifugação, o RNA é dissolvido em 100µl de água bidestilada esterilizada. Ressuspende-se o DNA em cerca de 100 µl de TE (Tris-HCl pH8,0, 10mM; EDTA 1mM) e estima-se sua concentração através de espectrofluorimetria (excitação 358nm e emissão 484nm), após a reação com o corante Hoechst (H 33258). Cem pares de glândulas fornecem um rendimento de cerca de 60 µg de DNA. A concentração do RNA é determinada por espectrofotometria a 260 nm. O rendimento de 50 pares de glândulas salivares é cerca de 30-50 µg de RNA.

Método 2 - uso de isotiocianato de guanidina, segundo Chirgwin et al. (1979).

Após a coleta de cerca de 200 pares de glândulas salivares na idade desejada, conforme descrito acima, o sobrenadante contendo etanol/glicerol é descartado após a centrifugação a 12000 rpm (microcentrifuga), por 2 min.. Em seguida as glândulas são lavadas em etanol, seguido de nova centrifugação para a eliminação do glicerol remanescente. As glândulas são transferidas para homogeneizador com adição de 1-2 ml de tampão de lise (isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sódio 25 mM pH7,0, sarcosil 0,5% e β-mercaptoetanol 0.1 M). As glândulas são homogeneizadas por cerca de 20X, no gelo. O homogeneizado é transferido para tubo Eppendorf, adicionado acetato de sódio pH 4.0, para concentração final de 0,2 M e realizado extração com fenol:clorofórmio (1:1/5). Após forte agitação, incuba-se no gelo por 15 min. e a fase aquosa é recolhida por centrifugação por 5 min., a 12000 rpm. Em seguida, realiza-se uma segunda extração com fenol:clorofórmio (1:1). Após agitação vigorosa e centrifugação, a fase aquosa é recolhida, adicionado igual volume de isopropanol e o ácido nucleico é deixado precipitar por duas horas, a -20 °C. Após recuperação por centrifugação a 12000 rpm, por 30 min., a 4 °C, o precipitado é ressuscitado em 1 ml do mesmo tampão de lise mencionado acima, para a garantia da obtenção de RNA com alto grau de pureza. Em seguida adiciona-se igual volume de isopropanol e incuba-se por 1 hora, a -70

°C. Após a recuperação por centrifugação a 12000 rpm (microcentrífuga), por 20 min., a 4 °C, o RNA é lavado em etanol 70%, seco a vácuo e ressuscitado em 250 µl de água bidestilada estéril. A concentração do RNA é determinada por espectrofotometria a 260. O rendimento de 50 pares de glândulas salivares é cerca de 40-60 µg de RNA.

b) Mini-preparação do DNA de fago

Uma cultura (10 ml) de bactérias de *E. coli*, linhagem C-600, na fase logarítima de crescimento (veja métodos 2c, pg.26) é centrifugada 10 min., 3000 rpm (2000g), a temperatura ambiente. As bactérias são ressuscitadas em 0,4 do volume em MgSO₄ 10 mM, ajustando-se em seguida a DO₆₀₀ da suspensão para 0,5 com MgSO₄ 10 mM. Seiscentos microlitros desta suspensão de bactérias são inoculados com cerca de 10⁵ pfu/ml de fagos e a mistura é incubada a 37 °C, por 20 min.. Em seguida, essa mistura é transferida para 10 ml de NZCYM e incubada sob agitação a 250 rpm por cerca de 12-16 horas, a 37 °C, para a obtenção do lisado. Ao lisado obtido adicionam-se 600 µl de clorofórmio e agita-se o frasco por 5 min. O lisado é então centrifugado 2 a 3 vezes a 3000 rpm (2000g), por 20 min., para a remoção das bactérias. Em seguida, a suspensão de fagos é centrifugada a 25000 rpm (Ti-50, Beckman), por duas horas, a 4 °C. Os fagos são então ressuscitados em 360µl de SM (ver material, sessão 6.3), aos quais adicionam-se 40 µg de proteinase K, EDTA (concentração final 25 mM) e SDS (concentração final 8 %). Incuba-se a preparação a 65 °C, durante 1 hora. A seguir, são feitas as seguintes extrações: duas vezes com igual volume de fenol, duas vezes com fenol:clorofórmio (1:1) e uma vez com clorofórmio. A separação das fases fenólica e aquosa é realizada por centrifugação a 12000 rpm (microcentrífuga), por 5 min. O DNA presente na fase aquosa é precipitado com 1/10 volume de acetato de sódio 2M (pH 5,2) e dois volumes de etanol. A fibra de DNA é lavada em etanol 70% e dissolvida em 50µl de TE.

c) Mini-preparação do DNA plasmidial

Uma colônia da bactéria em questão, ou 50 µl do estoque, são inoculados em 3 ml de LB contendo o antibiótico apropriado e incubado, sob agitação, a 37 °C, durante a noite. As bactérias presentes em 2,5 ml dessa cultura são coletadas por centrifugação na microcentrífuga, durante 3 min.. As bactérias são ressuscitadas gentilmente em 300 µl de solução STET (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 50mM; glicose 8% e Triton X100 0,1%) e incubadas com lisozima (3 mg/ml) por 10 min., a temperatura ambiente. Em seguida, a preparação é fervida por 90 seg. e o grumo constituído de DNA bacteriano e proteínas pode ser retirado com o auxílio de um palito estéril, após a centrifugação, por 10 min. O DNA plasmidial é precipitado pela adição de CTAB (para concentração final de 0,5 mg/ml). Após centrifugação por 5 min., o ácido nucleico é ressuscitado em 300 µl de NaCl 1.2 M e reprecipitado pela adição de 2,5 volumes de etanol P.A. O precipitado é recolhido após centrifugação por 10 min., lavado em etanol 70%, seco a vácuo por 10 min. e dissolvido em 20 µl de TE.

d) Digestão com enzimas de restrição.

O DNA é digerido com a enzima de restrição apropriada, segundo as condições recomendadas pelo fabricante. Após a digestão, a preparação é extraída com igual volume de fenol:clorofórmio (1:1) e o DNA, após precipitação em etanol, é dissolvido em TE.

2. PROPAGAÇÃO E MANUTENÇÃO DE BACTÉRIAS E FAGOS

a) Obtenção de colônia de bactéria isolada

Um frasco de 25 ml de meio líquido é inoculado com 1 ml da bactéria estoque e incubado a 37 °C, por 12-14 horas, sob agitação. Uma alça de platina, após esterilização em chama, é mergulhada no meio contendo a bactéria e esfregada na superfície de uma placa de agar a 1,5% em meio LB. A placa é invertida e incubada a 37 °C, por 16-24 horas. Colônias bem separadas são geralmente vistas na área final do esfregaço.

b) Estoque de bactéria

Um frasco contendo 3 ml de meio líquido é inoculado com 1 colônia de bactéria e incubado a 37 °C, por 12-14 horas, sob agitação. Aliquotas de 200 µl dessa cultura são distribuídas em tubos Eppendorf e a cada tubo são adicionados 100 µl de glicerol 70%, previamente esterilizado por autoclavagem. Essa suspensão é misturada com o auxílio de um vórtex e armazenada à -20 °C, ou -70 °C, por alguns anos, sem que as bactérias percam a viabilidade.

c) Preparo da bactéria para plaqueamento

Vinte e cinco mililitros de meio líquido, em um Erlenmeyer de 125 ml, são inoculados com bactérias do estoque glicerinado e incubados a 37 °C, durante a noite, sob agitação. Meio mililitro dessa cultura é adicionado a outros 25 ml de meio líquido fresco e incubado a 37 °C, sob agitação, por cerca de 1:30 a 2 horas, tempo suficiente para que a cultura atinja a fase logarítmica de crescimento. Essa cultura é usada para o plaqueamento do fago.

d) Plaqueamento do fago

É preparada uma série de diluições (10^{-2} , 10^{-3} ...) do fago estoque, alíquotas de 100 µl de cada diluição colocadas em tubos Eppendorf e misturadas com 100-200 µl da cultura de bactéria na fase logarítmica de crescimento. Essa mistura é incubada a 37 °C, por 20 min., e transferida para tubo contendo 3 ml de agar a 0,75%, fundido e mantido a 48 °C. Com movimentos rápidos, o agar é misturado à suspensão de bactéria e fago e espalhado sobre a placa de agar a 1,5%, pré-aquecida a 37 °C. Após a solidificação do agar de cima, as placas são invertidas e incubadas a 37 °C, por cerca de 12 a 18 horas. Após esse tempo, as placas de lise podem ser contadas para cálculo do título de fagos, expresso em unidade formadora de placa por mililitro (pfu/ml), ou podem ser coletadas isoladamente.

e) Coleta de placas de lise

As placas de lise escolhidas são retiradas com um tubo de vidro fino, equipado com um bulbo em uma das extremidades para a sucção, ao interior do tubo, da placa escolhida. Cada placa é então transferida para um tubo contendo 1 ml de SM e 50 µl de clorofórmio. O tubo é deixado uma hora à temperatura ambiente para que os fagos se difundam para fora do agar. Uma placa média resulta em 10^6 a 10^7 partículas infecciosas de fagos que podem ser estocados indefinidamente a 4 °C em SM, na presença de clorofórmio.

f) Amplificação do fago e preparo de estoque

Cerca de 10^5 pfu são misturadas com 200 µl de uma cultura de bactéria na fase logarítmica de crescimento. A mistura é incubada a 37 °C, por 20 min.. Em seguida, essa mistura é transferida para tubo contendo 3 ml de agar a 0,75%, e imediatamente espalhada em placa de agar a 1,5%, pré-aquecida a 37 °C. Após cerca de 18 horas de cultura, para obtenção de lise confluyente, adiciona-se 5 ml de SM e a placa é mantida a 4 °C, por várias horas, para que as partículas de fagos difundam para o SM. O SM é então recolhido com pipeta Pasteur e transferido para tubos de centrifuga, ao qual adiciona-se 0,1 ml de clorofórmio. A suspensão de fago recolhida é centrifugada a 3000 rpm (2000g), por 15 min., a 4 °C. Adiciona-se clorofórmio (concentração final 0,3%) ao sobrenadante e os fagos em suspensão são armazenados a 4 °C, por vários anos.

3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E DE ACRILAMIDA

a) Gel de Agarose neutro

Para a análise das preparações de DNA de plasmídeos e do DNA de fagos a eletroforese é feita em gel de agarose neutro, a 1,0-1,5%. A agarose é fundida em tampão tris-acetato 0,04M e EDTA 1mM, pH 8,0, no forno microondas, e despejada sobre uma placa horizontal de dimensão 6 X 5,5 cm ou 6 X 11 cm, devidamente vedada. Após solidificação da agarose, a placa é transferida para cuba de eletroforese, contendo o mesmo tampão tris-acetato. Em cada poço são aplicados 10 µl da amostra contendo 8 µl de DNA dissolvido em tampão TE e 2 µl do tampão de aplicação (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol). A eletroforese é realizada à voltagem constante de 100 V, durante 30-40 minutos. Em seguida, o gel é corado no mesmo tampão tris-acetato contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídeo, por 10 min. O DNA é visualizado através de iluminação com UV a 300 nm.

b) Gel de Agarose desnaturante

Para análise do RNA total da glândula salivar a eletroforese é feita em gel de agarose desnaturante, a 1,5%. A agarose é fundida em tampão MOPS 0,2M, pH 7,0, contendo acetato de sódio 5 mM, EDTA 1 mM. A temperatura do gel liquefeito é deixada abaixar até aproximadamente 65 °C e então adiciona-se formadeído para concentração final de 6,5%. O gel é despejado rapidamente sobre uma placa horizontal de dimensão 11 X 14 cm, devidamente vedada.

Após a solidificação do gel, a placa é transferida para cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão MOPS. As amostras são preparadas em tampão MOPS contendo 50% de formamida e 6,5 % de formaldeído. As amostras são aquecidas por 10 min., a 56 °C, seguido da adição de 1µl de brometo de etídio (1µg/ml). A eletroforese é realizada a voltagem constante de 80V, durante 6-7 horas. A migração do RNA é visualizada através de iluminação com UV a 300 nm.

c) Gel de poliacrilamida/uréia

Para análise dos produtos das reações de seqüenciamento e dos produtos das reações de "primer extension", a eletroforese é feita em gel de poliacrilamida desnaturante. Uma solução contendo acrilamida 5,7%, bisacrilamida 0,3%, uréia 8 M em tampão TBE (ácido bórico 0,056M, Tris 0,089M, pH 8.8 e EDTA 1mM) é filtrada através de membrana de 0,45 µm e deaerada por 1 min. Em seguida, adiciona-se TEMED para concentração de 0,08%, persulfato de amônia para concentração de 0,05 % e despeja-se a solução em uma placa vertical de dimensão 40 X 30 cm, devidamente vedada. Após a polimerização do gel a placa é transferida para cuba de eletroforese (LBK-Bromma), contendo o mesmo tampão Tris-borato. Em cada poço são aplicados 2-3 µl da amostra, previamente aquecida por 2-3 min., a 100 °C. A eletroforese é realizada a potência constante de 60 W, durante 1:30-5 horas. Terminada a eletroforese, o gel é aderido a uma folha de papel 3MM, seco por 2 horas, a 80 °C e exposto ao filme de raio-X (hyperfilm MP/Amersham) por 24-48 horas, a temperatura ambiente, em cassete munido de intensificador.

Para a análise da qualidade dos oligonucleotídeos sintéticos a eletroforese é feita em gel de poliacrilamida sob as condições descritas acima com duas modificações: 1) a concentração de acrilamida é 20%; 2) a eletroforese realizada a potência constante de 45W, durante cerca de 3 horas.

4. TRANSFERÊNCIA DE DNA E RNA PARA FILTROS DE NITROCELULOSE

a) Transferência das placas de lise para filtro de nitrocelulose

Após incubação das placas de cultura, a 4 °C, por 2 horas, o filtro de nitrocelulose (Schleicher + Schull, BA85/20) é colocado sobre a placa, por dois minutos. O filtro é devidamente marcado para orientação. Em seguida, o filtro é retirado com ajuda de uma pinça e submerso seqüencialmente em: solução de desnaturação (NaOH 0,5M e NaCl 1,5M) por 1 minuto, solução de neutralização (Tris HCl 0,5M, pH 8.0 e NaCl 1,5M) por 5 min. e dois banhos de 2X SSC (NaCl 0,3 M e citrato de sódio 0,03 M pH 7,0), 5 minutos cada. Após secagem ao ar, os filtros são colocados entre folhas de papel Whatmann 3MM, embrulhados em papel de alumínio e incubados a 80 °C, por duas horas.

b) Transferência de RNA para filtros de nitrocelulose ("northern blot")

Após a eletroforese, o gel é incubado em 20X SSC (NaCl 3 M, citrato de sódio 0,3 M, pH 7,0) por 30 min., com agitação. O "blot" é montado da seguinte

forma: o gel é colocado sobre 3 papéis 3MM (de tamanho 1 cm maior que o gel, na largura e no comprimento) previamente mergulhados em 20X SSC. Sobre o gel são colocados o filtro de nitrocelulose e 2 papéis 3MM, do tamanho exato do gel, umedecidos em 2X SSC. Os papéis 3MM abaixo do gel são conectados a um reservatório contendo 20X SSC. Em cima desse bloco são colocadas várias folhas de papel absorvente e um peso de aproximadamente 0,5 Kg. Um parafilme é colocado entre as bordas do gel e do papel 3MM, para evitar contato entre o reservatório de 20X SSC e os papéis acima do gel. Após 15-20 horas de transferência, o "blot" é desmontado e o filtro de nitrocelulose é mantido por 5 horas, a 80 °C.

c) Transferência de DNA para filtros de nitrocelulose ("Southern blot")

Após a eletroforese do DNA, o gel é tratado seqüencialmente com HCl 0,25 N, por 1 min., um banho em água bidestilada, dois banhos em solução de desnaturação por 5 a 10 min., um banho em água bidestilada, três banhos em solução de neutralização por 5 a 10 min. e um banho em SSC 20X por 30 min.. O "blot" é preparado como descrito acima. Neste caso, após a transferência, para a fixação do DNA por aquecimento, o filtro é incubado por 2 horas a 80 °C.

5. PREPARO DAS SONDAS

a) Preparo do fragmento de DNA para a marcação em gel de agarose

O método utilizado emprega agarose de baixo ponto de fusão. Após separação dos fragmentos de DNA, por eletroforese em agarose de baixo ponto de fusão (LGT) a 1,0%, a banda contendo o fragmento de interesse é cortada e transferida para tubo Eppendorf de peso conhecido. Avalia-se o peso do fragmento de gel coletado e adiciona-se água numa razão de 3 ml H₂O/g de gel. O tubo é então colocado em água fervente por 7 min., para que a agarose se dissolva e o DNA se desnature. O DNA pode ser estocado a -20 °C até o momento da marcação.

b) Marcação do DNA pela reação de "multiprimer"

Os fragmentos de DNA foram marcados radioativamente pela reação de "multiprimer", utilizando-se o Kit da Amershan RNP 1600Z. A reação foi realizada em um volume final de 50 µl contendo cerca de 25-50 ng de DNA, previamente desnaturado, (presente em agarose, num volume de 21 µl), 0,04 mM de cada deoxinucleotídeo frio, 0,05 mM de hexanucleotídeos ("primer"), 50 µCi de ³²P-CTP e 2 unidades de DNA polimerase I (Klenow fragment) de *E. coli*. A reação é incubada por no mínimo 2 horas, à temperatura ambiente, e interrompida pela a adição de EDTA (para concentração final de 20 mM) e incubada a 60 °C, por 10 min.. Em seguida, adiciona-se 50 µg RNA de levedura e completa-se o volume para 100 µl com STE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM e NaCl 0,1 M). A separação dos deoxinucleotídeos não incorporados é realizada em uma coluna de Sephadex G-50, equilibrada com STE, construída em uma seringa hipodérmica de 1 ml. A amostra é aplicada à coluna e

submetida a centrifugação a 2000 rpm, por 50 segundos, utilizando uma centrífuga de mesa.

6. HIBRIDAÇÃO EM FILTROS DE NITROCELULOSE

Os filtros de nitrocelulose contendo DNA ou RNA são incubados por cerca de 30 min. em 6X SSC (ver acima SSC 20 X, seção 4b) e, em seguida, são colocados em sacos plásticos com 5-10 ml de solução de hibridação (formamida 50%, SSC 5X, Denhardt's 1X [Ficoll 0,02%, polivinilpirrolidona 0,02% e BSA 0,02 %], SDS 0.1%, tampão fosfato 50 mM, pH 6.3 e DNA carregador para concentração final de 100 µg/ml).

O saco é selado e incubado por 24 a 48 horas, a 42 °C. Antes da adição da sonda, a solução de hibridação é substituída por solução fresca e, em seguida, adicionados cerca de 5×10^5 cpm/ml de sonda, previamente desnaturada por aquecimento, a 100°C, por 5 min.. A hibridação é realizada a 42 °C por 18 horas no mínimo.

Após hibridação, os filtros são lavados seqüencialmente com:

a) filtros de DNA: 2 banhos de SSC (2X) contendo 0.1% de SDS, por 15 min., à temperatura ambiente e dois banhos de SSC (2X) contendo 0,1 % SDS, por 30 min. a 60 °C. Cada banho é realizado em um volume de 500-1000 ml.

b) filtros de RNA: 2 banhos de SSC (2X) contendo 0.1% de SDS, por 15 min., a temperatura ambiente e dois banhos de SSC (1X) contendo 0.1% de SDS, por 1 hora a 50 °C. Cada banho é realizado em um volume de 500-1000 ml.

Os filtros são então secos ao ar e expostos a filmes de raios X da Kodak (T-MAT S ou X-OMAT) ou da Amersham (Hyperfilm-MP) a -70 °C, por no mínimo 7 horas, em cassete munido de intensificador.

A regeneração dos filtros de nitrocelulose é obtida por incubação do filtro durante 30 min. em água destilada, a 100 °C.

7. SUB-CLONAGEM EM PLASMÍDEO

a) Preparação do DNA do vetor

Linearização do vetor: o DNA do vetor é linearizado com a enzima de restrição apropriada, segundo as condições recomendadas pelo fabricante. Após a digestão é realizada a extração com igual volume de fenol:clorofórmio (1:1). A fase aquosa é recolhida após centrifugação em microcentrífuga e o DNA precipitado com 1/10 de volume de acetato de sódio 2M, pH 5,2 e 2 volumes de etanol. O precipitado é recolhido por 10 min. de centrifugação, lavado em etanol 70%, seco a vácuo por 10 min., e dissolvido em 100 µl de tampão da fosfatase alcalina (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3; ZnSO₄ 1 mM; MgCl₂ 1 mM e espermidina 1 mM).

Defosforilação do vetor: O DNA previamente linearizado e dissolvido no tampão da fosfatase alcalina é incubado com 0,085 U de fosfatase alcalina de intestino de bezerro (CIP) por 60 min., a 37 °C. A reação é interrompida adicionando-se EDTA para concentração final de 6 mM e a enzima desnaturada por aquecimento a 85 °C, por 15 min.. Após a desnaturação da enzima realiza-

se as seguintes extrações: 1 X com igual volume de fenol; 1 X com fenol:clorofórmio e 1 X com clorofórmio. A separação das fases fenólica e aquosa é realizada por centrifugação a 12000 rpm (microcentrífuga), por 5 min.. O DNA é precipitado com 1/10 volume de acetato de sódio 2M, pH 5,2 e dois volumes de etanol. O precipitado é recolhido por 20 min. de centrifugação a 12000 rpm (microcentrífuga), a 4°C, lavado em etanol 70%, seco a vácuo por 10 min., e dissolvido em 10 µl de TE.

b) Preparação do inserto de DNA

Isolamento do fragmento de DNA

O método utilizado para o isolamento de fragmentos de DNA emprega eletroforese em agarose de baixo ponto de fusão. Após a separação dos fragmentos de DNA, por eletroforese em agarose LGT a 1,0%, a banda contendo o fragmento de interesse é retirada e transferida para tubo Eppendorf. Em seguida, o tubo contendo a banda é incubado a 68 °C, durante 15 min., para a fusão da agarose, e adicionado acetato de sódio para concentração final de 0,2 M. A extração da agarose é realizada com a adição de igual volume de fenol a 68 °C, com forte agitação, por 5 min. A fase aquosa é recolhida após centrifugação em microcentrífuga, e o DNA precipitado com 2 volumes de etanol, a -70 °C, por no mínimo 24 horas.

c) Reação de ligação

A reação de ligação do fragmento isolado ao vetor de clonagem é realizada incubando-se o vetor linearizado/defosforilado e o fragmento, numa relação 1:2, em 12 µl de solução de reação contendo: BSA(1mg/ml), Tris-HCl 50mM, pH 7,6, MgCl₂ 10mM, DTT 10mM, ATP 1mM e 0,5-1 Unidade de T4 ligase. Essa mistura é incubada a 12 °C, por 12-18 horas, ou à temperatura ambiente por 2 horas, e pode ser armazenada a -20 °C por um tempo.

d) Preparação de bactérias competentes

Uma colônia da bactéria em questão é transferida para 50 ml de meio LB e incubada a 37 °C, sob agitação, durante a noite. Meio mililitro dessa cultura é adicionado a outros 100 ml de meio líquido fresco e incubado a 37 °C, sob agitação, por cerca de 1:30 a 2 horas, tempo suficiente para que a cultura atinja a fase logarítmica de crescimento. A suspensão de bactérias é transferida para tubos de centrifuga, incubada no gelo por 1 hora e centrifugada a 1600 x g por 10 min.. As bactérias são cuidadosamente ressuspensas em 7,5 ml de CaCl₂ 70 mM em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e incubadas no gelo por 45 min. Esta suspensão é submetida a nova centrifugação a 1100 x g por 5 min. e as bactérias ressuspensas em um volume de 1,4 ml da mesma solução de CaCl₂ (previamente esfriada) e em seguida adicionado 0,35 ml de glicerol. Alíquotas de 400 µl são colocadas em tubos Eppendorf, imersos imediatamente no N₂ líquido e levados a -70 °C, onde ficam armazenados por alguns meses, sem que as bactérias percam a viabilidade.

e) Transformação

As bactérias competentes armazenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ são deixadas descongelar no gelo, por cerca de 30-40 min. A cada alíquota de $100\text{ }\mu\text{l}$ de bactérias adiciona-se CaCl_2 $0,85\text{ mM}$, MgCl_2 $0,046\text{ mM}$ e PEG $2,5\%$ e mistura-se cinco microlitros da reação de ligação. Essa mistura é primeiramente incubada no gelo por 20 min., em seguida é submetida a choque térmico a temperatura ambiente por 10 min., transferida para $600\text{ }\mu\text{l}$ de meio LB e incubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min.. Alíquotas de $300\text{ }\mu\text{l}$ são espalhadas em placa de LB contendo o antibiótico apropriado, $8\text{ }\mu\text{l}$ de IPTG (100 mg/ml) e $80\text{ }\mu\text{l}$ de XGal (10 mg/ml), previamente espalhados sobre a superfície da placa. Após o espalhamento das bactérias as placas são incubadas durante a noite, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. As colônias portadoras de plasmídeo recombinante são detectadas por apresentarem coloração esbranquiçada. Após análise do DNA, por eletroforese em gel de agarose, para confirmação de que a bactéria é portadora do plasmídeo contendo o fragmento em questão, são preparados estoques das bactérias da maneira descrita acima (veja 2b).

