

neg

IARA FINO SILVA <sup>m. j. aut.</sup>



**BC/13528**  
**IB/80213**

Caracterização de um gene de subunidade  $\alpha$  de proteína G do  
*Nematoda Caenorhabditis elegans*

Tese apresentado ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas para a obtenção do título  
de Mestre em Ciências Biológicas na  
área de Genética

Orientador: Prof. Dr. Crodowaldo Pavan <sup>m. j. aut.</sup>

Este exemplar  
corresponde à  
redução final  
da tese  
depondo  
pela consistência  
de Iara Fino Silva  
aprovada  
pelo  
comitê julgador

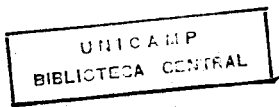
↓  
Arquivo Autor / Tê  
No Inst. Biol. Univ.  
Campinas 1991

Campinas 24.02.91

Campinas SP  
1991

T/UNICAMP

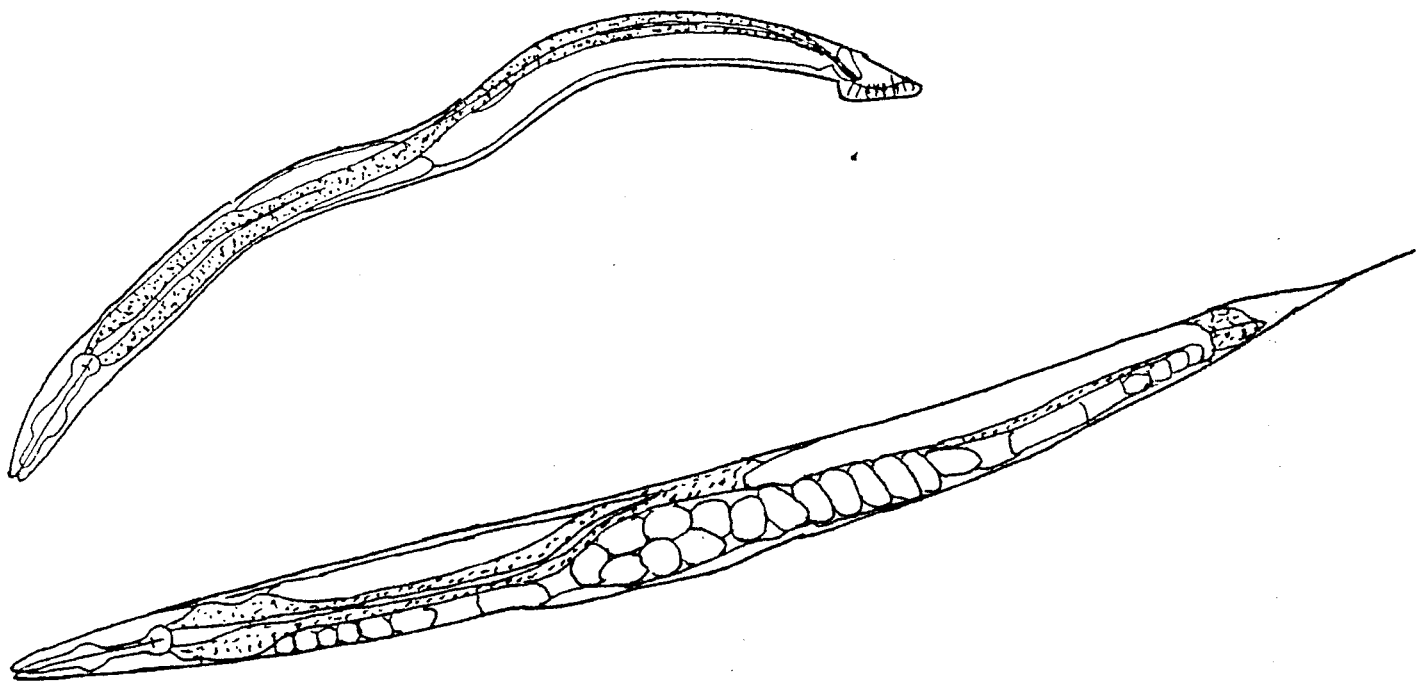
Si38<sub>c</sub>



CM 000 10 475-8

CLASSIF.	T
AUTOR	M 380
V.	EX
TOMBO BDI	13528
	EB 1014

Caracterização de um gene de subunidade  $\alpha$   
de proteína G do nematoda  
*Caenorhabditis elegans*



## Conteúdo

### I. Introdução

#### 1.1 Caenorhabditis elegans

1.1.1 Descrição geral

1.1.2 Características filogenéticas dos nematodas

1.1.3 Genética

1.1.4 Anatomia

1.1.5 Desenvolvimento

1.1.6 Biologia dos músculos

1.1.7 Comportamento e Neurobiologia

1.1.8 Período de vida

1.1.9 Caenorhabditis elegans como um sistema experimental

#### 1.2 Proteína G

1.2.1 Generalidades

1.2.2 Diversidade de proteína G $\alpha$

1.2.3 Interações com o nucleotídeo guanina

1.2.4 Interações das subunidades  $\alpha/\beta\gamma$

1.2.5 Subunidade  $\alpha$ /Interações com o receptor

1.2.6 Subunidade  $\alpha$  / Interações com os efetores

1.2.7 Ribosilação por ADF

1.2.8 Acetilação de lipídios

1.2.9 Fosforilação

1.2.10 Caracterização genética da proteína G

### II. Objetivo

### III. Material e métodos

- III.1 Banco genômico  $\lambda$
- III.2 Crescimento de bactérias
- III.3 Infecção de bactérias NM 538 com fago  $\lambda$
- III.4 Preparação da sonda pelo PCR
- III.5 Marcação radioativa das sondas
- III.6 Hibridização
- III.7 Protocolos experimentais para extração de DNA de fagos  $\lambda$
- III.8 Técnicas para clonagem e subclonagem de DNA
  - III.8.1 Células competentes
  - III.8.2 Eletroforese de DNA em gel de agarose
  - III.8.3 Southern Blot
  - III.8.4 Digestão de DNA com enzimas de restrição
  - III.8.5 Transformação de células JM 101
  - III.8.6 Análise das placas positivas
  - III.8.7 Preparação de DNA de plasmídeo para subclonagem
- III.9 Preparação de DNA de plasmídeo para seqüenciamento
- III.10 Desnaturação de DNA de plasmídeo para seqüenciamento
- III.11 Reação de seqüenase
- III.12 Preparação de gel para eletroforese de DNA

### IV. Resultados

- IV.1. Seleção de placas lisadas por fagos  $\lambda$
- IV.2. Digestão dos fagos  $\lambda$  com enzimas de restrição
- IV.3. Tratamento dos fagos  $\lambda$  com enzimas de restrição
- IV.4. Transformação de bactérias JM 101
- IV.5. Estudos com o fragmento H.4.2
- IV.6. Estudos com o fragmento H.3.9
- IV.7. Estudos com os fragmentos E15 e E17
- IV.8. Comparação da cadeia polipeptídica do gene G $\alpha$

## V. Discussão

Resumo

Bibliografia

Apêndice 1 : Seqüência de nucleotídeos e seqüência dos amino ácidos correspondentes do gene G $\alpha$  de *Caenorhabditis elegans*.

Apêndice 2 : Comparação da seqüência do polipeptídeo referente ao gene G $\alpha$  de *Caenorhabditis elegans* com outros polipeptídeos.

Apêndice 3 : Soluções usadas

Apêndice 4 : Símbolos e abreviações usados.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular do Instituto do Cancer da Holanda, sob orientação do Prof.Dr. Ronald Plasterk. A pesquisa foi subsidiada pelo "Netherlands Cancer Foudation" e "Netherlands Organization of Pure Scientific Research". A publicação do mesmo foi feita no Journal of Molecular Biology (1990), 214, 1-5.

## 1. Introdução

### 1.1 *Caenorhabditis elegans*

#### 1.1.1 Descrição geral

*Caenorhabditis elegans* é um nematoda pequeno cujo habitat natural é o solo. Ele pode ser encontrado em muitas partes do globo. Sua principal fonte de alimentos constitui-se de bactérias e, sob condições ótimas tem um ciclo de vida de cerca de três dias. Existem dois sexos a saber, os hermafroditas e os machos. O comprimento médio de ambas as formas é de 1 mm, e existem diferenças morfológicas entre eles, como mostra a figura 1.1. Os hermafroditas produzem tanto ovócitos quanto espermatozóides e são capazes de se reproduzir por autotecundação. Os machos são originados espontaneamente a uma baixa frequência, e podem fertilizar os hermafroditas; um hermafrodita não é capaz de fecundar um outro hermafrodita, ou seja, não ocorre fecundação cruzada entre hermafroditas.

Um hermafrodita pode produzir cerca de 300 ovos durante sua vida reprodutiva. Há quatro estágios de desenvolvimento dos vermes (referidos em geral como estágios larvais, embora não ocorra metamorfose); o adulto maduro emerge do quarto estágio e tem um período fértil de cerca de quatro dias e, depois vive de 10 a 15 dias adicionais.



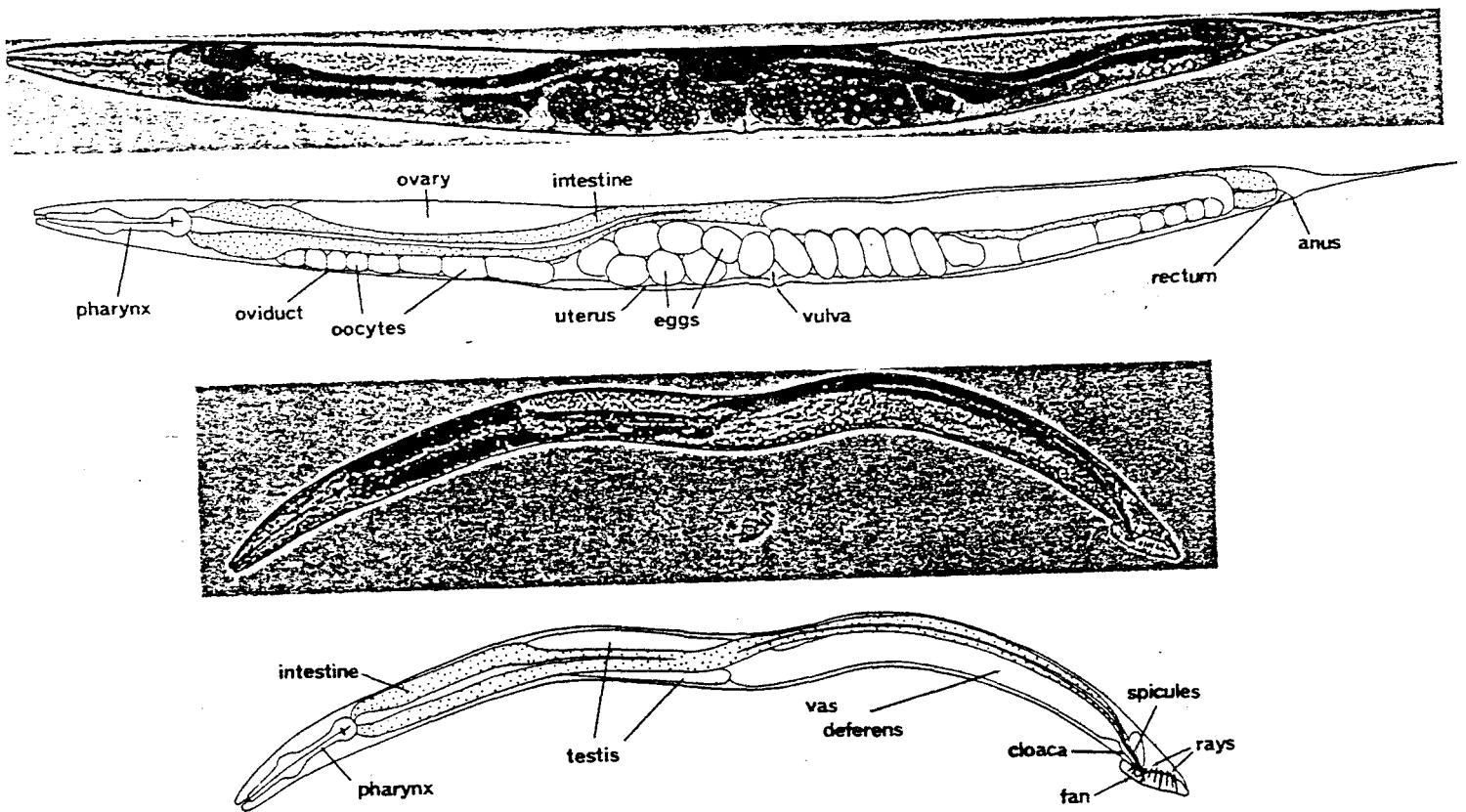


figura 1.1

rotômicrografia mostrando as principais características anatômicas de *Caenorhabditis elegans* adulto hermafrodita (acima) e macho (abaixo). Vista lateral; iluminação de campo claro. (reproduzido de Wood, 1988).

*Caenorhabditis elegans* é um organismo simples, tanto do ponto de vista anatômico quanto genético. O hermafrodita adulto possui apenas 959 núcleos somáticos, e o macho adulto apenas 1031. O genoma haplóide também é reduzido, constituindo-se de apenas  $8 \times 10^7$  pares de nucleotídeos, o que é oito vezes maior do que o da levedura *Saccharomyces* ou a metade daquele da mosca de fruta *Drosophila*.

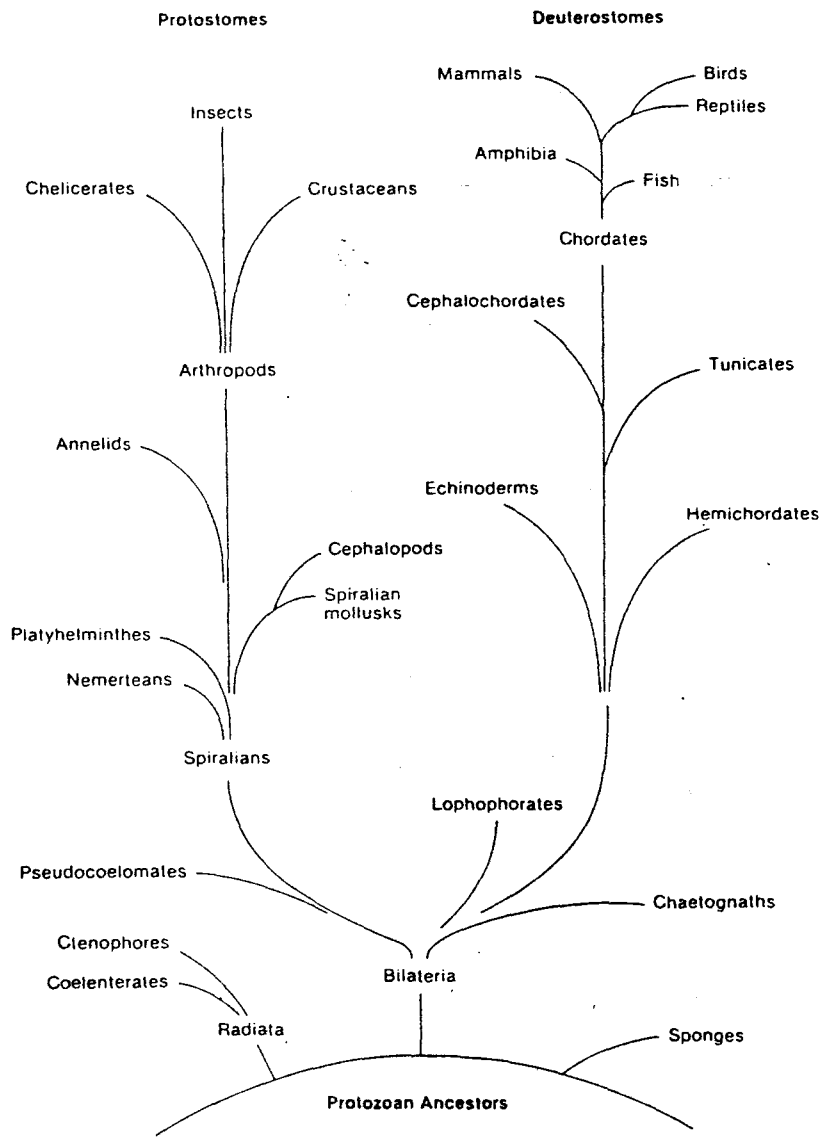
A manutenção de *Caenorhabditis elegans* em laboratório é fácil, ele pode crescer sobre placas de petri com ágar ou em cultura líquida com *Escherichia coli* como fonte de alimento. Também é possível fazê-lo crescer axenicamente em meio líquido. Pode-se observar e manipular os animais individualmente com o auxílio de um microscópio de dissecação. Durante todo seu ciclo de vida os animais são transparentes, assim o seu desenvolvimento pode ser acompanhado ao nível celular, utilizando-se para isso organismos vivos sob microscopia óptica, preferencialmente com contraste de interferência óptica diferencial. Sua completa descrição anatômica ao nível do microscópio eletrônico também foi possível devido ao seu pequeno tamanho. A obtenção de mutantes é fácil por meio de mutagênese química ou por radiações ionizantes. Devido a sua simplicidade, conveniência de manipulação, e ciclo de vida curto, *Caenorhabditis elegans* é um organismo experimental útil para o estudo de desenvolvimento e comportamento de metazoários (Wood, 1988).

### 1.1.2 Características filogenéticas dos nematodas

O filo Nematoda possui diversos e numerosos membros, havendo adaptação à vida livre na maior parte dos ambientes marítimos e terrestres, bem como parasitismo numa ampla variedade de hospedeiros vegetais e animais. As formas parasitárias tiveram um impacto substancial no bem estar humano, através de danos em colheitas e doenças tanto em animais domésticos como no homem. Por exemplo, nos Estados Unidos há uma perda estimada de U\$ 5 bilhões anuais na agricultura causada por nematodas parasitas de plantas, e cerca de um quarto da população mundial sofre de infecções debilitantes por nematodas parasitas.

Evolucionariamente, os nematodas têm uma origem muito antiga, aparecendo como outros filos invertebrados durante a era Pré-Cambriana (figura 1.2). Todavia, não existem fósseis de nematodas, e sua relação com outros invertebrados não é clara.

Taxonomicamente, pode-se dividir os nematodas em duas classes : a *Secernentes* (ou *Phasmidia*), onde estão incluídas a maioria das espécies terrestres de vida livre e as parasitas, e a *Adenofora* (ou *Afasmidia*), que são em geral marinhas. A figura 1.3 mostra um esquema simplificado de classificação e, lista as ordens que são reconhecidas em cada classe, indicando os principais gêneros parasitas de animais e de plantas.



*figura 1.2 árvore filogenética de metazoários. Os nematodos e outros asqueimintes estão incluídos sob pseudocelomados embaixo à esquerda (reproduzido de Wood, 1988).*

Phylum  
Nematoda

Classe  
Adenophorea

Ordens :

Araeolaimida

Monohysterida

Desmodorida

Chromadorida

Desmoscolecida

Enoplida

Dorylaimida

Classe  
Sercentea

Ordens :

Rhabditida

Família Rhabditidae

Gêneros :

Caenorhabditis

Panagrellus

Turbatrix

Tylenchida

Aphelenchida

Strongylida

Ascaridida

Família Ascarididae

Gêneros :

Ascaris

Parascaris

Oxyurida

Spirurida

*figura 1.3 classificação simplificada dos nematodas (reproduzido de Wood, 1988).*

Todos os nematodas, a despeito de seus diversos habitats e estilo de vida, são anatomicamente e morfológicamente similares. A forma geral do corpo é de dois tubos concêntricos separados por um espaço, o pseudoceloma. O tubo mais interno corresponde ao intestino; o mais externo consiste de cutícula, hipóderme, musculatura e células nervosas. O pseudoceloma, no adulto, também contém as gônadas (figura 1.1).

Todos os nematodas parecem ter um desenvolvimento similar. As primeiras divisões das células embrionárias incluem uma série de clivagens assimétricas e assincrônicas nas quais a linhagem germinativa age como uma linhagem de células mãe, dando origem seqüencialmente às células fundadoras para as linhagens de tecidos somáticos, e finalmente à célula fundadora da linhagem germinativa. O soma embrionário é, como em outros metazoários, dividido claramente em ectoderme, mesoderme e endoderme. Pós-embrionariamente, como tipificado por *Caenorhabditis elegans*, todos os nematodas se desenvolvem através de quatro estágios larvais, caracterizados por estruturas cuticulares diferentes.

### 1.1.3 Genética

#### A. O genoma

Cerca de 80 % do genoma é composto de cópias simples e, o restante constitui-se de seqüências moderadamente repetitivas (duas a dez cópias por genoma). As seqüências repetitivas contêm um transposon (Tc1), que está presente cerca de 30 cópias por genoma em algumas linhagens, e cerca de 300 cópias em outras.

Os genes de *Caenorhabditis elegans* podem ser mapeados em seis grupos de ligação que correspondem aos 6 cromossomos do genoma haplóide. Os cromossomos são holocentricos, isto é, os cinetocoros estão distribuídos mais ao longo de seu comprimento que localizados num único ponto. O conjunto haplóide inclui cinco autossomos (A) e um cromossomo sexual (X), todos mais ou menos do mesmo tamanho. A determinação do sexo depende da razão X/A, sendo que os hermafroditas são diplóides para todos os seis cromossomos (XX), enquanto que os machos são diplóides apenas para os autossomos mas possuem apenas um cromossomo X (X0). A origem dos machos nas populações hermafroditas é espontânea e, ocorre pela não disjunção do cromossomo X na meiose, com uma freqüência de cerca de 1 em 500 animais.