A sub-clonagem do cDNA e dos sub-fragmentos genômicos ($1,3$ e $0,7\text{ kb}$) no vetor pT7T3 é mostrada na figura 5.

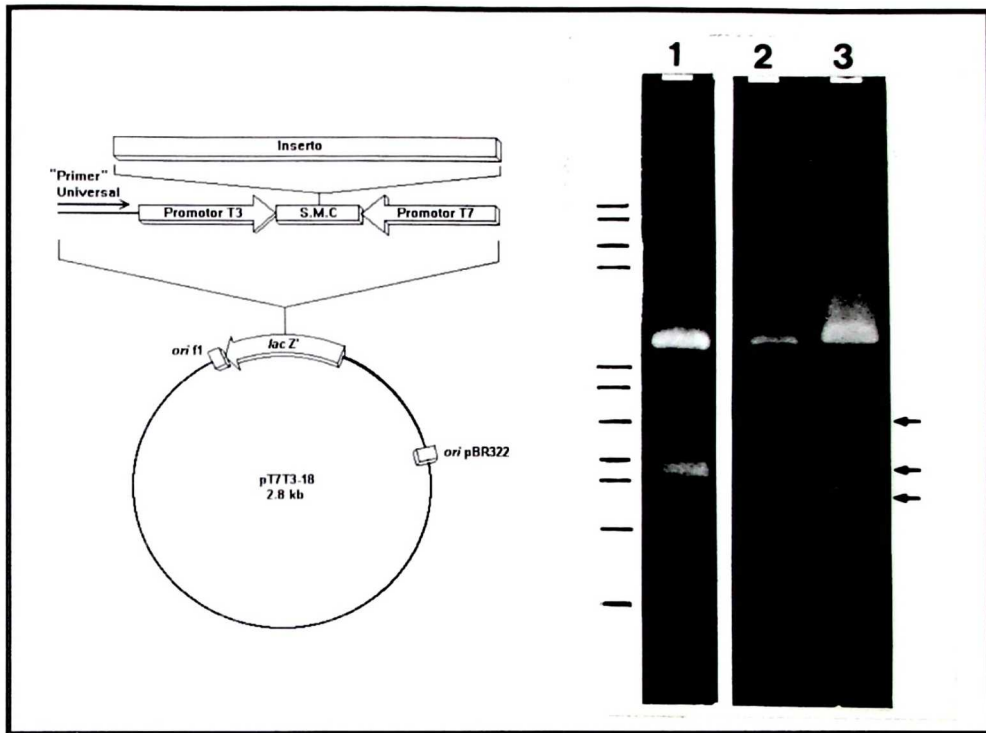


Figura 5 - Sub-clonagem do cDNA de 1,0 kb e dos sub-fragmentos genômicos (1,3 e 0,7 kb) no vetor de seqüenciamento pT7T3-18U. À esquerda - Representação esquemática do vetor de seqüenciamento pT7T3-18U. À direita - Gel de agarose corado com brometo de etídeo, após a eletroforese do DNA dos sub-clones. A raia 1 mostra o DNA do clone pcB10 após a digestão com *EcoRI*; a raia 2 o DNA do clone pgB10 (1,3 kb) após a digestão com *EcoRI* + *SalI* e a raia 3 o DNA do clone pgB10 (0,7 kb) após a digestão com *EcoRI* + *SalI*. A banda maior de cerca de 2,8 kb é o DNA do fagomídeo pT7T3-18U e as demais bandas os respectivos insertos. As setas à direita indicam os insertos de 1,3 kb, 1,0 kb e 0,7 kb, respectivamente. Como marcador de peso molecular foi utilizado o DNA do fago λ digerido com *HindIII* (fragmentos 23,5; 9,7; 6,6; 4,3; 2,2; 2,0 kb) e do fago ϕ X-174 digerido com *HaeIII* (fragmentos 1,353; 1,078; 0,872 e 0,603 kb). A mancha inferior em torno da posição de migração de 0,5 kb nas raia 2 e 3 são resíduos do RNA da bactéria.

8. DELEÇÃO POR EXONUCLEASE III

Para o seqüenciamento do DNA de interesse utilizou-se a estratégia de obtenção de deleções unidirecionais, baseado no controle da digestão do DNA pela exonuclease III. Essa enzima tem a propriedade de remover progressivamente nucleotídeos de uma das fitas da seqüência alvo (a fita contendo a extremidade 3' não protusa), criando uma região de fita simples que pode ser removida posteriormente pela ação da S1 nuclease. Devido ao fato da exonuclease III ser processiva e ter uma taxa uniforme de digestão do DNA, as deleções são geradas após a remoção, a intervalos regulares, de aliquotas submetidas a digestão com exonuclease III. Inicialmente, para que seja permitida a ação da exonuclease III na direção do inserto, o sub-clone contendo o inserto de interesse é digerido com duas enzimas do "polylinker" do vetor (veja esquema do vetor na figura 5). Uma das enzimas deve gerar terminais 3' protuso e a outra 3' não protuso. No caso do sub-clone contendo o cDNA utilizou-se as enzimas *Pst*I+*Bam*HI e no caso dos sub-clones contendo os fragmentos genômicos de 1,3 kb e 0,7 kb utilizou-se as enzimas *Sph*I+ *Sal*I. A reação de digestão com as enzimas escolhidas é realizada segundo as condições recomendadas pelo fabricante em um volume final de 25 µl, e interrompida por aquecimento a 70 °C, por 10 min.. Ao DNA digerido adiciona-se 20 µl de uma solução contendo 8µl de tampão ExoIII (fornecido pelo fabricante), 8 µl de NaCl 0,3 M e 8µl de água bidestilada estéril. Esta reação é incubada a 25 °C, por 2 min.. À essa mistura adiciona-se 1µl de Exonuclease III e incuba-se à 25 °C. A cada 3 ou 5 min. aliquotas de 2µl são transferidas para tubos devidamente marcados, contendo 3µl do tampão da S1 nuclease (fornecido pelo fabricante) e 1µl de S1 nuclease e mantidos no gelo. Após a coleta de todas as aliquotas, os tubos são incubados a temperatura ambiente por 30 min., para a ação da S1 nuclease. Essa enzima elimina as fitas simples de DNA encontradas, sendo portanto eliminadas as fitas de DNA complementares às deletadas e também as extremidades 3' protusas do vetor. A reação é interrompida adicionando-se 1 µl de solução contendo Tris 10 mM, pH 8.0 e EDTA 1mM e incubando-se a amostra a 65 °C, por 3 min.. Feita a checagem das deleções por eletroforese em mini-gel de agarose a 1%, procede-se à religação das deleções escolhidas e a transformação. Em seguida, são escolhidas algumas colônias e realizado a preparação do DNA plasmidial de cada tempo de deleção, segundo o procedimento descrito em 1c. O DNA é analisado por eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA das deleções utilizadas no seqüenciamento do cDNA e dos sub-fragmentos genômicos de 1,3 kb e 0,7 kb é mostrado nas figuras 6, 7 e 8 respectivamente.

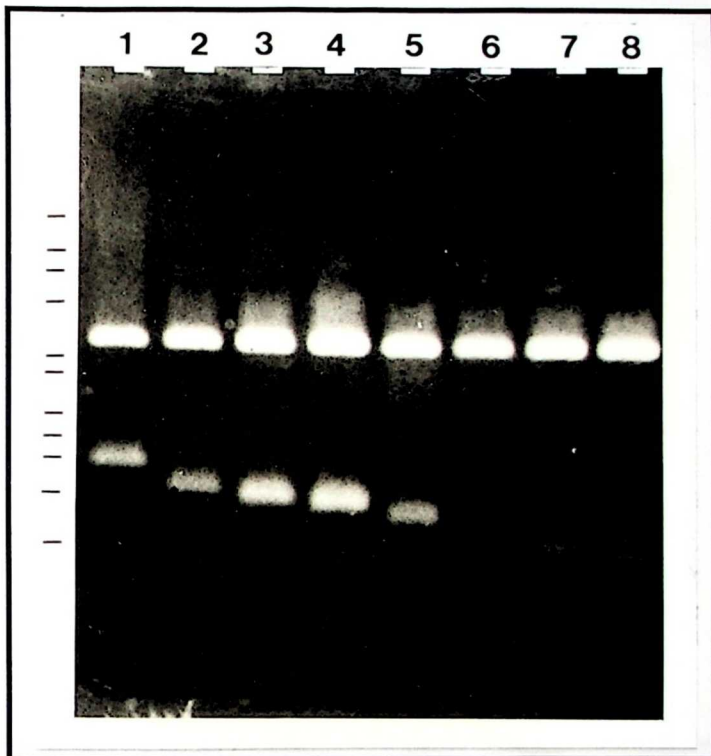
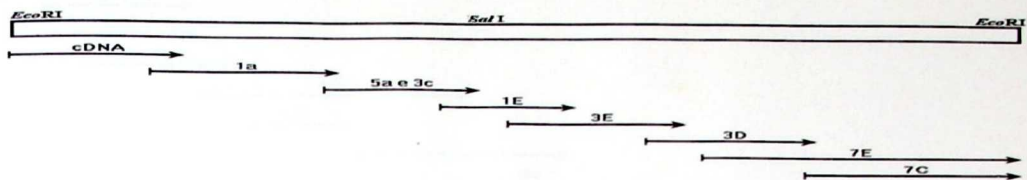


Figura 6 - Estratégia de seqüenciamento do cDNA de cerca de 1,0 kb. No topo está representado o fragmento de cDNA (retângulo aberto) com as deleções progressivas utilizadas para o seqüenciamento do cDNA (indicadas por setas). A extensão das setas indica a região seqüenciada em cada deleção. As deleções diferem no terminal 5' (região digerida pela exonucleaseIII) apresentando o mesmo terminal 3' (não representado no esquema). A foto mostra um gel de agarose, corado com brometo de etídeo, após a eletroforese do DNA dos sub-clones contendo DNA das deleções do cDNA, digerido com *EcoRI*+*Hind*III. As raias de 1 a 8 mostram o DNA dos sub-clones nomeados 1a, 5a, 3C, 1E, 3E, 3D, 7E e 7C, respectivamente. A banda maior de cerca de 2,8 kb é o DNA do fagomídeo pT7T3-18U e as demais bandas os respectivos fragmentos de cDNA deletados. Como marcador de peso molecular foi utilizado o DNA do fago λ digerido com *Hind*III (fragmentos 23,5; 9,7; 6,6; 4,3; 2,2; 2,0 kb) e do fago ϕ X-174 digerido com *Hae*III (fragmentos 1,353; 1,078; 0,872 e 0,603 kb).

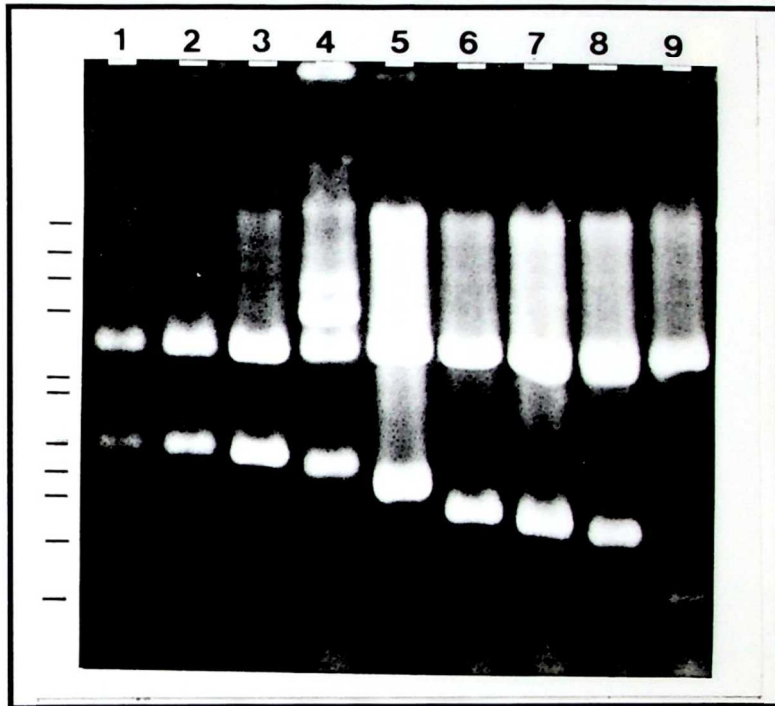
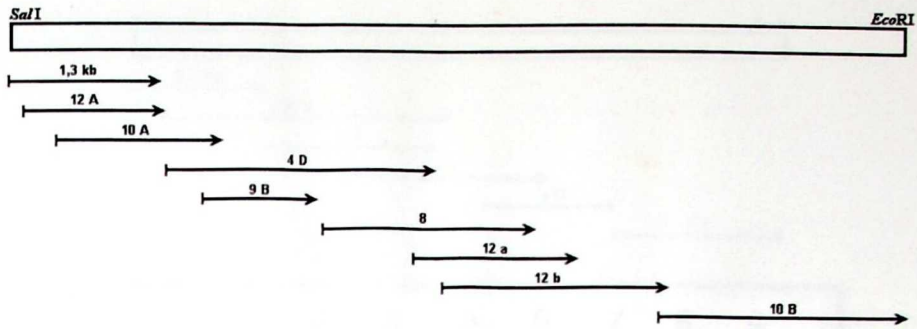


Figura 7 - Estratégia de seqüenciamento do sub-fragmento genômico de 1,3 kb. No topo está representado o sub-fragmento genômico de 1,3 kb (retângulo aberto) com as deleções progressivas utilizadas para o seqüenciamento do mesmo (indicadas por setas). A extensão das setas indica a região seqüenciada em cada deleção. As deleções diferem no terminal 5' (região digerida pela exonuclease III) e apresentam o mesmo terminal 3' (não representado no esquema). A foto mostra um gel de agarose, corado com brometo de etídeo, após a eletroforese do DNA dos sub-clones contendo as deleções do fragmento genômico de 1,3 kb, digeridos com *EcoRI*+*HindIII*. A raia 1 mostra o DNA do sub-clone pgB10-1,3 inteiro (não deletado). As raia de 2 a 9 mostram o DNA dos clones portando insertos deletados nomeados 12A, 10A, 9B, 4D, 8, 12a, 12b e 10B. A banda maior de cerca de 2,8 kb é o DNA do fagomídeo pT7T3 18-U e as demais bandas as respectivas deleções do fragmento de 1,3 kb. Como marcador de peso molecular foi utilizado o DNA do fago λ digerido com *HindIII* (fragmentos 23,5; 9,7; 6,6; 4,3; 2,2; 2,0 kb) e do fago ϕ X-174 digerido com *HaeIII* (fragmentos 1,353; 1,078; 0,872 e 0,603 kb).

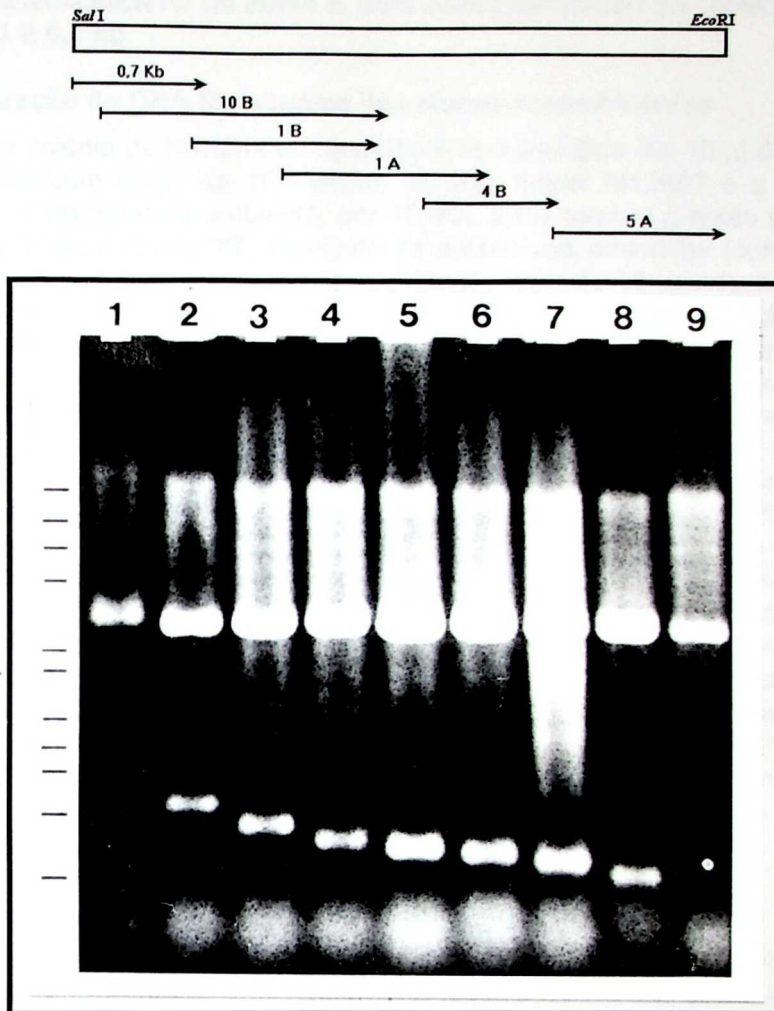


Figura 8 - Estratégia de seqüenciamento do sub-fragmento genômico de 0,7 kb. No topo está representado o sub-fragmento genômico de 0,7 kb (retângulo aberto) com as deleções progressivas utilizadas para o seqüenciamento do mesmo (indicadas por setas). A extensão das setas indica a região seqüenciada em cada deleção. As deleções diferem no terminal 5' (região digerida pela exonuclease III) e apresentam o mesmo terminal 3' (não representado no esquema). A foto mostra um gel de agarose, corado com brometo de etídeo, após a eletroforese do DNA dos sub-clones contendo as deleções do fragmento genômico de 0,7 kb, digeridos com *EcoRI*+*HindIII*. A raia 1 mostra o DNA do sub-clone pgB10-0,7 inteiro (não deletado). As raias de 2 a 9 mostram o DNA dos clones portando insertos deletados nomeados 10B, 1B, 1A, 2c, 7B, 6c, 4B, 5A. A banda maior de cerca de 2,8 kb é o DNA do fagomídeo pT7T3-18U e as demais bandas as respectivas deleções do fragmento de 0,7 kb. Como marcador de peso molecular foi utilizado o DNA do fago λ digerido com *HindIII* (fragmentos 23,5; 9,7; 6,6; 4,3; 2,2; 2,0 kb) e do fago ϕ X-174 digerido com *HaeIII* (fragmentos 1,353; 1,078; 0,872 e 0,603 kb).

9. SEQÜENCIAMENTO DO cDNA E DOS SUB-FRAGMENTOS GENÔMICOS DE 1,3 E 0,7 kb

a) Preparação do DNA fita simples dos clones recombinantes

Uma colônia da bactéria em questão é ressuspensa em 15 µl de meio LB e infectada com cerca de 10¹¹ pfu/ml do fago helper M13K07 e a mistura é incubada a temperatura ambiente, por 15 min. Essa mistura é então transferida para 500 µl de meio 2x YT, contendo os antibióticos ampicilina (concentração final de 100 µg/ml) e tetraciclina (concentração final de 12 µg/ml), no caso da linhagem XL-Blue1, e colocada a 37 °C, por 1 hora, para o crescimento da bactéria. Em seguida, essa suspensão de bactérias é transferida para 5 ml de meio 2x YT, contendo os antibióticos ampicilina, tetraciclina e kanamicina (concentração final de 70 µg/ml), e incubada por cerca de 12 a 16 horas para a produção do DNA fita simples, a partir da origem do fago filamentososo. Esse DNA é encapsulado em partículas virais, que são secretadas pela bactéria, ficando em suspensão no meio. As bactérias são então removidas por centrifugação a 12000 rpm (microcentrifuga), por 5 min., e o fago é precipitado pela adição de 0.2 ml de uma solução PEG (8000) 20% em NaCl 2,5 M e incubado a temperatura ambiente, por 15 min.. O precipitado é recolhido após centrifugação a 12 krpm, por 5 min., e ressuspensa em 100 µl de TE. Realiza-se então as seguintes extrações: duas vezes com igual volume de fenol e uma vez com fenol:clorofórmio (1:1). A separação das fases fenólica e aquosa é realizada por centrifugação a 12000 rpm por 5 min.. O DNA é reprecipitado com 1/10 volume de acetato de sódio 2 M, pH 5,2 e 2½ volumes de etanol, e mantido no gelo por 1 hora. O precipitado é recolhido por 15 min. de centrifugação, lavado em etanol 70%, seco à vácuo por 10 min., e ressuspensa em 50 µl de TE.

b) Método de seqüenciamento segundo Sanger et al., 1977

Todas as reações: hibridação do "primer" universal com o DNA fita simples; replicação com a enzima T7 polimerase e terminação da replicação através da incorporação de dideoxynucleotídeos, foram feitas de acordo com as condições do fabricante do kit utilizado para o seqüenciamento (Pharmacia).

A reação de hibridação do "primer" com o DNA simples fita é realizada em um volume final de 14 µl, misturando-se 10 µl do DNA fita simples (1,5 µg de DNA), 2 µl do "primer" universal (0.8 µM) e 2 µl do tampão de hibridação (fornecido pelo fabricante). A reação é incubada a 65 °C, por 2-5 min., e deixada por no mínimo 5 horas até que a temperatura atinja 37 °C. Ao DNA hibridado com o "primer" universal adiciona-se, 10 µCi de α-³⁵S-dATP, 1,5 U T7 DNA polimerase e 2 µl da solução "labelling mix" contendo os nucleotídeos dCTP, dGTP e dTTP. A reação de replicação na presença de α-³⁵S dATP é realizada durante 5 min., a temperatura ambiente. A síntese da cadeia é interrompida em quatro reações separadas, cada uma delas contendo um único dideoxynucleotídeo e os outros três deoxynucleotídeos. Essa reação é realizada em placas de ELISA, incubando-se por 5 min., a 37 °C. A reação é então interrompida pela adição de 5 µl de solução contendo EDTA 10mM, pH7,5 e

formamida deionizada (97,5%), podendo ser armazenada a -20 °C por um tempo.