Com seu ciclo de vida curto e modo de reprodução hermafrodita, *Caenorhabditis elegans* é bastante conveniente para análises genéticas. Pode-se induzir mutações com freqüências altas com a utilização de mutagênicos químicos como o etilmetanosulfonato. A descoberta de linhagens nas quais alguns elementos transportáveis são móveis na linhagem germinativa também permite mutagênese por inserção de transposon, o que é particularmente útil para a clonagem molecular de genes mutacionalmente definidos. A mutação presente no estado heterozigoto num hermafrodita será homozigota num quarto dos animais do própria progênie. O cruzamento genético pode ser feito usando-se machos. Cerca de 700 genes de *Caenorhabditis elegans*, distribuídos entre todos os 6 grupos de ligação, foram identificados por mutação, mapeados e foram feitos testes de complementação. O número total de genes foi estimado em menos de

5000, com base na frequência de mutações letais e nas estimativas sobre a proporção de genes essenciais.

### 3. Mutantes fenotípicos

Uma dificuldade inicial sobre a genética de *Caenorhabditis elegans* foi o número limitado dos mutantes fenotípicos férteis que podiam ser identificados sob o microscópio de dissecação. Esta limitação foi particularmente compensada pela possibilidade dos hermafroditas se reproduzirem por auto-fertilização, mesmo com defeitos comportamentais ou morfológicos graves que tornam o acasalamento impossível.

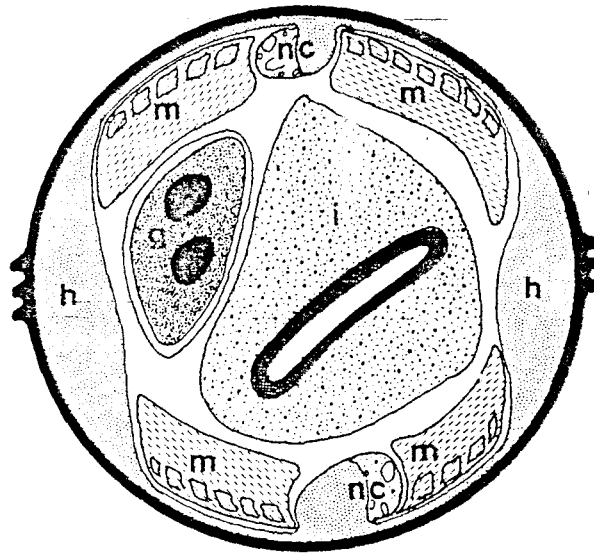
O aumento de instrumentos genéticos, incluindo o balanceamento de cromossomos para a manutenção de mutações letais, duplicações estáveis para análise de mosaicos, mutantes sensíveis à temperatura, e supressores "non-sense", tornaram-se disponíveis. Foram desenvolvidos métodos seletivos poderosos, que permitiram o isolamento de mutantes raros e revertentes. Uma grande vantagem genética de *Caenorhabditis elegans* é que um grande número de animais ( $10^4$  ou mais) podem ser manuseados pelos métodos de rotina dos laboratórios.

A contribuição da análise genética foi inestimável em todas as principais áreas de pesquisa sobre *Caenorhabditis elegans*. A abordagem genética levou à modelos explícitos de muitos processos desenvolvimentais nos nematodas, tais como a formação da vulva, maturação do espermatozóide, determinação sexual, montagem da musculatura, diferenciação neuronal, e formação da larva latente. Genes chave identificados por mutação puderam ser clonados e sujeitos à análise molecular com o objetivo de se testar e se ampliar estes modelos. A disponibilidade de mutantes também permitiu experimentos não invasivos sobre muitos aspectos fisiológicos dos nematodas, os mais notáveis se dirigem a biologia dos músculos e dos nervos.



#### I.1.4 Anatomia

*Caenorhabditis elegans* tem um plano de corpo típico de nematoda, com um tubo externo que consiste de cutícula, hipoderme, neurônios, e músculos circundando um espaço pseudocelômico que contém o intestino e as gônadas. Uma membrana basal separa a hipoderme da musculatura. A figura 1.4 mostra o esquema de um corte transversal feito num hermafrodita adulto. A forma do verme é mantida pela pressão hidrostática externa, controlada por um sistema osmoregulador.



*figura 1.4* diagrama de um corte posterior no adulto hermafrodita. (g) gônada; (h) hipoderme; (i) intestino; (m) musculatura; (nc) corda neural. Reproduzido de Wood, 1988.

Uma cutícula de três camadas de colágeno é secretada pela hipoderme subjacente. Este tecido é sincicial (constituído por células grandes multinucleadas). No adulto, cordões laterais e longitudinais de células de junção formam degraus ("alae") sobre a superfície da cutícula. Sobre meio sólido o verme rasteja sobre um lado, com o "alae" em contato com o substrato.

As células musculares obliquamente estriadas da parede do corpo de *Caenorhabditis elegans* são arranjadas em quatro faixas

que correm ao longo do comprimento do animal, duas dorsalmente e duas ventralmente (figura 1.4). A maioria das células do sistema nervoso são encontradas ao redor da faringe, ao longo da linha ventral média, e na cauda. Processos desses neurônios formam um anel externo ao redor da faringe (o anel nervoso) ou contribuem para processos de feixes que correm ao longo do corpo, sendo que os mais proeminentes são os cordões nervosos dorsais e ventrais. Neurônios sensoriais correm anteriormente do anel nervoso para os órgãos sensoriais ("sensila") na cabeça.

O anel nervoso recebe entrada de sinais da região da cabeça e os envia primariamente aos músculos da parede do corpo, via axônios neurais no próprio anel e nos cordões dorsais e ventrais.

A alimentação de *Caenorhabditis elegans* é feita através de uma faringe bilobada, que bombeia o alimento para o intestino, que o tritura quando passa pelo segundo lóbulo. O intestino é formado por dois caminhos de oito células mais um anel anterior de quatro, circundando um lúmen central, que se conecta com o anus próximo a cauda (figura 1.1). O sistema excretor é simples e, provavelmente responsável pela osmoregulação. Ele é constituído por um par de canais excretores, que são processos de uma única célula que corre o comprimento do animal, conectando-se com o exterior através de um poro excretor localizado anteriormente.

O sistema reprodutor do hermafrodita é composto de gônadas bilobadas arranjadas simetricamente, com um lóbulo se estendendo anteriormente e o outro posteriormente a partir da região central do animal. Cada lóbulo tem a forma de U, compreendendo um ovário distal (ao útero) e um oviducto proximal e espermateca (figura 1.1). Os ovários são sinciciais, com os núcleos da linhagem germinativa, parcialmente segregados por membranas, circundando um coração citoplasmático central. Os núcleos da extremidade distal estão na primeira divisão mitótica, então progridem para a prófase meiótica, alcançando a diacinese no oviducto antes da fertilização. A cada curva do lóbulo os núcleos individuais tornam-se quase que completamente fechados por membranas para formar ovócitos, que aumentam e amadurecem quando passam pelo oviducto. Todavia, os

ovocitos mantêm contacto com o sincício até muito perto do momento da fertilização. No adulto jovem, cada lóbulo do oviducto termina em uma espermateca, carregando ao redor de 150 espermatozoides amebóides. A espermateca faz conexão com um útero comum, que abriga ovos fertilizados nos primeiros estágios da embriogênese. O útero abre-se para o exterior através de uma vulva, que projeta-se visivelmente na superfície do adulto (figura 1.1).

A gônada masculina é formada por um único lóbulo, em forma de U, estendendo-se anteriormente seu término distal e então fazendo um "looping" posterior e conectando-se com a cloaca próximo a cauda (figura 1.1). Ao seu término distal, os núcleos da linhagem germinativa são mitóticos. As células meióticas em estágios progressivamente mais adiantados da espermatogênese são distribuídas sequencialmente ao longo da gônada do término distal para a vesícula seminal. Ocorrem duas divisões meióticas para que as espermátides maduras sejam produzidas, sendo então armazenadas na vesícula seminal e liberadas durante a cópula através de canais deferentes para a cloaca.

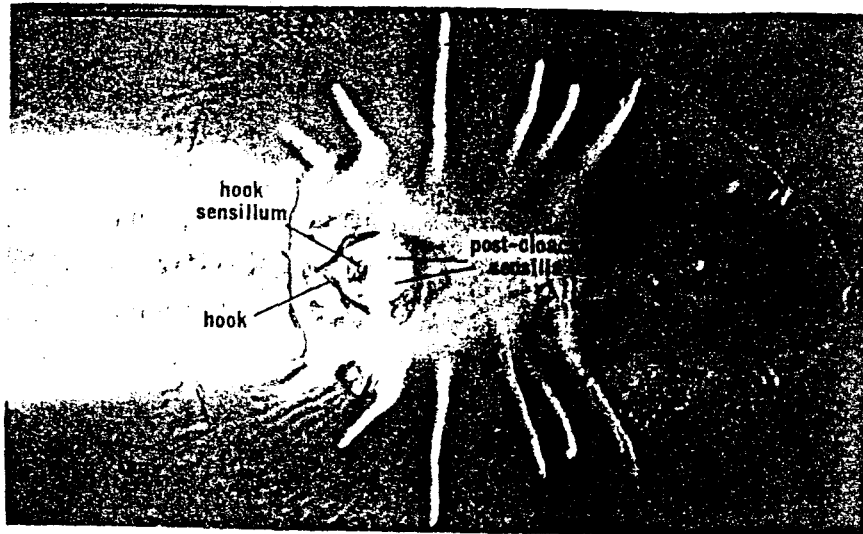


figura 1.5 Cauda do macho adulto de *Caenorhabditis elegans*. Vista ventral, fotomicrografia de Nomarski (barra=20  $\mu$ m). Reproduzido de Wood, 1988.

A cauda do macho tem neurônios especializados, músculos e estrutura hipodermal para o acasalamento, o que lhe dá uma aparência bastante diferente daquela do hermafrodita (figuras 1.1 e 1.5). A cauda do macho é em forma de leque com 18 raios sensoriais. Na base da cauda há duas espículas, que são inseridas na vulva do hermafrodita durante a cópula para auxiliar na transferência do esperma.

### 1.1.5 Desenvolvimento

#### A. Fertilização e Embriogênese

Os ovócitos maduros passam através da espermateca e são fertilizados, ou pelo esperma do próprio hermafrodita, ou do macho, que são introduzidos no útero pela cópula e armazenados na espermateca. Durante os 30 minutos após a fertilização, o zigoto desenvolve uma casca quitinosa e resistente e uma membrana vitelínica, derivadas de componentes do ovo, que conferem impermeabilidade ao embrião à maioria dos solutos e os tornam capazes de sobreviver fora do útero. Todavia, os ovos permanecem normalmente no útero até as primeiras clivagens e são depositados através da vulva ao redor do período de gastrulação, aproximadamente três horas após a fertilização.

Pode-se dividir a embriogênese em duas fases de duração aproximadamente iguais : (1) proliferação celular e organogênese, e (2) morfogênese. Durante a fase de proliferação ocorrem divisões celulares, movimentos celulares, e morte celular, que obedecem um modelo temporal e espacial preciso, que não varia de um embrião para outro, e que dá origem a um número fixo de células com destino rigidamente determinado. A meio caminho da embriogênese, sete horas após a fertilização, o embrião apresenta-se como um esferóide de aproximadamente 550 células, mostrando algumas características de diferenciação. A proliferação cessa então quase inteiramente; durante as próximas sete horas o corpo se alonga, o processo neural cresce e interconecta-se, e finalmente, a cutícula é secretada. O primeiro estágio larval (L1), de 250  $\mu\text{m}$  de comprimento e consistindo de 558 células no hermafrodita e 560 no macho, sai do ovo cerca de 14 horas após a fertilização (figura 1.6).

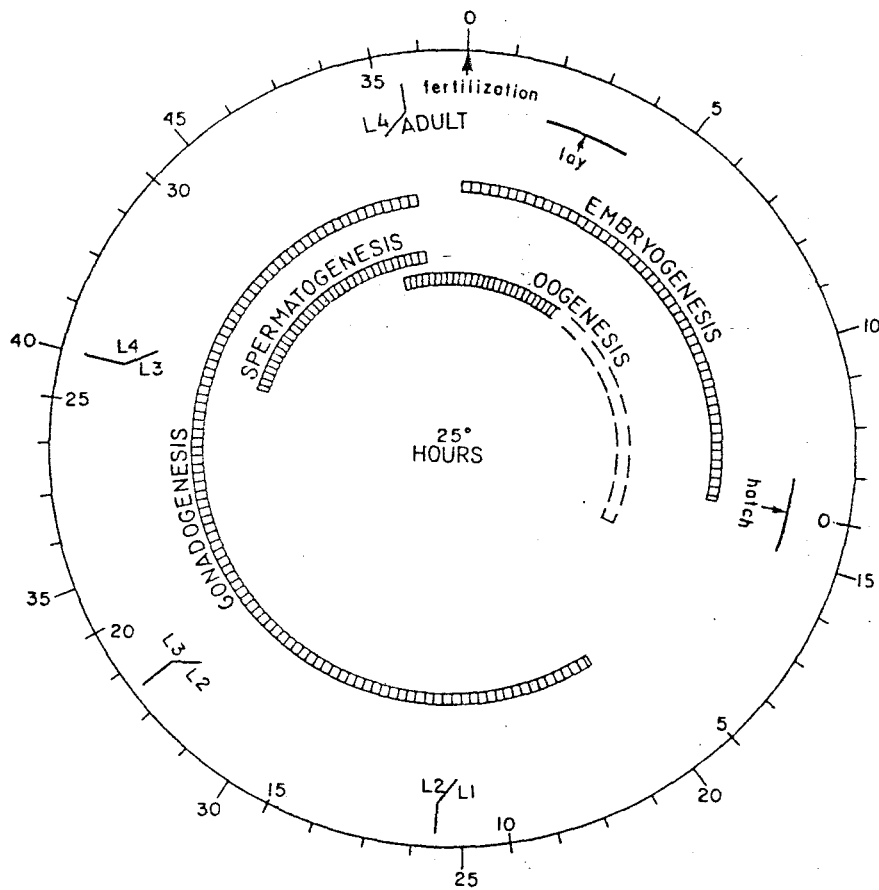


figura 1.6 representação diagramática do ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*, mostrando a duração dos estágios larvais. Os números fora do círculo representam horas após a fertilização a 25 °C, os números dentro do círculo representam aproximadamente as horas após o acasalamento. Os quatro moltes larvais são indicadas por linhas radiais. Reproduzido de Wood, 1988.

#### B. Desenvolvimento larval

Nas próximas 50 horas, o desenvolvimento larval prossegue através de três estágios adicionais : L2, L3 e L4 (figuras 1.6 e

1.7). Cerca de 10% das células no estágio L1 são células blásticas somáticas que sofrem divisões celulares durante o desenvolvimento larval, contribuindo para as estruturas da hipoderme, sistema nervoso, musculatura e para o arcabouço gonadal somático. Além disso, cerca de 7 horas após a saída do ovo, as duas linhagens de células germinativas na gonada primordial iniciam sua proliferação, que continua no adulto. Com exceção da proliferação da linhagem germinativa, as divisões das células pós-embrionárias, como aquelas no embrião, seguem modelos precisos e quase invariáveis temporal e espacialmente, dando origem a um número fixo de células com destino determinado. Este padrão não difere entre os sexos para produzir a gonada bilobada e vulva no hermafrodita e a gonada simples e estruturas especializadas da cauda para a fertilização no macho.

Os quatro estágios larvais são pontuados por mudas. Nova cutícula é sintetizada sob a velha e o bombeamento da faringe cessa durante um curto período denominado letargo, enquanto a cutícula velha é ecdisada. As cutículas são diferentes, estrutural e molecularmente, a cada estágio. O tamanho relativo da larva a cada estágio pode ser visto na figura 1.7.

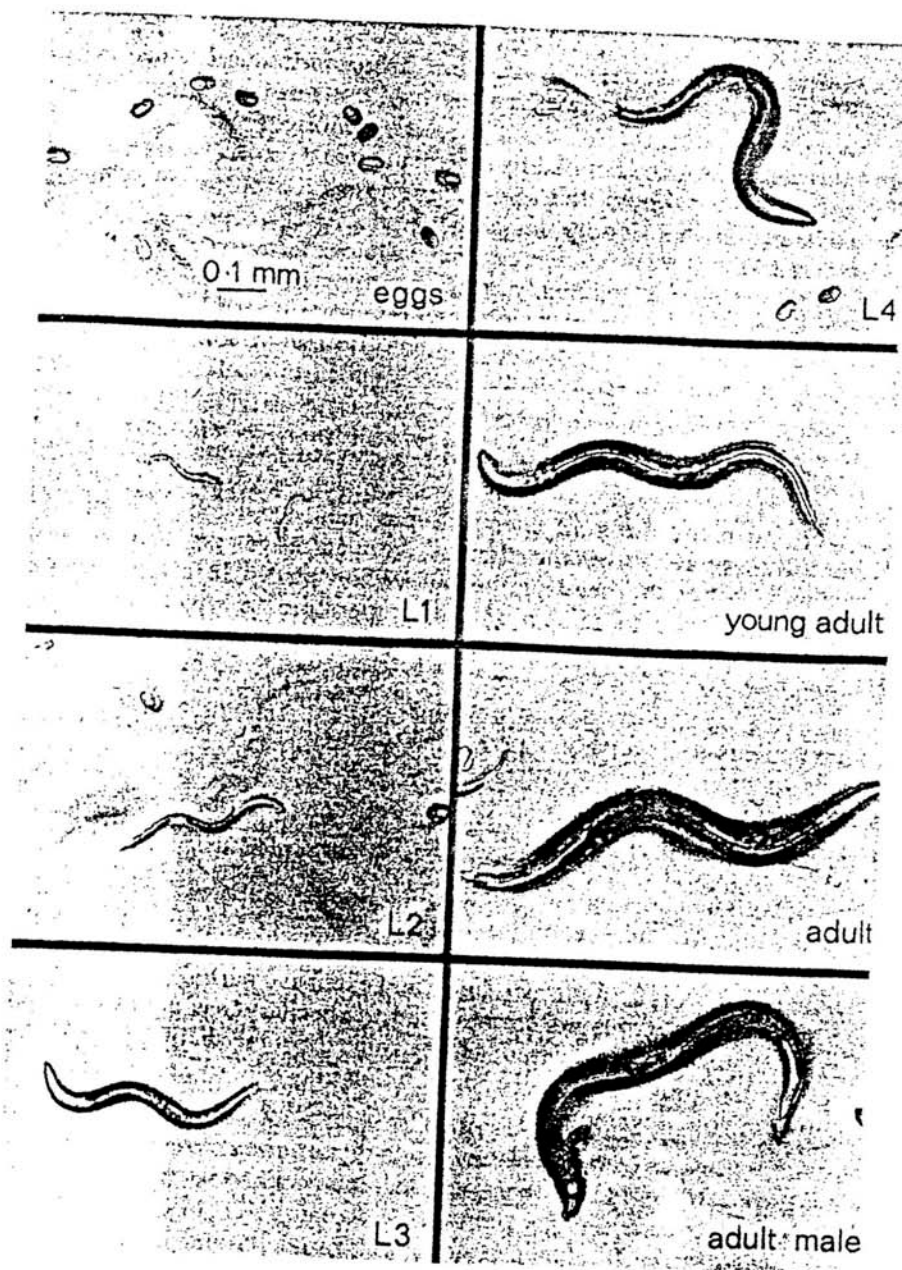


figura 1.7

ovos, larvas e adultos de *Caenorhabditis elegans*. Todos os painéis mostram hermafroditas, com exceção do inferior à direita. Fotomicrografias de campo claro. Reproduzido de Wood, 1988.



### C. Gonadogênese e Gametogênese

A gonadogênese se completa durante o estágio L4. No hermafrodita, durante este estágio, as células germinativas em cada ramo da gonada sofrem meiose e diferenciam-se em cerca de 150 espermatozoides maduros, que são estocados na espermateca. A muda L4, a produção de esperma cessa (fig. 1.6), e a meiose subsequente e a diferenciação geram apenas ovócitos. Ao mesmo tempo, a vulva abre para o exterior assim que o acasalamento possa ocorrer, e a auto-reatilização se inicia imediatamente antes. O número de descendentes que um hermafrodita pode produzir é limitado pelo número de espermatozoides. Os ovócitos são produzidos por cerca de 4 dias, e um hermafrodita não acasalado depletado de esperma continua a produzir e desovar ovócitos não fecundados por um dia ou mais. Um hermafrodita acasalado pode dar origem a uma prole de mais de 1000 indivíduos. O macho, que também torna-se fértil pouco antes da muda L4, continua a produzir esperma durante sua vida reprodutiva.

### 1.1.6 Biologia dos músculos

A maior parte do corpo tanto da larva como do adulto é ocupada por células musculares, que são as células mais bem descritas em termos de anatomia, ultraestrutura e conteúdo bioquímico. Os músculos da parede do corpo não são requeridos para viabilidade, de modo que muitas mutações que afetam os músculos puderam ser isoladas e estudadas. A maioria das principais proteínas musculares foram definidas por técnicas genéticas e moleculares, conduzindo a uma avaliação detalhada da organização e função dos miofilamentos. As informações obtidas sobre a musculatura de *Caenorhabditis elegans* têm sido importantes para o estudo de musculatura de outros animais, porque as proteínas musculares e estrutura muscular são altamente conservadas na evolução.

### 1.1.7 Comportamento e Neurobiologia

*Caenorhabditis elegans* pode impulsionar-se para frente e para trás com movimentos ondulatórios. Ele responde a uma variedade de estímulos como tato, mudança de temperatura, e diferentes compostos químicos e íons, movendo-se para ou contra o estímulo. O animal move-se contra o estímulo do tato pela cabeça ou pela cauda. Quando colocado num gradiente de temperatura, ele tende a permanecer à temperatura a qual ele foi previamente exposto. Já foram identificados vários atraentes e repelentes químicos. Adultos dos dois sexos apresentam comportamentos específicos, postura de ovos nos hermafroditas e comportamento de cópula no macho (o hermafrodita parece ser passivo durante o acasalamento).

A simplicidade do sistema nervoso de *Caenorhabditis elegans* e os detalhes com que ele foi descrito oferecem uma oportunidade para endereçar questões fundamentais sobre sua função e desenvolvimento. Com relação à função é possível se correlacionar o repertório total do comportamento com a neuroanatomia conhecida. Com relação ao desenvolvimento, a descrição completa do desenvolvimento do sistema nervoso leva a idéias específicas sobre como este sistema nervoso tornou-se eletrificado. Aqui novamente, a análise de mutantes prove um aumento poderoso na tentativa que pode levar a um quadro quase completo de como o desenvolvimento de um sistema nervoso simples é geneticamente direcionado.

### 1.1.8 Período de vida

Quando o suprimento de alimentos é limitado precocemente no desenvolvimento larval, *Caenorhabditis elegans* pode tomar uma alternativa de modo de desenvolvimento a muda L2/L3 para produzir a larva latente, um estágio L3 especializado que não se alimenta, é resistente à dessecação, e pode sobreviver por mais de três meses sem desenvolvimento posterior. Se o alimento se torna disponível durante este período, a larva latente muda para se tornar um L4, que resume o desenvolvimento normal.

Com a alimentação adequada durante o ciclo de vida, sob condições padronizadas de laboratório (cultura líquida, 20°C), os hermafroditas e os machos vivem cerca de 17 dias após alcançar a maturidade, embora o hermafrodita apresente consistentemente um período de vida ligeiramente mais longo que os machos. As mudanças que ocorrem durante a senescência incluem diminuição da mobilidade, alteração na atividade enzimática e morfologia, e acumulação do pigmento lipofucsina. A análise genética quantitativa indica um componente genético substancial na determinação da duração da vida. Linhagens de vida longa podem ser obtidas por cruzamento interlinhagem ou por isolamento de mutantes aparentes de um único gene; estudos destas linhagens sugerem que a duração dos diferentes estágios no ciclo de vida podem ser controlados separadamente. *Caenorhabditis elegans* deverá ser um modelo útil para estudar alguns aspectos da longevidade.

## 1. 9 *Caenorhabditis elegans* como um sistema experimental

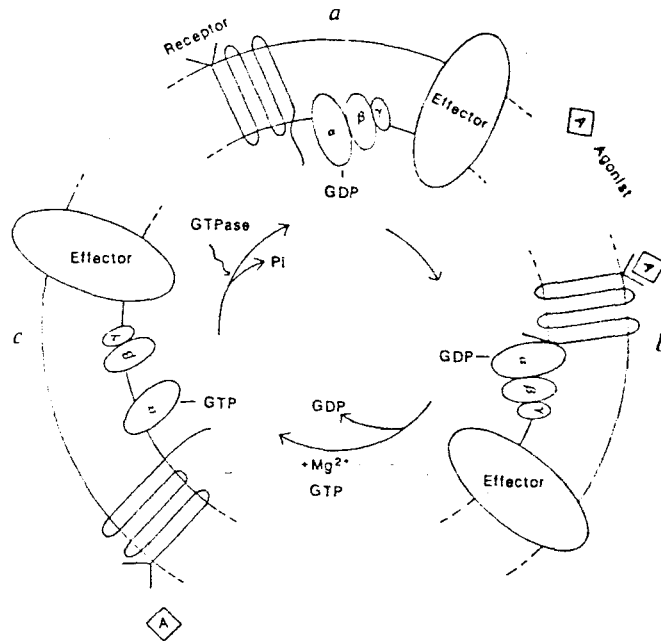
Os atributos chave de *Caenorhabditis elegans* como um sistema experimental para estudos biológicos são a simplicidade, transparência, cultivo fácil em laboratório, ciclo de vida curto, adequação para análise genética, e pequeno tamanho do genoma. Estas propriedades tornaram possível a acumulação de informações descritivas extensivas aqui sumarizadas. Agora já se conhece a anatomia completa graças à resolução da microscopia eletrônica, a localização e características de todas as células somáticas no adulto hermafrodita e no macho, e a linhagem celular completa que tem relação temporal de localização, e ancestral de todas as divisões celulares durante o desenvolvimento. A descrição genômica do animal está progredindo rapidamente, incluindo mapeamento genético detalhado, clonagem e análise de genes mutacionalmente definidos, e mapeamento físico do genoma total. Além disso o diagrama completo do circuito do sistema nervoso derivado de trabalho anatômico, e alguns conhecimentos das funções neurofisiológicas foram obtidos a partir da análise de neurotransmissores e do estudo eletrofisiológico de sistemas nervosos homólogos como o do nematoda *Ascaris suum*. Por causa dos seus atributos experimentais favoráveis e as informações descritivas agora disponíveis, *Caenorhabditis elegans* deverá ser um organismo de utilidade experimental crescente para a investigação de uma variedade de problemas na biologia animal.

## 1.2 Proteína G

### 1.2.1 Generalidades

As proteínas G fazem parte de uma família de proteínas regulatórias que se ligam ao nucleotídeo guanina, e servem como intermediárias numa variedade de processos de sinais transmembrana em células de eucariotos. Elas se localizam sobre a superfície citoplasmática da membrana, onde se acoplam fisicamente a receptores para regulação de proteínas efetoras que produzem mudanças no metabolismo intracelular. As proteínas G são heterotrimeros compostos das subunidades  $\alpha$  (Mr 39000 a 54000),  $\beta$  (Mr 35000 a 36000), e  $\gamma$  (Mr 8000 a 10000). A subunidade  $\alpha$  interage com o nucleotídeo guanina. As subunidades  $\beta$  e  $\gamma$  formam um complexo intimamente associado. Proteínas G distintas contêm diferentes tipos de subunidade  $\alpha$  e provavelmente, diferentes tipos de subunidade  $\gamma$ , mas apenas um, dois ou três tipos de subunidade  $\beta$ .

O funcionamento da proteína G se baseia na utilização de uma ligação de nucleotídeo guanina e de um ciclo de hidrólise. Em tal processo, a ligação ao receptor ativado induz uma troca de GDP por GTP na subunidade  $\alpha$ , sendo que o sistema de acoplamento  $\alpha$ -GTP regula diretamente as proteínas efetoras (alguns dados indicam que  $\beta\gamma$  também podem regular certos efetores). A atividade regulatória de  $\alpha$ -GTP depende de uma atividade de GTPase intrínseca da subunidade  $\alpha$ , e a  $\alpha$ -GDP resultante pode então iniciar nova troca com GTP e ciclo de hidrólise. Uma grande amplificação do estímulo original pode ser obtida através de eventos cíclicos múltiplos. A figura 1.8 mostra como a proteína G pode agir. Duas toxinas de bactéria podem interromper o ciclo de sinal de transdução em estágios específicos através de ribosilação covalente por ADP na subunidade  $\alpha$ . A toxina de pertussis não permite o acoplamento de receptores de proteína G abolindo o sinal, enquanto que a toxina da cólera inibe a atividade de GTPase aumentando o sinal (Lochrie & Simon, 1988).



**figura 1.8**

esquema simplificado para transdução de sinal por proteína G. Do estado não ligado (a), o agonista liga-se ao receptor que produz uma mudança (b) na interação receptor-proteína G, deixando GTP substituir GDP na subunidade  $\alpha$ , na presença de  $Mg^{2+}$ . A subunidade  $\alpha$ -GTP ativada dissocia-se das subunidades  $\beta\gamma$ , e um ou ambos interagem com o efector. A atividade de GTPase intrínseca da subunidade  $\alpha$  causa hidrólise de GTP para GDP, assim a subunidade  $\alpha$  pode voltar a se ligar a  $\beta\gamma$  (reproduzido de Neer & Clapham, 1988).

### 1.2.2 Diversidade de proteína G $\alpha$

Tornou-se evidente nos últimos anos que o número de proteínas G é maior do que se suspeitava previamente. As mais bem estudadas proteínas G são transducina, Gs e Gi. A transducina (Tr) é a proteína G dos bastonetes fotoreceptores da retina que se acoplam a rodopsina fotolisada para ativar uma fosfodiesterase cGMP. Gs e Gi são encontradas em muitos tipos celulares e podem estimular ou inibir, respectivamente, a atividade de adenilato ciclase através do acoplamento a vários receptores. Proteínas menos bem caracterizadas que têm sido mais recentemente estudadas incluem Go, a outra proteína G, que é abundante no cérebro e no coração, T $\alpha$ , que é encontrada nos cones fotoreceptores, vários substratos novos da toxina de pertussis parecidos com Gi tais como os isolados de cérebro, neutrófilos, e eritrócitos e a proteína denominada Gp. A existência de várias proteínas G foi inferida do isolamento dos genes de subunidade G $\alpha$  ou cDNA, como por exemplo: proteínas G de levedura (SCG1); GP1; GP2 Dictyostelium [G1, G2], e humanas [Gz (Lochrie & Simon, 1988)].

A diversidade nos sistemas de sinais de transdução está sendo desnudada em todos os níveis, uma vez que não se restringe as proteínas G. Por exemplo, o produto do oncogene *mas*, a substância receptora K, os fatores a e  $\alpha$  receptores de ferormônios de levedura, e uma proteína denominada G-21 (Lochrie & Simon, 1988) exibem todos homologia a receptores que interagem com proteínas G. O arsenal de efetores que podem ser regulados por proteína G expandiu-se de enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos cíclicos para incluir canais de cálcio e potássio e fosfolipases A2 e C. A proteína quinase C, que é ativada pela quebra do produto do metabolismo da fosfolipase C, consiste pelo menos sete espécies distintas. Mesmo uma única célula de eucarioto simples tal como levedura pode conter pelo menos três tipos distintos de proteína G (Lochrie & Simon, 1988).

A revisão feita por Lochrie & Simon (1988) foi enfocada sobre informações que foram obtidas como resultado do isolamento e caracterização de vários cDNAs e genes que codificam diferentes



subunidades de proteína G. Foi dada ênfase sobre a discussão das subunidades  $\alpha$  uma vez que muitos dos conhecimentos que emergiram a respeito da similaridade e diversidade das proteínas G é um resultado da análise de suas seqüências. A figura 1.9 mostra a seqüência de 30 amino ácidos correspondentes a 10 classes diferentes de proteína G. Em contraste com a diversidade das subunidades  $\alpha$  há apenas três subunidades  $\beta$  conhecidas :  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 3$  que apresentam 80 a 90 % de similaridade a nível de seqüência de amino ácidos, mas são codificadas por genes separados (van der Voorn et al., 1990). Com respeito a diversidade da subunidade  $\gamma$ , apenas uma seqüência de subunidade  $\gamma$  (Try) está caracterizada mas as seqüências de outras subunidades  $\gamma$  estarão disponíveis num futuro próximo (Lochrie & Simon, 1988).

Existe uma variedade de outras proteínas que são conhecidas ou postuladas a ligarem-se especificamente ao nucleotídeo guanina. Determinados coratores de iniciação e alongação da maquinaria de síntese de proteínas tal como o Ef-Tu utilizam claramente um "switch" molecular similar ao das proteínas G no qual formas alternadas de GDP e GTP interagem com macromoléculas distintas (Lochrie & Simon, 1988). Produtos dos oncogenes parecidos com ras também usam uma estrutura similar desde que eles se ligam a GDP e GTP especificamente e possuem atividade de GTPase. Todavia, faltam detalhes sobre uma suposta reação de troca. As tubulinas ligam-se e hidrolizam GTP, mas parecem funcionar por mecanismos que são fundamentalmente diferentes daquele das proteínas G ou dos coratores para síntese proteica.

As proteínas LepA e ARF podem ligar-se a GTP. A proteína de levedura SEC4 e outras são preditas ligarem-se a GTP com base na sua forte homologia na seqüência de amino ácidos com ras. Todavia, pouco se sabe sobre o mecanismo bioquímico envolvido no funcionamento destas proteínas. Todas estas proteínas podem ser distinguidas da subunidade  $G\alpha$ , porque (a) elas não são susceptíveis a modificações causadas pela toxina da cólera ou de pertussis, (b) elas parecem não interagir com o complexo  $\beta\gamma$ , e (c) as subunidades  $G\alpha$  têm maior similaridade entre si na

seqüência de amino ácidos. Elas também podem ser distinguidas pelo tamanho. Em geral, as proteínas G $\alpha$  têm 350-400 amino ácidos, enquanto que as proteínas parecidas com ras têm cerca de 200 e as similares a Ef-Tu têm freqüentemente 400-900 amino ácidos. Além disso, quando se comparam as outras proteínas que se ligam a GTP às subunidades G $\alpha$ , particularmente com respeito às suas características estruturais compartilhadas que presumivelmente funcionam na ligação ao nucleotídio guanina e hidrólise, também pode-se distingui-las de G $\alpha$ . Todas as proteínas conhecidas que se ligam a GTP, exceto as tubulinas, compartilham seqüências de motivos de homologia limitada, mas a subpopulação que é representada pelas proteínas G compartilham um número de características adicionais que são únicas para proteínas G.

### 1.2.3 Interações com o nucleotídeo guanina

Ocorre uma ampla variação (35-94 %, tabela 1.1) na porcentagem de identidade de seqüências entre subunidades  $\alpha$ , mas há 82 amino ácidos invariáveis entre elas (figura 1.9). A maior parte das seqüências mais altamente conservadas estão próximas das regiões que supostamente participam das interações com o nucleotídeo guanina. Esta predição se baseia em estudos biofísicos sobre a estrutura cristalográfica de GDP de Ef-Tu e em estudos genéticos de mutações que afetam as interações das proteínas ras com o nucleotídeo guanina. Destas duas aproximações independentes surgiram dados complementares e, foram identificadas cinco regiões de homologia que são críticas para as interações com o nucleotídeo guanina. Pode-se encontrar regiões análogas em proteínas G, que são indicadas na figura 1.9 como A, C, E, G e I da nomenclatura de Halliday (apud Lochrie & Simon, 1988).

*tabela 1.1*

*porcentagem de identidade da seqüência de aminoácidos entre subunidades  $\alpha$  de proteína G.*

---

s	(100 M/H; 99,8 R/H; 99,8 B/H; 99,8 B/M; 99,8 M/R; 99,5 R/B 99,2 B/H)							
o	46	(98,3 R/B)						
1-1	44	72	(100 H/B; 99,7 H/R; 99,7 R/B)					
1-2	43	69	88	(99,2 R/M; 98,6 H/R; 97,7 H/M)				
1-3	43	70	94	85	(98,6 R/H)			
c	44	62	70	69	69			
r	43	63	69	68	66	81		
z	41	60	67	67	67	57	55	
y	35	44	48	47	46	45	44	44
	s	o	1-1	1-2	1-3	c	r	z

---

R = rato, B = bovino, H = humano, M = murino



```

y:  MGCTIVSIQIIGDQSDPFLQN KRANVDIEQS LQLEKQRDKN EIKLLLLGAG ESGKSTIVLKQ LKLLHQGCFSS -----HQERLQYAV IWADAIQSMK 90
s:  MGCLGNSKTEDQRNEEKAQR EANKK-IEKQ LQKDKQVYRA THRLLLLGAG ESGKSTIVKQ MRILHVNCFN GEGGEEDPQAARSNSDGEKATKVQD IKNNLKEAIE 104
1-1: MGCTLSA-----EDKAAV ERSK-MIDRN LREDGEKAAR EVKLLLLGAG ESGKSTIVKQ MKIIHEAGYS -----EEECKQYKAV VYSNTIQSII 82
1-2: MGCTVSA-----EDKAAA ERSK-MIDKN LREDGEKAAR EVKLLLLGAG ESGKSTIVKQ MKIIHEDGYS -----EEECRQYRAB VYSNTIQSIM 82
1-3: MGCTLSA-----EDKAAV ERSK-MIDRN LREDGEKAAR EVKLLLLGAG ESGKSTIVKQ MKIIHEDGYS -----EDECCKQYKVV VYSNTIQSII 82
o:  MGCTLSA-----EERAAL ERSK-AIEKN LKEDGISAAR DVKLLLLGAG ESGKSTIVKQ MKIIHEDGFS -----GEDVKQYKPV VYSNTIQSLA 82
z:  MGCRQSS-----EKECAA RRSRR-IDRH LRSESRQRRR EIKLLLLGTS NSGKSTIVKQ MKIIHSGGFN -----LEACEKYKPL IINYAIDSLI 82
r:  MGAGASA-----EEK--- -HSRE-LEKK LKEDALKDAR TVKLLLLGAG ESGKSTIVKQ MKIIHQDGYSS -----LEECELEFIAI IYGNLQSLIL 78
c:  MGSGASA-----EDKELA KRSKE-LEKK LQEDADKEAK IVKLLLLGAG ESGKSTIVKQ MKIIHQDGYSS -----PEECELEYKAI IYGNVLQSLIL 82
MG L L L L L G S G K S T I V K Q H G

```

```

y:  ILIIQARKLK IQLDCCDPPIN N-KOLFACKR I-(117)-HE DIAKAIKQLWN NDKGIKQCFR RSNEFQLEGS AAYYFDNIEK FASPNVYCTD EDILKGRITK 300
s:  IIVAAMSNLV PPVELANPLN QFRVYDYLVS MNPVNFDFPP EFYEHAKALW- EDEGVRACYE RSNEYQLIDC AQYFLDKIDV IKQADYVPSD QDLLRCRVL 204
1-1: AIIRAMGRK IDFGAARAD DARQLFVLAG AAEEGFM-TA ELAGVTKRLW- KDSGVQACFN RSREYQLNDS AAYYLNLDLR IAOPNYIPTQ QDVLRTRVKT 181
1-2: AIVKAMGNLQ IDFADPQRAD DARQLFALSC AAEEGGMLEP DLGCVIRRLW- ADHGQVQACFG RSREYQLNDS AAYYLNLDLR IAQSDYIPTQ QDVLRTRVKT 182
1-3: AIIRAMGRK IDFGAARAD DARQLFVLAG SAEEGVM-TS ELAGVTKRLW- RDGGVQACFS RSREYQLNDS ASYYLNLDLR ISQINYIPTQ QDVLRTRVKT 181
o:  AIVRAMDILG VEYGDKERKA DSKMVCDDVVS RMEDETPFSA ELLSAMRRLW- GDSGIQACFN RSREYQLNDS AKYYLDSLDR IGAADYQPIE QDILRTRVKT 182
z:  RIIRAL AALR IDFHNPDRAY DAVQLFALTC PAESKGEITP ELLGVMRRLW- ADPQAQACFS RSSEYHLEDN AAYYLNLDLR IAAADYIPTV EDILRSRDMT 182
r:  AIVRAMITLN IKYGDARSQD DARKLMHMAD TIEEGTM-PK EMSDIQRLW- KDSGIQACFD RASEYQLNDS AGYYLDSLDR LVTPGYVPTD QDVLRSRVKT 177
c:  AIIRAMPILG IDYAEVSCVD NGRQLNNLAD SIEEGTM-PK ELVEVTRKRW- KDSGVQACFD RAADYQLNDS ASYYLNQLDR ITAPDYLPNE QDVLRSRVKT 181
L L W D G C R L A Y Y D L R T

```

```

y:  TGITETEFNI GSSKFKVLDA GGQRSEKRW IHCFEGVIAV LFLVAMSEYD QMLFEDERN RMHESIMLFD TLLNSKWFKD IPFILFLNKI DLFEKVKSM 400
s:  SGIFETKQV DKNVHMFQV GGQRSEKRW IQCFNDVIAI IFVYVASSYN MVIREDNQIN RLQEALNLFK SIWNNRWLRT ISVILFLNKQ DLLAEKVLAC 304
1-1: TGIVEIHTF KDLHFQMFQV GGQRSEKRW IHCFEGVIAI IFCVALSDYD LVLAEDEEMN RMHESMKLFD SICNNKWFID TSIILFLNKK DLFEKIKKS 281
1-2: TGIVEIHTF KDLHFQMFQV GGQRSEKRW IHCFEGVIAI IFCVALSDYD LVLAEDEEMN RMHESMKLFD SICNNKWFID TSIILFLNKK DLFEKIKKS 282
1-3: TGIVEIHTF KELYFKMFQV GGQRSEKRW IHCFEGVIAI IFCVALSDYD LVLAEDEEMN RMHESMKLFD SICNNKWFID TSIILFLNKK DLFEKIKKS 281
o:  TGIVEIHTF KNLHFLRFQV GGQRSEKRW IHCFEDVIAI IFCVALSGYD QVLHEDETIN RMHESLMLFD SICNNKFFID TSIILFLNKK DLFEKIKKS 282
z:  TGIVEIHTF KELYFKMFQV GGQRSEKRW IHCFEGVIAI IFCVALSGYD LKLYEDNQIS RMAESLRLFD SICNN-WFIN TSLILFLNKK DLLAEKIRRI 282
r:  TGIIEIQFSF KDLNFRMFQV GGQRSEKRW IHCFEGVICI IFIAALSDYD MVLVEDDEVN RMHESLHLFN SICNHRYFAI TSIILFLNKK DVFSEKIKKA 277
c:  TGIIEIKFSF KDLNFRMFQV GGQRSEKRW IHCFEGVICI IFCAALSDYD MVLVEDDEVN RMHESLHLFN SICNHKFFAA TSIILFLNKK DLFEKIKKV 281
GI E F F D GGQR ER KW I CF T F S Y ED R E LF N LFLNK D EK