10. ANÁLISE COMPUTADORIZADA DE SEQÜÊNCIAS

Foi utilizado o pacote de programas PC/GENE versão 6.01 (Intelligenetics, Mountain, CA) para a entrada dos dados de seqüência no computador e para sua análise. Os valores de porcentagem de identidade e similaridade entre seqüências foram obtidos usando o programa NALIGN, com os valores de pênaltes e pesos padronizados (*default*). Pesquisas no banco de genes (GenBank) foram realizadas com o uso do programa BLASTP 1,3.11MP que emprega o método desenvolvido por Altschul et al. (1990).

11. REAÇÃO DE "PRIMER-EXTENSION"

O ensaio para a determinação do sítio de início da transcrição foi realizado segundo o método de Ausubel et al. (1987), com modificações.

a) Marcação da extremidade 5' do oligonucleotídeo sintético.

O oligonucleotídeo utilizado nesse ensaio (indicado por duplo sublinhado na **figura 14**) não apresenta um grupo fosfato na extremidade 5' não necessitando, portanto, ser defosforilado.

A marcação do terminal 5' do oligonucleotídeo é realizada em um volume de 20 µl contendo 100 pmoles de oligonucleotídeo sintético, 50 µCi de ³²P-γ-ATP, Tris-HCl 50 mM pH7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 15 mM e 10U de T4 polinucleotídeo quinase. A reação se dá por 1 hora, a 37 °C. Em seguida são adicionados 10 µl de STE 10 X (Tris-HCl 0,1 M, EDTA 10 mM e NaCl 1 M), o volume completo para 100 µl com TE e realizado a extração com igual volume de fenol uma vez, seguida de uma segunda extração com clorofórmio. O DNA contido na fase aquosa é recolhido após centrifugação em microcentrífuga e armazenado a -20 °C.

b) Extensão do oligonucleotídeo com transcriptase reversa

O oligonucleotídeo marcado, cerca de 5x10⁵ cpm, é co-precipitado com 20-40 µg de RNA total em STE 1X (Tris-HCl 0,01 M, EDTA 1 mM e NaCl 0,1 M), e 2 1/2 volumes de etanol absoluto, por no mínimo 24 horas, a -20 °C. O precipitado é recolhido após centrifugação a 11000 x g por 20 min. a 4 °C, seco a vácuo e ressuspenso em 10 µl de TE contendo 0,25 M KCl. A desnaturação é realizada a 65 °C, durante 1 hora. O tubo Eppendorf é colocado em um tubo de ensaio e este em um Bequer de 1 litro mantido no banho a 65 °C. A hibridação do oligonucleotídeo com o RNA é realizado deixando a temperatura abaixar lentamente. Isso é feito mantendo primeiramente o Bequer por cerca de 15 min. a temperatura ambiente, em seguida o tubo de ensaio por 15 min. e finalmente apenas o tubo Eppendorf. Em seguida é realizada a reação de extensão do

oligonucleotídeo em um volume final de 35 μ l contendo 0,5 mM de cada dNTP, TrisHCl 40 mM pH8,3, KCl 75 mM, DTT 10 mM, $MgCl_2$ 3 mM, actinomicina D (50 μ g/ml) e 200 U de MMLV transcriptase reversa. A reação é incubada por 1 hora a 50 °C. O cDNA é precipitado com acetato de sódio para concentração final de 0.3 M e 2 volumes de etanol, a -20 °C, por no mínimo 24 horas. O precipitado é recuperado por centrifugação a 11000 x g por 30 min., a 4 °C, seco a vácuo e ressuspensão em 5 μ l de tampão de amostra para gel de seqüenciamento. As reações são analisadas em géis de seqüenciamento, (como descrito em 3c).

12. REAÇÃO COM RNase-H PARA OBTENÇÃO DE RNA POLI A⁻

Aproximadamente 20 μ g de RNA total são incubados com 0.2 μ g de oligonucleotídeo dT, na presença de KCl 0,1 M. Inicialmente realiza-se a desnaturação do RNA por incubação a 65 °C, durante 60 min., como descrito acima (ver seção 11b). O tubo Eppendorf é colocado em um tubo de ensaio e este em um Bequer de 1 litro mantido no banho a 65 °C. A hibridação do oligonucleotídeo com o RNA é realizado deixando a temperatura abaixar lentamente. Isso é feito mantendo primeiramente o bēquer por cerca de 15 min. a temperatura ambiente, em seguida o tubo de ensaio por 15 min. a temperatura ambiente e finalmente apenas o tubo Eppendorf. Em seguida é realizada a reação de digestão com RNase-H (que digere o RNA híbrido com DNA) em um volume final de 42 μ l contendo TrisHCl 20 mM pH 8.0, KCl 25 mM, $MgCl_2$ 28 mM, EDTA 0,5 mM, e 2,5 U de RNase-H. A reação é incubada por 30 min., a 37 °C. Em seguida, completa-se o volume para 300 μ l com TE e realiza-se uma extração com igual volume de fenol, seguida de uma segunda extração com fenol/clorofórmio (1:1), que é seguida de uma terceira extração somente com clorofórmio. O RNA deadenilado é precipitado com a adição de acetato de sódio para concentração final de 0.2 M e 2 volumes de etanol, a -70 °C, por no mínimo 24 horas. O precipitado é recuperado por centrifugação a 11000 x g, por 30 min., a 4 °C, seco a vácuo e ressuspensão em 10-20 μ l de tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose desnaturante (descrito em 3c, desta sessão). Após a eletroforese é feito o "northern blot" e RNAs específicos podem ser identificados por hibridação com sondas radioativas.

RESULTADOS

I. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CLONES DE cDNA RELATIVOS AO PUFEB10

Em estudos anteriores demonstramos que um fragmento genômico de 2 kb/*EcoRI*, localizado por hibridação *in situ* no pufe B10, é amplificado na glândula salivar e contém seqüências complementares a duas espécies de RNA, de cerca de 1,1 kb e 1,3 kb, expressas de modo regulado durante o desenvolvimento da glândula salivar de *B. hygida* (FONTES et al., 1992).

Com o objetivo de compreender a estrutura e expressão deste(s) gene(s) amplificado(s) no pufe B10 iniciamos o isolamento de clones de cDNA referentes a essas duas mensagens. O rastreamento de cerca de 4500 fagos de uma biblioteca de cDNA, construída a partir de RNA de glândulas salivares em idades E7- E7+16 horas, com o fragmento de 2 kb resultou na detecção de 50 clones, nomeados λ cBhB10 (1) a λ cBhB10 (50). Destes clones, 24 foram purificados a homogeneidade em um segundo rastreamento. A análise do DNA desses 24 clones em gel de agarose, após a digestão com *EcoRI*, mostrou que todos apresentam um inserto aparentemente de mesmo tamanho, de cerca de 1,0 Kb, o que corresponde ao tamanho da mensagem menor (**figura 9**). Esse resultado poderia ser explicado pela maior abundância e/ou estabilidade da mensagem menor quando comparada à mensagem maior, associado ao fato de termos utilizado uma biblioteca de cDNA já amplificada.

Um desses clones foi caracterizado por hibridação em "northern blot". Conforme mostra a **figura 10**, a hibridação do ^{32}P - λ cDNA-2 com "northern blot", contendo RNA total da glândula salivar em diferentes estágios do desenvolvimento, revelou duas mensagens de tamanho e perfil de expressão iguais ao detectado anteriormente pelo fragmento de 2 kb. Esses experimentos foram realizados em triplicata e os autoradiogramas submetidos a diferentes tempos de exposição. Em todos os casos foi detectado em E7 o mRNA de 1,3 kb e um sinal que se espalha até a posição de 1,1 kb e 8 horas mais tarde, período em que o pufe apresenta-se em máxima expansão, o sinal detectado é mais intenso, indicando maior quantidade de ambas as mensagens. Em E7+16 horas, quando o pufe B10 está regredido, apenas a mensagem menor é detectada. A membrana mostrada na **figura 10** foi re-hibridada com o plasmídeo

contendo rDNA de *R. americana* (pRa) e observou-se sinais de hibridação de intensidades similares indicando quantidades semelhantes de RNA total nas diferentes amostras (dados não mostrados). Esses resultados mostram que as duas mensagens de 1,3 e 1,1 kb relativas ao pufe B10 apresentam homologia entre si. Esse clone ^{32}P - λ cDNA-2 foi também hibridado com “northern blot” de RNA poli (A)⁺, selecionado de RNA total de glândulas salivares da época em que os pufes de DNA se desenvolvem e detectou-se um intenso sinal de hibridação na faixa entre 1,1 e 1,3 kb indicando que as duas espécies são enriquecidas na fração poli (A)⁺ (dados não mostrados).

A hibridação desse ^{32}P - λ cDNA-2 em “Southern blot”, contendo DNA da glândula salivar, digerido com *EcoRI*, detecta somente o fragmento de 2 kb, indicando que pelo menos 1,0 kb de uma unidade de transcrição está contido no fragmento de 2 kb (**figura 11B**).

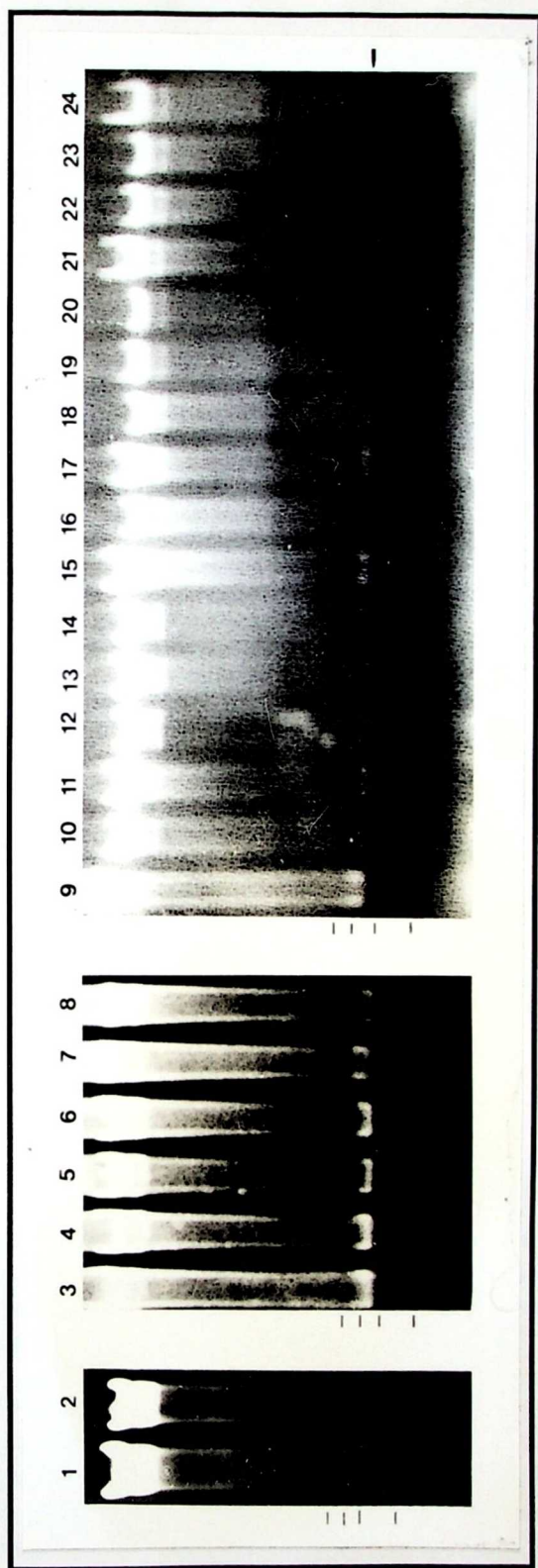


Figura 9 - Os 24 clones de cDNA isolados apresentam um inserto de cerca de 1,0 kb. Gel de agarose corado com brometo de etídeo, após a eletroforese do DNA dos diversos clones, digeridos com *EcoRI*. As raías de 1 a 24 se referem ao DNA dos fagos λ cBhB10 (1) a λ cBhB10 (24), respectivamente. As duas primeiras bandas, fortemente coradas, correspondem aos braços esquerdo (23 kb) e direito (8 kb) do fago e a banda de cerca de 1,0 kb (indicada por seta) corresponde ao inserto dos respectivos clones. Como marcador de peso molecular foi utilizado o DNA do fago ϕ X-174 digerido com *HaeIII*, e as marcações se referem aos fragmentos de 1,353, 1,078, 0,872 e 0,603 kb, respectivamente.

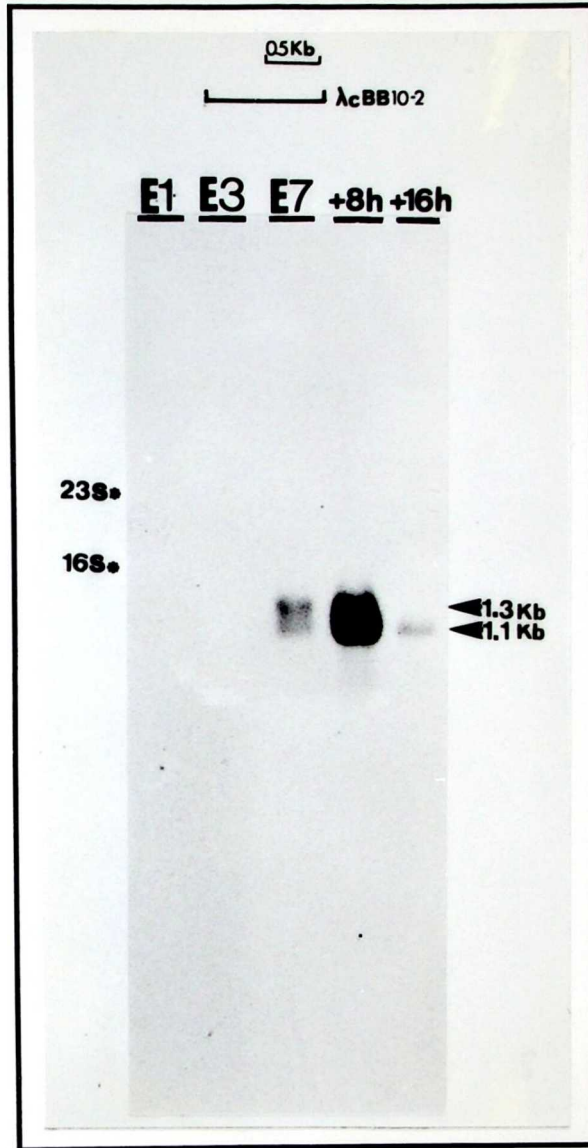


Figura 10 - O clone λ cDNA-2 revela duas mensagens de mesmo tamanho e perfil de expressão detectados pelo fragmento genômico de 2 kb. Autorradiografia de "northern blot" contendo 20 μ g de RNA total de glândulas salivares em diferentes estágios do desenvolvimento (E1, E3, E7, E7+8 e E7+16 hs) após a hibridação com o 32 P- λ cDNA-2. Em E7 é detectado um RNA de 1,3 kb e um sinal que se espalha até a posição de 1,1 kb. Em E7 + 8 horas esse sinal é bem mais intenso e em E7+16 horas apenas um RNA de 1,1 kb é detectado. Os asteriscos indicam as posições de migração dos RNAs ribossômicos 16S e 23S de *E. coli*, utilizados como marcadores de tamanho molecular. O tempo de exposição da membrana ao filme de raio-X foi 2 dias, a -70 °C.

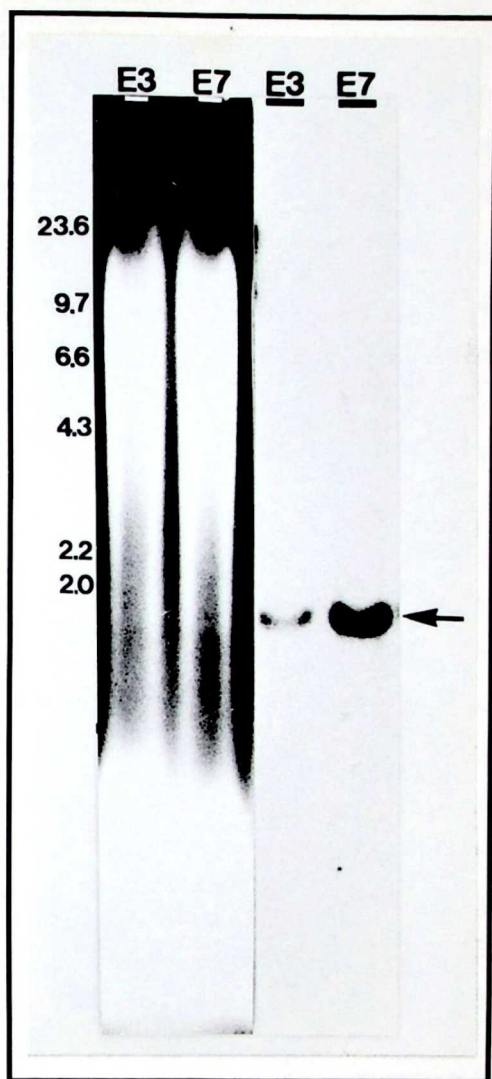


Figura 11 - O fragmento genômico de 2 kb contém 1 kb de uma unidade de transcrição. (A) Gel de agarose corado com brometo de etídeo, após a eletroforese. Cada raia contém cerca de 20 µg de DNA de glândulas salivares, em E3 e E7, digerido com *EcoRI*. (B) Autoradiografia de "Southern blot" do gel mostrado em A, após hibridação com o ^{32}P - λ cDNA-2. Como marcador de peso molecular foi utilizado o DNA do fago λ digerido com *HindIII* (fragmentos 23,5; 9,7; 6,6; 4,3; 2,2; 2,0 kb). O tempo de exposição da membrana ao filme de raio-X foi 7 dias, a -70°C .

Esses resultados poderiam indicar diferentes situações quanto a organização gênica no fragmento de 2 kb, como: 1) a ocorrência de dois genes homólogos agrupados; 2) a ocorrência de um único gene sob um controle diferencial quanto ao uso de sítios alternativos de início da transcrição, padrões de "splicing" alternativo, uso de sítios de poliadenilação diferentes ou, ainda, 3) a mensagem menor poderia ser produto de degradação da mensagem maior.

Considerando que a glândula salivar de *Bradysia hygida* apresenta três regiões morfológicamente distintas (ver **figura 3**, mat. e mét.), averiguamos inicialmente a possibilidade dessas duas mensagens serem consequência de um controle de expressão gênica a nível tecidual. A análise em "northern blot" de RNA total de cada região glandular, em diferentes estágios do desenvolvimento, após hibridação com o ^{32}P - λ cDNA-2 mostrou que as duas espécies de RNA estão presentes nas três regiões glandulares, de acordo com um mesmo padrão de expressão (**figura 12**). Conforme observado anteriormente em experimentos de mesma natureza, mas com RNA extraído da glândula inteira (FONTES et al., 1992), em E7 detecta-se a mensagem maior e 8 horas mais tarde, período em que o pufe apresenta-se em máxima expansão, é detectada uma grande quantidade desta mensagem. Neste período aparece a mensagem menor e 8 horas após (cerca de 16 horas após E7) quando o pufe B10 está regredido, apenas a mensagem menor é detectada. Além disso, a simples observação da intensidade dos sinais de hibridação detectados pelo cDNA e pelo rDNA de *Rhynchosciara*, utilizado como controle da quantidade de RNA presente nas diferentes raias, mostra que as mensagens relativas ao pufe B10 estão presentes em maior quantidade nas regiões S1 e S3 quando comparado à região S2.

Esses resultados associados ao fato de, apesar de inúmeras tentativas, não termos conseguido isolar cDNA de tamanho correspondente a mensagem maior levou-nos ao seqüenciamento do cDNA isolado e do fragmento genômico de 2 kb, para continuarmos nossas investigações a respeito da organização gênica no pufe B-10.

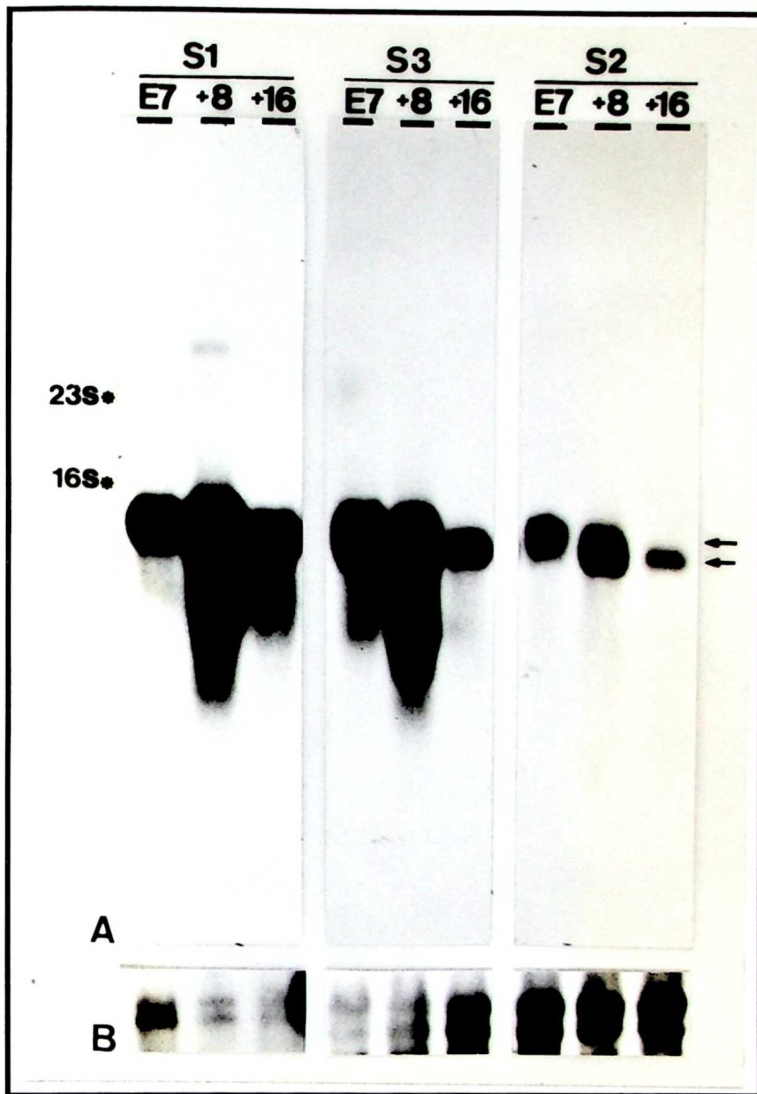


Figura 12 - As duas mensagens relativas ao pufe B-10 estão presentes nas três regiões glandulares, de acordo com o mesmo padrão de expressão. A - Autoradiografia de "northern blot" contendo 20 μg de RNA total das três regiões glandulares (S1, S2 and S3) em diferentes estágios do desenvolvimento (E7, início da expansão do pufe B-10; E7+8 h, máxima expansão do pufe B-10 e E7+16 h, regressão do pufe) após a hibridação com o ^{32}P - $\lambda\text{cDNA-2}$. As setas indicam as duas espécies de RNA de cerca de 1,1 e 1,3 kb. Os asteriscos indicam as posições de migração dos RNAs ribossômicos 16S e 23S de *E. coli*, utilizados como marcadores de tamanho molecular. O tempo de exposição da membrana ao filme de raio-X foi cerca de 24 horas, a -70°C . **B -** Autoradiografia da mesma membrana após re-hibridação com o plasmídeo contendo rDNA (pRa) de *Rhynchosciara*. Nesse caso o tempo de exposição foi cerca de 7 horas, a -70°C .