```

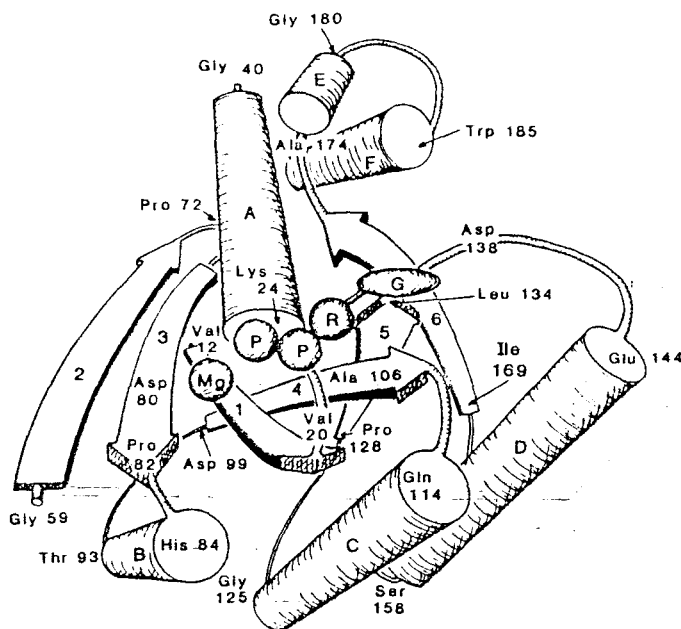
```

y:  PIRK---YFPDYQ GRVGDAAEAGL -----KYFEKI-FLSLNKTN---KPIYVKRI CATDTQIMKF VLSAVTDLII QNLLKIGII 472
s:  KSKI-EDYFPEFA RYTIPEDAIP EPGEDPRVIRAKYF IRDEF LRISTASGDGRHYCYPHF I CAVDTENIRR VFNDCRDIIQ RMHLRQYELL 394
1-1: PLTIC---YPEYA GSNTYEEAAA -----YIQCFEDLNRRKDT--KEIYTHFT CAIDTKNVQF VFDAVTDVII KNNLKDCGLF 354
1-2: PLTIC---FPEYT GANKYDEAAS -----YIQSKFEDLNRRKDT--KEIYTHFT CAIDTKNVQF VFDAVTDVII KNNLKDCGLF 355
1-3: PLTIC---YPEYT GSNTYEEAAA -----YIQCFEDLNRRKDT--KEYYTHFT CAIDTKNVQF VFDAVTDVII KNNLKECCGLY 354
o:  PLTIC---FPEYP GSNTYEDAAA -----YIQIQFESKNRSPN--KEIYCHMT CATDINNIQV VFDAVTDIII ANNLRGCCLY 354
z:  PLTIC---FPEYK GSNTYEEAAV -----YIQRFEDLNRRKDT--KEIYSHFT CAIDTSNIQF VFDAVTDVII QNNLYKIGLC 354
r:  HLSIC---FPOYN GPNTYEDAGN -----YIKVQFLELNRRRDV--KEIYSHMT CAIDTQNVKF VFDAVTDIII KENLKDCGLF 350
c:  HLSIC---FPEYD GNSYEDAGN -----YIKSQFLELNRRKDV--KEIYSHMT CAIDTQNVKF VFDAVTDIII KENLKDCGLF 354
C P A F Y T CA DT V D I L

```

figura 1.9

seqüência de homologia de aminoácidos entre subunidades  $\alpha$  e proteína G. As seqüências de subunidades  $\alpha$  comparadas são de levedura GPI (y), rato G<sub>1</sub> (s), G<sub>1</sub> (1-1,2,3) e G<sub>1</sub> (o), G<sub>1</sub> humana (z) e transducina bovina de bastonetes (r) e de cone (c). Reproduzido de Lochrie & Simon (1988).



*figura 1.10*

*esquema de ligação de GDP a Ef-Tu. As setas representam cadeias de aminoácidos; cilindros significam hélices; círculos abertos são as ligações a GDP. A localização aproximada dos carbonos  $\alpha$  dos aminoácidos selecionados também é mostrado. Reproduzido de Jurnak, 1985.*

A seqüência consenso da região A é Gly-X-X-X-Gly-Lys. Em Ef-Tu esta região é próxima ao fosfato  $\alpha$  de GDP. A carga negativa no fosfato é neutralizada pela lisina. Mutações em regiões análogas de *ras* reduzem a ligação à GTP e a atividade de GTPase. São encontradas regiões similares em outras proteínas que se ligam a nucleotídeos de purina.

A região C tem a seqüência consenso Asp-X-X-Gly. O ácido aspártico, na estrutura de Ef-Tu, quelata um íon magnésio que é íntimo ao fosfato  $\beta$  de GDP. Uma mutação de Asp-X-Ala-Gly para Asp-X-Thr-Gly em *ras* resulta em autofosforilação da treonina se GTP é usado como substrato. A atividade de GTPase é reduzida quando ocorre mutação de outros resíduos próximos a esta seqüência em *ras* (Lochrie & Simon, 1988).

A região E está situada entre as regiões C e G e, caracteriza-se como uma região muito hidrofóbica. Ela contém

frequentemente uma alanina que se localiza 26 amino ácidos distais ao ácido aspártico da seqüência consenso da região C. Em Ef-Tu esta alanina, juntamente com outros amino ácidos hidrofóbicos das regiões G e I, formam um pacote hidrofóbico próximo ao anel de guanina e ribose. Mutações de alanina análoga para treonina, no *ras*, resulta em redução de 30 vezes na afinidade por GTP (Lochrie & Simon, 1988).

A região G é assim denominada por conter a região que determina a especificidade da ligação ao nucleotídeo. Esta região tem a seqüência-consenso Asn-Lys-X-Asp. Em Ef-Tu a asparagina liga-se através de uma ponte de hidrogênio ao grupo C-6 ceto do anel de guanina e, o ácido aspártico forma ponte de hidrogênio com o grupo C-2 amino. Uma mutação de ácido aspártico para asparagina em Ef-Tu altera a especificidade nucleotídica da proteína favorecendo xantina difosfato sobre guanosina difosfato. Mutações nesta mesma região de *ras* reduzem, alteram, ou abolem a ligação nucleotídica. A lisina conservada pode formar ponte de hidrogênio com o carbonil principal ou com cadeias laterais de dois amino ácidos precedendo Gly-Lys na região A. Em *ras* mutação desta lisina para glutamina resulta em 75 % de redução na ligação nucleotídica. Tal mudança pode distorcer a arquitetura da ligação nucleotídica mas deve conservar a ponte de hidrogênio do grupo amino.

A região I pode também estar envolvida na ligação nucleotídica, mas esta região ainda não está bem definida. Em Ef-Tu ela pode estar próxima de Gly-172, Ser-173, Ala-174 e 1, mas a determinação precisa da função de cada amino ácido depende da obtenção de uma estrutura cristalográfica mais refinada. A região análoga de *ras* pode ser Thr-144, Ser-145, Ala-146. Num rastreamento genético designado para isolar mutantes de *ras* para ligação a GTP, foi obtido um em que Thr-144 foi mudada para isoleucina. Esta mudança resultou em uma redução de 25 vezes na afinidade por GTP. Ainda não houve uma ampla discussão sobre a existência de uma região I na subunidade  $\alpha$ . A figura 1.9 mostra uma possível região I com a seqüência Thr-Cys-Ala. Ela se encontra após a região G e, como as outras regiões de Halliday.

contém um agrupamento de amino ácidos invariáveis. A homologia desta região na família de proteínas Ef-Tu é baixa, mas uma maior homologia pode ser encontrada quando ela é comparada à família de ras, particularmente a proteína rab (Lochrie & Simon, 1988).

Mutações nas regiões A,C,E,G e I de ras têm efeito biológico dominantes numa variedade de sistemas, incluindo levedura, ovócitos de *Xenopus*, células PC12, células NIH 3T3, e camundongos transgênicos. Também foram observados efeitos específicos de mutações recessivas em levedura. Os efeitos fenotípico e bioquímico de mutações análogas feitas em proteína G estão sob investigação (Lochrie & Simon, 1988).

Em proteínas que se ligam ao nucleotídeo guanina que têm regiões de Halliday, a área imediatamente próxima de cada seqüência consenso é similar dentro de uma família, mas é diferente das de outras famílias. Além disso, estas regiões formam uma "impressão digital" pela qual as proteínas G podem ser identificadas e distinguidas de outras proteínas que se ligam ao nucleotídeo guanina. A seqüência de Gz é interessante a este respeito porque ela difere levemente de outras seqüências nas regiões A e E. Deste modo, uma nova subclasse de proteína G pode ser definida por Gz. De fato, pode existir um amplo contínuo de subunidades  $\alpha$ , cada uma levemente diferente da outra. Tal situação está emergindo para as proteínas parecidas com ras, que incluem pelo menos cinco famílias relacionadas porém distintas (Lochrie & Simon, 1988).

As seqüências de amino ácidos fora das regiões de Halliday são necessárias para as funções específicas da subunidade  $\alpha$  tais como as interações com receptor, efetor e com as subunidades  $\beta$ - $\gamma$ . Estudos sobre a estrutura e função das proteínas G, particularmente a transducina, são uma tentativa para indicação funcional para algumas daquelas regiões (Lochrie & Simon, 1988).



#### 1.2.4 Interações das subunidades $\alpha/\beta\gamma$

Algumas evidências sugerem que a extremidade amino terminal de  $\alpha$  é necessário para a ligação com  $\beta\gamma$ , mas os dados não indicam se ele também é suficiente. Quando se faz tratamentos de  $Tr\alpha$  com proteases que removem ao redor dos 20 primeiros amino ácidos, várias reações que dependem de  $Tr\beta\gamma$  são abolidas, como por exemplo a ribosilação por ADP de  $\alpha$  pela toxina de pertussis, a ligação à rodopsina, a ligação à Gpp(NH)p, e a imunoprecipitação de  $Tr\beta\gamma$  por um anticorpo monoclonal contra  $Tr\alpha$ . Uma das regiões mais variáveis entre as subunidades  $\alpha$  é o amino terminal. Ela é uma região singularmente hidrofílica e, exibe uma característica anfipática na qual os amino ácidos hidrofóbicos ou neutros são encontrados ao redor de cada posição quatro. Não é claro como estas propriedades podem contribuir com a ligação  $\alpha\beta\gamma$ . A subunidade  $\gamma$  pode prover a maior parte da especificidade da ligação desde que se sabe que ela também é variável, mas não é possível separar o complexo  $\beta\gamma$  em subunidades puras, sem usar condições desnaturantes, para ter acesso às suas propriedades individuais de ligação (Lochrie & Simon, 1988).

### 1.2.5 Subunidade $\alpha$ /Interações com o receptor

As interações receptor/proteína G podem ser de dois tipos. As seqüências conservadas da proteína G podem reconhecer as seqüências conservadas do receptor e funcionar num processo básico para todos os sistemas de acoplamento receptor/proteína G, tal como a reação de troca do nucleotídeo guanina. As seqüências variáveis do receptor e da proteína G podem interagir para permitir discriminação específica entre proteínas estreitamente relacionadas (Lochrie & Simon, 1988).

Há evidências de que as interações com o receptor são influenciadas pela extremidade carboxi terminal da subunidade  $\alpha$ . Primeiro, a toxina de pertussis, que não se acopla a receptores de proteína G, ribosila por ADP a Tr $\alpha$  na Cys-347. Segundo, a mutação UNC, que não acopla Gs $\alpha$  ao receptor  $\beta$ -adrenérgico, resulta de uma mudança de arginina para prolina à posição 389 de Gs $\alpha$ . Finalmente, há uma correlação entre seqüência de homologia ao terminal carboxila de Tr $\alpha$  e a habilidade para interagir com rodopsina (Lochrie & Simon, 1988).

Todavia, uma comparação das interações de rodopsina e do receptor adrenérgico  $\alpha_2$  com Go, Gi e Tr indica outra região que pode ser importante para dar especificidade de ligação ao receptor. A rodopsina pode interagir igualmente com Go, Gi e Tr enquanto que o receptor  $\alpha_2$  mostra uma preferência diferencial para Go e Gi sobre Tr. A maior parte das posições onde as seqüências Go $\alpha$  e Gi $\alpha$  são idênticas mas diferem de Tr $\alpha$ , estão concentradas nas extremidades amino terminal e carboxila terminal sobre ambos os lados da suposta região I. O amino terminal variável de  $\alpha$  pode determinar indiretamente a especificidade ao receptor, desde que o mesmo é requerido para a ligação  $\beta\gamma$ , que por sua vez está implicado na ligação ao receptor. Uma indicação de que a extremidade carboxi terminal pode não ser o único determinante nas interações com o receptor, é a observação de que os últimos 40 amino ácidos de Tr $\alpha$  e Tc $\alpha$  que parecem estar ligados a receptores diferentes, são idênticos.

### 1.2.6 Subunidade $\alpha$ / Interações com os efetores

As seqüências envolvidas na regulação das proteínas efetoras estão localizadas entre as regiões A e C, onde se encontram as seqüências com maior variabilidade entre as subunidades  $\alpha$ . A região análoga de Ef-Tu liga-se ao aminoacil-tRNA numa reação dependente de GTP, e mutações no *ras* numa região limitada entre A e C abole sua atividade biológica mas não interfere com suas interações com nucleotídeo ou com a membrana. De fato, um segundo sítio, supressor alelo específico de uma tal mutação *ras* de levedura mapeia para adenilil ciclase, um efetor para *ras* em levedura (Lochrie & Simon, 1988).

Foi isolada uma mutação em  $G\alpha$  (H21a), que impede a ativação de adenilil ciclase. Esta mutação envolve um único par de base que resulta em mudança de glicina para alanina na posição 228 de  $G\alpha$  na seqüência consenso da região C. Todavia, há evidências de que a inabilidade da proteína H21a em ativar adenilato ciclase pode ser devida à sua incapacidade para sofrer mudança conformacional associada com ligação a GTP, que é um pré-requisito para a interação efetora, mais do que uma interrupção direta da mesma per se (Lochrie & Simon, 1988).

Foi proposto um mecanismo de ativação de fosfodiesterase (PDE) de cGMP, no qual  $Tr\alpha$ -GTP liga-se a PDE $\gamma$ , um inibidor conhecido de PDE $\alpha\beta$ , a subunidade catalítica. Ovchinnikov e colaboradores (apud Lochrie & Simon, 1988) determinaram a seqüência de amino ácidos de PDE $\gamma$ . Na sua seqüência de 89 amino ácidos há uma região de 35 amino ácidos com 12 resíduos básicos, isto explica porque PDE pode ser ativado por tripsina. Todavia, não se pode inferir a base molecular da interação proposta entre PDE $\gamma$  e  $Tr\alpha$  apenas pelo exame de sua seqüência de amino ácidos.

### 1.2.7 Ribosilação por ADP

A arginina da posição 174 e cisteína da posição 347 já foram identificadas como sendo substratos da toxina da cólera e da toxina de pertussis em  $Tr\alpha$ , respectivamente. O substrato da toxina da cólera é conservado em todas as seqüências de subunidade  $\alpha$  e, o substrato da toxina de pertussis é encontrado em  $Gi-1,2,3\alpha$ ,  $G\alpha$ ,  $Tr\alpha$  e  $To\alpha$ . Como predito pela similaridade da seqüência, as subunidades  $\alpha$  que foram purificadas podem ser ribosiladas por ADP. Todavia, como os elementos tóxicos não foram bem definidos, não se sabe se a presença do amino ácido substrato encontrado à posição análoga em  $Tr\alpha$  é necessária para permitir ribosilação por ADP. Permanece então a ser determinado se  $G\alpha$  será um substrato da toxina de pertussis, desde que ela tem uma cisteína ramificada por três amino ácidos de outros substratos da toxina de pertussis (Lochrie & Simon, 1988).

Os amino ácidos que são ribosilados por ADP pela toxina da cólera e pela toxina de pertussis são notavelmente conservados. O substrato da toxina da cólera é invariável, e a região ao seu redor é altamente conservada mesmo nas proteínas G de levedura. Tal grau de conservação sugere que estes amino ácidos possam ter uma função especial. Uma vez que todas as proteínas G contêm subunidades  $\beta$  similares e, a região próxima ao substrato da toxina da cólera é bem conservada, foi sugerido que ela desempenha um papel na interação com  $\beta\gamma$ . Kahn & Gilman relataram que a ribosilação por ADP da toxina da cólera promove a dissociação das subunidades  $\alpha$  e  $\beta\gamma$  (Lochrie & Simon, 1988).

### 1.2.8 Acetilação de lipídios

Fode-se extrair a maioria das proteínas G de membranas apenas pelo uso de detergentes, uma propriedade que é inconsistente com a natureza hidrofílica de sua sequência de amino ácidos. Com base na sutil homologia de sequência a duas outras proteínas hidrofílicas, *src* e *ras*, que também estão associadas à superfície citoplasmática da membrana, pode ser formulado um mecanismo possível para a localização de proteínas G na membrana, que envolve acetilação com lipídios (Lochrie et al., apud Lochrie & Simon, 1988). A figura 1.11 mostra como as proteínas G podem se associar à membrana.

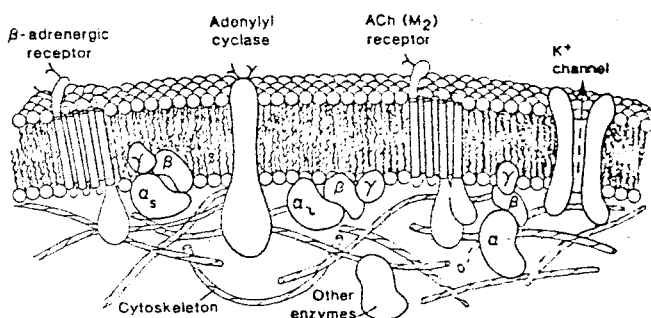


figura 1.11 esquema de ligação das proteínas G à membrana. Reproduzido de Neer & Clapham, 1988.

O produto do oncogene *src* mostrou ser N-miristilado na glicina da segunda posição (Gly-2) que está presumivelmente exposta após remoção da metionina inicial por uma aminopeptidase. Várias observações indicam que a miristilação está envolvida na sua ligação à membrana. Mutações que removem Gly-2 de *src* resultam numa proteína que não está associada com a membrana, não é miristilada e é incapaz de transformação neoplásica. Quando se procede a fusão dos 15 primeiros amino ácidos de *src* à extremidade amino terminal de globina, esta pode ligar-se então à membrana. Numerosas outras proteínas são sabidamente N-miristiladas, em cada caso no resíduo Gly-2. Em geral, não é bem entendida a função da acetilação por ácidos graxos. Ocorre que

algumas proteínas miristiladas são solúveis, indicando que a miristilação nem sempre é um determinante para associação à membrana. Foram purificadas N-miristiltransferases (NMT) de levedura e de rato, e suas especificidades a substrato foram examinadas usando-se cerca de 80 substratos peptídicos sintéticos. Com base nestes estudos e na comparação das seqüências, pode-se sugerir uma seqüência consenso para as proteínas miristiladas : Met-Gly-X-X-X-Ser. Todas as subunidades de proteína G exceto G $\alpha$ ,  $\beta$ 35,  $\beta$ 36 e Tr $\gamma$  contém este consenso. As subunidades  $\beta$ 35,  $\beta$ 36 e Tr $\gamma$  não têm Gly-2, que é um requerimento indispensável. G $\alpha$  tem uma serina na posição 7 mas asparagina na posição 6. De acordo com Towler et al. (apud Lochrie & Simon, 1988) esta diferença pode reduzir o Km de G $\alpha$  para NMT a um fator de 6000. Buss e colaboradores (apud Lochrie & Simon, 1988) publicaram o primeiro estudo para determinar se as proteínas G são modificadas por lipídios. Eles encontraram que Gi $\alpha$  e Go $\alpha$  são miristiladas mas que G $\alpha$ ,  $\beta$ 35,  $\beta$ 36 e Tr $\Gamma$  não são. Eles também relateram que Tr $\alpha$  não é miristilada.

As proteínas ras são acetiladas com vários lipídios, primariamente palmitato, numa cisteína que é o quarto amino ácido a partir da extremidade carboxi terminal (-4Cys). A ligação nucleotídica e a atividade de hidrólise são normais em mutantes que perdem -4Cys, mas eles não são palmitalados e possuem atividade biológica reduzida. A sobreexpressão da proteína pode compensar esta deficiência, indicando que o propósito de associação à membrana pode ser o de aumentar a eficiência de interação entre ras e outras proteínas de membrana. Go $\alpha$ , Gi-1,2,3 $\alpha$ , To $\alpha$  e Tr $\alpha$  têm uma -4Cys. De fato, é este amino ácido que pode ser ribosilado por ADP pela toxina de pertussis, mas não há dados que indiquem se ele é modificado pós-traducionalmente por enzimas de eucariotos com ADP-ribose ou algum outro aduto.

Tr $\gamma$  também tem uma -4Cys. Neste caso, é notável que dois grupos de pesquisa independentes falharam em determinar a seqüência de amino ácidos de Tr $\gamma$  além desta cisteína bem como sua presença por análise de amino ácidos, indicando que ela pode ser modificada nesta posição. As subunidades  $\beta$  $\gamma$  puras estão

associadas a vesículas fosfolipídicas, enquanto que as subunidades  $\alpha$  não o fazem a não ser que as subunidades  $\beta$  e  $\gamma$  estejam presentes. Desde que as seqüências das proteínas  $\beta$  e  $\gamma$  são hidrofílicas, a subunidade  $\gamma$  modificada com um grupo hidrofóbico pode mediar esta interação. Embora Buss e colaboradores (apud Lochrie & Simon, 1988) não tenham encontrado miristato ou palmitato ligados a Try, as cisteínas na região carboxi terminal de outras proteínas são modificadas com outros adutos hidrofóbicos ao redor dos ácidos graxos. Uma cisteína ao carboxi terminal do antígeno Thy-1 está ligada a fosfatidilinositol-glicano, e uma cisteína no ferormônio de acasalamento da levedura *Tremella* está ligada a um grupo farnisil. Talvez as subunidades  $\alpha$  e  $\gamma$  estejam ligadas a uma destas outras metades hidrofóbicas.

### 1.2.9 Fosforilação

Desde que o sistema de sinais de transdução da membrana é a primeira etapa numa via complicada, ele pode estar sujeito a uma retro-regulação. A regulação de receptores por fosforilação foi bem documentada. As proteínas G ( $Tr\alpha$  e  $Gi\alpha$  mas possivelmente não  $Gs\alpha$ ) são substratos subestequiométricos para fosforilação por proteína quinase C in vitro e in vivo. A proteína substrato estimulada é  $\alpha$ -GDP e não  $\alpha\beta\gamma$  ou  $\alpha$ -GTP- $\gamma$ -S. O amino ácido substrato é uma serina. Além disso,  $\beta\gamma$  inibem fosforilação de  $\alpha$ -GDP. Os requerimentos exatos do substrato para fosforilação pela proteína quinase C não são bem entendidos, mas para muitos substratos de quinase C um amino ácido básico está localizado dois ou três amino ácidos proximais ao amino ácido substrato, que é uma serina ou treonina. Em alguns casos o substrato está dentro de um sítio de acoplamento de cerca de 10 amino ácidos da membrana, o que está de acordo com o que se sabe sobre as propriedades de translocação da quinase C na membrana quando ela é ativada. Observadas estas linhas mestras, ser-12 (em  $Tr\alpha$ ) é um bom candidato para ser um substrato de quinase C. Esta serina é conservada em todas as subunidades  $\alpha$  (exceto em  $Gs\alpha$ ), a 11 amino ácidos do suposto sítio de acoplamento à membrana, e próxima de vários amino ácidos básicos.

### 1.2.10 Caracterização genética da proteína G

Nosso grupo recebeu um banco genômico de *Caenorhabditis elegans* clonado em fago  $\lambda$  do Prof. Dr. J. Sulston. Partindo deste banco genômico nós "fisgamos" o gene da subunidade  $\alpha$  da proteína G utilizando sondas que são descritas em Material e Métodos.



## 11. Objetivo

O propósito deste trabalho foi o de clonar e determinar a seqüência de nucleotídeos de um gene  $G\alpha$  de *C. elegans*.

Uma vez tendo a seqüência dos nucleotídeos nossa intenção era de proceder a tradução para seqüência de amino ácidos a fim de se poder comparar as regiões dos exons com a seqüência de amino ácidos de proteínas G (cadeia  $\alpha$ ) de outros organismos com a finalidade, em primeira instância, de se obter uma comprovação de que teríamos mesmo em mãos um gene  $G\alpha$  e, em segunda instância, para determinar a identidade desta cadeia proteica com a mesma cadeia proteica de outros organismos.

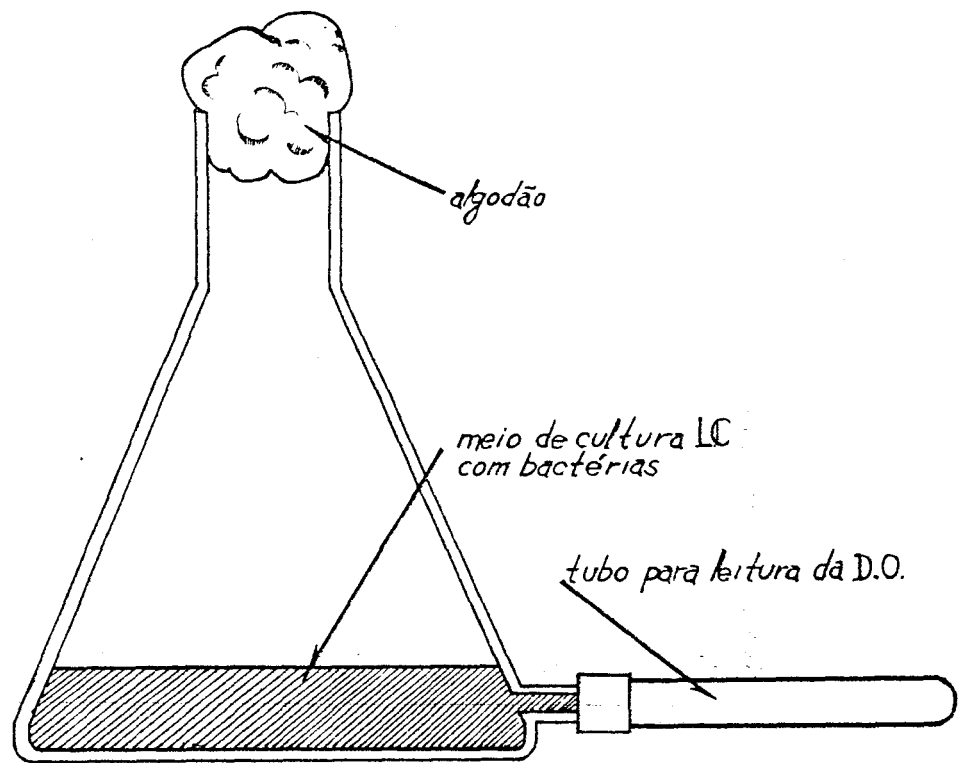
### III. Material e métodos

#### III.1 Banco genômico $\lambda$

O banco genômico de *Caenorhabditis elegans* foi gentilmente doado por J. Sulston. O DNA genômico de *Caenorhabditis elegans* foi clonado em fago  $\lambda$ , e nós selecionamos um clone que continha o gene Gx utilizando uma sonda radioativa.

#### III.2 Crescimento de bactérias

Bactérias NM 538 semeadas em placas de petri com agar foram incubadas durante uma noite a 37°C e mantidas a 4°C para uso posterior. A partir destas culturas obteve-se inóculo para cultura em meio líquido LC (com 20% de maltose), e a incubação deu-se a 37°C em banho-maria com agitação (shaker). Foram utilizados erlenmeyer com um tubo ligado, que propiciou a leitura da OD (veja fig. III.1), a cultura foi considerada ainda em fase log até uma OD de 0,6. A suspensão era então centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos e o sedimento era ressuspenso em MgCl<sub>2</sub> a 10 mM.



*figura 111.1*

*Erlenmeyer com tubo para leitura da OD, para determinar o crescimento das bactérias.*

### 111.3 Infecção de bactérias NM 538 com fago $\lambda$

As bactérias preparadas como acima eram incubadas com suspensão de fago  $\lambda$  durante 15 minutos a 37°C com leve agitação (em banho-maria). Adicionava-se então top agar ou top agarose a 42°C e derramava-se esta suspensão numa placa de petri com agar (já solidificado), após o que procedia-se incubação durante uma noite em estufa a 37°C. No top agar ou top agarose adicionava-se maltose a 20% e MgSO<sub>4</sub> a 0,01 M.

### 111.4 Preparação da sonda pelo PCR

As sondas foram preparadas através do uso de oligonucleotídeos que tem identidade com seqüências de DNA de proteína G (cadeia  $\alpha$ ) de outros organismos (no caso de bovinos). Os oligonucleotídeos tem as seguintes seqüências :

Oligos para Gi :

```
      T      T      G      A      A      T
T A C A T C C C A A C A C A G C A G G A C G
      A      T
      C
```

(384 diferentes oligos possíveis)

e :

```
      T      A      A      A      A
C T C C C T C G A A G C A G T G G A T C C
      T
```

(48 diferentes oligos possíveis)

Os oligonucleotídeos foram usados na reação de PCR (polymerase chain reaction) para se obter as sondas em grande quantidade. Eles foram então submetidos a eletroforese e as bandas correspondentes foram retiradas do gel e armazenadas a - 20°C até o momento de uso.

Os primers do PCR foram selecionados correspondendo a seqüência de DNA predita codificando a seqüência de aminoácidos YIPTQQDV e a seqüência de DNA completa para a seqüência que codifica a seqüência peptídica KWIHCFEG. Estas seqüências foram selecionadas desde que elas foram conservadas nos genes de subunidade  $\alpha$  de proteína G entre *Drosophila* e mamíferos (Provost et al., 1988). A seqüência dos probes foi :

probe 1a : TA(T/C)AT(T/C/A)CCAACXCA(A/G)CA(A/G)GA(T/C)G (22 mer, 384 x degenerado) e

probe 3b : CTCC(T/C)TC(A/G)AA(A/G)CA(A/G)TG(A/G/T)ATCC (21 mer, 48 x degenerado).

A combinação de primers descrita na legenda do apêndice 1

originou um produto discreto, que foi usado para rastrear um banco genômico de *Caenorhabditis elegans* em fago  $\lambda$  (generosamente doado por Dr. J. Sulston). Todos os clones selecionados estavam sobrepostos e continham os mesmos fragmentos de restrição. Os clones foram mapeados por A. Coulson (MRC Cambridge) no cromossomo V (informações detalhadas sobre o mapeamento podem ser obtidas por contato direto com o banco de dados em Cambridge). Um fragmento Eco RI de um dos clones foi subclonado num plasmídeo derivado de pBR322 e a parte relevante foi seqüenciada. A análise do seqüenciamento foi feita usando-se o programa de Deverieux et al. (1984).

A sonda aqui caracterizada foi denominada sonda 3, a sonda denominada sonda 4 não está caracterizada porque não houve similaridade do clone a ela relacionado com outras proteínas G $\alpha$ .

### III.5 Marcação radioativa das sondas

Foram usados os seguintes componentes :

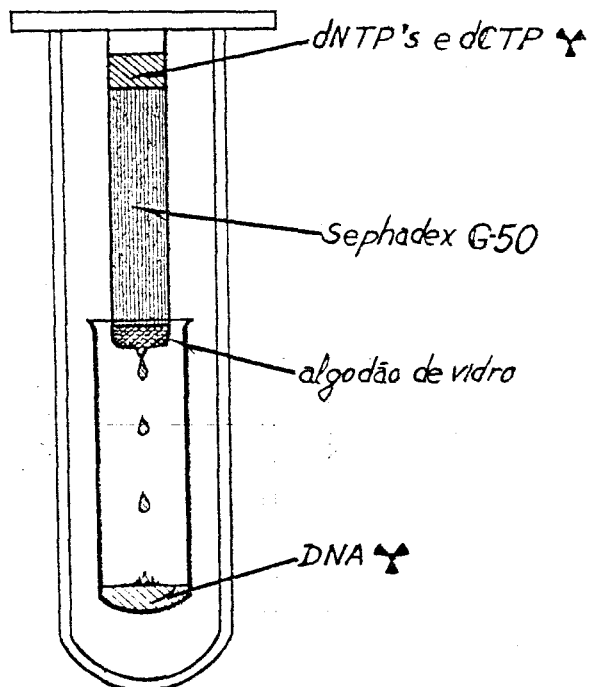
DNA [0,01 - 2 $\mu$ g] (10 min. a 100°C - direto no gelo)	2 $\mu$ l
mistura reativa	2 $\mu$ l
Klenov [2 $\mu$ l] (DNA polimerase)	1 $\mu$ l
dATP, dGTP, dTTP [0,1 mol/l]	3 $\mu$ l
[32] P dCTP	5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	7 $\mu$ l

Esses componentes juntos foram incubados a 37°C durante 30 minutos (em banho-maria).

Enquanto isso foram preparadas seringas de 1 ml com Sephadex G50.

Aos 20  $\mu$ l de mistura radioativa foram adicionados 180  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O e foram aplicados a coluna de Sephadex G 50, que foi centrifugada a 2500 rpm durante 2 minutos. Colocou-se a coluna de

sephadex num tubo de ensaio com um tubo eppendorf embaixo, conforme o esquema da figura 111.2 :



*figura 111.2*

*Esquema da filtração da sonda radioativa de DNA.*

As sondas foram guardadas nos eppendorfs e estes em tubos de chumbo a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes do uso o material foi deixado durante alguns minutos a temperatura ambiente e, foi submetido a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 2-5 minutos para que ocorresse a denaturação do DNA.

### 111.6. Hibridização

As placas anteriormente mencionadas eram tratadas da seguinte maneira no dia seguinte : eram colocadas em camara fria durante alguns minutos e, em seguida era colocado um filtro de nylon (Hybond N) em contato com a placa (durante 60, 90 e 120 segundos), para que o rago  $\lambda$  se ligasse ao filtro de nylon. Os filtros foram mergulhados durante 1 minuto em solução de denaturação e em seguida durante 5 minutos em solução de neutralização. Foram então lavados com 2 x SSC e deixados para secar ao ar. Já secos foram expostos a UV durante 2 minutos a fim de que o material se fixasse melhor ao filtro de nylon.

Os filtros foram pré-hibridizados com a solução apropriada durante no mínimo 15 minutos. As sondas marcadas radioativamente foram em seguida adicionadas e a hibridização ocorreu num período de no mínimo duas horas. Tanto a pré-hibridização quanto a hibridização ocorreram em banho-maria a 65°C, com agitação.

Após o período de hibridização, os filtros foram lavados rapidamente em 2 x SSC a temperatura ambiente (com agitação) e uma vez durante 15 minutos com 2 x SSC também a temperatura ambiente. Eles também foram lavados com 2 x SSC durante 15 minutos em banho-maria a 65°C com agitação e, em seguida lavados com 2 x SSC com 0,1% de SDS durante 15 minutos a 65°C com agitação. A última lavagem foi repetida durante 30 minutos, e finalmente os filtros foram lavados com 0,1% de SSC a 52°C durante 10 minutos.

Os filtros foram envolvidos em plástico aderente e foram submetidos a autoradiografia, num período que variou de 2 horas a uma noite, a - 70°C.

As colônias positivas foram selecionadas para que se pudesse isolar o DNA correspondente ao gene Gα, e o processo se repetiu. Nas novas colônias positivas foram escolhidas colônias individuais e o procedimento de hibridização se repetiu mais uma vez.

### III.7 Protocolos experimentais para extração de DNA de fagos λ

a) Foi utilizada em primeiro lugar a técnica modificada de Maniats, como segue :

Foram usadas placas de bactérias lisadas por fago λ como descrito anteriormente, as quais foram adicionados 15 ml de tampão SM e, seguiu-se eluição durante 4 horas sob agitação a temperatura ambiente. A suspensão foi então transferida para tubos falcon e os "debris" de bactéria foram removidos por centrifugação a 8000 g durante 10 minutos a 4°C. Ao sobrenadante foram adicionados RNase e DNase a concentração final de 1 µg/ml.

seguinte-se incubação de 30 minutos a 37°C. Foi adicionado um volume igual de polietilenoglicol a 20% (peso/volume) e NaCl a 2 M em SM e incubou-se durante 1 hora a 0°C (gelo-agua). Seguiu-se então centrifugação a 10000 g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado secar sobre papel absorvente.

Adicionou-se 1 ml de tampão SM e as partículas dos bacteriófagos foram ressuspensas por vortex. Seguiu-se finalmente centrifugação a 8000 g durante 2 minutos a 4°C para remover os "debris".

O sobrenadante foi transferido para tubos eppendorf. Adicionou-se 10 µl de SDS a 10% e 10 µl de EDTA a 0,5 M (pH 8,0). Seguiu-se incubação a 68°C durante 15 minutos. Foi feita uma extração com fenol e uma com fenol : clorofórmio (1 : 1) e mais uma com clorofórmio. A fase aquosa final foi adicionado um volume igual de isopropanol. isto foi estocado a -70°C durante 20 minutos. Seguiu-se centrifugação em eppendorf durante 15 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com etanol a 70%, secado e ressuspendido em 50 µl de TE (pH 8,0).

Este DNA assim obtido foi utilizado para tratamento com enzimas de restrição.

Entretanto tendo em vista os resultados insatisfatórios para o nosso trabalho, adotamos o procedimento abaixo descrito.

b) Foram usadas também placas de bactérias lisadas por fagos λ como no método anterior, as quais foram adicionados 15 ml de tampão Tris para fagos e duas gotas de clorofórmio, e as placas foram submetidas a agitação a temperatura ambiente durante quatro horas. Ao lisato foi adicionado 1/50 do volume de clorofórmio e centrifugou-se durante 10 minutos a 4000 g. Ao sobrenadante foram adicionados 60 µg/ml de DNase I e incubou-se durante 20 minutos a temperatura ambiente. Seguiu-se centrifugação a 8000 g durante 5 minutos e ao sobrenadante foram adicionados 50 µg/ml de gelatina e o mesmo volume de DEAE celulose a 80% em LC. isto foi agitado durante 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugado a 4000 g durante 10 minutos. o sobrenadante foi filtrado



(0,45 µm) e foram adicionados EDTA 20 mM e 50 µg/ml de proteinase K. seguiu-se incubação durante 15 minutos a 45°C. Foram então adicionados CTAB a 0,1% em 0,5 M NaCl e seguiu-se incubação durante 3 minutos a 68°C.

Em seguida permaneceu 5 minutos a 0°C e foi centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 1/10 do volume em NaCl 1.2 M e 2,5 do volume de etanol a 96% a -20°C.

A suspensão foi então centrifugada a 10000 rpm durante 10 minutos. O sedimento foi lavado com álcool a 70%, secado e ressuspenso em TE.

c) A seguinte metodologia foi adotada como definitiva, um vez que ela se mostrou mais rápida e eficaz que a anterior. Colocou-se bactérias NM 538 para crescer durante uma noite e foi colocado fago λ sobre uma placa com bactérias e incubou-se durante uma noite. Foram utilizadas bactérias numa diluição de 1/200 em LC com MgCl<sub>2</sub> a 10 mM e foi adicionado um pedaço de agar contendo fago λ. O elenmeyer foi colocado num shaker a 37°C com agitação e permaneceu lá até que ocorresse lise total. O conteúdo do elenmeyer foi transferido para tubos eppendorf, que foram centrifugados a 14000 rpm durante 5 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 2 µl de DNase/RNase (20 mg/ml), e foi deixado a temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida foram adicionados 400 µl de polietilenoglicol (PEG) a 25% em NaCl a 3 M, e foi deixado a 4°C durante 30 minutos, após o que centrifugou-se durante 5 minutos, duas vezes. Adicionou-se ao sedimento 200 µl de EDTA 10 mM, Tris-acetato 10 mM, pH 8,0 : isto foi submetido a vortex e adicionou-se 100 µl de fenol. Submeteu-se novamente a vortex e deixou-se no gelo durante 5 minutos, o vortex foi novamente utilizado e o preparado foi centrifugado durante 15 minutos a 14000 rpm. A fase aquosa foi transferida para tubo eppendorf contendo 20 µl de acetato de sódio 3 M, e adicionou-se 200 µl de isopropanol, o preparado foi submetido a vortex e foi estocado durante 30 minutos a -20°C. Seguiu-se centrifugação durante 5 minutos a 14000 rpm, o sedimento foi

secado e ressuspendido em 30 µl de TE.

### **III.8 Técnicas para clonagem e subclonagem de DNA**

#### **III.8.1 Células competentes**

Foram crescidas células JM 101 em LC a 37°C com agitação (em shaker) até que a OD atingisse o valor de 0,6. As células foram então deixadas em gelo durante 10 minutos. Em seguida as mesmas foram centrifugadas a 4°C a 3000 rpm durante 5 minutos. Foi utilizado vortex para ressuspender o sedimento, e foram adicionados 10 ml de CaCl<sub>2</sub> a 100 mM. As células foram então deixadas novamente em gelo durante 20 minutos após o que seguiu-se centrifugação como acima e o sedimento foi ressuspendido em 1 ml de CaCl<sub>2</sub> a 100 mM.

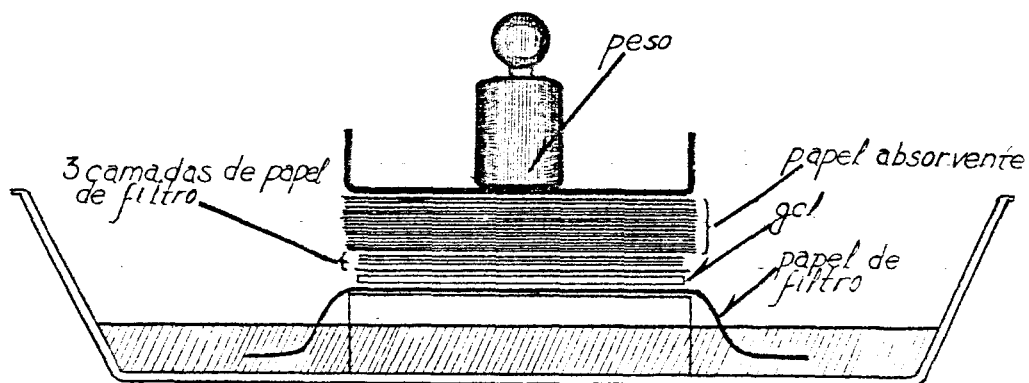
#### **III.8.2 Eletroforese de DNA em gel de agarose**

Foi preparado um gel com agarose a 1% de TAE e foram colocadas as amostras nas cavidades formadas pelo pente. Foi utilizado o corante azul de bromofenol para acompanhar a corrida, e foi aplicada uma voltagem de 80 V e corrente de 200 mA. A eletroforese foi interrompida quando julgou-se que o corante tinha atingido a distância desejada. O gel foi corado com brometo de etídio, observado e fotografado sob luz ultravioleta.