II. ESTRUTURA DO GENE DO PUFÉ B-10

A - SEQÜENCIAMENTO DO cDNA

O cDNA de 1,0 kb mencionado acima foi subclonado no fagomídeo pT7T3-18U e o seqüenciamento realizado pelo método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeos (SANGER et al., 1977), utilizando-se DNA fita simples de 7 deleções (ver estratégia de seqüenciamento na **figura 6**, mat. e mét.). A **figura 13** mostra a seqüência de nucleotídeos do cDNA, que apresenta um tamanho de cerca de 916 pb, tamanho similar ao estimado para a espécie de mRNA menor. A seqüência de aminoácidos, deduzida com base na fase de tradução aberta de maior extensão, codifica uma proteína de 180 aminoácidos que começa no códon de iniciação ATG, na posição 41, e termina no códon de terminação TAG, na posição 580. A região terminal 3' apresenta um sítio de poliadenilação AATAAA potencial, na posição 862 (em negrito na **figura 13**), seguido de uma cauda de cerca de 40 resíduos de adenina (dados não mostrados), indicando que o terminal 3' está completo no cDNA. O número de resíduos de adenina é um valor aproximado, pois a resolução das bandas no gel de seqüenciamento não foi suficiente para obtermos uma estimativa exata.

Outras características do cDNA são: uma região 5' não traduzida curta, com cerca de 40 nucleotídeos, e uma longa região 3' não traduzida, de cerca de 324 nucleotídeos, que se inicia na posição 582. Nessa região foi identificado o pentanucleotídeo ATTTA na posição 800 (sublinhado na **figura 13**), comum entre diversos mRNAs instáveis de eucariotos (recentemente revisado CHEN e SHYU, 1995).

B- SEQÜENCIAMENTO DO FRAGMENTO GENÔMICO

Os sub-fragmentos de 1,3 e 0,7 kb, gerados pela digestão do fragmento de 2 kb/*EcoRI* com *Sall*, foram sub-clonados no fagomídeo pT7T3-18U e o seqüenciamento realizado pelo método de terminação da cadeia por dideoxinucleotídeos (SANGER et al., 1977), utilizando-se DNAs fita simples de diversas deleções (ver **figuras 7 e 8**, em mat. e mét.), seguindo a mesma estratégia mencionada para o seqüenciamento do cDNA.

Conforme mostra a **figura 14**, o fragmento genômico *EcoRI* de 2 kb apresenta um tamanho, com base no seqüenciamento, de 1933 pb. O alinhamento desta seqüência com a seqüência do cDNA mostrou a presença de um íntron de 62 pb na região 5' da unidade de transcrição e uma região flanqueadora à 5' do cDNA com elementos encontrados em promotores de eucariotos, como a seqüência consenso TATA box na posição - 29bp. O estudo desta região promotora mostrou algumas características importantes, dentre elas temos: **1)** na posição - 244 nt, uma seqüência de 20 pb rica em adenina, com 85% de identidade ao elemento 5'-TAA[A/T]NAAA[A/T][A/T]ATAAAAAAAT-3' (HOFFMAN e CORCES, 1986), presente em diversos genes de *Drosophila* que respondem ao hormônio ecdisona, **2)** na posição -224 nt, uma seqüência com alta similaridade (9/11) à seqüência conservada de 11 pb 5'-[A/T]TTTAT[A/G]TTT[A/T]-3' (PALZKILL e NEWLON, 1988), encontrada na região ARS de levedura, **3)** na posição -407 nt, uma seqüência com similaridade parcial (69%) à seqüência palindrômica imperfeita 5'-[A/G]G[G/T]TCANTGA[C/A]C[C/T]-3' (CHERBAS et al., 1991) onde, se liga o receptor da ecdisona em alguns genes de *Drosophila*, **4)** nas posições -730, -565 e -550 nt, três seqüências com 100% de identidade às seqüências altamente conservadas 5'-GCAAA-3'; 5'-AAAGTG-3'; 5'-TGCCTT-3' (rev. ORR-WEAVER, 1991), encontradas no domínio ACEIII dos genes coriônicos de diferentes espécies de *Drosophila*.

```

5'  AGCATTTTAAACAAATAAAGTGGACATTCAATTCCTAAAAA[ATG]CAAGCAAAATCTACGTT
                                     M  Q  A  K  S  T  F
060  CCTTTTTGTATTGATTTCTTCCATGAAGTTGGCGTCAGGCACTCCAATTTTAGATGGTCT
    L  F  V  L  I  S  S  M  K  L  A  S  G  T  P  I  L  D  G  L
120  TTTAAAAGGAGTTTTAGGTGGGGGAGGACTTCCAATTGGTGGTGGAGCTTTAGGAGGCGG
    L  K  G  V  L  G  G  G  G  L  P  I  G  G  G  A  L  G  G  G
180  GGGAGGAATACCAATTGTTGGTGGAGGTAAAGGAGGCAACGGAGGTAGCAATGTGAATGT
    G  G  I  P  I  V  G  G  G  K  G  G  N  G  G  S  N  V  N  V
240  AGATGGACTTCTGCACGGATTAATGACATTCTGGCGGAGCCCCTGTGCTCTGTTGGATT
    D  G  L  L  H  G  L  N  D  I  L  A  E  P  L  C  S  V  G  L
300  GGGATGCGACAACACTGTGATGGCCTTTTGAAGGCCTACAGCCTCCATTGGGAAAAACAAT
    G  C  D  N  C  D  G  L  L  E  G  L  Q  P  P  L  G  K  T  I
360  CAACTCCCTTGGGTTAGGCGTCGACTGTGATGATGACAATGGTAAAGGGAACCAAAAAGG
    N  S  L  G  L  G  V  D  C  D  D  D  N  G  K  G  N  Q  K  G
420  GAAAGGTAAGGGCCACGTCGGTGGAGGAGGTAGAGGAGGCAATCAAGTGAATGAAGACGG
    K  G  K  G  H  V  G  G  G  G  R  G  G  N  Q  V  N  E  D  G
480  ACTTCTGCACGGATTAATGGCATTCTGGCGAACAGCTGTGCTCTGTTGGATTGGGATGC
    L  L  H  G  L  N  G  I  L  A  N  S  C  A  L  L  D  W  D  A
540  AACGACTGTAAAGGCCTTTTGAAGGTTTACAGCCTCCAT[TAG]GAAAACCTTTAAATTCA
    T  T  V  K  A  F  W  K  V  Y  S  L  H  -
600  CTGGGTTTGGGAATTGACTGTGATGATTCTGGGCACAAAGGTAAAACAAAGCCAGGTAAA
660  GGCAATGACAGCGATGGTTGTGGCTGTGATGGAAATCAAGTTCCTATTGGAGGAGGTAAA
720  CATGGACATCGAGGTGGTCATGGTGGTCACGGAGGTTACCATGATGACTGCGACAACTTT
780  GATTGTGATGTATGCTCATAATTTATTGAAACGAAATGTGAAACCTTTAAATTGTAGAAT
840  GCTTAACAGATATGCAAATATAATAAATGTTTTTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
900  AAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'

```

Figura 13 - A seqüência de nucleotídeos e a seqüência de aminoácidos deduzida do cDNA relativo ao pufe B-10 de *B. hygida*. O cDNA apresenta 916 pb, um tamanho similar à espécie de mRNA menor. A fase de leitura de maior tamanho codifica um polipeptídeo de 180 aminoácidos que se inicia no códon de iniciação ATG, na posição 41, e termina no códon de terminação TAG, na posição 581. Ambos os códons estão destacados em um retângulo. O sítio de poliadenilação potencial está indicado em negrito. O segmento sublinhado corresponde ao pentanucleotídeo envolvido na instabilidade de diversos mRNAs eucarióticos. Estas seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos estão disponíveis no EMBL/GenBank/DDJB sob o número de acesso L43904.

C - CARACTERIZAÇÃO DAS REGIÕES 5' E 3' DAS MENSAGENS

O alinhamento entre as seqüências do fragmento *EcoRI* de 2 kb e do cDNA de 1,0 kb permitiu a identificação de uma unidade de transcrição no fragmento de 2 kb, com um único íntron de 62 pb na região 5' desta unidade. Esse dado é desfavorável à hipótese de um gene apresentando padrões de "splicing" alternativo, uma vez que o tamanho do íntron, de 62 pb, é inferior a diferença do tamanho esperado entre as duas mensagens, que é cerca de 200 pb. A análise da seqüência do DNA mostrou ainda a presença de um único sítio de poliadenilação e, portanto, o uso de sítios de poliadenilação alternativos é também pouco provável. Restava-nos agora outras duas hipóteses: 1) seria este o caso de um único gene sob um controle diferencial no uso de sítios alternativos de iniciação da transcrição? ou 2) estaríamos diante de uma única mensagem que sofre um processamento, resultando em uma mensagem menor em tempos tardios? Para investigarmos a respeito da primeira hipótese delineamos um experimento de "primer extension" para o mapeamento do terminal 5' das duas mensagens. Neste experimento tivemos o cuidado de utilizar preparações de RNA onde detectávamos em "northern blot" apenas a mensagem maior na idade E7 (preparações estas também utilizadas em experimentos como o da figura 16).

Conforme mostra a **figura 15**, o tamanho do fragmento estendido, a partir do oligonucleotídeo (complementar as posições 43 à 62 do cDNA, ver figura 14) hibridado com RNA da glândula salivar de dois estágios do desenvolvimento E7 e E7 + 16 horas é o mesmo, de 78 pb. Com base neste tamanho localizamos o sítio de início da transcrição no nucleotídeo T que se posiciona 29 nucleotídeos a jusante do primeiro T do TATA box (indicado por seta na **figura 14**). Esses resultados mostram que a síntese de ambos mRNAs inicia-se no mesmo sítio e que portanto a diferença entre eles não está no terminal 5'. Convém aqui ressaltar que este experimento foi realizado em quintuplicata onde utilizamos quantidades menores de RNA total para obtenção de uma banda menos espessa, assim como, tivemos o cuidado de analisar no mesmo gel o produto de sequenciamento da deleção do cDNA dessa região utilizando o "primer" do

próprio cDNA (dados não mostrados) permitindo a confirmação da posição do sítio de iniciação da transcrição.

Para investigarmos a hipótese de que a mensagem menor poderia ser fruto de um processamento da mensagem maior delineamos um experimento para medir o comprimento das duas mensagens, após a remoção da cauda poli A. Isso seria possível tendo o cuidado de utilizar uma preparação de RNA onde em E7 é detectada apenas a mensagem maior e em E7 + 16 horas apenas a mensagem menor (ver as duas primeiras raias da **figura 16**). Conforme mostra a **figura 16**, a remoção da cauda poli A das duas mensagens (E7 e E7+16 tratado com RNase-H) resulta em um RNA de mesmo tamanho, cerca de 1,0 kb. Esses dados mostram que a diferença entre as mensagens está no comprimento da cauda poli A e que, portanto, os mRNAs de 1,1 kb e 1,3 kb relativos ao pufe B10 representam a mesma mensagem que sofre o encurtamento da cauda poli A, durante o desenvolvimento.

Figura 14 - Alinhamento entre as seqüências de nucleotídeos do cDNA e do fragmento genômico EcoRI de 2 kb. As seqüências correspondentes ao fragmento genômico de 1933 pb são precedidas por sinal - ou +, indicando se a região é anterior (-) ou posterior (+) ao início de transcrição. O nucleotídeo T, indicado por seta, é o sítio de iniciação da transcrição determinado por "primer extension" (ver figura 15). O alinhamento mostra a presença de um único intron de 62 pb, indicado por uma linha interrompida, na região 5' da unidade de transcrição. As seqüências consensos doadoras (GT) e receptoras (AG) do intron estão em negrito. Na região promotora estão destacados os seguintes elementos: 1) a seqüência TATA "box", indicada em negrito e sublinhada, na posição - 29 nt, 2) uma seqüência rica em adenina, com 85% de identidade ao elemento conservado encontrado em diversos genes de *Drosophila* que respondem ao hormônio ecdisona (HOFFMAN e CORCES, 1986) e indicada em itálico e sublinhada, na posição -244 nt, 3) uma seqüência com alta similaridade (9/11) à seqüência conservada de 11 pb encontrada na região ARS de levedura (PALZKILL e NEWLON, 1988), indicada por asteriscos, na posição -224 nt, 4) uma seqüência com similaridade parcial à seqüência palindrômica conservada, no sítio de ligação do receptor de ecdisona em diversos genes de *Drosophila* (hsp 27, Eip28/29 e P1, CHERBAS et al., 1991), indicada pelo sinal + na posição -407 nt, 5) três seqüências com 100% de similaridade às seqüências altamente conservadas no domínio ACEIII entre diversas espécies de *Drosophila* (rev. ORR-WEAVER, 1991), indicado por círculos em negrito nas posições - 730, -565 e -550 nt. A seqüência complementar ao oligonucleotídeo de 20 pb utilizado no ensaio de "primer extension" está duplamente sublinhada. A seqüência genômica está disponível no EMBL/GenBank/DDJB sob o número de acesso L43853.

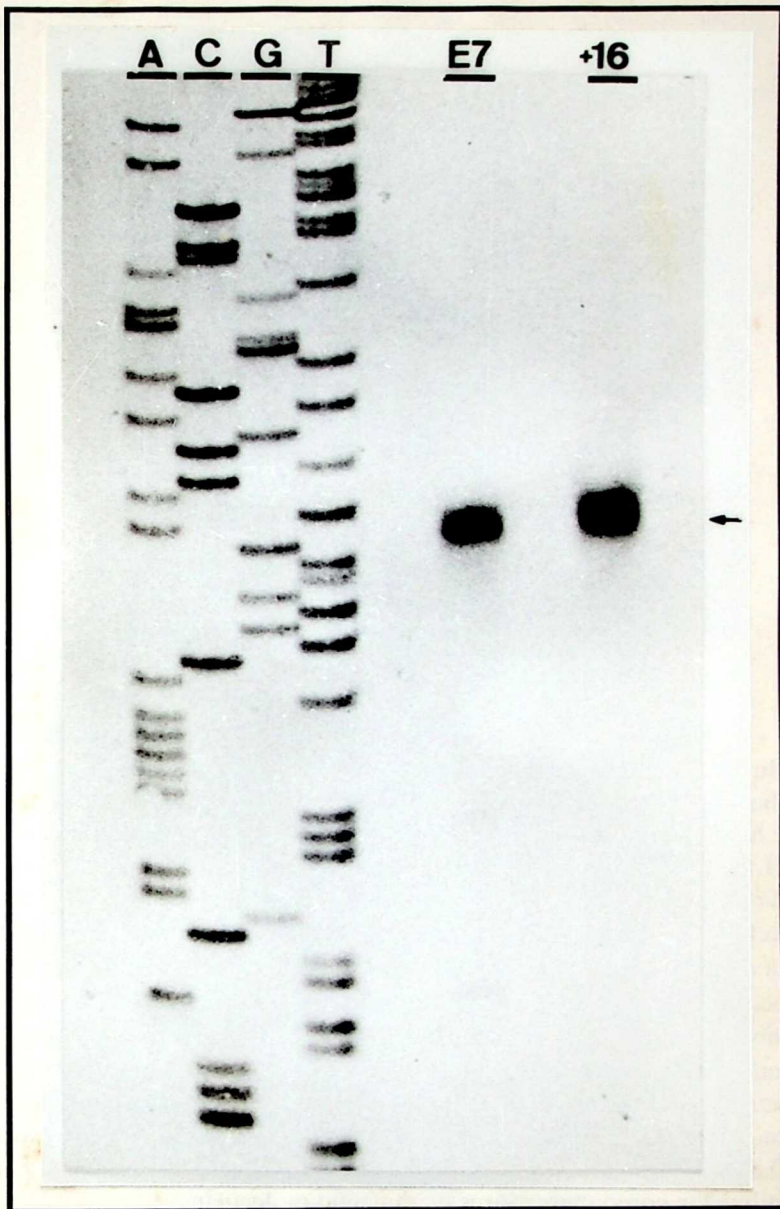
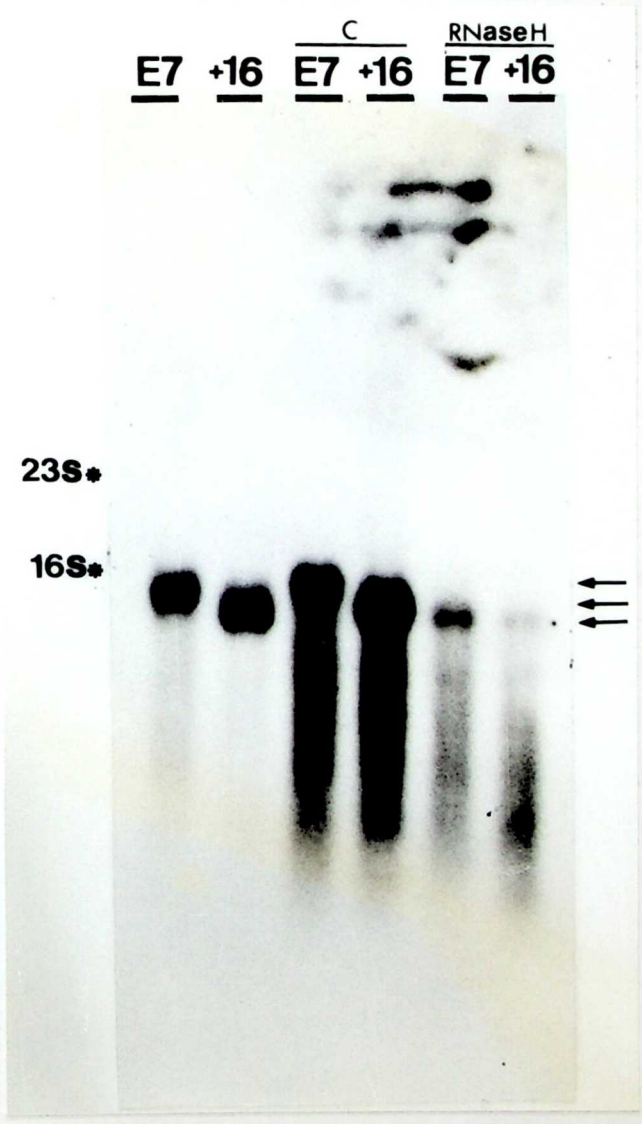
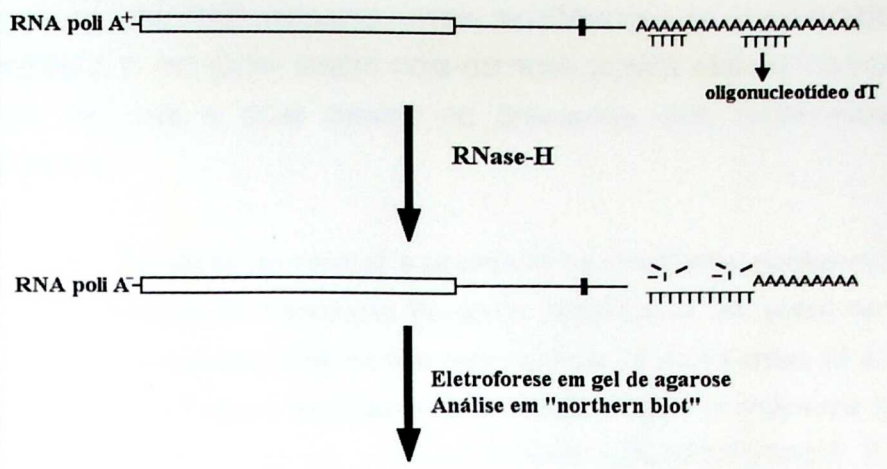


Figura 15 - A transcrição dos mRNAs de 1,3 kb e 1,1 kb inicia-se no mesmo sítio. Autoradiograma do ensaio de extensão, pela ação da transcriptase reversa, do oligonucleotídeo de 20 pb (complementar aos resíduos 21 a 41 do cDNA - ver figura 14), após a hibridação com 30 μ g RNA total da glândula salivar de dois estágios do desenvolvimento E7 (raia 1 - período em que está presente a mensagem maior) e E7 + 16 horas (raias 2 - período em que está presente apenas a mensagem menor). A seta a direita indica o fragmento estendido de 87 pb. ACGT indica as raias contendo o produto do seqüenciamento de DNA utilizando o primer universal do vetor pT7T3-18U.

Figura 16 - Os mRNAs de 1,3 kb e 1,1 kb correspondem a mesma mensagem que durante o desenvolvimento sofre um encurtamento da cauda poli A. O diagrama acima ilustra os passos do experimento. RNA total da glândula salivar é hibridado com oligonucleotídeo dT(12-16) e submetido a ação da ribonuclease H. Os produtos desta reação são submetidos a eletroforese em gel de agarose desnaturante, transferidos para membrana de "nylon" e hibridados com o ³²P-λcDNA-2, obtendo-se o autoradiograma mostrado abaixo. As duas primeiras raias contém RNA total de glândula salivar em E7 e E7 + 16 horas (20 µg) sem nenhum tratamento; as raias indicadas por **C** contém 20 µg de RNA total hibridado com oligo dT, sem o tratamento subsequente com RNase-H e as raias indicadas por **RNase-H** contém os RNAs após o tratamento com RNase-H. As setas à direita apontam as mensagens de 1,3 e 1,1 kb (antes da remoção da cauda) e uma mensagem menor, de cerca de 1,0 kb (após a remoção da cauda). Os asteriscos indicam as posições dos RNAs ribossômicos 23S e 16S de *E. coli*, utilizados como marcadores de tamanho molecular.



III. ANÁLISE DA SIMILARIDADE ENTRE SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO 5' DO GENE B β 10 COM OUTROS GENES AMPLIFICADOS EM PUFES DE DNA E COM GENES DE *Drosophila* QUE RESPONDEM À ECDISONA

Com a finalidade de verificar a ocorrência de seqüências conservadas na região de iniciação da transcrição de genes amplificados em pufes de DNA, fizemos um alinhamento para máxima homologia de 10 pb distantes 26 a 32 pb do TATA box em 7 genes de pufes de DNA (**tabela I**). Esse alinhamento revelou uma seqüência conservada de consenso 5'-[T/A][T/A]NCA[G/T][T/A]-3'. Em três desses genes o sítio de início da transcrição foi mapeado no nucleotídeo 4 ou 5 do consenso. Em *B. hygida* o sítio de início de transcrição foi mapeado 1 a 3 nucleotídeos à montante do início do consenso. Curiosamente essa seqüência consenso apresenta similaridade com o heptanucleotídeo 5'-ATCA[G/T]T[C/T]-3' conservado entre diversos genes de insetos e com o pentanucleotídeo 5'-CAGTT-3' conservado entre genes de "heat shock" (HULTMARK et al., 1986). O significado funcional dessas seqüências será analisado mais detalhadamente na discussão.

Objetivando verificar a conservação de seqüências no sítio de início da tradução do mRNA de genes amplificados em pufes de DNA, fizemos um alinhamento para máxima homologia de 6 nt adjacentes ao pressuposto codon de iniciação da tradução (posição 41 do cDNA, veja **figura 13**). Curiosamente esse alinhamento (**tabela II**) revelou uma seqüência de consenso 5'-[A/T][A/G]N[A/G]AAATG-3', distinta da seqüência consenso 5'-CC[A/G]CCAUG-3' descrita por KOZAK (1984) em um estudo de alinhamento utilizando 211 mRNAs de eucariotos superiores. Entretanto, uma base purina (mais frequentemente A) na posição -3 (3 nt a montante do ATG) ocorre em todos os genes analisados e representa a característica mais importante nessa região entre todos os mRNAs eucarióticos superiores (KOZAK, 1984).