#### **III.8.3 Southern Blot**

O gel, após eletroforese, foi deixado durante 15 minutos na solução de denaturação e 15 minutos na solução de neutralização (com agitação). Numa cuba foi colocada uma placa e sobre esta um papel de filtro embebido em 2 X SSC e o gel foi colocado sobre

este papel de filtro. Sobre o gel foi colocado um filtro de nylon (Hybond) e sobre este 3 pedacos de papel de filtro, sobre os quais foi colocado um bloco de papel absorvente. Por cima de tudo foi colocada uma placa com um peso por cima. A cuba foi preenchida com 20 X SSC até o nível do primeiro papel de filtro e isto foi deixado até o dia seguinte (veja figura III.3).



*figura III.3*  
*Southern Blot.*

No dia seguinte o filtro de nylon foi retirado, secado ao ar e em seguida submetido a luz ultravioleta durante 2 minutos. O filtro foi colocado num saco plástico com solução de pré-hibridização e foi deixado, sob agitação, em banho-maria a 65°C durante 15 minutos. Em seguida foram adicionadas as sondas e a hibridização ocorreu a 65°C durante 2 horas (no mínimo). O filtro foi lavado com 2 X SSC durante 15 minutos a 65°C e com 2 X SSC com 0,1% de SDS a 65°C durante 15 minutos e, em seguida, envolvido em saran e submetido a autoradiografia a - 70°C durante 2 horas (no mínimo).

#### **III.8.4 Digestão de DNA com enzimas de restrição**

O DNA extraído como descrito acima foi incubado com enzimas de restrição a 37°C durante 30 minutos. Para DNA de fago  $\lambda$  utilizou-se 10  $\mu$ l de DNA, 1  $\mu$ l de enzima e 1  $\mu$ l de tampão. Para

DNA de plasmídeo utilizou-se  $\mu$   $\mu$ l de DNA, 1  $\mu$ l de enzima, 1  $\mu$ l de RNase (0.5 mg/ml), 1  $\mu$ l de tampão e completou-se com H<sub>2</sub>O até 10  $\mu$ l. O plasmídeo utilizado para clonagem foi o bluescript e para subclonagem o pk 18.

### **III.8.5 Transformação de células JM 101**

Tratou-se 1  $\mu$ l de plasmídeo doador e receptor com enzima de restrição como descrito acima. Colocou-se o DNA a 65°C a fim de se inativar a enzima de restrição. Misturou-se 10  $\mu$ l dos digestos de DNA a ser clonado, 5  $\mu$ l do plasmídeo receptor, 10  $\mu$ l de tampão de diluição para ligase, 1  $\mu$ l de ligase e 85  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, incubou-se durante 1 hora (no mínimo) a 16°C ou a temperatura ambiente.

A 100  $\mu$ l de células competentes foram adicionados 25  $\mu$ l da suspensão de ligação e deixou-se 20 minutos no gelo. Foi dado então um choque térmico a 42°C e foi adicionado 1 ml de LC e a suspensão foi deixada a 37°C num shaker durante 30 minutos, para que o plasmídeo pudesse se expressar, dando então resistência às células (ampicilina ou canamicina). A suspensão foi centrifugada a 14000 rpm durante 1 minuto e as células foram semeadas em placas de petri com ágar (sólido) contendo X-gal, IPTG e ampicilina ou canamicina conforme a resistência conferida pelo plasmídeo. As placas foram colocadas em estufa a 37°C e foram incubadas durante uma noite. As placas foram observadas e as placas brancas foram usadas para análise.

### **III.8.6 Análise das placas positivas**

As placas brancas foram colocadas para crescer em LC com ampicilina ou canamicina de acordo com a resistência do plasmídeo. Utilizou-se tubos de 50 ml com 2.5 ou 5.0 ml de LC e 1  $\mu$ l de antibiótico para 5.0 ml de LC. Os tubos foram colocados em shaker a 37°C e quando as culturas cresciam a densidade

desejada fez-se a extração de DNA como descrito anteriormente.

### III.8.7 Preparação de DNA de plasmídeo para subclonagem

Foram feitas culturas de 2 ml de bactérias transformadas por plasmídeo (as bactérias foram colocadas em LC com antibiótico e incubadas durante uma noite num shaker a 37°C). A suspensão de bactéria foi centrifugada em tubo eppendorf a 14000 rpm rapidamente (temperatura ambiente) e, o sedimento foi ressuspendido em 100 µl de tampão de lise e, deixado no gelo durante 10 minutos. Foram então adicionados 200 µl de NaOH a 0,2 N em SDS a 1%, e deixou-se no gelo durante 10 minutos.

Foram então adicionados 150 µl de NaAc a 3 M, utilizou-se vortex (gentilmente), e deixou-se no gelo durante 10 minutos. Em seguida o preparado foi centrifugado durante 10 minutos a 4°C a 14000 rpm.

Ao sobrenadante foi adicionado 1 ml de álcool 96% e o tubo foi colocado em nitrogênio líquido e, o preparado foi centrifugado durante 10 minutos a 14000 rpm a 4°C. O sedimento foi ressuspendido em 100 µl de NaAc a 0,3 M e permaneceu 5 minutos a temperatura ambiente. Foram então adicionados 100 µl de fenol/clorofórmio, utilizou-se o vortex, e centrifugou-se durante 2 minutos a 14000 rpm a 4°C e ao sobrenadante foram adicionados 200 µl de álcool a 96% e o tubo foi novamente colocado em nitrogênio líquido e, centrifugado a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Ao sedimento foram adicionados 500 µl de álcool a 70% (lavagem) e centrifugou-se rapidamente a 14000 rpm. O sedimento foi secado ou numa centrifuga a vácuo ou, numa estufa a 65°C, e o sedimento foi ressuspendido em 25 µl de TE. O DNA assim obtido foi utilizado para digestão com enzimas de restrição.

### III.9 Preparação de DNA de plasmídeo para sequenciamento

Foram preparadas culturas de bactérias com plasmídeo como descrito anteriormente. A cultura foi centrifugada 1 minuto a 14000 rpm e o sedimento foi ressuscitado em 200 µl de tampão STET e foram adicionados 4 µl de lisozima (50 mg/ml, fresco) e seguiu-se incubação durante 5 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram fervidas durante 1 minuto e em seguida centrifugadas a 4°C durante 10 minutos a 14000 rpm. O sedimento foi removido com um palito de dente e, foram adicionados 8 µl de CTAB (5% peso/volume em 0,5 M NaCl) e seguiu-se centrifugação a temperatura ambiente durante 5 minutos a 14000 rpm. O sedimento foi ressuscitado em 300 µl de NaCl a 1,2 M (o CTAB e substituído por NaCl), utilizou-se vortex. Foram adicionados 750 µl de etanol 96% (-20°C) e seguiu-se centrifugação a 4°C durante 10 minutos a 14000 rpm. O sedimento foi lavado com álcool a 70%, secado a vácuo, ressuscitado em 100 µl de TE e foram adicionados 100 µl de fenol/clorofórmio, utilizou-se o vortex e centrifugou-se durante 2 minutos a 14000 rpm a 4°C (esta operação foi repetida mais duas vezes) e, foi feita uma extração com 100 µl de clorofórmio e, ao sobrenadante foram adicionados 10 µl de NaAc a 3 M e 250 µl de álcool a 96%, o tubo foi colocado em nitrogênio líquido e o material foi centrifugado a 14000 rpm a 4°C durante 10 minutos, o sedimento foi lavado com álcool 70% e secado em uma centrífuga a vácuo ou em estufa a 65°C, ressuscitado em 20 µl de TE e utilizado para digestão deste com enzimas de restrição (Del Sal et al., 1988).

### III.10 Desnaturação de DNA de plasmídeo para sequenciamento

Ao DNA obtido acima foram adicionados 2 µl de NaOH a 2 M e seguiu-se incubação a 68°C (banho-maria) durante 20 minutos. Em seguida foram adicionados 8 µl de acetato de amônio 5 M, pH 5,4 e 100 µl de etanol. Isto foi incubado durante 5 minutos em gelo seco e seguiu-se centrifugação a 4°C, 14000 rpm durante 10 minutos.

O sedimento foi lavado com álcool 70% e secado a vácuo. O sedimento foi ressuscitado em 10 µl de água e utilizado para seqüenciamento. Quando não utilizado imediatamente foi armazenado a -20°C.

### III.11 Reação de seqüenase

Num tubo eppendorf foram colocados :

- 1 µl de "primer"
- 2 µl de tampão de reação
- 4 µl de DNA
- 3 µl de água destilada

Incubou-se durante 2 minutos a 65°C num becker de vidro e deixou-se esfriar até menos que 30°C. Em seguida foram adicionados :

- 1 µl de DTT
- 2 µl de mistura de ligação (diluído 5 x em H<sub>2</sub>O)
- 0,5 µl dATP (5 µCi)
- 2 µl seqüenase (1/8 diluída em tampão de diluição da enzima)

Incubou-se durante 5 minutos a temperatura ambiente. Enquanto isso foram preparados 4 tubos eppendorf da seguinte maneira :

- G 2,5 µl
- A 2,5 µl
- T 2,5 µl
- C 2,5 µl

Obs. Apenas uma base por tubo sendo G = ddGTP, A = ddATP, T = ddTTP, C = ddCTP.

Em cada eppendorf preparado como acima foram adicionados 3,5 µl da suspensão de DNA e, seguiu-se incubação a 37°C (banho-

maria) durante 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 4 µl do corante.

Antes de serem aplicadas no gel as amostras foram centrifugadas rapidamente e aquecidas a 90°C. (Tabor & Richardson, 1987).

### III.12 Preparação de gel para eletroforese de DNA

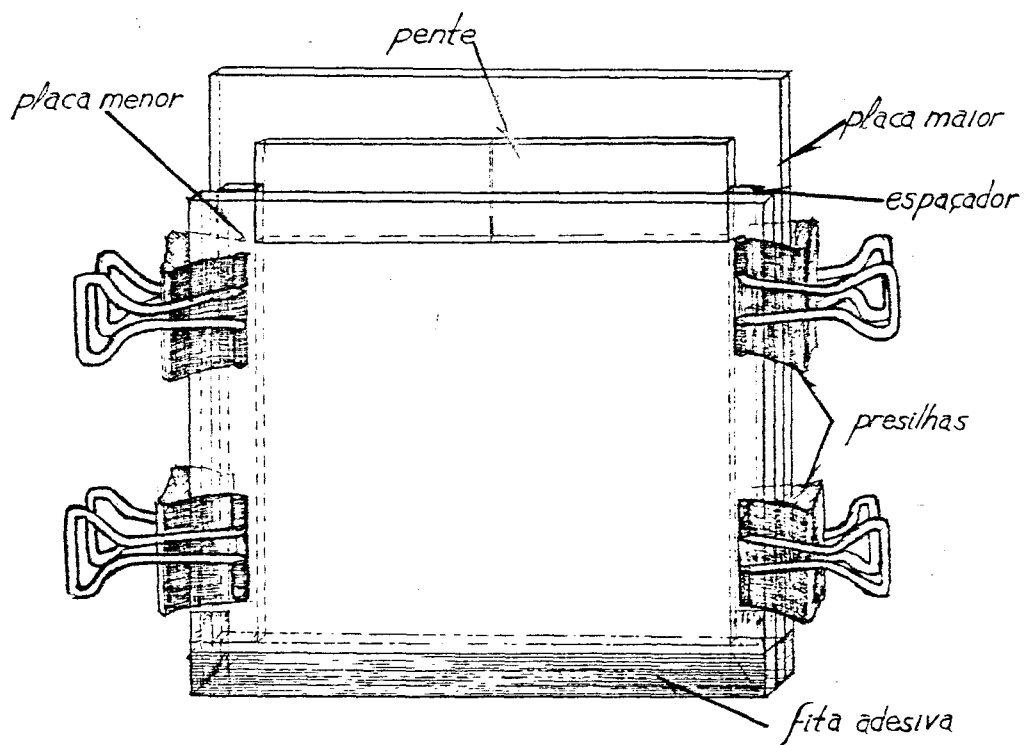
Foram utilizadas duas placas de vidro para montar o gel, uma grande (40 cm x 30 cm) e uma pequena (35 cm x 30 cm). A placa maior foi tratada com "repel coat" e lavada duas vezes com álcool. A menor foi tratada com a seguinte mistura :

5 ml de álcool  
165 µl 10% ácido acético  
15 µl "bind"

Isto foi misturado, despejado na placa e disperso de forma homogênea. Após 2 minutos a placa foi lavada 4 x com álcool.

O gel de acrilamida foi preparado como descrito acima e despejado entre as duas placas, que foram colocadas uma sobre a outra com dois espaçadores, um em cada lateral e vedadas lateral e terminalmente com fita adesiva, conforme ilustra o esquema abaixo (figura III.4). As placas foram mantidas unidas através do uso de presilhas.





*figura 111.4*

*Esquema da placa de eletroforese em acrilamida para sequenciamento de DNA.*

Quando o gel já estava polimerizado foram retiradas as fitas adesivas, presilhas e pente. O espaço onde estavam os pentes foi bem lavado com o tampão de corrida com o uso de uma seringa. O gel foi colocado na cuba de eletroforese e o pente foi colocado. Fez-se uma pré-corrida de 30 minutos a 80 W, 2000 V e 40 mA.

As amostras foram aplicadas no gel após a pré-corrida e a corrida foi feita nas mesmas condições. Após o término da corrida o gel foi colocado para secar em estufa a 90°C e quando resfriado foi submetido a autoradiografia. A placa maior foi retirada e o gel ficou colado a placa menor e, desta forma foi colocado para secar (Biggin et al., 1983, Carninci et al., 1989).

## IV. Resultados

### IV.1. Seleção de placas lisadas por fagos $\lambda$

Após a hibridização das placas com as sondas 3 e 4 (descritas no item III.), foram selecionadas as placas positivas por sobreposição do filme de autoradiografia nas placas com bactérias e, a região positiva foi retirada do gel de ágar, os fagos  $\lambda$  foram ressuspensos em tampão SM e armazenados a 4°C com uma gota de cloroformio. Cada placa recebeu um número sendo que o primeiro dígito se referiu a sonda (3 ou 4), o segundo ao número da placa (foram feitas três placas por ensaio) e o terceiro ao número que foi dado a uma determinada placa. Como houve uma troca em relação às sondas, na verdade as placas começadas pelo dígito 3 hibridizaram com a sonda 4 e vice-versa. As placas positivas foram as seguintes:

(3.1.1), (3.1.2), (3.1.3), (3.1.4), (3.2.1), (3.2.2), (3.3.1), (3.3.2), (3.3.3), (4.1.1), (4.1.2.3.4), (4.1.5), (4.1.6), (4.1.7), (4.2.1), (4.2.2), (4.2.3), (4.2.4), (4.3.1) e (4.3.2).

A seleção das placas foi feita semeando-se novamente bactérias com os fagos  $\lambda$  obtidos acima e após hibridização com as sondas 3 e 4. Dos locais positivos foram escolhidas placas individuais que foram usadas para infectar bactérias em gel de agarose. A hibridização com as sondas 3 e 4 foi repetida e os fagos foram armazenados como acima.

### IV.2. Digestão dos fagos $\lambda$ com enzimas de restrição

Os fagos  $\lambda$  de número 3.1.1, 3.2.1, 4.2.4, 4.1.6, 4.1.5, 4.1.1 e 4.1.2.3.4 foram tratados com Hind III como descrito em material e métodos. Foram utilizados 10  $\mu$ l de DNA, 1  $\mu$ l de tampão B e 1  $\mu$ l de Hind III e seguiu-se incubação a 37°C (banho-maria)

durante 30 minutos. Após este tempo foram adicionados 1 µl do corante (azul de bromofenol) a cada amostra e as mesmas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (descrito em MM). Todas as amostras apresentaram um ou mais sítios de restrição de Hind III.

As amostras acima citadas foram enviadas a Cambridge (DNA e fagos λ) juntamente com a foto da eletroforese, para que ficasse registrado o material obtido e para que fosse determinada a localização cromossômica do DNA obtido, que é mostrada na figura IV.1. Nos decidimos trabalhar com as amostras 3.2.1 e 4.1.2.3.4.

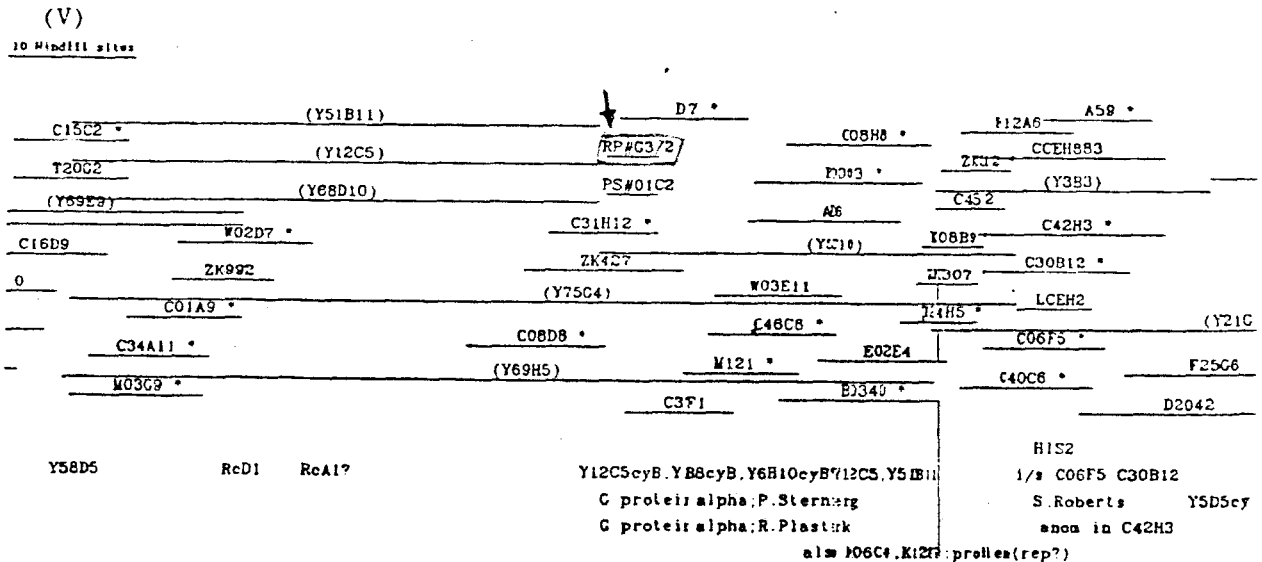


figura IV.1

Localização cromossômica do clone λ3 (RP#G3/2).

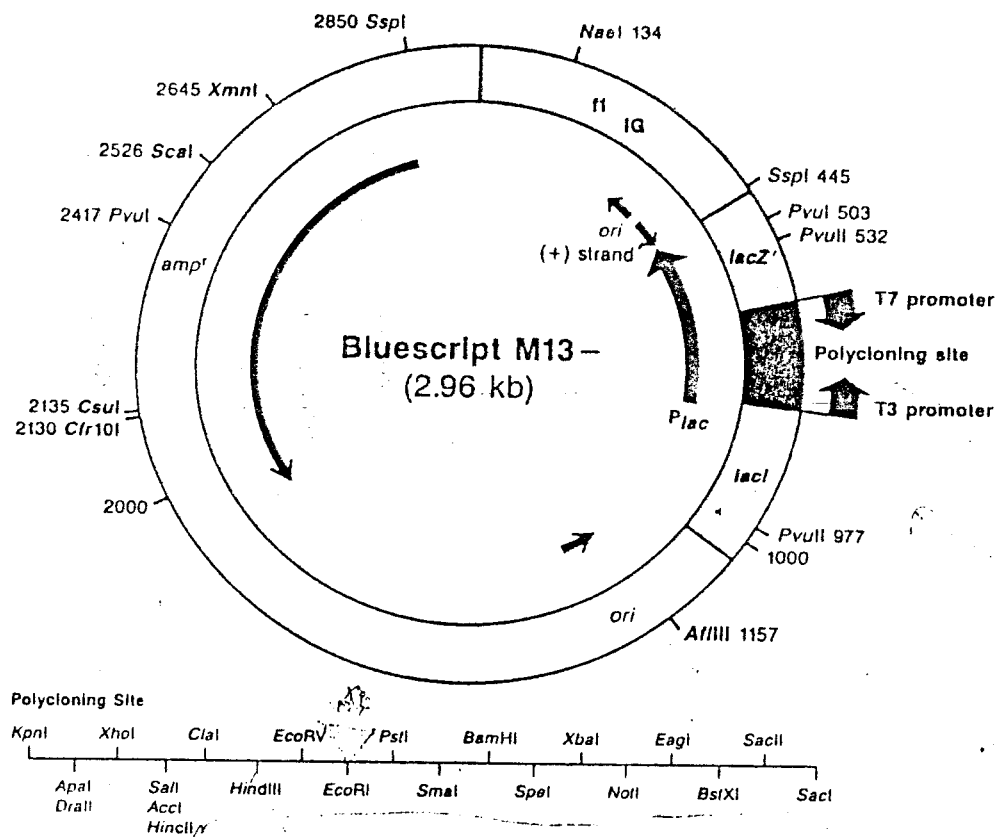
#### IV.3. Tratamento dos fagos $\lambda$ com enzimas de restrição

Os fagos  $\lambda$  (DNA) 4.1.2.3.4 e 3.2.1 foram tratados com as enzimas de restrição Hind III, Sac I e Sau IIIA. Também foi utilizado o plasmídeo bluescript neste experimento, para posterior transformação de bactérias. Este gel foi utilizado para "Southern blot" com as sondas 3 e 4 e ocorreu hibridização com as amostras 3.2.1 e 4.1.2.3.4.