Tabela I - Similaridade entre a seqüência da região de início de transcrição de BhB10 e outros seis genes amplificados em pufes de DNA.

											Posição.	Ref.
BhB10	A	A	<u>I</u>	T	T	G	C	A	G	T	-30	(1)
BhC4	<u>I</u>	T	A	T	A	A	C	A	G	A	-32	(2)
RhynC8	C	G	T	T	A	T	C	A	G	T	-27	(3)
RhynC3	C	A	A	A	T	T	<u>C</u>	A	G	T	-26	(4)
Scill/9-1	C	A	G	A	A	T	C	<u>A</u>	T	T	-26	(5)
Scill/9-2	C	A	G	A	A	T	C	<u>A</u>	T	T	-26	(5)
TricC4B-1	C	A	G	A	A	T	C	A	T	T	-28	(6)
consenso				T/A	T/A	N	C	A	G/T	T/A		

Em negrito estão os nucleotídeos idênticos ao heptanucleotídeo conservado nos sete genes analisados e de consenso 5'-[T/A][T/A]NCA[G/T][T/A]-3'. As seqüências estão representadas na direção 5'→3'. O nucleotídeo sublinhado indica o sítio de início de transcrição mapeado experimentalmente. À direita está a posição do heptanucleotídeo consenso após o primeiro T do TATA box. Essas seqüências foram retiradas de (1) figura 14, deste trabalho; (2) MONESI et al., 1995; (3) FRYDMAN et al., 1993; (4) YOKOSAWA, com. pes.; (5) DIBARTOLOMEIS e GERBI, 1989 e (6) DESSEN et al., 1995.

Tabela II - Similaridade entre a seqüência da região de início da tradução de BhB10 e outros quatro genes amplificados em pufes de DNA.

				↓						Ref.
BhB10	A	A	A	<u>A</u>	A	A	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	(1)
BhC4	G	C	G	<u>A</u>	A	A	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	(2)
RhynC8	T	G	C	<u>G</u>	A	A	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	(3)
Scill/9-1	T	G	T	<u>A</u>	A	A	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	(4)
TricC4B-1	T	T	C	<u>A</u>	A	A	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	(5)
consenso	A/T	A/G	N	<u>A/G</u>	A	A	<u>A</u>	<u>I</u>	<u>G</u>	

Em negrito estão os nucleotídeos idênticos a seqüência conservada nos cinco genes analisados e de consenso 5'-[A/T][A/G]N[A/G]AAATG-3'. A seta indica a posição do nucleotídeo mais conservado na região de início da tradução entre mRNAs eucariotos (KOZAK, 1984). Os nucleotídeos com duplo sublinhado indicam o codon de iniciação ATG. Essas seqüências foram retiradas de (1) figura 13, deste trabalho; (2) MONESI et al., 1995; (3) FRYDMAN et al., 1993; (4) DIBARTOLOMEIS e GERBI, 1989 e (5) DESSEN et al., 1995.

Uma análise da seqüência de nucleotídeos da região promotora do gene BhB10 e de outros seis genes amplificados em pufes de DNA permitiu a descoberta interessante da presença, em cinco desses genes, de uma seqüência palindrômica imperfeita, composta por 13 pb, que compartilha similaridade com um elemento, demonstrado experimentalmente ser um sítio de ligação do receptor de ecdisona (EcRE), e que é parcialmente conservado entre os genes hsp 27, Eip 27/28, P1 de *Drosophila* (RIDDIHOUGH e PELHAN, 1987, CHERBAS et al., 1990; e MASCHAT et al., 1990; 1991). Este estudo comparativo (**Tabela III**) mostra que esse elemento se posiciona preferencialmente em regiões distais, superiores a 300 pb, em relação ao sítio de início de transcrição. O possível significado biológico desse elemento nos genes de pufes de DNA será analisado mais adiante na discussão.

Conforme mostrado na **figura 14**, identificamos também na região promotora de BhB10 uma seqüência de 20 pb rica em adenina, com alta similaridade (85%) à seqüência (5'-TAA[AT]NAAA[AT][AT]ATAAAAAAAT-3', HOFFMAN e CORCES, 1986), conservada entre diversos genes de *Drosophila* que respondem à ecdisona. Conforme mostra a **tabela IV**, esta seqüência está também presente em todos os outros seis genes amplificados em pufes de DNA que foram caracterizados até o momento. Esses dados sugerem que fatores transcricionais comuns podem estar atuando na regulação de genes de pufes de DNA que, conforme abordaremos na discussão, são potencialmente regulados pela ecdisona.

Outra característica interessante encontrada na região promotora do gene BhB10, e de outros quatro genes de pufes de DNA, é uma seqüência similar ao elemento de 11 pb ACS (seqüência consenso de ARS), conservado entre todas as seqüências ARS de levedura e essencial para o funcionamento das mesmas como origem de replicação. A **tabela V** mostra a similaridade desta seqüência com seqüências da região promotora do gene BhB10 e de quatro outros genes de pufes de DNA.

Tabela III - Similaridade da sequência de BhB10 e de outros quatro genes amplificados em pufes de DNA com as seqüências EcRE de hsp27, Eip28/29 e P1 de *Drosophila*.

↓

consenso	A/G	G	G/T	T	C	A	N	T	G	A	C/A	C	C/T	Posição	(a)	fitas	Ref
hsp 27	G	G	I	T	C	A	A	I	G	C	A	C	T	-549	92%	+	(1)
Eip28/29	A	G	G	I	T	A	A	I	G	A	C	C	A	-447	85%	+	(2)
P1	A	G	A	I	C	A	A	I	G	A	A	C	C	-316	92%	+	(3)
P1	G	G	I	I	G	A	A	I	G	A	A	T	T	-90	84%	-	(3)
BhB10	G	T	C	C	C	T	G	T	G	A	A	C	T	-407	69%	+	(4)
ScII/9-1	G	I	I	C	A	A	C	G	G	A	A	A	T	-508	62%	-	(5)
ScII/9-1	G	A	T	A	C	A	T	I	G	A	T	I	T	-78	69%	+	(5)
BhC4	A	I	A	A	C	A	A	T	G	A	A	A	I	-152	69%	+	(6)
RhynC8*	I	G	G	I	A	A	A	I	I	A	C	C	A	-91	69%	+	(7)
Tric4B-1*	C	T	A	I	C	C	T	T	G	A	C	C	T	-668	69%	+	(8)

As seqüências estão representadas na direção 5'→3'. A seta indica o centro de simetria de cada díade imperfeita. A fita + do DNA indica a seqüência presente na fita complementar à fita molde (da qual é derivada a seqüência do mRNA substituindo o U por T) e a fita - do DNA indica a seqüência presente na fita molde (codifica o mRNA). Em negrito estão as bases que compartilham identidade com a seqüência consenso EcRE. As bases que contribuem para essa simetria dentro do palíndromo foram sublinhadas. A tabela mostra a seqüência EcRE de três genes de *Drosophila*, onde foi confirmado experimentalmente ser ligante do receptor da ecdisona e a seqüência que apresenta similaridade parcial ao elemento EcRE em seis genes amplificados em pufes de DNA. À direita está a posição desta seqüência em relação ao início de transcrição, e a porcentagem de identidade em relação à seqüência consenso (a). O asterisco nos genes RhynC8 e Tric4B-1 indica que o início de transcrição não foi mapeado experimentalmente e as posições -91 e -668 são em relação ao primeiro T do TATA box. No gene BhC4 a seqüência coincide com a seqüência rica em adenina conservada entre genes de *Drosophila* que respondem a ecdisona. Essas seqüências foram retradas de: (1) RIDDIHOUGH e PELHAN, 1987; (2) CHERBAS et al., 1990; (3) MASCHAT et al., 1990; (4) figura 14 deste trabalho; (5) DIBARTOLOMEIS e GERBI, 1989; (6) MONESI et al., 1995; (7) FRYDMAN et al., 1993 e (8) DESSEN et al., 1995.

Tabela IV - Similaridade da sequência de BbB10, e de outros seis genes amplificados em pufes de DNA, com uma sequência consenso de 20 pb, rica em adenina e presente no promotor de diversos genes de *Drosophila* que respondem à ecdisona.

consenso	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	(a)	(b)	fitas	ref.
BbB10	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	-244	85%	+	(1)
BbC4	T	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	-159	80%	+	(2)
RhynC8*	G	A	T	T	T	G	T	T	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	-56*	65%	-	(3)
RhynC3	T	A	A	A	A	T	G	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	-60	70%	+	(4)
ScII/9-1	A	A	A	A	A	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	-64	65%	+	(5)
ScII/9-2	A	A	A	A	A	T	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	T	-64	60%	+	(5)
TricC4B-1*	T	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C	-139	80%	+	(6)

As seqüências estão representadas na direção 5' → 3'. Em negrito estão os nucleotídeos idênticos à seqüência consenso. A posição está indicada em relação ao sítio de início de transcrição (a). (b) porcentagem de identidade com a seqüência consenso. A fita + do DNA indica a seqüência presente na fita complementar à fita molde (não codificadora) e a fita - do DNA indica a seqüência presente na fita molde (fita codificadora). O asterisco nos genes RhynC8 e TricC4B-1 indica que o início de transcrição não foi mapeado experimentalmente e as posições -56 e -139 são em relação ao primeiro T do TATA box. Essas seqüências foram retiradas de (1) figura 14 deste trabalho; (2) MONESI et al., 1995; (3) FRYDMAN et al., 1993; (4) YOKOSAWA, com. pes.; (5) DIBARTOLOMEIS e GERBI, 1989 e (6) DESSEN et al., 1995.

Tabela V - Similaridade da seqüência de BhB10, e de outros quatro genes amplificados em pufes de DNA, com o elemento ACS de 11 pb da seqüência ARS de levedura.

consenso	A/T	T	T	T	T	A	T	A/G	T	T	T	T	A/T	posição	identidade	fitas	ref.
BhB10	A	A	T	T	T	C	T	G	T	T	T	T	A	-224	9/11	+	(1)
RhynC3	T	T	T	T	T	T	T	A	T	T	T	T	A	-54	10/11	-	(2)
ScII/9-1	T	T	T	T	T	T	G	A	T	T	T	T	A	-58	9/11	-	(3)
ScII/9-2	T	T	T	T	T	G	G	A	T	T	T	T	A	-58	9/11	-	(3)
Tric4B-1	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	A	-135	9/11	-	(4)

As seqüências estão representadas na direção 5'→3'. Em negrito estão os nucleotídeos idênticos à seqüência consenso. A posição está indicada em relação ao início de transcrição. A fita + do DNA indica a seqüência complementar a fita molde (não codificadora) e a fita - do DNA indica a seqüência da fita molde (codificadora). Note que nos genes BhB10 e Tric4B-1 a posição é mais distal, enquanto para os outros genes a posição é similar, entre 54-58 pb a montante do sítio de início de transcrição. Essas seqüências foram retiradas de (1) figura 14 deste trabalho; (2) YOKOSAWA, com. pes.; (3) DIBARTOLOMEIS e GERBI, 1989 e (4) DESSEN et al., 1995.

Uma característica estrutural, conservada entre todos os genes amplificados em pufes de DNA caracterizados até o momento é a presença de um íntron na região 5' da unidade de transcrição. Conforme mostra a **tabela VI** o tamanho dos íntrons varia entre 62-67 pb e a composição de AT entre 68-79%.

Tabela VI- Similaridade da região intrônica entre os genes amplificados em pufes de DNA.

BhB10	<u>GT</u> ACTAGCTCATAGTTGTGCATAAAAAATTTTACTACATTAACTTTTTAATACTTTTACAG	62pb	79%	(1)
BhC4	<u>GTGAGTACTTGT</u> TTTATCAAATCTTAAATCTCGGTGAATGATCTTTTCTTTTACTTTTTTAG	67pb	75%	(2)
Sc1	<u>GTATGTTAAAACAAGATTGAAACTA</u> ACTTTGAGAATCTGCTAACCAATCAAATAATATTATTCAG	67pb	76%	(3)
Sc2	<u>GTATGTTAAAACAAGATTGAAACTGTA</u> ACTTTGAGAATCTATTACCAATCAAATAATATTATTCAG	65pb	75%	(3)
RhC8	<u>GTAAGAATTTGGTCTC</u> ATTGACTACAAATGCATATCTCTAATCCACTACTCTTCTAATGTAG	66pb	68%	(4)

As seqüências estão representadas na direção 5'→3'. Os nucleotídeos sublinhados indicam as seqüências consenso doadoras (GT) e receptoras (AG) do íntron. À direita está o comprimento em pb e a porcentagem de bases AT de cada íntron. As seqüências foram retiradas de (1) figura 14 deste trabalho; (2) MONESI et al., 1995; (3) DiBARTOLOMEIS e GERBI, 1989 e (4) FRYDMAN et al., 1993.

Em todos os casos observamos que o primeiro exon codifica 80%, ou mais, do peptídeo sinal (segundo VON HEIJNE, 1986, ver parte IV desta seção). Essa similaridade sugere uma conservação estrutural entre genes amplificados em pufes de DNA, que possivelmente codificam para produtos de secreção da glândula salivar durante o último estágio larval.

IV. ANÁLISE DA SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA PROTEÍNA PB10 DEDUZIDA DO cDNA

A proteína deduzida da seqüência de nucleotídeos do cDNA do gene BhB10 contém 180 aminoácidos, o que corresponde a um peso molecular de

17.710 Da. As principais características desta proteína são (**figura 17**): 1) um alto conteúdo de glicina (25%) e leucina (15%), que juntamente com outros resíduos confere à proteína um carácter altamente hidrofóbico (115 aa hidrofóbicos X 46 aa hidrofílicos); 2) apresenta cinco resíduos de cisteínas, que poderiam promover a formação de pontes de dissulfeto intra e/ou inter-cadeias; 3) um pI de 5,6. Os primeiros 20 resíduos apresentam cinco características típicas de seqüência peptídica sinal, segundo VON HEIJNE, (1986): a) região N-terminal (resíduos 1-6) básica; b) região central (resíduos 7-14) hidrofóbica; c) região C-terminal (resíduos 15-19) polar; d) ausência do aminoácido prolina nas posições 17 (designada -3, em relação ao sítio de clivagem) e 20 (+1) e e) um resíduo pequeno na posição 19 (sítio de clivagem). Com relação a predição da estrutura secundária, oito diferentes métodos mostram que esse peptídeo contém um alto conteúdo de estruturas do tipo "β-turn" (dados não mostrados). Esse tipo de conformação provavelmente é consequência do alto conteúdo de glicina.

Outra característica interessante desta proteína diz respeito a presença de diversas repetições, em particular 4 repetições de DGLXGLVX (em negrito e sublinhado, **figura 17**), sendo duas delas idênticas e localizadas em uma região rica em glicina. Esse motivo DGLXGLVX foi comparado com proteínas presentes no banco de dados do NCBI e não foi encontrado em outras proteínas conhecidas. O alinhamento da seqüência de aminoácidos dessa proteína em um gráfico de "dot plot" (**figura 18**), onde as repetições são indicadas por linhas paralelas à linha diagonal central e o posicionamento dessas repetições é dado no eixo da abscissa e ordenada, permite visualizar essas repetições de maneira mais clara. Foi também realizado o alinhamento dessa proteína segundo o método de Barton. Conforme mostra a **figura 19**, esse peptídeo pode ser dividido em duas regiões: a primeira do resíduo 20 ao 68 e a segunda do resíduo 69 ao 180. Essas regiões apresentam cerca de 50% de identidade. Esse resultado sugere a ocorrência de uma duplicação gênica durante a evolução.

Uma comparação da seqüência de aminoácidos da proteína PB10 com a de outras proteínas codificadas por genes amplificados em pufes de DNA

revelou baixa identidade: cerca de 8% com a proteína codificada pelo gene II/9-1 de *Sciara* (DIBARTOLOMEIS e GERBI, 1989), 21% com a proteína do pufe C8 de *R. americana* (FRYDMAN et al., 1993), 17% com a proteína do pufe C4 de *B. hygida* (MONESI et al., 1995) e inferior a 2% com a proteína do pufe C4 de *T. pubescens* (COSTA, 1995). Portanto, a proteína PB10 representa uma proteína distinta das demais proteínas de pufes de DNA deduzidas do cDNA até o momento. Uma característica importante encontrada em todas essas proteínas é a presença de um segmento com característica de peptídeo sinal. A presença de um peptídeo sinal de secreção fortalece a hipótese de que sejam proteínas de secreção, provavelmente envolvidas na construção do casulo da larva, que se inicia no período de aparecimento do pufes de DNA.

Além dessa análise, a seqüência de aminoácidos da proteína do pufe B10 também foi comparada com seqüências presentes nos bancos de dados do NCBI e SWEEP.DAT. Essas comparações não mostraram homologias com outras proteínas conhecidas. Foi detectada similaridade com regiões de glicina de outras proteínas em que este resíduo também é abundante como: queratinas, proteínas ligantes de mRNA, proteínas constituintes da parede de células vegetais e da casca do ovo de *Schistosoma*. Para algumas queratinas já está determinada a estrutura tridimensional, via estudos de ressonância magnética nuclear (MACK et al., 1988), o que poderia abrir um espaço para a realização de estudos de modelagem molecular e predição da estrutura secundária e terciária da proteína PB10. Entretanto, o fato da similaridade ser detectada apenas nas regiões ricas em glicina torna duvidável a validade de tal estudo.

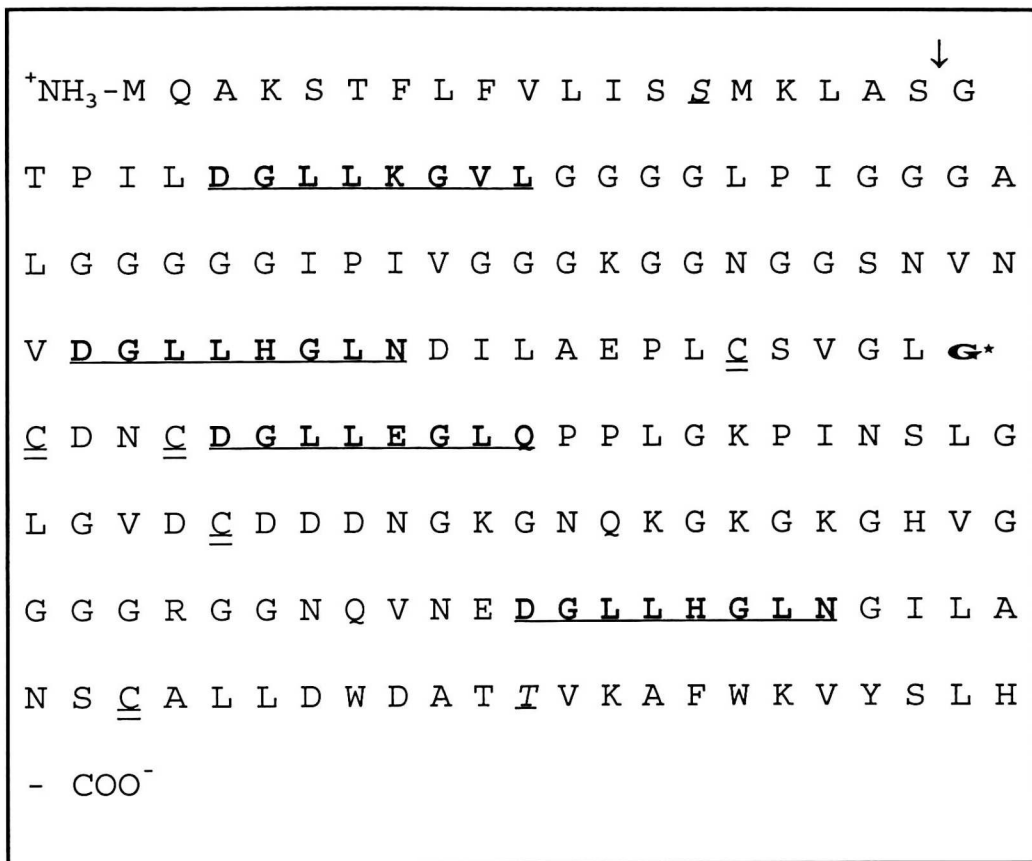


Figura 17 - Estrutura Primária da proteína deduzida do cDNA de 1,0 kb relativo ao pufe B-10. O potencial sítio de clivagem do peptídeo de sinal está indicado por uma flecha vertical. As quatro repetições da sequência DGLLXGL/VX estão em negrito e sublinhadas. O resíduo G que se destaca em negrito e com asterisco indica o primeiro resíduo na região C-terminal, a qual apresenta 49% de identidade com a região N-terminal. Os resíduos de cisteína estão indicados por um duplo sublinhado. Os dois resíduos de aminoácidos (serina e treonina) sublinhados e em itálico representam potenciais sítios de fosforilação pela proteína quinase C. Esta proteína apresenta um alto conteúdo de glicina (25%).

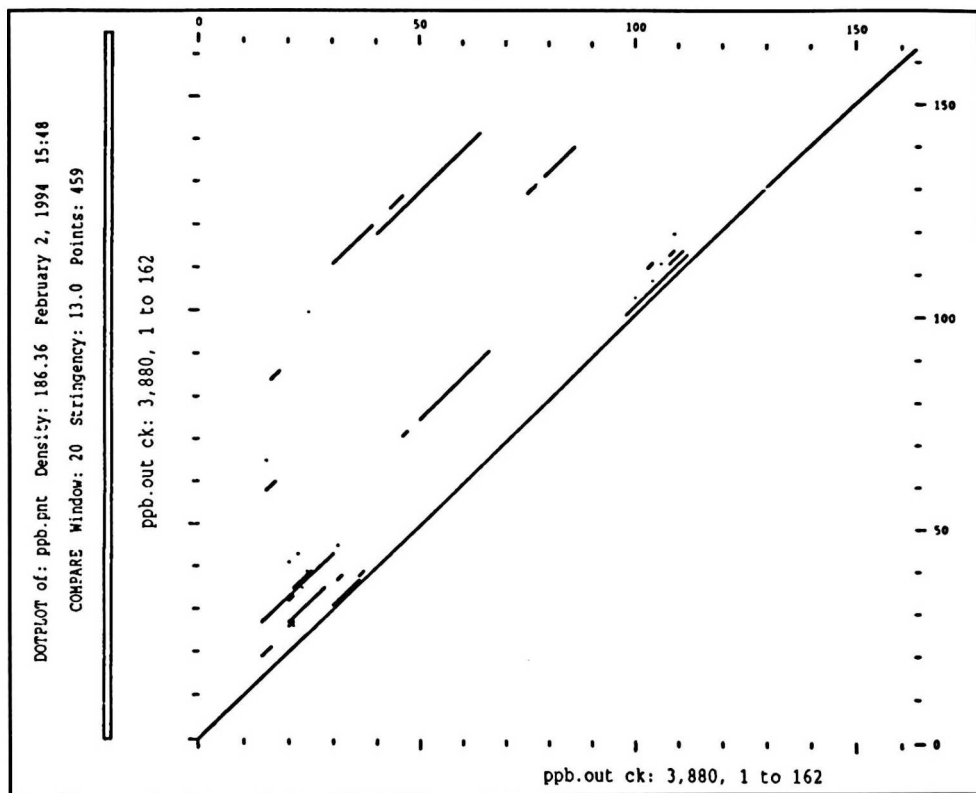


Figura 18 - "Dot plot" da proteína PB10. Nos eixos da abscissa e da ordenada estão as posições dos resíduos na proteína. As linhas paralelas à diagonal principal representam as regiões de repetição na proteína.

PB10-N	<u>GTPILDGLL</u> <u>KG</u> V LGGG GLPIGGGALGGGGGPIVGGGKG G
PB10-C	GCDNC <u>DGLLE</u> GLQPPLGKTINSLGLGVDCDDNGKGNKKGKGGHVGGGG
PB10-N	NGGSNVNVD <u>DGLLHGLNDILA</u> EPLCSV GL
PB10-C	RRGNQVNED <u>DGLLHGLN</u> GILANS CALLDWDATTVKAFWKVYSLH

Figura 19 - Alinhamento da seqüência de aminoácidos de duas regiões da proteína PB10. PB10-N indica a seqüência de aminoácidos da região N-terminal (resíduos de 20 a 68) e PB10-C indica a seqüência de aminoácidos da região C-terminal (resíduos de 69 a 180) da proteína do pufe B-10. A comparação revela 49% de identidade. As principais regiões de repetições estão sublinhadas.

DISCUSSÃO

I. O gene amplificado no pufe de DNA B10

Nesse trabalho clonamos e caracterizamos a nível de seqüência de nucleotídeos um gene amplificado no pufe de DNA B10 de *Bradysia hygida*. Esse gene contém características típicas de genes transcritos pela RNA polimerase II, ou seja, a presença da seqüência TATA box, situada 29 nt a montante do sítio de iniciação da transcrição. A região onde se localiza o sítio de início de transcrição, determinado por "primer extension", apresenta similaridade com a seqüência de nucleotídeos da região de início de transcrição de diferentes genes de pufes de DNA. Em uma análise para a máxima homologia encontramos um consenso de 7 nucleotídeos 5'-[T/A][T/A]NCA[G/T][T/A]-3'. Um dado curioso é que esta seqüência consenso é parte do heptanucleotídeo 5'-ATCA[G/T]T[C/T]-3' conservado na região de início da transcrição entre diversos genes de insetos e contém o pentanucleotídeo 5'-CAGTT-3' conservado entre os genes de "heat shock" de *Drosophila* (HULTMARK et al., 1986). Esses elementos localizam-se 25-33 pb a jusante do primeiro T do TATA box, e no caso do gene *hsp22* de *Drosophila*, HULTMARK e cols. (1986) mostraram através de mutações pontuais que esse pentanucleotídeo conservado é essencial para a expressão do gene em altos níveis após o choque térmico. A realização de experimentos similares nos genes amplificados em pufes de DNA, assim como o isolamento e caracterização de proteínas ligantes nessa região, são necessários para avaliação do significado funcional desses elementos. A potencial região onde se localiza o sítio de início de tradução apresenta o nucleotídeo A situado 3 nt a montante do codon de iniciação (ATG), característica mais conservada entre mRNAs eucariotos, mas difere do consenso encontrado em cerca de 80% dos mRNAs eucarióticos (KOZAK, 1984). Em uma análise para a máxima homologia entre cinco genes amplificados em pufes de DNA encontramos o consenso 5'-[A/T][A/G]N[A/G]AAATG-3', sugerindo uma conservação do sítio de início da tradução entre esses mRNAs.

O gene BhB10 apresenta um único íntron na região 5' codificadora contendo alto conteúdo de AT (76%). Uma organização estrutural semelhante foi também observada em outros genes de pufes de DNA (DIBARTOLOMEIS e

GERBI, 1989, FRYDMAN et al., 1993 e MONESI et al., 1995). Em todos os casos foi detectado um íntron de tamanho similar, variando entre 62-67 pb, e com um alto conteúdo de AT, de cerca de 68-79%. Foi observado também que a posição do íntron nos diferentes genes é bastante conservada, de modo que o primeiro exon codifica cerca de 80%, ou mais, do peptídeo sinal de secreção. Esses dados sugerem uma via comum na evolução desses genes amplificados em pufes de DNA, talvez no sentido de codificar polipetídeos que devem ser secretados pelas células da glândula salivar no final do desenvolvimento larval, provavelmente para a construção do casulo onde ocorre a pupação.

A região 5' não-codificadora do transcrito BhB10 é curta, cerca de 40 nt, e a região 3' não-codificadora é longa, de cerca de 324 nt. Nessa região observamos somente um sítio potencial de poliadenilação, situado 14 nt a montante do início da cauda de poli A, e um pentanucleotídeo ATTTA, na posição 800. Em outros sistemas, esse pentanucleotídeo é conhecido como elemento determinante de instabilidade do mRNA, e é comum entre diversos mRNA altamente instáveis, como os mRNA codificados pelos proto-oncogenes *c-myc*, *c-fos* e o mRNA que codifica para β -*IFN* (SHYU et al., 1991; YOU et al., 1992; GRAFI et al., 1993; ALBERTA et al., 1994; HERRICK e ROSS, 1994; CHEN et al., 1994; e para rev. ver GREENBERG e BELASCO, 1993). Na maior parte dos mRNAs instáveis esse pentanucleotídeo está presente em várias cópias (2-5 cópias) e é essencial para a regulação da degradação do mRNA. Deleções ou mutações pontuais nesse elemento conservado causa a estabilização da mensagem. Por outro lado, sua inserção na região 3' não-codificadora de mRNAs estáveis promove a desestabilização dessas mensagens. A participação do pentanucleotídeo nesse processo seria a de ser um elemento alvo de fatores específicos que regulariam a ação da maquinaria de degradação (veja recente revisão CHEN e SHYU, 1995). O simples fato do mRNA do gene BhB10 apresentar um pentanucleotídeo AUUUA não garante que este esteja sujeito a instabilidade, como é o caso do mRNA que codifica para β -globina, o qual apresenta uma única cópia desse elemento na região 3'UTR e uma meia vida superior a 24 horas (KROWCZYNSKA et al., 1985). Por outro lado, o mRNA que codifica para *junB* apresenta um único

pentanucleotídeo ATTTA e apresenta uma meia-vida inferior a 30 min. (CHEN e SHYU, 1995). A observação de que a mensagem do BhB10 sofre um encurtamento da cauda poliA de modo regulado no desenvolvimento sugere que esse pentanucleotídeo tenha um papel funcional na regulação da expressão do gene (veja modelo proposto na **figura 20**).

Outro dado que fortalece essa idéia é que a administração de baixas concentrações de cicloheximida, em um período específico do desenvolvimento larval, causa a estabilização da mensagem de 1,3 kb (ALMEIDA et al 1993, CONACCI et al., 1994). Esse efeito é comum em todos os casos estudados de degradação do mRNA (THEODORAKIS e CLEVELAND, 1992, 1993; HERRICK e ROSS, 1994; CHEN et al., 1994, GRAFI et al., 1993). A dependência de síntese proteica na regulação da degradação de mensageiros pode indicar dois mecanismos distintos. O primeiro é que o próprio produto de tradução estaria envolvido nesse processo, como é o caso da degradação do mRNA que codifica para β -tubulina e que envolve a ligação do peptídeo nascente com elementos da região 5' UTR (GAY et al., 1987; THEODORAKIS e CLEVELAND, 1992, 1993). Uma outra possibilidade é que nesse processo estariam envolvidas proteínas extremamente lábeis que se ligariam a seqüências específicas do transcrito, ativando a maquinaria da degradação. No caso do mRNA BhB10, o fato da degradação ser via o encurtamento da cauda poli (A), e dado que em todos os casos descritos na literatura esse mecanismo de degradação depende de fatores ligantes às seqüências específicas da região 3' UTR do transcrito, entre elas o pentanucleotídeo AUUUA, favorece a idéia de que outros fatores, que não o produto do gene BhB10, estejam participando da regulação da degradação desse transcrito (ver modelo da **figura 20**).

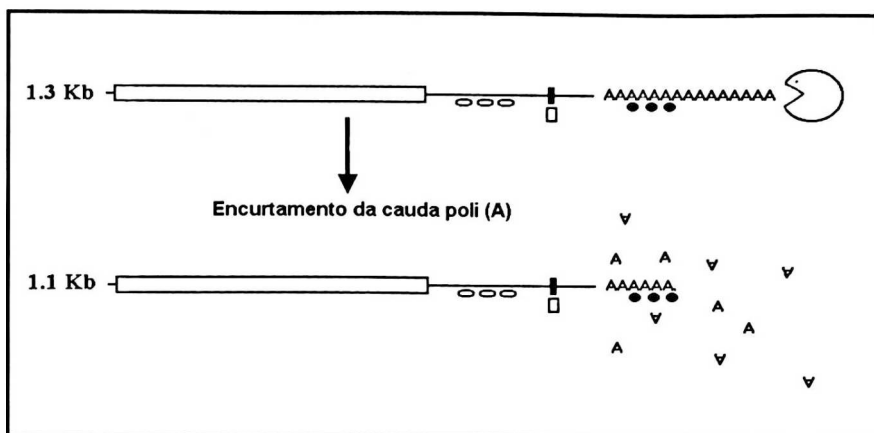


Figura 20 - Modelo do encurtamento da cauda de poli A do mRNA BhB10. A interação de fatores citoplasmáticos com o elemento determinante de instabilidade AUUUA (representado por um retângulo preenchido), e provavelmente outros elementos ainda não caracterizados, promovem a digestão da cauda poli A da mensagem de 1,3 kb por uma exonuclease gerando a mensagem menor de 1,1 kb presente em tempos tardios.

Ainda dentro deste contexto, outras questões são abertas, por exemplo: qual das mensagens do gene BhB10 é eficientemente traduzida? Com base na correlação temporal entre o período de desenvolvimento do pufe B10 e o perfil de síntese proteica da glândula salivar durante esse período de desenvolvimento, ALMEIDA (1989) propôs que um polipeptídeo de secreção de 25 kD (Sp25) é o produto do gene BhB10. Se este for o caso, a mensagem maior deve ser a forma traduzida, pois o polipeptídeo Sp25 é detectado a partir de E7+4 horas, período em que está presente a mensagem maior e não é detectado em E7 +16 hs, período em que apenas a mensagem menor é detectada. Ainda em favor dessa hipótese, ALMEIDA e cols (1993) e CONNACI e cols. (1994) mostraram que a estabilização da mensagem de 1,3 kb pelo tratamento com cicloheximida é acompanhada de extensão no período de detecção do polipeptídeo Sp25. Esse conjunto de dados favorece a hipótese de que a mensagem de 1,3 kb é a forma traduzida. Entretanto, embora não seja uma situação muito freqüente, existem exemplos na literatura, como o do mRNA que codifica para β -interferon (GRAFI et al., 1993 e GRAFI e GALILI, 1993),

onde a mensagem mais eficientemente traduzida é a forma deadenilada. Esclarecimentos a esse respeito são importantes para se verificar como a regulação do encurtamento da cauda do mRNA estaria refletindo na expressão da proteína PB10. Anticorpos específicos contra o polipeptídeo PB10 permitiriam a análise de sua expressão na glândula salivar durante o desenvolvimento larval. Com esse objetivo em mente estamos iniciando em nosso laboratório ensaios de expressão em bactéria da proteína codificada pelo gene BhB10.

Outro ponto interessante a ser discutido sobre a regulação da expressão do gene BhB10 diz respeito aos elementos e fatores envolvidos na regulação transcricional, que acompanha o período de desenvolvimento do pufe de DNA B10 (FONTES et al., 1992). Evidências indiretas relatadas na literatura apontam para a participação do hormônio ecdisona no processo de formação dos pufes de DNA, e da amplificação e transcrição gênica a nível desses pufes. Diversos estudos realizados em *T. pubescens* e *R. americana* envolvendo a injeção da ecdisona em um período apropriado do desenvolvimento (CROUSE, 1968; AMABIS e AMABIS, 1984a; STOCKER e PAVAN, 1974 e BERENDES e LARA, 1975), ou a ligadura de um segmento larval para o impedimento da passagem de hormônios produzidos pelas glândulas endócrinas (AMABIS e AMABIS 1984b), ou ainda, experimentos de transplante de glândulas salivares (AMABIS e CABRAL, 1970; AMABIS e SIMÕES, 1971) permitiram demonstrar a necessidade da ecdisona para o desenvolvimento dos pufes de DNA. Em *Bradysia hygida* mostramos também, anteriormente, que a administração do hormônio ecdisona em larvas novas induz o processo de formação dos pufes de DNA (FONTES, 1988), assim como a amplificação e transcrição de genes localizados nos pufes de DNA C4 e B10 (FONTES et al., 1991). Nesse trabalho, a análise de seqüências da região promotora do gene BhB10 permitiu a identificação de uma seqüência de 20 pb, rica em adenina, com alta similaridade à uma seqüência conservada entre diversos genes de *Drosophila* que respondem a ecdisona, porém de função desconhecida. No promotor do gene BhB10 observamos também uma seqüência de 13 pb com similaridade parcial (69%) à seqüência EcRE, onde, em três genes de *Drosophila* (hsp27, Eip 27/28

e P1) se liga o receptor da ecdisona. Uma análise da seqüência da região promotora de outros genes amplificados nos pufes de DNA C4 de *B. hygida*, C8 de *R. americana*, C4B de *T. pubescens* e no pufe II/9A de *S. coprophila* também mostrou a ocorrência de seqüências similares ao EcRE. Neste sentido, é bastante interessante o fato de em estudos recentes realizados em *S. coprophila* ter sido relatado que três oligonucleotídeos da região promotora do gene II/9-1 com similaridade parcial (39% a 62%) ao elemento EcRE, após a incubação com extrato da glândula salivar apresentam um retardamento da mobilidade eletroforética, e que esse complexo (DNA+proteína do extrato glandular) por sua vez sofre um retardamento adicional da mobilidade eletroforética ("supershift"), após a incubação com anticorpo policlonal contra o receptor da ecdisona de *Drosophila* (citado na rev. GERBI et al., 1993). Estudos recentes de imunolocalização, utilizando anticorpo policlonal contra receptor da ecdisona de *Chironomus*, sugerem a ligação do receptor às regiões formadoras de pufes de DNA em *R. americana* e *T. pubescens* (STOCKER et al., 1995). Essas observações fortalecem a idéia da ocorrência de elementos de ligação do receptor da ecdisona em genes amplificados em pufes de DNA, abrindo a interessante perspectiva de que a replicação nesse caso possa estar também sob direto controle hormonal.

A amplificação gênica durante o desenvolvimento é um evento raro em células somáticas de eucariotos. São conhecidos dois exemplos, os genes que codificam para as proteínas coriônicas, em células do folículo ovariano de *Drosophila* (SPRADLING e MAHOWALD, 1980, rev. KAFATOS et al., 1987) e os genes de pufes de DNA, que ocorrem em glândulas salivares de Sciarídeos, no final do último estágio larval (rev. LARA, 1987 e LARA et al., 1991). Em ambos os casos a amplificação gênica é entendida como um processo necessário para atender a grande demanda de produtos em um curto período de tempo. Entretanto, os aspectos moleculares envolvidos na regulação da amplificação gênica durante o desenvolvimento ainda são pouco conhecidos. Em *Drosophila*, análises genéticas e estudos de transformação mediada pelo elemento P, associados a mutações dirigidas, permitiram identificar elementos essenciais

para a amplificação denominados ACE (ORR-WEAVER e SPRADLING, 1986; ORR-WEAVER et al., 1989), e outros elementos AER requeridos para a manutenção de altos níveis de amplificação (DELIDAKIS e KAFATOS, 1987 e DELIDAKIS e KAFATOS, 1989). Dentro do domínio ACE foram identificados 10 elementos altamente conservados entre diversas espécies de *Drosophila*, cujo papel funcional é desconhecido (MARTINEZ-CRUZADO et al., 1988, para rev. ver ORR-WEAVER, 1991). Nesse trabalho a análise da região promotora do gene BHB10 também permitiu a identificação de 3 dos elementos altamente conservados no domínio ACE. Entretanto, o esclarecimento a respeito da participação, ou não, desses elementos no mecanismo de amplificação gênica requer ensaios funcionais.

Outra característica interessante detectada na região promotora do gene BHB10 é uma seqüência de 11 pb, com similaridade à seqüência ACS (seqüência consenso de ARS) conservada entre os diferentes elementos ARS de levedura (PALZKILL e NEWLON, 1988). Essa seqüência, também conhecida como elemento A, é essencial para a função de origem e a ela se associa um complexo de 6 proteínas, conhecido como ORC (complexo de reconhecimento de origem, BELL et al., 1993,a,b; rev. ROWLEY et al., 1994). Essa seqüência foi também identificada no domínio coriônico de *Drosophila*, onde foi mapeada uma origem de replicação, através de eletroforese em géis bi-dimensionais (DELIDAKIS e KAFATOS, 1989 e HECK e SPRADLING, 1990). O consenso ACS foi identificado em vários outros genes eucarióticos cuja origem foi mapeada experimentalmente como: gene para rDNA de *Tetrahymena thermophila*, gene da dihidrofolato redutase (DHFR) de ovário de hamster chinês, proto-oncogene humano que codifica para *c-myc*, gene que codifica para histona H5 de galinha e gene que codifica para rodopsina de ovário de hamster chinês (DOBBS et al., 1994 e para rev. HAMLIN e DIJKWEL, 1995). Se os mecanismos que regulam o início de replicação do DNA são conservados de levedura a eucariotos superiores, a identificação de fatores que se ligam à seqüência ACS, bem como de outros fatores que se associam às seqüências adjacentes, os quais parecem ser também importantes para a ativação da replicação de ARS, deverá contribuir grandemente para a elucidação da

regulação da replicação em eucariotos. Deste modo, a identificação na região promotora do gene BhB10 de uma seqüência com alta similaridade ao elemento ACS despertou-nos grande interesse para investigações futuras sobre um possível significado funcional desses elementos na regulação da amplificação gênica deste domínio.

II. Proteína deduzida do cDNA relativo ao pufe B10

O cDNA de 1,0 kb relativo ao pufe B-10, aqui isolado, codifica uma proteína de 17,71 kDa, a qual apresenta um caráter ácido (pI de 5.6) e um alto conteúdo de glicina (25%) e leucina (15%). Utilizando o método de VON HEIJNE (1986) é predito um sítio de clivagem de peptídeo de secreção entre os resíduos 19 e 20, sugerindo que a proteína PB10 possa ser uma proteína de secreção da glândula salivar.

Essa proteína PB10 contém 49% de identidade entre as regiões N e C-terminais, sugerindo que seja produto de uma duplicação gênica ocorrida durante a evolução (**figura 21**). A presença de 4 repetições de oito aminoácidos (DGLIXGLVX) simetricamente dispostos, reforça essa hipótese. Em *Chironomus* (GALLI e WIESLANDER, 1993; PAULSSON et al., 1992) foram relatados diversos genes codificadores para proteínas de secreção da glândula salivar, cuja estrutura também é favorável a hipótese da ocorrência de uma duplicação gênica durante a evolução. Deste modo, esta característica não é rara entre os genes codificadores para proteínas de secreção da glândula salivar de inseto.

A proteína PB10 é uma proteína distinta das demais proteínas codificadas por genes presentes em pufes de DNA. A maior identidade, de cerca de 21%, foi obtida com a proteína do pufe C-8 de *R. americana*. Apesar da baixa identidade da proteína PB10 com outras proteínas de genes amplificados em pufes de DNA, PB10 apresenta um alto conteúdo de resíduos hidrofóbicos, similar ao encontrado na proteína do pufe C-4 de *B. hygida* e C-8 de *R. americana* (FRYDMAN et al., 1993 e MONESI et al., 1995). Além disso, uma comparação da seqüência de aminoácidos da proteína PB10 com seqüências presentes nos

bancos de dados do NCBI e SWEEP.DAT mostrou similaridade com as regiões ricas em glicina de outras proteínas em que este resíduo também é abundante, como: queratinas, proteínas ligantes de mRNA, proteínas constituintes da parede de células vegetais e da casca do ovo de *Schistosoma*. Os polipeptídeos da super-família das proteínas ricas em glicina apresentam diversas repetições do motivo $x(y)_n$ (onde x é um resíduo aromático ou alifático de cadeia longa, y é o resíduo de glicina e n pode variar de 1-35). Esses grupos de glicina podem ocasionalmente conter resíduos hidrofílicos como serina, asparagina e arginina e resultam na formação de alças de glicina, importantes na organização tri-dimensional e no papel desempenhado por essas proteínas (STEINER et al., 1991). A proteína PB10 apresenta em sua região N-terminal (do resíduo 32 ao 64) uma organização similar, com 5 agrupamentos de glicina inter-espaçados por resíduos aromáticos ou alifáticos, sugerindo a existência nessa região de uma estrutura de alças de glicina. Esclarecimentos sobre a estrutura desta proteína dependem da purificação bioquímica do polipeptídeo, seguido por ensaios de cristalografia de raio-X, e poderão contribuir para a compreensão do papel desempenhado pela mesma durante o desenvolvimento larval e, assim, para o entendimento do significado biológico da amplificação desses genes.

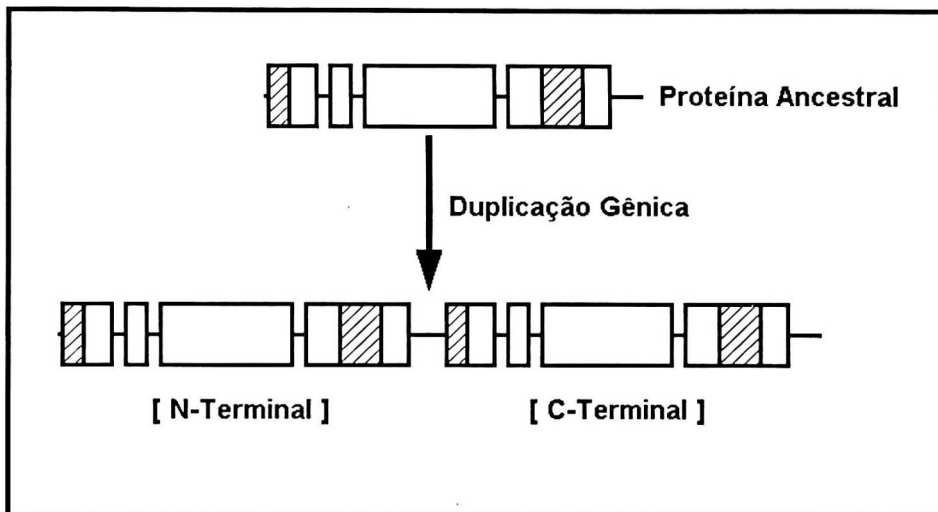


Figura 21 - Hipótese da Duplicação Gênica. A análise da seqüência primária da proteína PB10 revela uma identidade de 49% entre as regiões N e C-terminais, 4 repetições principais (quadrado hachurado) e diversas regiões com resíduos de alta similaridade (quadrado não hachurado). Essa organização pode ser decorrente de uma duplicação gênica durante a evolução. As linhas sólidas indicam as regiões codificadoras variáveis.

III. Relação entre os processos de formação dos pufes de DNA amplificação e transcrição gênica

Nesse trabalho, o estudo da expressão do mRNA do gene BhB10 nas três regiões da glândula salivar de *B. hygida* mostra que, embora em quantidades menores, a mensagem é também expressa na região S2, onde o pufe B10 não se forma. A detecção de menor quantidade do mRNA BhB10 em S2, quando comparada às outras duas regiões provavelmente é consequência da ausência de amplificação gênica nessa região (FONTES e PAÇÓ-LARSON, 1992). Além disso, a detecção de mensagens na região S2 indica que a transcrição *per se* não é suficiente para a expansão do pufe de DNA B10.