#### IV.4. Transformação de bactérias JM 101

Os fragmentos das amostras 3.2.1 e 4.1.2.3.4 ( $\lambda$ 3 e  $\lambda$  4, respectivamente) foram inseridos em bluescript após o tratamento com as enzimas de restrição citadas acima. O bluescript apresenta um sistema de operon onde IPTG se assemelha a lactose, ligando-se ao repressor e ativando a síntese de beta-galactosidase. X-gal é transformado pela beta-galactosidase num produto azul. Quando se insere DNA na região do polilinker deste sistema não há mais síntese de beta-galactosidase e por sua vez não se forma mais o produto azul e as placas ficam brancas.

A figura IV.2 mostra o plasmídeo bluescript com seus sítios de restrição.



*figura IV.2*

*Plasmidio bluescript e seus sitios de restrição.*

Foram selecionadas placas brancas de fragmentos inseridos em bluescript dos digestos de Hind III.

Os fragmentos de Hind III foram os seguintes : H.3.1, H.3.2, H.3.3, H.3.4, H.3.5, H.3.6, H.3.7, H.3.8, H.3.9, H.3.10 e H.3.11. Apenas foi utilizado o fragmento H.3.9 por conter a região da sonda. E dos fragmentos H.4.1 a H.4.11 foi utilizado o H.4.2 também por conter a região da sonda.

#### IV.5. Estudos com o fragmento H.4.2

Os fragmentos de H.4.2 hibridizaram com a sonda 4.

O fragmento H.4.2 foi tratado com as seguintes enzimas de restrição : Kpn I, Xho I, Sma I, Cla I, Eco RV, Pst I, Sma I, Xba I e Spe I. Não é possível fazer a seqüência de um fragmento tão grande quanto H.4.2 (4540 pb), estas enzimas foram utilizadas para se obter fragmentos menores que foram então sub-clonados em pk 19 (resistente à canamicina) e utilizados para o seqüenciamento.

Os fragmentos H.3.9 e H.4.2 tratados com Bam HI, Eco RI, Sac I e Hind III hibridizaram com o probe 3.

O fragmento H.4.2 também foi tratado com as seguintes enzimas:

Eco RI, Eco RV e Pvu

Stu Eco RI

Bgl II

Também para se obter fragmentos possíveis de serem sub-clonados para posterior seqüenciamento.

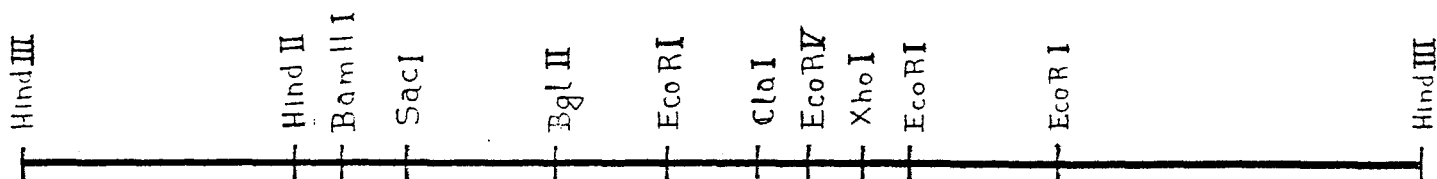
Foram feitas eletroforeses do fragmento H.4.2 tratado com diversas enzimas de restrição como segue :

Tratamento 1	Tratamento 2	Tratamento 3	Tratamento 4
Egl II Pst I	Pvu II	Xho I Egl II	Kpn I Hind II
Eco RI	Pvu II Pst I	Xho I	Kpn I Sac I
Eco RV	Eco RI	Xho I Eco RI	Kpn I Egl II
Cla I Pst I	Stu I	Xho I Hind II	kpn I Nde I
Xho I Pst I	Stu I Pst I	Xho I Dra I	Kpn I Eco RV
Kpn I Sac I	Egl II	Xho I Nde I	Kpn I Cla I
Kpn I Bam HI	Egl II Pst I	Xho I Hpa I	Kpn I Eco RI
		Xho I Sca I	Kpn I Xho I
		Pst I Hind II	Xho I Pst I
		Pst I Dra I	Cla I Pst I
		Pst I Hpa I	Eco RV

Os tratamentos acima foram feitos com o intuito de se obter fragmentos para seqüenciamento.

Os fragmentos necessários para o seqüenciamento do fragmento H.4.2 foram sub-clonados em pk 18 e foi determinada a seqüência de nucleotídeos do DNA e dos amino ácidos correspondentes. Não foi encontrada identidade entre esta seqüência de amino ácidos e a de proteínas conhecidas, assim este clone não foi mais utilizado para estudos.

A figura IV.3 mostra o fragmento H.4.2 e a localização de seus sitios de restrição.



*figura IV.3*

*fragmento H.4.2 com seus sitios de restrição.*

#### IV.6. Estudos com o fragmento H.3.9

O fragmento H.3.9 também foi tratado por várias enzimas de restrição a fim de se obter os fragmentos necessários para o seqüenciamento e foram utilizados os seguintes fragmentos para este estudo:  $\Delta$ Cla I,  $\Delta$ Pst I,  $\Delta$ Xba I (estas foram deleções feitas), Bgl II Bam HI, Hind II Hind III, Xba I Hind III. Além disso foram utilizados dois fragmentos Eco RI clonados em pk 18 para o seqüenciamento com o auxílio de oligonucleotídeos. A figura IV.4 mostra os fragmentos que foram utilizados neste seqüenciamento.



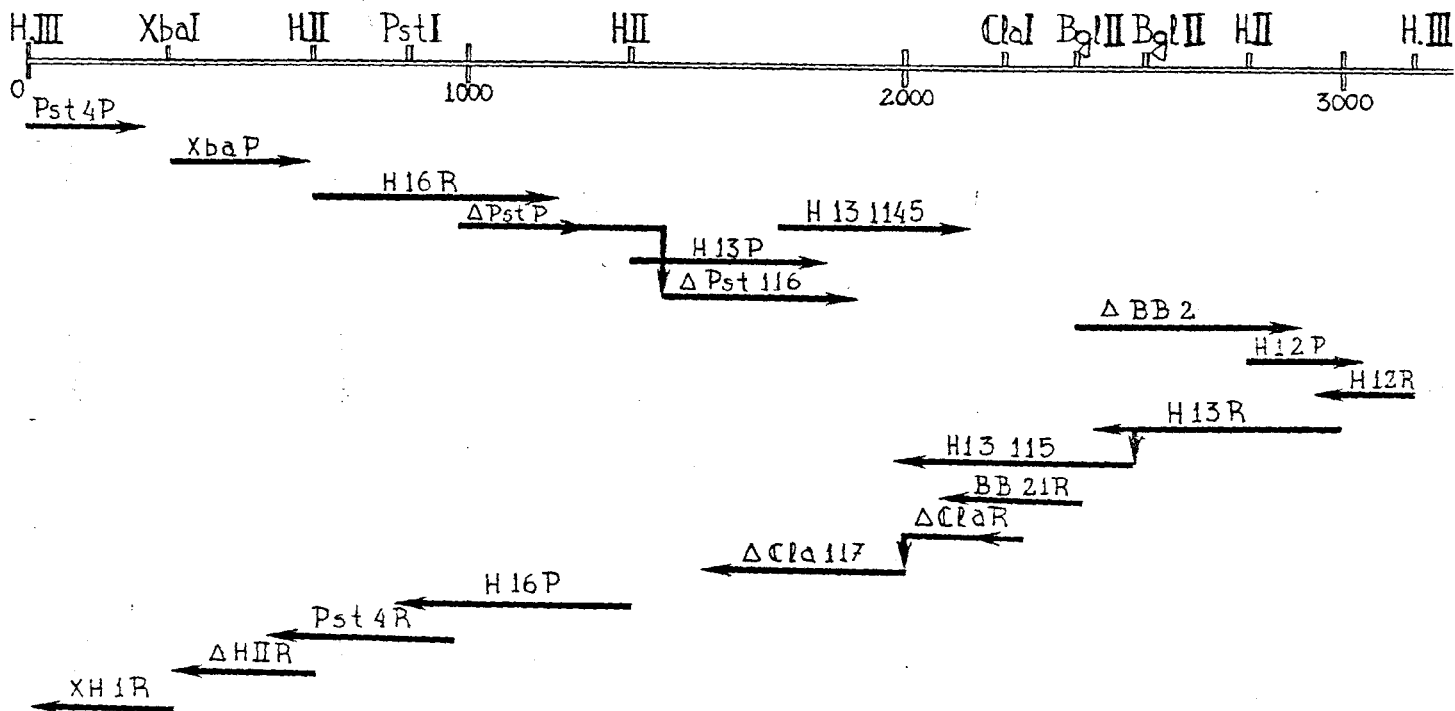


figura IV.4

fragmento H.3.9 com seus sítios de restrição e direção de leitura.

Foram feitas diversas eletroforeses, e fragmentos foram selecionados para o seqüenciamento.

Tratamento 1 :

ΔBgl II  
ΔCla I  
ΔXho I  
ΔBam HI  
ΔEco RI  
ΔEco RV  
ΔSma I  
ΔXba I  
ΔSpe I  
ΔKpn I  
ΔSal

As deleções Bgl II, Cla I e Xba I foram escolhidas para o seqüenciamento.

Tratamento 2 :

ΔPst I  
ΔStu I  
ΔNru I  
ΔSac I  
ΔSma I Stu I  
ΔSma I Nru I  
ΔHind II

As deleções Pst I e Hind II foram escolhidas para o seqüenciamento.

Nossas observações mostram que há apenas um sitio de restrição no fragmento H.3.9 para as seguintes enzimas : Xho I, Bam HI, Eco RV, Sma I, Spe I, Sal I, Sac I, Stu I, Nru I, Kpn I e Eco RI.

Mas as enzimas Cla I (fragmento de 900 bp), Pst I (fragmento de 900 bp), Hind II (fragmentos de 1400, 700 e 300 bp) e Xba I

(fragmento de 400 bp) têm pelo menos dois sítios de restrição.

Tratamento 3 :

Cla I

Cla I Bam HI

Pst I

Pst I Bam HI

Hind II

Hind II Bam HI

Cla I Pst I

Cla I Hind II

Pst I Hind II

O fragmento Cla I Pst I foi escolhido para o seqüenciamento.

Tratamento 4 :

H.3.9 Hind II

H.3.9 Pst I

H.3.9 Hind III Bgl II

H.3.9 Xba I

pk 18 Pst I Hind III

pk 18 Cla I Hind III

pk 18 Hind II Hind III

H.3.9 Pst I Hind III

H.3.9 Hind II Hind III

H.3.9 Cla I Hind III

Os fragmentos Pst I Hind III, Cla I Hind III e Hind II Hind III foram escolhidos para o seqüenciamento.

Os fragmentos H7 até H16, que são fragmentos derivados de H.3.9 e subclonados em pk 18, foram clonados em pk 18 e tratados com Eco RI e Hind III para que fossem selecionados fragmentos para o seqüenciamento, como segue :

H7 Eco RI Hind III  
H8 Eco RI Hind III  
H9 Eco RI Hind III  
H10 Eco RI Hind III  
H11 Eco RI Hind III  
H12 Eco RI Hind III  
H13 Eco RI Hind III  
H14 Eco RI Hind III  
H15 Eco RI Hind III  
H16 Eco RI Hind III  
H.3.9 Hind II

No caso de BB1 a BB10, que também são fragmentos derivados de H.3.9 e subclonados em pk 18, os fragmentos H.3.9 foram cortados com as enzimas Bam HI e Hind III, mas o plasmidio pk18 foi cortado com Bgl II Hind III. Neste caso Bgl II é usada porque pk18 não tem sítio de restrição para Bam HI. Como as duas enzimas têm identidade parcial, torna-se possível se utilizar deste recurso.

Bam HI : GGATCC  
Bgl II : AGATCT

Os fragmentos de Hind II, BB5 e BB6 foram clonados em pk18.  
Os fragmentos H7, H9, H12 e H16 foram selecionados neste caso.

Estes fragmentos foram tratados como segue na seguinte página.

H1 Eco RI Hind III  
H10 Eco RI Hind III  
H.3.9 Hind II  
H3 Eco RI Hind III  
H6 Eco RI Hind III  
pk 18 Eco RI Hind III  
BB5 Eco RI Hind III  
BB6 Eco RI Hind III  
H.3.9 Bgl II Hind III

Foi feita uma eletroforese dos fragmentos BB21 e BB22 tratados com as enzimas de restrição Cla I Pst I.

O fragmento BB21 foi selecionado para o seqüenciamento.

Tratamento :

BB21 Cla I Pst I  
H.3.9 Cla I Pst I  
BB22 Cla I Pst I  
pk 18 Cla I Hind III  
H.3.9 Cla I Hind III

#### IV.7. Estudos com os fragmentos E15 e E17

As seqüências dos oligonucleotídeos que foram usados para determinar a seqüência dos fragmentos Eco RI clonados em pk 18, são as seguintes :

AB1145 GTACATTCTAAATATG  
AB1146 ACTTATGTTTTTCAGC  
AB1118 TTA CTCTAAAGTTAATT  
AB1116 GATATTCTATCGCTG  
AB1117 TCTCCTGAAATTTAG  
AB1115 GTTGAAAAGGGATGA

Foram feitas eletroforeses dos fragmentos obtidos de  $\lambda$ 3 tratados com Eco RI clonados em pk 18, os fragmentos E15 e E17 foram utilizados para estudos posteriores.

Tratamento 1

E10 Eco RI  
E11 Eco RI  
E12 Eco RI  
 $\lambda$ #3 Eco RI  
E13 Eco RI  
E14 Eco RI  
E15 Eco RI

Tratamento 2

E16 Eco RI  
E17 Eco RI  
E18 Eco RI  
 $\lambda$ #3 Eco RI  
E19 Eco RI  
E20 Eco RI  
E21 Eco RI

Tratamento 3

E15 Hind III  
E17 Hind III  
H.3.9 Hind III  
E18 Hind III  
E19 Hind III  
E15 Cla I Pst I  
H.3.9 Cla I Pst I  
E17 Cla I Pst I

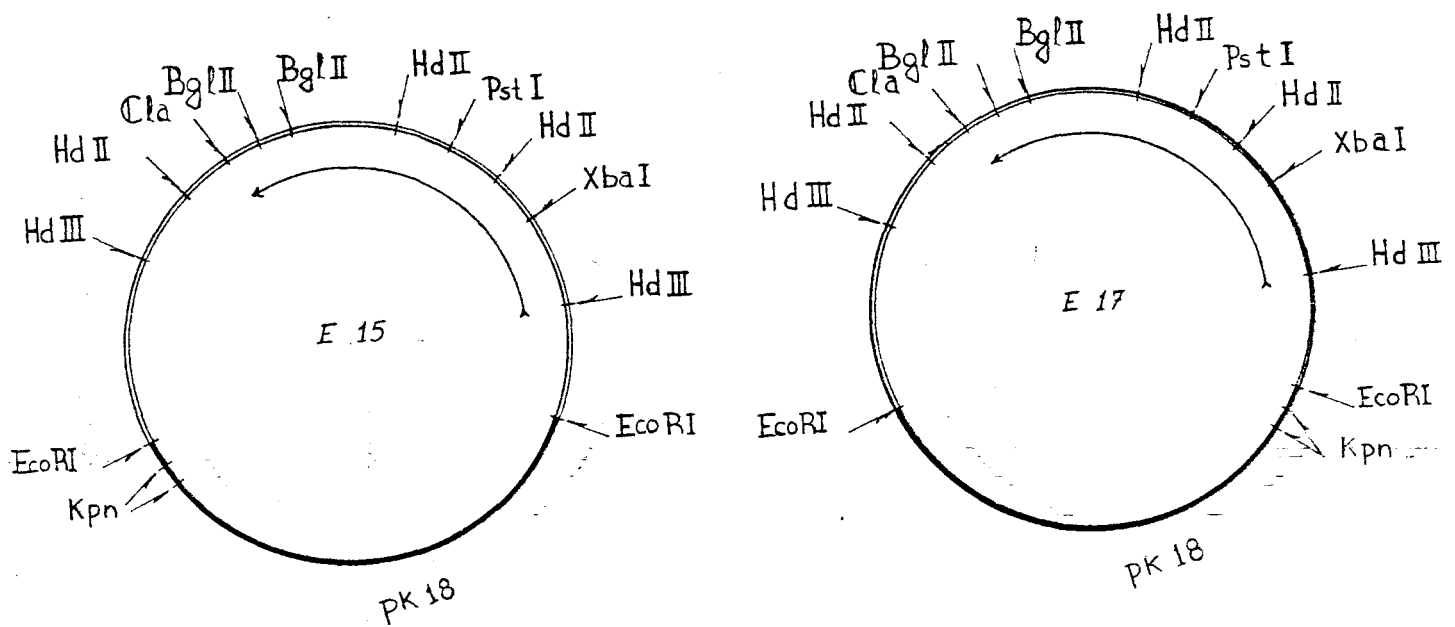
Tratamento 4

E15 Hind III  
E17 Hind III  
E15 Hind III Eco RI  
E17 Hind III Eco RI  
E15 Kpn I Bgl II  
E17 Kpn I Bgl II  
E15 Kpn I Cla I

Tratamento 5

E15 Hind II  
H.3.9 Hind II  
E17 Hind II  
E15 Bgl II Eco RI  
E15 Bgl II Kpn I  
E17 Bgl II Eco RI  
E17 Bgl II Kpn I

Todos os testes feitos acima citados foram realizados a fim de se determinar a localização dos sítios de restrição dos fragmentos, o que mostra a figura IV.5.



*figura IV.5*

*Localização dos sítios de restrição dos fragmentos E15 e E17.*

Foi feita uma comparação da localização dos introns do nosso fragmento com o gene G $\alpha$  de *Drosophila*.

Os introns 1 e 3 localizam-se no mesmo lugar. Veja figura IV.6.

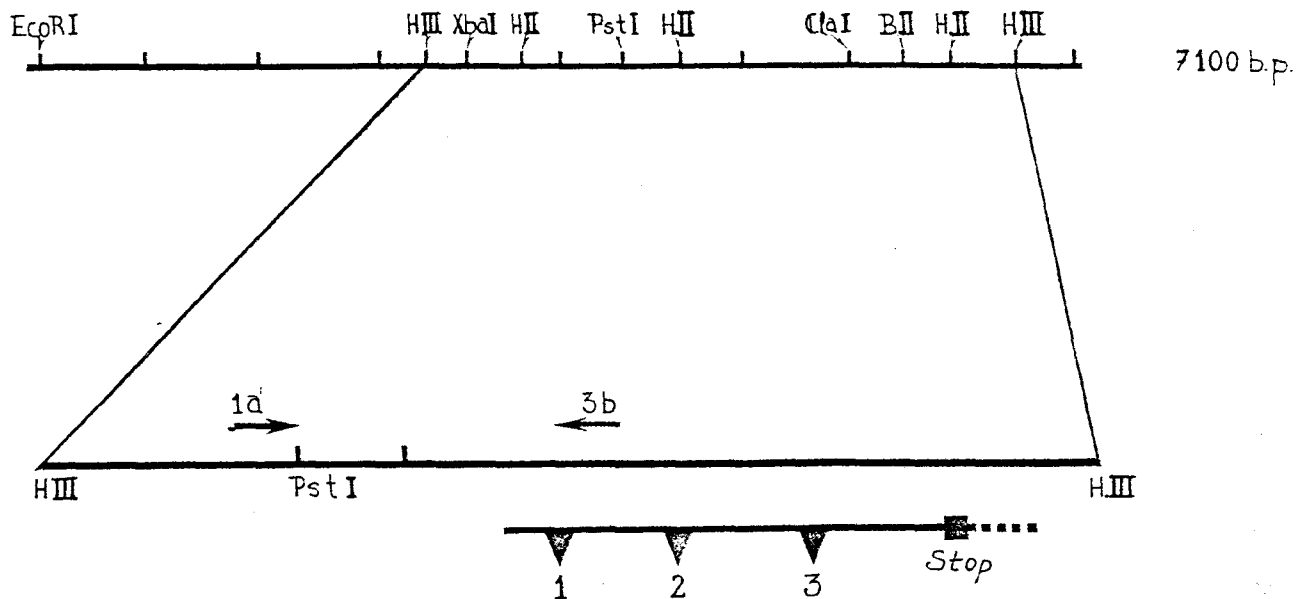


figura IV.6

Comparação da localização dos introns do gene *Gα* de *Caenorhabditis elegans* e de *Drosophila*.