Evidências indiretas de que a expansão dos pufes de DNA depende da ocorrência de amplificação do DNA foram obtidas em estudos citológicos realizados pelo grupo de Sauaia, durante a década de 70, utilizando drogas que interferem com a síntese de DNA. Nestes estudos foi mostrado que a administração, em tempo e doses apropriadas de hidroxiuréia ou IMPY suprime ou inibe fortemente o desenvolvimento dos pufes de DNA, sem impedir a transcrição nestes sítios (embora em níveis menores) e sem impedir a continuação do desenvolvimento larval e o programa de formação dos pufes de RNA (SAUAIA et al., 1971; RIBEIRO, 1975; ALMEIDA, 1977 e ALVES, 1981).

Estudos moleculares de alguns pufes de DNA têm mostrado a ocorrência de mais de um gene na região de amplificação desses *loci* cromossômicos, similar ao observado no domínio coriônico de *Drosophila* (DiBARTOLOMEIS e GERBI, 1989; COELHO et al., 1993 e COSTA, 1995). Níveis máximos de amplificação, de 10-50X, ocorre entre genes cujo perfil de transcrição acompanha a formação dos pufes de DNA (SANTELLI, et al., 1991, PAÇÓ-LARSON, et al., 1992; FONTES, et al., 1992a; CADAVID, 1993; WU et al., 1993; MONESI, 1995; COSTA, 1995, SOARES, 1995). Em *B. hygida*, foi mostrado que genes expressos antes da abertura dos pufes, ou quando os mesmos já regrediram, atingem níveis de amplificação de 3-4X (COELHO, 1993; COELHO et al., 1993).

Esse conjunto de observações, citológicas e moleculares, levam a interpretação de que a formação dos pufes de DNA é consequência da ativação de genes amplificados acima de um determinado nível, num rearranjo topográfico da cromatina para acomodar as maquinarias de transcrição e replicação que ocorrem concomitantemente nesses sítios cromossômicos.

SUMÁRIO

Neste trabalho aprofundamos a caracterização molecular de um fragmento de 2 kb-*EcoRI* previamente demonstrado amplificar no pufe de DNA B10 de *B. hygida* e conter seqüências complementares à duas espécies de mRNA reguladas durante o desenvolvimento da glândula salivar do último estágio larval (Fontes et al.,1992).

O seqüenciamento deste fragmento de 2 kb e de um cDNA de 1 kb a êle complementar, em associação com experimentos de "5' extension", resultou no mapeamento fino de uma unidade de transcrição no fragmento de 2 kb. Na análise da seqüência de 816 pb que flanqueia a unidade de transcrição a 5' nós identificamos seqüências similares a elementos provados experimentalmente participar da regulação da transcrição de genes de *Drosophila* pelo hormônio ecdisona. Neste segmento de 816 pb nós também encontramos seqüências similares a seqüências conservadas no elemento ACE, geneticamente definido como controlador da amplificação gênica no domínio coriônico de *Drosophila*, e com a seqüência ACS essencial para o funcionamento das seqüências ARS como origens de replicação em cromossomos de levedura.

A análise das pontas 5' e 3' dos mRNAs do gene BhB10, realizada através de experimentos de "5' extension" e por avaliação do tamanho das mensagens após a retirada da cauda poli A, indica que o gene BhB10 codifica uma mensagem que sofre um encurtamento da cauda poli A durante o desenvolvimento. O papel desse processo na expressão da proteína não foi abordado experimentalmente neste trabalho. A seqüência de aminoácidos deduzida da fase de leitura aberta presente no cDNA indica que a proteína codificada pelo gene BhB10 é secretada pela glândula.

Ainda neste trabalho, experimentos de hibridação em "northern blot" mostram que os mRNAs do BhB10 estão presentes nas três diferentes regiões da glândula salivar de *B. hygida*. Uma vez que em uma destas regiões (chamada S2) o pufe B10 não se forma, nossos resultados indicam que a formação deste pufe não é conseqüência da atividade transcricional *per se*. Em vez disto, como sugerido por resultados preliminares não apresentados aqui, a falta de amplificação desse gene na região glandular S2 poderia explicar o fato do pufe de DNA não se formar em cromossomos de S2. Nossas observações

de que na região S2 os mRNAs do gene B_hB10 estão presentes em menor quantidade, quando comparado às outras duas regiões glandulares, são compatíveis com a falta de amplificação gênica na região S2 e enfatizam o papel da amplificação gênica como um mecanismo de controle da expressão gênica.

SUMMARY

In this work we extend the molecular characterization of a 2 kb *EcoRI* fragment, previously shown to amplify in the DNA puff B10 of *B. hygida*, and to contain sequences complementary to two mRNAs regulated developmentally in the larvae salivary gland (Fontes et al., 1992).

The sequencing of this 2 kb genomic fragment and of a 1kb cDNA complementary to it, together with experiments of 5' extension, allowed the fine mapping of a complete transcription unit to the 2 kb fragment. In the analysis of 816 pb flanking the 5' transcription unit we identified sequences similar to the elements experimentally proved to participate in the regulation of *Drosophila* genes transcription by the molt hormone ecdysone. In this 816 pb segment we also found sequences similar to ones conserved in the amplification control element (ACE), that was genetically defined in the *Drosophila* chorion domain, and to the consensus sequence ACS found in the replication origin of yeast chromosomes.

The analysis of the 5' and 3' structure of the BhB10 mRNAs, by 5' extension and deletion of the mRNA poly A tails, indicates that the BhB10 gene encodes a message that suffers a poly A tail shortening during development. What role this process could have in the expression of the protein was not experimentally accessed here. The sequence deduced from the open reading frame (ORF) present in the cDNA indicates that the encoded protein is secreted by the gland.

Also in this work, the analysis by developmental northern blot hybridization shows that the BhB10 mRNAs are present in the three different regions of the salivary gland. Since in one of these regions (called S2) the DNA puff B10 is not formed, our results indicate that the puff formation is not a consequence of the transcription activity *per se*. Instead, as suggested by preliminary results not presented here, the lack of this gene amplification in the S2 gland region may explain why the DNA puff is not formed in the S2 chromosomes. Our observation that in the S2 region there is less BhB10 mRNA, compared with the other two gland regions, is also compatible with the lack of gene amplification in the S2 region and emphasizes the role of gene amplification as a control of gene expression.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C.C. & WORKMAN, J.L.** (1993) Nucleosome Displacement in transcription. *Cell*, 72:305-308.
- ALBERTA, J.A.; RUNDELL, K. & STILES, C.D.** (1994) Identification of an activity that interacts with the 3'- untranslated region of c-myc mRNA and the role of its target sequence in mediating rapid mRNA degradation. *J. Biol. Chem.*, 269:4532-4538.
- ALMEIDA, J.C.** (1989) The relation between the DNA puff B10 and the production of a salivary polypeptide of 25kD in the salivary gland of *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae). *Arq. Biol. Tecn.*, 32:26.
- ALMEIDA, J.C.** (1977) Efeito da 5-bromodesoxiuridina sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA dos cromossomos politênicos da região anterior da glândula salivar de *Bradysia hygida*. (Diptera, Sciaridae). Tese de Doutorado, Depto de Morfologia, FMRP/USP.
- ALMEIDA, J.C.; CONACCI, M.E.; de BARROS, H.H.; MONESI, N.; PAÇOLARSON, M.L.** (1993). A delayed effect of cyclohexemidine on the expression of a specific mRNA in the salivary gland of *B. hygida*. Anais da XXII SBBq, pg 27.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. & LIPMAN, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- ALVARENGA, C.A.S.; PUEYO, M.T. & LARA, F.J.S.** (1979) *In vitro* DNA puff induction by beta-ecdysone in salivary glands of *Rhynchosciara americana*. *Ann. Acad. Brasil. Ciênc.*, 51:182-183.
- ALVES, M.A.R.** (1975) Cromossomos politênicos de *Bradysia hygida*. Especificidade do padrão de pufes de DNA segundo o tipo celular. Dissertação de Mestrado, FMRP- USP.
- ALVES, M.A.R.** (1981) Pufes de DNA e histólise da glândula salivar em *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae). Tese de Doutorado, Depto de Morfologia, FMRP/USP.
- AMABIS, D.C. & AMABIS, J.M.** (1984a) Effects of ecdysterone in polytene chromosomes of *Trichosia pubescens*. *Devel. Biol.*, 102:1-9.
- AMABIS, D.C. & AMABIS, J.M.** (1984b) Hormonal control of gene amplification and transcription in the salivary chromosomes of *Trichosia pubescens*. *Devel. Biol.*, 102:10-20.
- AMABIS, J.M. & CABRAL, D.** (1970) RNA and DNA puffs in polytene chromosomes of *Rhynchosciara*. Inhibition by extirpation of the prothorax. *Science*, 169:692-694.

- AMABIS, J.M. & SIMÕES, L.C.G.** (1971) Puff induction and regression in *Rhynchosciara angelae* by the method of salivary gland implantation. *Genetica*, 42:404-413.
- ANACHOVA, B. & HAMLIN, J.L.** (1989) Replication in the amplified dihydrofolate reductase domain in CHO cells may initiate at two distinct sites, one of which is a repetitive sequence element. *Mol. Cell Biol.*, 9:532-540.
- ASHBURNER, M.; CHIARA, C.; MERLTZER, P. & RICHARDS, G.** (1974) Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 38:655-662.
- ASHBURNER, M. & RICHARDS, G.** (1976) Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* III. Consequences of ecdysone withdrawal. *Dev. Biol.*, 54:241-255.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, R.E. SEIDMAN, D.D.; SMITH, J.A. & STRUL, K.** (1987) Current Protocols in Molecular Biology. New York, Greene Publishing Associates e Willey-Interscience.
- BARINAGA, M.** (1994) Yeast enzyme finds fame in link to DNA replication. *Science*, 265:1175-1176.
- BELL, S.P. & STILLMAN, B.** (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*, 357:128-134.
- BELL, S.P.; KOBAYASHI, R. & STILLMAN, B.**(1993a) Yeast origin recognition complex functions in transcriptional silencing and DNA replication *Science*, 262:1844-1849.
- BELL, S.P.; MARAHRENS, Y.; RAO, H. & STILLMAN, B.** (1993b) The replicon model and eukaryotic chromosomes. In: *Symposia on Quantitative Biology*, vol. LVIII, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 435-442.
- BELL, S.P.** (1995) Eukaryotic replicators and associated protein complexes. *Cur. Op. Gen. Dev.*, 5:162-167.
- BENBOW, R.M.; ZHAO, J. & LARSON, D.D.** (1992) On the nature of DNA replication in eukaryotes. *Bioessays*, 14(10):661-
- BERENDES, H.D. & LARA, J.F.C.** (1975) RNA synthesis: a requirement for hormone induced DNA amplification in *Rhynchosciara americana*. *Chromosoma*, 50:259-274.
- BERNARD, E.; LAGNEL, C. & PIERRON,** (1992) Mapping of a *Physarium* chromosomal origin of replication tightly to a developmentally-regulated profilin gene. *Nucleic. Acids. Res.* 20:3309-3315.

- BIENZ-TADMOR, B.; SMITH, H.S. & GERBI, S.A.** (1991) The promoter of DNA puff II/9-1 of *Sciara coprophila* is inducible by ecdysone in late prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Cell regulation*, 2:875-888.
- BREUER, M.E. & PAVAN, C.** (1955) Behavior of polytene chromosome of *Rhynchosciara angelae* at different stages of development. *Chromosoma*, 7:371-381.
- BURHANS, W.C.; VASSILEV, L.T.; CADDLE, M.S.; HEINTZ, N.H. & DEPAMPHILIS, M.L.** (1990) Identification of an origin of bidirectional DNA replication in mammalian chromosomes. *Cell* 62:955-965.
- CADAVID, E.O.** (1993) Caracterização molecular e quantificação das seqüências amplificadas no pufe de DNA C-8 de *Rhynchosciara americana*. Tese de Doutorado, IQ/USP, São Paulo.
- CHEN, C.Y.A.; CHEN, T. & SHYU, A.B.** (1994) Interplay of two functionally and structurally distinct domains of the *c-fos* AU-rich element specifies its mRNA-destabilizing function. *Mol. Cel. Biol.*, 14:416-426.
- CHEN, C.Y.A. & SHYU, A.B.** (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *TIBS* 20:465-470.
- CHERBAS, L.; LEE, K. & CHERBAS, P.** (1990). The induction of Eip 28/29 by ecdysone in *Drosophila* cell lines. *Int. J. Invertebr. Reprod. Dev.* 18:108.
- CHERBAS, L.; LEE, K. & CHERBAS, P.** (1991). Identification of ecdysone response elements by analysis of the Eip28/29 gene. *Genes Dev.*, 5:120-131.
- CHIRGWIN, J.; AEYBLE, A.; MCDONAL, R. & RUTTER, W.** (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease., 8:5294-5299.
- CHIU, C.P. & BLAU, H.M.** (1984). Reprogramming cell differentiation in the absence of DNA synthesis. *Cell* 37:879-887.
- COELHO, P.S.R. & ALMEIDA, J.C.** (1989) The effect of cicloheximide in low concentration on the synthesis of two groups of polypeptides in the anterior region (S1) of the salivary gland of *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae). *Anais da XVIII SBBq*, pg 27.
- COELHO, P.S.R.** (1993) Caracterização de clones portadores de seqüências gênicas de pufes de DNA de *Bradysia hygida*. Dissertação de Mestrado. Depto de Morfologia FMRP/USP.
- COELHO, P.S.R.; MONESI, N.; de ALMEIDA, J.C.; TOLEDO, F.; BUTTIN, G. & PAÇÓ-LARSON, M.L.** (1993) DNA puff C4 of *B.hygida* contains genes unequally amplified and differentially expressed during development. *Chromosome Res.*, 1:121-126.

- CONACCI, M.E.; BARROS, H.H. & ALMEIDA, J.C.** (1994) The effect of cycloheximide on the expression of the 1,3 kb RNA species coded by DNA puff B10 in the salivary gland of *Bradysia hygida*. *Annais da XXIII SBBq*, pg 32.
- COSTA, R.M.A.** (1995) Caracterização molecular do DNA genômico do pufe de DNA C4B de *Trichosia pubescens*. Dissertação de Mestrado, IB/USP, São Paulo.
- CROUSE, H.V.** (1968) The role of ecdysone in DNA puff formation and DNA synthesis in the polytene chromosomes of *S.coprophila*. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 61:1971
- CROUSE, H.V. & KEYL, H.G.** (1968) Extra replication in the DNA puffs of *S. coprophila*. *Chromosoma*, 25:357-364.
- DELIDAKIS, C. & KAFATOS, F.C.** (1987) Amplification of a gene cluster in *Drosophila* is subject to multiple as regulatory elements and to long-range position effects. *J. Mol. Biol.* 197:11-26.
- DELIDAKIS, C. & KAFATOS, F.C.** (1989) Amplification enhancers and replication origins in the autosomal chorion cluster of *Drosophila*. *EMBO J.*, 8:891-901.
- DESSEN, E.M.B.; MIDDELER, M. & SCHIMIDT, E.** (1995) Molecular characterization of DNA puff C4B gene of *Trichosia pubescens*. *Chromosoma* (in press).
- de TOLEDO, S.M. & LARA, F.J.S.** (1978) Translation of messages transcribed from the "DNA puffs" of *Rhynchosciara*. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 85:160-166.
- DHAR, V. SKOUTHCHI, A.I. & SCHILDKRAUT, C.L.** (1989) Activation and repression of a β -globin gene in cell hybrids is accompanied by shift in its temporal replication. *Mol. Cell Biol.*, 9: 3524-3532.
- DIBARTOLOMEIS, S.M. & GERBI, S.A.** (1989) Molecular Characterization of DNA Puff II/9A Genes in *Sciara coprophila*. *J. Mol. Biol.*, 210:531-540.
- DIFFLEY, J.F.X. & COCKER, J.H.** (1992) Protein-DNA interactions at a yeast replication origin. *Nature*, 357:169-172.
- DIJKWELL, P.A. & HAMLIN, J.L.** (1992) Initiation of DNA replication in the dihydrofolate reductase locus is confined to the early S period in CHO cells synchronized with the plant amino acid mimosine. *Mol. Cell Biol.* 12:3715.
- DOBBS, D.L.; SHAIU, W.-L. & BENBOW, R.M.** (1994) Modular sequence elements associated with origin regions in eukaryotic chromosomal DNA. *Nucl. Ac. Res.*, 22(13):2479-2489.

- DOWELL, S.J.; ROMANOWSKI, P. & DIFFLEY, J.F.X.** (1994) Interaction of Dbf4, the cdc7 protein kinase regulatory subunit, with yeast replication origins *in vivo*. *Science*, 265:1243-1246.
- DU, C.; SANZGIRL, R.P.; SHAU, W.L.; CHOI, J.K.; HOU, Z.HEN, H.; BENBOW, R.M. & DOBBS, D.L.** (1995) Modular structural elements in the replication origin region of Tetrahymena rDNA. *Nucleic Acids Res.*, 23:1766-1774.
- FICQ, A. & PAVAN, C.** (1957) Autoradiography of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Nature*, 180:983-984.
- FONTES, A.M.** (1988) Efeito da ecdisona sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA em glândula salivar de *B.hygida*. Monografia apresentada a FFCLRP/USP.
- FONTES, A.M.; COELHO, P.S.R. & PAÇÓ-LARSON, M.L.** (1991) Hormone-induced amplification and transcription of a gene sequence from DNA puff C4 of *Bradysia hygida*. Anais da XX SBBq, pg 93.
- FONTES, A.M.; de ALMEIDA, J.C.; EDSTROM, J.E. & PAÇÓ-LARSON, M.L.** (1992) Cloning of a B-10 DNA puff sequence developmentally amplified and expressed in the salivary gland of *Bradysia hygida*. *Braz. J. Med. Biol. Res*, 25:777-780.
- FONTES, A.M. & PAÇÓ-LARSON, M.L.** (1992) Characterization of a 2 kb fragment from DNA puff B-10 in the three different salivary gland region of *B. hygida*. Anais da XXI SBBq, pg 145.
- FRYDMAN, H.M.; CADAVID, E.O.; YOKOSAWA, J.; SILVA, F.H.; NAVARRO-CATTAPAN, L.D.; SANTELLI, R.V.; JACOBS-LORENA, M.; GRAESSMANN, M.; GRAESSMANN, A.; STOCKER, A.J. & LARA, F.J.S.** (1993) Molecular characterization of the DNA puff C-8 gene of *Rhynchosciara americana*. *J. Mol. Biol.*, 233:799-803.
- GABRUSEWYZEZ-GARCIA, N.** (1964) Cytological and autoradiographic studies in *Sciara coprophila* salivary gland chromosome. *Chromosoma*, 15:312-324.
- GALE, J.M.; TOBEY, R.A. & D'ANNA, J.A.** (1992) Localization and DNA sequence of a replication origin in the rodopsin gene locus of Chinese hamster cells. *J. Mol. Biol.* 224:343-358.
- GALLI, J. & WIESLANDER, L.** (1993) Two secretory genes in *Chironomus tentans* have arisen by gene duplication and exhibit different developmental expression patterns. *J. Mol. Biol.*, 234:324-334.
- GAY, D.A.; YEN, T.J.; LAU, J.T.Y. & CLEVELAND, D.W.** (1987) Sequences that confer β -tubulin autoregulation through modulated mRNA stability reside within exon 1 of a β -tubulin mRNA. *Cell*, 50:671-670

- GERBI, S.A.; LIANG, C.; WU, N.; DIBARTOLOMEIS, S.M.; BIENZ-TADMOR, B.; SMITH, H.S. & URNOV, F.D. (1993) DNA amplification in DNA puff II/9A of *Sciara coprophila*. In: *Symposia on Quantitative Biology*, vol. LVIII, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 487-494.
- GOODRICH, J.A. & TJIAN, R. (1994) TBF-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:403-409.
- GLOVER, D.M.; ZAHA, A.; STOCKER, A.J.; SANTELLI, M.T.; de TOLEDO, S.M. & LARA, F.J.S. (1982) Gene amplification in *Rhynchosciara* salivary gland chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79:2947-2953.
- GOLDMAN, M.A.; HOLMQUIST, G.P.; GRAY, M.C.; CASTON, L.A. & NAG, L.A.. (1984) Replication time of mammalian genes and middle repetitive sequences. *Science*, 224:686-692.
- GRAFI, G. & GALILI, G. (1993) Induction of cytoplasmic factors that bind of the 3' AU-rich region of human interferon β mRNA during early development of *Xenopus laevis*. *FEBS*, 336:403-407.
- GRAFI, G.; SELA, I. & GALILI, G. (1993) Translational regulation of human beta interferon mRNA: association of the 3' AU-rich sequence with the poly(A) tail reduces translation efficiency *in vitro*. *Mol. Cel. Biol.*, 13:3487-3493.
- GREENBERG, M.E. & BELASCO, J.G. (1993) Control of the decay of labile protooncogene and cytokine mRNAs. In *Control of Messenger RNA Stability* Acad. Press, INC California, pg 199-218.
- GUNARATNE, P.H.; NAKAO, M.; LEDBETTER, D.H.; SUTCLIFFE, J.S. & CHINAULT, A.C. (1995) Tissue-specific and allele-specific replication timing control in the imprinted human Prader-Willi syndrome region. *Genes & Dev.*, 9:808-820.
- HAMLIN, J.L. (1992) Mammalian origins of replication. *Bioessays*, 14(10):651-659.
- HAMLIN, J.L. & DIJKWEL, P.A. (1995) On the nature of replication origins in higher eukaryotes. *Cur. Op. Gen. Dev.*, 5:153-161.
- HECK, M. M. S. & SPRADLING, A.C. (1990). Multiple replication origins are used during *Drosophila* Chorion gene amplification. *J. Cell Biol.*, 110:903-914.
- HEINTZ, N.H. & HAMLIN, J.L. (1982) An amplified chromosomal sequence that includes the gene for dihydrofolate reductase initiates replication within specific restriction fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79: 4083-4087.
- HEINTZ, N.H.; DAILEY, L.; HELD, P. & HEINTZ, N. (1992) Eukaryotic replication origins as promoters of bidirectional DNA synthesis. *TIG*, 8(11):376-381.

- HERRICH, D.J. & ROSS, J.** (1994) The half-life of *c-myc* mRNA in growing and serum-stimulated cells: influence of the coding and 3' untranslated regions and role of ribosome translocation. *Mol. Cel. Biol.*, 14:2119-2128.
- HOFFMAN, E. & CORCES, V.** (1986) Sequences involved in temperature and ecdysterone-induced transcription are located in separate regions of a *Drosophila melanogaster* heat shock gene. *Mol. Cel. Biol.*, 6:663-673.
- HULTMARK, D.; KLEMENZ, R. & GEHRING, W.** (1986) Translational and transcriptional control elements in the untranslated leader of the heat-shock gene *hsp22*. *Cell*, 44:429-438.
- KAFATOS, F.C.; SPOEREL, N.; MITSIALIS, S.A.; NGUYEN, H.T.; ROMANO, C.; LINGAPPA, J.R.; MARIANI, B.D.; RODAKIS, G.C.; LECANIDOU, R. & TSITILOU, S.G.** (1987) Developmental control and evolution in the chorion gene families of insects. *Advances in Genetics*, 24:223-242.
- KITSBERG, D.; SELIG, S.; KESHET, I. & CEDAR, H.** (1993) Replication structure of the beta-globin domain. *Nature*, 366:588-590.
- KOZAK, M.** (1984) Compilation and analysis of sequences upstream from the translation start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 12:857-872.
- KROWCZYNSKA, A.R.; YENOFSKY, R. & BRAWERMAN, G.** (1985) Regulation of messenger RNA stability in mouse erythroleukemia cells. *J. Mol. Biol.* 181:231-239.
- LAICINE, E.M.; ALVES, M.A.R.; de ALMEIDA, J.C.; RIZZO, E.; ALBERNAZ, W.C. & SAUAIA, H.** (1984) Development of DNA puffs and patterns of polypeptide synthesis in the salivary glands of *Bradysia hygida*. *Chromosoma*, 89:280-284.
- LARA, F.J.S.** (1987) Gene amplification in *Rhyncosciara* (1955-1987). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82(suppl. III):125-128, Intern. Symp. on Insects.
- LARA, F.J.S.** (1988) Developmentally regulated gene amplification in *Rhynchosciara*. In: *The Roots of Modern Biochemistry*. Walter de Gruyter & Co, New York.
- LARA, F.J.S.; STOCKER, A.J. & AMABIS, J.M.** (1991) DNA sequence amplification in sciarids flies: results and perspectives. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 24:233-248.
- LEFFAK, M. & JAMES, D.** (1989) Opposite replication polarity of the germ line *c-myc* gene in HeLa cells compared with that of two Burkitt lymphoma cell line. *Mol. Cell Biol.*, 9:586-593.
- LIANG, C.; SPITZER, J.D.; SMITH, H.S. & GERBI, S.A.** (1993) Replication initiates at a confined region during DNA amplification in *Sciara* DNA puff II/9A. *Genes & Dev.*, 7:1072-1084.

- LINSKENS, M.H.K. & HUBERMAN, J.A.** (1990) The two faces of higher eukaryotic DNA replication origins. *Cell*, 62:845-847.
- MACK, J.W.; TORCHIA, D.A. & STEINERT, P.M.** (1988) Solid -state NMR studies of the dynamics and structure of mouse keratin intermediate filaments. *Biochemistry*, 27:5418-5426.
- MARIANI, B.D.; LINGAPA, J.R. & KAFATOS, F.C.** (1988) Temporal regulation in development: negative and positive cis-regulators dictate and precise timing of expression of a *Drosophila* chorion gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3029-3033.
- MARTÍNEZ-CRUZADO, J. C.; SWIMMER, C.; FENERJIAN, M. G.; & KAFATOS, F. C.** (1988). Evolution of the autosomal chorion *locus* in *Drosophila*. I. General organization of the *locus* and sequence comparisons of genes s15 and s19 in evolutionarily distant species. *Genetics* 119:663-667.
- MASCHAT, F.; DUBERTRET, M.L. & LEPESANT, J.A.** (1991) Transformation mapping of the regulatory elements of the ecdysone-inducible P1 gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.*, 11(5):2913-2917.
- MASCHAT, F.; DUBERTRET, M.L.; THÉRON, P.; CLAVERIE, J.M. & LEPESANT, J.-A.** (1990) Structure of the ecdysone-inducible P1 gene of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, 214:359-372.
- MONESI, N.; FERNANDEZ, M.A.; FONTES, A.M. ; BASSO, Jr.L.R.; NAKANISHI, Y.; BARON, B.; BUTTIN, G. & PAÇO-LARSON, M.L.** (1995). Molecular characterization of an 18kb segment of DNA puff C4 of *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae). *Chromosoma* 103:715-724.
- ORR-WEAVER, T. L. & SPRADLING, A. C.** (1986) *Drosophila* chorion gene amplification requires an upstream region regulating s18 transcription. *Mol. Cell Biol.* 6:4624-4633.
- ORR-WEAVER, T. L.; JOHNSTON, C. G. and SPRADLING, A. C.** (1989) The role of ACE3 in *Drosophila* chorion gene amplification. *EMBO J.*, 8(13) 4153-4162.
- ORR-WEAVER, T. L.** (1991) *Drosophila* chorion genes: cracking the eggshell's secrets. *Bioessays* 13:97-105.
- PAÇO-LARSON, M.L.** (1976) Análise quantitativa do conteúdo de DNA da glândula salivar de *Bradysia hygida*. Dissertação de Mestrado, Depto de Morfologia, FMRP/USP.
- PAÇO-LARSON, M.L.** (1982) Citofotometria do DNA de núcleos inteiros e de segmentos cromossômicos formadores de pufes de DNA da região anterior da glândula salivar de *Bradysia hygida* (Díptera, Sciaridae). Tese de Doutorado, Depto de Morfologia, FMRP/USP

- PAÇÓ-LARSON, M.L.; de ALMEIDA, J.C.; EDSTROM, J.E. & SAUAIA, H.** (1992) Cloning of a developmentally amplified gene sequence in the DNA puff C4 of *Bradysia hygida* salivary gland. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 22(5):439-446.
- PALZKILL, T.G. & NEWLON, C.S.** (1988) A yeast replication origin consists of multiple copies of a small conserved sequence. *Cell* 53:441.
- PAULSSON, G.; BERHOLM, K. & WIESLANDER, L.** (1992) Conserved and variable repeat structures in the Balbiani ring gene family in *Chironomus tentans*. *J. Mol. Evol.*, 35:205-219.
- RASCH, E.** (1970) Two-wavelength cytophotometry of *Sciara* salivary gland chromosomes. In: Wied, G. L. & Bahr, G. F. (Editors). *Introduction to quantitative Cytochemistry*. Academic Press, New York, 335-355.
- RIBEIRO, W.R.** (1975) Efeito do dihidro-1H- imidazol (1,2-b) pirazol (Impy) sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA de *Bradysia hygida*. Dissertação de Mestrado, FMRP-USP.
- RIDDIHOUGH, G. & PELHAM, H.R.B.** (1987) An ecdysone response element in the *Drosophila* hsp27 promotor. *EMBO J.*, 6(120):3729-3734.
- ROWLEY, A.; DOWELL, S.J. & DIFFLEY, J.F.X.** (1994) Recent developments in the initiation of chromosomal DNA replication: a complex picture emerges. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1217:239-256.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467.
- SANTELLI, R.V.; MACHADO-SANTELLI, G.; PUEYO, M.T.; NAVARRO-CATAPAN', L.D. & LARA, F.J.S.** (1991) Replication and transcription in the course of DNA amplification of the C3 and C8 puffs of *Rhynchosciara americana*. *Mechan. Develop.*, 36:59-66.
- SAUAIA, H.** (1971) Cromossomos politênicos de *B. hygida*: Inibição do desenvolvimento dos pufes de DNA pela hidroxiurêa. Tese de Doutorado, Depto de Morfologia FMRP/USP.
- SAUAIA, H. & ALVES, M.A.R.** (1968) A description of a new species of *Bradysia* (Diptera, Sciaridae). *Pap. Avul. Zool.*, 22:85-88.
- SAUAIA, H.; LAICINE, E.M. & ALVES, M.A.R.** (1971) Hydroxiurea-induced inhibition of DNA puff development in salivary gland chromosomes of *Bradysia hygida*. *Chromosoma*, 34:129-151.
- SHYU, A.; BELASCO, J.G. & GREENBERG, M.E.** (1991) Two distinct destabilizing elements in the *c-fos* message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes Dev.*, 5:221-231.

- SOARES, M.A.M.** (1995) Caracterização molecular do amplicon do pufe C3 e quantificação de seqüências na região dos pufes C3 e C8 e em três regiões controles do genoma de *Rhynchosciara americana*. Dissertação de Mestrado, IQ/USP, São Paulo.
- SPRADLING, A.C. & MAHOWALD, A.P.** (1980) Amplification of genes for chorion proteins during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1096-1100.
- SPRADLING, A.C.** (1981) The organization and amplification of two chromosomal domains containing *Drosophila* chorion genes. *Cell*, 27:193-201.
- STEINER, P. M.; MACK, J. W.; KORGE, B.P. & GAN, S.Q.** (1991) Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricrins and single-stranded RNA binding proteins. *Int. J. Biol. Macromol.*, 13:129-139.
- STINCHCOMB, D.T.; STRUHL, K. & DAVIS, R.W.** (1979) Isolation and characterization of a yeast chromosomal replicator. *Nature*, 282:39.
- STOCKER, A.J. & PAVAN, C.** (1974) The influence of ecdysterone on gene amplification DNA synthesis and puff formation in the salivary gland chromosomes of *R. hollaenderi*. *Chromosoma*, 45:295-319.
- STOCKER, A.J.; LEZZI, M. & LARA, F.J.S.** (1995) Antiserum against an ecdysone receptor reactive with RNA and DNA puff sites on the salivary gland chromosomes of *Rhynchosciara americana* and *Trichosia* (Diptera, Sciaridae). Anais da XXIV SBBq, pg 41.
- SWIMMER, C.; KASHEVSKY, H.; MAO, G. & KAFATOS, F. C.** (1992) Positive and negative elements of the *Drosophila* grimshawi S/8 chorion gene assayed in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 152:103-112.
- THEODORAKIS, N.G.; & CLEVELAND, D.W.** (1992) Physical evidence for cotranslational regulation of β -tubulin mRNA degradation. *Mol. Cel. Biol.*, 12:791-799.
- THEODORAKIS, N.G. & CLEVELAND, D.W.** (1993) Translationally coupled degradation of tubulin mRNA. *In Control of Messenger RNA Stability* Acad. Press, INC California, pg 219-238.
- TOLIAS, P.P. & KAFATOS, F.** (1990) Functional dissection of an early *Drosophila* chorion gene promoter: expression throughout the follicular epithelium is under spatially composite regulation. *EMBO J.*, 9:1457-1464.
- VAUGHN, J.P.; DIJKWELL, P.A. & HAMLIN, J.L.** (1990) Replication initiates in a broad zone in the amplified CHO dihydrofolate reductase domain. *Cell* 61:1075-1987.

- VON HEIJNE, G.** (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucl. Acid Res.*, 14:4683-4690.
- WINTER, C.E.; BIANCHI, A.G.; TERRA, W.R. & LARA, F.J.S.** (1977) Relationships between newly synthesized proteins and DNA puff patterns in salivary glands of *Rhynchosciara americana*. *Chromosoma*, 61:193-206.
- WOLFFE, A.P. & BROWN, D.D.** (1988) Developmental regulation of two 5S ribosomal RNA genes. *Science*, 241:1626-1632.
- WU, N.; LIANG, C.; DIBARTOLOMEIS, S.M.; SMITH, H.S. & GERBI, S.A.** (1993) Developmental Progression of DNA Puffs in *Sciara coprophila*: Amplification and Transcription. *Dev. Biol.*, 160:73-84.
- YOKOSAWA, J.** (1995) Mapeamento de origens de replicação do pufe de DNA C3 de *Rhynchosciara americana*. Tese de Doutorado. Depto de Bioquímica IQ-USP/S.P.
- YOU, Y.; CHEN, C.A. & SHYU, A.** (1992) U-rich sequence-binding proteins (URBPs) interacting with a 20-nucleotide U-rich sequence in the 3' untranslated region of *c-fos* mRNA may be involved in the first step of *c-fos* mRNA degradation. *Mol. Cel. Biol.*, 12:2931-2940.

GLOSSÁRIO E ABREVIATURAS

I. SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO

ATP	Trifosfato de Adenosina.
BSA	Albumina de soro bovino.
CIAP	Fosfatase alcalina do intestino de bezerro.
CTAB	Brometo de cetil-trietilamônia.
dCTP	Trifosfato de desoxiacitidina.
dGTP	Trifosfato de desoxiguanosina.
DEAE	Dietilaminoetil.
EDTA	Ácido tetraacético etilenodiamina.
HEPES	Ácido etano sulfônico hidroxietil piperazina.
IPTG	tio-β-D-galactosídeo isopropílico.
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico.
PIPES	Ácido 2-etanosulfônico piperazina.
SDS	Duodecil sulfato de sódio.
SSC 0,1X	NaCl 15mM, Citrato de sódio 1,5mM, pH7,0.
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TEMED	Tetrametiletilenodiamina.
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo.

II. SEQÜÊNCIAS DE DNA, FATORES, PROTEÍNAS E ABREVIATURAS REFERIDAS NESTE TRABALHO

ABF-1	"ARS binding factor 1"
ACS	"ARS consensus sequence"
ACE III	"amplification control element/third chromosome"
AER	"amplification enhancer region"
ARS	"autonomously replicating sequence"
Cdc	"cell division cycle"
cDNA	DNA complementar
DBF4	"DNA binding factor 4"
DHFR	Dihidrofolato redutase
DNA	ácido desoxirribonucleico
D.O.	densidade óptica
DUE	"DNA unwinding element"
EcRE	elemento de ligação do receptor da ecdisona
IMPY	2,3 - dihidro -1H - imidazo (1,2-b) pirazol
Kb	mil pares de bases.
M	molar
MAR	"matrix attachment region"
mM	milimolar
M-MLV	vírus da leucemia de murino Moloney.
mRNA	RNA mensageiro
rRNA	RNA ribossômico
rpm	rotações por minuto
N-terminal	terminal amina.
nt	nucleotídeo ou nucleotídeos.

pb	pares de base
pfu	unidade formadora de placa de lise
ORC	"origin recognition complex"
RNA	ácido ribonucleico
SAR	"scaffold associated region"
SNRPN	"small nuclear ribonucleoprotein-associated polypeptide N"
UTR	"untranslated region"

III. SÍMBOLOS PARA AS BASES NITROGENADAS DO DNA

A	adenina
C	citosina
G	guanina
T	timidina

IV. SÍMBOLOS DE LETRA ÚNICA E TRÍPLICE PARA OS AMINOÁCIDOS

A	Ala	alanina
C	Cys	cisteína
D	Asp	ácido aspártico
E	Glu	ácido glutâmico
F	Phe	fenilalanina
G	Gli	glicina
H	His	histidina
I	Ile	isoleucina
K	Lys	lisina
L	Leu	leucina
M	Met	metionina
N	Asn	asparagina
P	Pro	prolina
Q	Gln	glutamina
R	Arg	arginina
S	Ser	serina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
W	Trp	triptofano
Y	Tyr	tirosina
X		Qualquer resíduo de aminoácido

CURRICULUM VITAE

Endereço Residencial: Rua Margarida, 156 apto 02
Bairro Jardim Macedo
14091-070 - Ribeirão Preto, S. P.
Endereço Profissional: Depto de Morfologia/ FMRP-USP
Av. Bandeirantes, 3900
14049-000 - Ribeirão Preto. S. P.
e-mail apfontes@spider.usp.br

I. IDENTIFICAÇÃO

Nome- Aparecida Maria Fontes.
Estado civil- solteira
Data de Nascimento- 26 de Novembro de 1966.
Naturalidade- Sorocaba, SP
Nacionalidade- brasileira
Filiação- Orlando Fontes e Maria de Lourdes Dias Fontes.
R.G.: 14834021
C.P.F.: 131138028-06
CRB-1 Registro n 06339-01
CRP-MEC - Registro n 104635-LP.

Função Atual: Pós-graduanda em nível de Doutorado na área de Biologia Celular e Molecular (bolsista do CNPQ).

II FORMAÇÃO ACADÊMICA

GRADUAÇÃO: Curso de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 1984-1987.

1985-1988: Estágio no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfoiogia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, onde realizou o trabalho experimental para conclusão do Curso de Bacharelado, Título: "**Efeito de Ecdisterona sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA em Glândula Salivar de *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae)**", 1988. Orientadora: Profa. Dra. Maria Luisa Paçó-Larson. Aprovada com nota 10 e distinção e louvor.

MESTRADO: Morfologia-Biologia Celular, Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, Título: "**Isolamento e Caracterização de um clone genômico do pufe de DNA B-10 do cromossomo politênico da glândula salivar de *Bradysia hygida*, (Diptera, Sciaridae)**", 1991. Orientadora: Profa. Dra Maria Luisa Paçó-Larson. Aprovada com nota 10 e distinção e louvor.

DOCTORADO: Início em março de 1991. Título- **Clonagem e caracterização da Estrutura e Expressão de um Gene amplificado no pufe B10 de *B. hygida***. Orientadora: Profa. Dra Maria Luisa Paçó-Larson. Defesa da tese em 9 de fevereiro de 1996.

III. TRABALHOS PUBLICADOS

- 1) **Fontes, A.M.**, J.C. de Almeida, J-E Edstrom and M.L. Paçó-Larson. Cloning of a B10 DNA puff sequence developmentally amplified and expressed in the salivary gland of *Bradysia hygida*. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 25:777-780, 1992.
- 2) Monesi, N.; M. A. Fernandez; **A. M. Fontes**; L. R. Basso Jr; Y. Nakanishi; B. Baron; G. Buttin and M. L. Paçó-Larson. Molecular characterization of DNA puff C4 of *B. hygida*. **Chromosoma** 103:715-724 (1995).

IV. TRABALHOS APRESENTADOS EM REUNIÕES CIENTÍFICAS

- 1) Paçó-Larson, M.L.; **A.M. Fontes**. Efeito da Ecdysona sobre o desenvolvimento dos pufes de DNA em glândula salivar de *Bradysia hygida* (Díptera, Sciaridae). XL Reunião da SBPC (resumos), pg 768, São Paulo, julho/1988.
- 2) Paçó-Larson, M.L.; **A.M. Fontes** and J.C. de Almeida. Isolation of a genomic clone from the DNA puff B10 of *B. hygida* salivary gland chromosomes carrying gene sequences developmentally regulated and amplified. **Arq. Biol. Tecnol.** 32:65, 1989.
- 3) **Fontes, A.M.**; N. Monesi and M.L. Paçó-Larson. Isolation of a cDNA clone related to DNA puff B10 of *B. hygida*. PAASS VI Congress (abstracts), pg. 187, São Paulo, fevereiro/ 1990
- 4) **Fontes, A.M.**; P.S. Coeího and M.L. Paçó-Larson. Hormone-induced amplification and transcription of a gene sequence from DNA puff C4 of *B. hygida*. Anais do XX Congresso da SBBQ e Biol. Mol., pg. 93, Caxambu, MG, abril/1991.
- 5) **Fontes, A.M.** and M.L. Paçó-Larson. Characterization of a 2 Kb fragment from DNA puff B10 in the three different salivary gland regions of *B. hygida*. Anais do XXI Congresso da SBBQ e Biol. Mol., pg. 145, Caxambu, MG, maio/1992.
- 6) **Fontes, A.M.**; J.C. de Almeida, M.L. Paçó-Larson. Clonagem de um fragmento de DNA do pufe B10 de *B. hygida*, amplificado e expresso de modo regulado no desenvolvimento. Anais da VII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, pg 267, Caxambu, MG, agosto/1992.

7) Del Bel, E.A.; **A.M. Fontes**; M. L. Paçó-Larson; T. Coimbra and F. S. Guimarães.

Comparação de dois métodos para extração de RNA total de cérebro de rato. Anais da VII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, pg 22, Caxambu, MG, agosto/1992.

8) Paçó-Larson, M.L.; N. Monesi; **A.M. Fontes**; P.S.R. Coelho, M. A. Fernandez and J.C. de Almeida.

Pufes de DNA e amplificação gênica no desenvolvimento.

Simpósio Anual da Academia de Ciências do Estado de São Paulo, pg.86-93, Ribeirão Preto, SP; outubro/1992.

9) **Fontes A.M.**; Ward, R. and M.L.Paçó-Larson.

Cloning of a cDNA and analysis of the deduced protein from B10 DNA puff of *B. hygida* (Diptera, Sciaridae).

Curso e Workshop: Métodos Avançados para Análise Estrutural de Biomoléculas, pg 05, São Carlos, S. P. janeiro 1993.

10) **Fontes A.M.** and M.L.Paçó-Larson

Sequence of a gene amplified in DNA puff B10 of *B. hygida* (Diptera:Sciaridae).

Anais do XXIII Congresso da SBBQ e Biol. Mol., pg.31, Caxambu, MG, maio/1994

11) Monesi, N.; **A.M. Fontes**; P.S.R.Coelho; M.C.R.Costa; E.M.Espreafico, R.Ward and M.L.Paçó-Larson

Expression of a *B.hygida* DNA puff C4 protein in *E.coli*.

Anais do XXIII Congresso da SBBQ e Biol. Mol., pg.32, Caxambu, MG, maio/1994

V ATIVIDADES NA PÓS-GRADUAÇÃO

1) Colaborou na execução do curso teórico/prático "Biologia Molecular (Metodologia e Linguagem)" ministrado pelos professores: Cruz, A. K. (FORP); Silva, C. L.; Del Bel, E.A.; Espreáfico, E. M. A.; Paçó-Larson, M.L.; Rossi, N. M.; Cairasco, N. G.; Coimbra, T. M.; Rodrigues, V. (FMRP) e Ferro, J. A. (FCAJ/UNESP) oferecido aos alunos de graduação, julho 1993.

2) Colaborou na organização e execução do curso teórico: "Pufes de DNA: um modelo de estudo da expressão gênica" oferecido aos alunos de graduação, 04-08 de outubro de 1993. Carga horária 20 horas.

3) Colaborou na organização e execução do curso optativo "Anatomia de um gene de eucarioto" oferecido aos alunos de graduação, 06-12 de dezembro de 1994. Carga horária 45 horas.

4) Representante da Categoria de Corpo Discente (pós-graduandos) junto a Congregação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. 1991-1993.

VI CURSOS EXTRA-CURRICULARES

NÍVEL DE GRADUAÇÃO

1) Mutagênese e Carcinogênese Ambiental. Ministrado pela Prof. Dra. Catarina Satie Takahashi. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Carga horária: 30 horas. Média final 10. Período: 10-15 de dezembro/1985.

2) Cinética da Proliferação Celular. Ministrado pelas Profas Silvia Regina Rogatto e Ilce Mara de S. Cólus. Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Carga horária 40:horas. Média final 10. Período: 09-13 de dezembro/1985

3) *Blastocladiell emersonii*: um modelo de diferenciação celular. Pré-Congresso.
13ª Reunião Anual de Genética de Microorganismos. Carga horária 56 horas.
Período: 22-28 de janeiro/1986

4) Pufes de DNA e Expressão Gênica. Ministrado pela Prof Dra. Maria Luisa Paçó-Larson. Departamento de Biologia da FFCL Ribeirão Preto/USP. Carga horária 40 horas. Média final 10. Período 26-31 de outubro/1987.

5) Biotecnologia e Genética de Microorganismos. Ministrado durante XIV Congresso Nacional de Genética.em São Paulo, 1988.

6) Linguagem e Técnicas em Biologia Molecular. Ministrado pela Profa. Dra. Bianca Zingales, durante a XVIII Reunião da SBBQ. Período: 2-3 de maio/1989.

NÍVEL DE PÓS-GRADUAÇÃO:

1) Controle da Transcrição Gênica em Eucariotos. Ministrado pelo Prof.Dr. Y. Nakanishi, quando de sua visita ao Departamento de Morfologia FMRP/USP, dentro do projeto recursos humanos USP/BID, junho 1990.

2) Estrutura, Função e Evolução de Proteínas. Disciplina de Pós-Graduação do Instituto de Física de São Carlos/USP, ministrado pelo Prof. Dr. R. C. Garrat. Período 1º semestre de 1994.

VII CONHECIMENTO DE LÍNGUAS ESTRANGEIRAS:

INGLÊS: cursou durante três anos nas escolas SENAC e Cultura Inglesa (1988-1991) e atualmente tem aulas particulares.

ALEMÃO: cursou durante dois anos na escola Instituto Brasil-Alemanha de Ribeirão Preto (1988-1989).

FRANCÊS: aulas particulares de francês durante um ano (1993).


Aparecida Maria Fontes
Aparecida Maria Fontes
25/01/96