Seqüenciamento do DNA do gene *Gα* de *Caenorhabditis elegans*

No apêndice 1 é mostrada a seqüência de nucleotídeos e a seqüência correspondente de amino ácidos de H.3.9.

O gene é apresentado com a estrutura intron/exon predita. Os limites dos introns derivam de uma comparação do Open Reading Frame resultante na região codificadora daqueles outros genes *Gα* (veja apêndice 2) e de uma busca de identidade (homologia) com a seqüência consenso para os sítios de ligação de *Caenorhabditis elegans* (Wood, 1988). As 6 bases mais externas de todos os introns estão sublinhadas. A seqüência TTTCAG é quase perfeitamente conservada ao sítio de ligação acceptor de todos os introns. A indicação de um sítio de ligação acceptor em potencial à esquerda da iniciação ATG (coordenada 129) não está naturalmente baseada na comparação com as seqüências de outras subunidades  $\alpha$  da proteína G; a razão para esta indicação é que ela combina (tem identidade/homologia) 100% com o consenso e que sua proximidade ao triplet de iniciação a torna uma possível candidata para a trans-ligação. Os sítios onde os oligonucleotídeos foram pareados no PCR estão em negrito e sublinhado.



Quando estes são comparados à sequência atual a qual eles correspondem no gene *gpa-2* encontra-se o seguinte : o probe 3b corresponde ao complemento da sequência de DNA atual GGATTCATTGTTTTGAAGATG (bp 2026-2047) na qual todos os resíduos que pareciam estão imprimidos em negrito. A tradução desta sequência em aminoácidos é KWIHCFED. Esta é a sequência à qual nós nos referimos e está sem dúvida conservada neste gene de *Caenorhabditis elegans*.

O primer 1a parece ser direcionado a uma sequência que não é conservada no grau que deveria ser reconhecida; a sequência de aminoácidos na região que nós referimos em *gpa-2* é YHPNATDT, assim que apenas 3 dos 9 aminoácidos têm identidade. Nós rastreamos a sequência de *gpa-2* para uma sequência que combina com a sequência do primer 1a, e encontramos que o melhor se encaixa é bp 1588-1610 : ACATAAAACTTCCAACAAGACG, onde novamente as combinações estão em negrito (e há uma falha de 2 bp no primer quando alinhado com a sequência correspondente em *gpa-2*). Note que o primer 1a era altamente degenerado de modo que uma razoável identidade seria provavelmente encontrada em muitas sequências. O tamanho do produto do PCR corresponde à distância presumida deste segundo sítio inicia ao sítio onde o primer 3b hibridiza (aproximadamente 400 bp). A conclusão é que a iniciação correta do primer 3b dá especificidade suficiente para a amplificação do produto desejado. As condições para o PCR foram as recomendadas pelos fornecedores da Taq polimerase (Cetus), com 40 ciclos, 30" de anelamento a 40°C e 1' de tempo de alongação). Como molde de DNA nós usamos DNA genômico de *Caenorhabditis elegans* purificado como descrito em Wood (1988). Um fragmento de DNA resultante de 400 bp foi isolado de um gel de agarose "Low Melting", e foi radioativamente marcado usando o método de iniciação randomizada (Boehringer) e utilizado para rastrear um banco genômico de DNA de *Caenorhabditis elegans* em A 2001 (uma doação de Dr. J. Sulston, da Universidade da Califórnia).

#### IV.B Comparação da cadeia polipeptídica do gene G $\alpha$

A cadeia polipeptídica do gene G $\alpha$  de *Caenorhabditis elegans* foi comparada com a de outras proteínas G $\alpha$  conhecidas. O apêndice 2 mostra o resultado desta comparação.

O alinhamento foi feito pelo programa CLUSTAL de Devereux et al. (1984). A seqüência de rato foi de Itoh et al. (1988) e a seqüência de *Drosophila* de Provost et al. (1988). A identidade é mostrada por sombreamento. Algumas das regiões mais conservadas coincidem com regiões cujas funções foram assinaladas; elas estão indicadas por letras maiúsculas (que correspondem àquelas de Lochrie e Simon (1988) : A é o domínio de ligação com o fosfato, C tem um papel na atividade GTPásica, G é a região de ligação nucleotídica, e I também está provavelmente envolvido na ligação com o nucleotídeo). O resíduo de cisteína que é o sítio da ADP-ribosilação catalizado pela toxina de pertussis na proteína do rato é indicado com um asterístico.

## V. Discussão

Experimentos prévios mostraram que a similaridade da subunidade  $\beta$  da proteína G entre diferentes organismos foi suficientemente alta para permitir a identificação de um clone contendo o gene  $G\beta$  do nematoda por hibridização de baixa estringência com um probe de cDNA de mamífero (van der Voorn et al., 1990); tentativas de se fazer o mesmo com probes de cDNA de  $G\alpha$  falharam, o que provavelmente reflete a alta divergência entre estes genes. Entretanto alguns domínios do gene  $G\alpha$  são fortemente conservados e.g. entre mamíferos e *Drosophila* (Provost et al., 1988) e nós selecionamos misturas de oligonucleotídeos correspondentes a estes domínios que podem servir como primers em amplificação por PCR (veja legenda para apêndice 1). Estes oligonucleotídeos foram todos testados num PCR com DNA genômico de *Caenorhabditis elegans*.

A seqüência do gene é mostrada no apêndice 1. Os limites intron/exon seguem-se de sítios de ligação doador e receptor do nematoda (Wood, 1988) e resultam da comparação da seqüência codificada predita de genes  $G\alpha$  de outros organismos (Lochrie e Simon, 1988). Isto não prova que nós identificamos todos os sítios de ligação corretamente, entretanto o alto grau de conservação em vários domínios das regiões limites codificadas tornam a possibilidade para sítios alternativos tão altamente improvável assim como que o "reading frame" identificado seja incorreto. Note que à posição -4 relativa ao sítio de iniciação ATG uma seqüência acceptora perfeita é encontrada (tttcag/aa): isto pode indicar que há um outro exon à esquerda, ou que outro exon é adicionado por trans-ligação (Krause e Hirsch, 1987). Isto será investigado futuramente, e.g. pelo seqüenciamento do cDNA. Os introns que correm de 251 a 1270, de 1937 a 1995 e 2541 a 2617 estão exatamente na mesma posição correspondente aos introns do gene DG $\alpha$ 1 de *Drosophila* (Provost et al., 1988): isto significa que todos menos um dos introns no gene de *Drosophila* são conservados neste gene de *Caenorhabditis elegans*. A localização dos introns de 251 a 1270 e de 1937 a 1995 também é conservada

nos genes das subunidades G $\alpha$ , G $\beta$  e G $\gamma$  de proteína G de mamíferos (Kaziro et al., 1988). Pode-se notar que genes parecidos com gpa-2 e gpb-1 (van der Voorn et al., 1990) têm um intron de mais de 1000 pares de base que neste caso também é o primeiro intron na região codificadora; uma situação similar provavelmente existe para gpa-3 (M. Lochrie, comunicação pessoal). Desde que a maioria dos introns de *Caenorhabditis elegans* são pequenos, este primeiro intron longo pode ter um papel na regulação da expressão do gene destas subunidades de proteína G.

Recentemente outros laboratórios nos EUA e Europa também iniciaram a clonagem e seqüenciamento de genes que codificam subunidades da proteína G de *Caenorhabditis elegans*, em acordo com estes laboratórios foi proposto que o gene da subunidade  $\beta$  da proteína G descrito recentemente por van der Voorn et al. (1990) será chamado gpb-1, e o gene aqui descrito gpa-2.

O apêndice 2 compara a seqüência do produto predito do gene gpa-2 com G $\alpha$ 12 de rato (Itoh et al., 1986 e 1988) e com o predito para DG $\alpha$ 1 de *Drosophila* (Provost et al., 1988). Alguns dos domínios das proteínas cujas funções foram previamente assinaladas (Lochrie e Simon, 1988) estão indicados: estes domínios são conservados em gpa-2. Geralmente resíduos que são conservados entre todas as outras subunidades  $\alpha$  de proteínas G (preditas) são também conservados em gpa-2, mas alguns resíduos diferem entre gpa-2 e o consenso de todas as outras subunidades  $\alpha$  das proteínas G. Eles estão sublinhados na figura 2; como pode ser visto eles parecem ser agrupados na área 135-152 (que é em geral uma área pouco conservada). O resíduo de cisteína (352) que é o sítio de ADP-ribosilação pela toxina de pertussis em muitas proteínas G não está presente em gpa-2. A comparação da seqüência de vários genes G- $\alpha$  de mamíferos levou a uma classificação (i, o, z etc.) baseada na similaridade destas seqüências; a seqüência de gpa-2 de *Caenorhabditis elegans* difere demais das seqüências de mamíferos para que seja claramente incluída a uma destas classes.

Como mencionado acima, o objetivo destes experimentos é o de isolar e caracterizar mutantes que sejam deficientes em um gene

de subunidade de proteína G. Desde que os genes podem ser essenciais o objetivo imediato é o de isolar animais heterozigotos para uma certa mutação, e então analisar o fenótipo dos 25 % de mutantes homozigotos nos descendentes. Agora que a seqüência de um gene Gx genômico do nematoda é conhecida há vários modos para se isolar os mutantes correspondentes : 1. Saturação mutagênica da região do cromossomo V onde o gene foi mapeado. Uma desvantagem deste método é que tem que se fazer uma "adoção" sobre o fenótipo do mutante (e.g. que ele é um letal embrionário), 2. Inativação do gene por recombinação homóloga (que pode ser feita injetando-se DNA do referido gene mutado no ovário dos vermes hermafroditas) e 3. Detecção por PCR de um transposon inserido (recentemente demonstrado por mutagenese dirigida em *Drosophila* (Ballinger e Benzer, 1989); no caso de *Caenorhabditis elegans* pode-se usar Tc1 para este propósito).

## Resumo

Um gene que codifica a subunidade  $\alpha$  de uma proteína regulatória guanina nucleotideo (proteína G) foi isolado de um banco genômico de DNA de *Caenorhabditis elegans*. A região predita codificada é colinear a genes relacionados de mamíferos e a seqüência de 356 amino ácidos mostra 63 % de identidade a e.g. G $\alpha$ 2 de rato. Três dos oito introns dentro da seqüência codificada estão exatamente na mesma posição daqueles num gene da subunidade  $\alpha$  de uma proteína G de *Drosophila*, e dois destes também estão conservados nos homólogos de mamíferos. O gene do nematoda não codifica o resíduo de cisteína que forma o sítio que é substrato para a toxina de pertussis catalizada por ADP-ribosilação em várias proteínas G.

A despeito da similaridade com o gene da subunidade de proteína G- $\alpha$  de mamíferos o gene não pode ser claramente categorizado como pertencendo as classes das proteínas G reconhecidas em mamíferos (G $\alpha$ i, o, z, etc). O gene foi mapeado no cromossomo V. A clonagem e seqüenciamento deste gene pode ser o ponto de partida de experimentos genéticos reversos com o objetivo do isolamento de animais mutados numa subunidade  $\alpha$  do gene de proteína G.

## Bibliografia

1. Ballinger, D.G., e Benzer, S. (1989)  
Target gene mutations in *Drosophila*.  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86, 9402-9406.
2. Biggin, M. D.; Gibson, T. J. & Hong, F.  
Buffer gradient gels and 35S label as an aid to rapid DNA  
sequence determination.  
Proc Natl Acad Sci USA, 80 : 3963-3965, 1983.
3. Brenner, S. (1974)  
The genetics of *Caenorhabditis elegans*.  
Genetics, 77, 71-94.
4. Carninci, P.; Gustinich, S.; Bottega, S.; Patrosso, C.; Del  
Sal, G.; Manfioletti, G. & Schneider, C.  
A simple discontinuos buffer system for increased resolution  
and speed in gel eletrophoretic analysis of DNA sequence.  
Nucleic Acids Research, 18 : 204, 1989.
5. Del Sal, G.; Manfioletti, G. & Schneider, C.  
A one tube plasmid DNA mini-preparation suitable for  
sequencing.  
Nucleic Acids Research, 16, 1988.
6. Devereux, J., Haerberli, P., Smithies, O. (1984)  
A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX.  
Nucl.Acids Res. 12, 387-395.
7. Fong, H. K. W.; Yashimoto, K. K.; Eversole-Cire, P. & Simon.  
M. I.  
Identification of a GTP-binding protein  $\alpha$  subunit that lacks  
an apparent ADP-ribosylation site for pertussi toxin.  
Proc Natl Acad Sci USA, 85 : 3066-3070, 1988.

8. Gilman, A.G. (1987)  
G proteins : Transducers of receptor-generated signals  
Annu.Rev.Biochem. 56, 615-649.
9. Itoh, H., Toyama, R., Kozasa, T., Tsukamoto, T., Matsuoka, M., Kaziro, Y. (1988)  
Presence of three distinct molecular species of Gi protein  $\alpha$  subunit. Structure of rat cDNA and human genomic DNAs.  
J.Biol.Chem. 263, 6656-6664.
10. Itoh, H., Toyama, R., Kozasa, T., Tsukamoto, T., Matsuoka, M., Kaziro, Y. (1988)  
Molecular cloning and sequence determination of cDNAs for  $\alpha$  subunits of the guanine nucleotide-binding proteins Gs, Gi, and Go from rat brain.  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83, 3774-3780.
11. Jurnak, F. (1985)  
Structure of the domain of Ef-Tu and location of the amino acids homologous to ras oncogene proteins  
Science, 230 : 32-36.
12. Kaziro, Y., Itoh, T., Toyama, R., Tsukamoto, T., Matsuoka, M., Nakafuku, M., Obara, T., Takagi, T., Hernandez, R. (1988)  
Structure of the genes coding for G-protein  $\alpha$  subunits from mammalian and yeast cells.  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 53, 209-220.
13. Krause, M., Hirsh, D. (1987)  
A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *Caenorhabditis elegans*.  
Cell 49, 753-761.



14. Lochrie, M. A. & Simon, M. I.  
G protein multiplicity in eucaryotic signal transduction systems.  
Biochemistry, 27 : 4957-4965, 1988.
15. Maniatis, T.; Fritsch, E. F. & Sambrook, J. Molecular Cloning  
- A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.  
New York.
16. Neer, E. J. & Clapham, D. E.  
Roles of G protein subunits in transmembrane signalling.  
Nature, 333 : 129-134, 1988.
17. Provost, N.M., Somers, D.E., Hurley, J.E. (1988)  
A *Drosophila melanogaster* G protein  $\alpha$  subunit gene is  
expressed primarily in embryos and pupae.  
J.Biol.Chem. 263, 12070-12076.
18. Tabor, S. & Richardson, C. C.  
DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA  
polymerase.  
Proc Natl Acad Sci USA, 84 : 4767-4771, 1987.
19. van der Voorn, L., Gebbink, M., Plasterk, R.H.A., Ploegh,  
H.L. (1990)  
Characterization of a G-protein  $\beta$ -subunit gene from the  
*Nematode Caenorhabditis elegans*.  
J.Mol.Biol. 213, 17-26.
20. Wood, W. B. Introduction to *C. elegans* Biology in : The  
*Nematode Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor  
Laboratory, 1-15, 1988.

Apêndice 1

Seqüência de nucleotídeos e seqüência dos amino ácidos correspondentes do gene Gx de *Caenorhabditis elegans*.

1 CCGCTTTTCTTCCCTCCCTGCTCCTCCACATCATTTTCATTTTCAGTGAATTTTTACTAATTCTCGTTATCGCGAAGCTTCTCACTTTTTGTGAA1  
101 TTCCTCTTTAACAAACATCTGTTTTTCAGAAAATGGGTCTGTGCCAAAGTGAGGAGGAAAAAGTTGGAACACTGAAAAGTCGTGCAATTGATAAGGAG1  
M G L C Q S E E E K V G T L K S R A I D K E I  
201 AAAACAGTTGCAAAACAAGCGAGGAACGAACTGTCAAACCTATTATTGCTAGTTTTCTAAAATTATCTCATAAATACAATTTTTATTTCAAATCAAATTC1  
K Q L Q T S E E R T V K L L L L  
301 CCATAATTAAAATGACGCCAGTTAACAGAAAGTTGCCATGGTACTAGACATGACTATGTGGGATTGAATACACATGTTAATAGTCTGTTATAAAGTGT1  
401 AAAACGAAAACAATAAAATGAAAATCAACGAAAATATACGTTCAAAAATAATACGTAATTAATATTTTAATACAATAAAGGCGGATTAATCCGGATA1  
501 TGAGGCGTATGTGGGAAAATGAATGATGTGTACTTAAAAGTAATAAGTTAATTTTTTTGCAAAAATGTAAGATGATATGAAAAAGTGTATTTAATA1  
601 TATGGAACCGTTGAGAAGAATCTGAAGCTTTTCTGAATTTTTTTTTGAAATTTTTGCTGAAAACATAAGTACCGAATGTTCAAAAATTTTTAAAAGT1  
701 CTTATTTATTTTTTGTAGTACTGTTTATGGTATTTTTTTCACATTAAAATTATTGAAAAAAGAGTTCTCAACAGCAATCGCCCTTTTGAATTTGTTTC1  
801 CTAGTCTCTCAACATACATAATCTTTTTTTTCAAACAGAACAATGATTATCACCAGACTAGAAAAAATATCTCATGCGTAATTTCTACTTATTTTCTT1  
901 TTGTCTTTTCAATTCACAAATCAAAAATAAACTGATGGTGACTAAACCGAAATAAAATTCATGTGTCATCAGTTTACGTCAGATGACGTTGGATTCT1  
1001 GATAGTTGTGCATTGCGATTTTGTGTTTGTGTTTGTCTCCTATATCTAAACTTCATGTGAAGAATGAAAAGACAAAGGATTTTCGTGAGAATGAG1  
1101 CTCAAAAGTGCACAAGGACTTTGATTAAATTCATTTAAATTTTCGATTACACCTTAGAAATCAGAATCCTCTTGGGGACAAACCTTGTACTATGACC1  
1201 TAGAATGAGTACACTTCCTGAATGTTTGGCGCTATAATAATGAAAATGAAACTATGACATTAATTTTCAGGAGCCGGAGAATGTGGAAAGTCAACGGT1  
A G E C G K S T V  
1301 TCAAGCAGATGAGATTGCTCACGTCAAACAGTACACAGATGAGGAACCTTTTGACCGAGGGCAAGSTATTTGAATTTAGAGATTTTGAATATAAAATG1  
K Q M R L L T S K Q Y T D E E L L T Q A K \*  
1401 GAATTTTCAGTTGGTATACACAAACATAGTTATTGAARTGGATCATTTAGTCAAAGCAATGCCAGCTGCCGGATTGAATTTTTCTGATCCGATGAGAG1  
L V Y T N I V I E M D H L V K A M P A A G L N F S D P M R E  
1501 GTGAGTGTAGTTTGAACCTTTTCAGTTTCCACTTATTTAATTTTCAGCATGATGTTCCACATGCTGACCCCTACATTAAGATATGCAACATAAAAC1  
H D V H M L T L Y I K D M Q H K N F  
1601 CABCAGACCGCTGCAGATCATGTGGAGGTAACGTTTCAAACCTCCTCGAAAGACAATATCTCCTCAAATTTTAGAACTATGGAAAGATCCAGTAG1  
Q Q D A A D H V E K L W K D P V V  
1701 AAAAGACTGTATGCCGAGAGAAAAGAATTGAATATTCGAGATATTGGTGATAACACGGAAATAGTGAGTTTTTTAACTGAAACCTTAAAAACAAAAG1  
K R L Y A E R K E L N I R D I G D N T E

1801 ATTCAGCTTTTTTGAAAACCTGCCAAGAATATCAAAGAAGATTATCACCCAAATGCGACAGACACCCCTTCTTTTGGGGACAAAGACAACCTGGGAAT1  
F F E N L P R I S K E D Y H P N A T D T L L L R T K T T G I

1901 AGAAGTTGGATTTGAAATTA AAAAAGTCAAGTTTAGGTAAGTGATTTTGAAAAATAAAAATTTGATATTCTATCGCTGATTTTCAGGGTATTTGACGTF  
E V G F E I K K V K F V F D V

2001 AGGTCAACGGTCGGAGAGAAAGAAATGGATTCATTGTTTTGAAGATGTCAATGCAATTATTTTCATTGCAGCGCTTTCCGAGTATAACGAAGTTTTGT  
G Q R S E R K K W I H C F E D V N A I I F I A A L S E Y N E V L F

2101 GAAGATGAGACAACGGTGAGATTTGTTTGATAAATCAGATAACTTCGGAAAAAAGTATCGTTTTAGAAATGAATACCTATTTGTCTATTTGTCCGAA  
E D E T T

2201 TCCCATCTTTTTTTTTGATATATTGTATCTTTCCCAACATTTTCAGTAGTTATAACAGTTTTTAATTA ACTGGAAAATGAGATTTTCAATTAAGTGF

2301 AGGAGTAGAAGACAATTAGCAAAACACATGGTACATTCTAAATATGAATAA AACAGTCTATTA AAAATAAAAATAAAAATTTCCAGAACCGAATGATC  
N R M I

2401 ATCCATGCGACTTTTCGAATCAATTTGTAATTTCTCGATGGTTCCATAATACTAATATTATCCTTTTCTTGAACAAAAAGGATTTGTTTCGAGGAGAAA  
S M R L F E S I C N S R W F H N T N I I L F L N K K D L F E E K I

2501 AAGAAGGAGAATATTCATAAGGGCTTTCCGGAATATCGAGGTAAGTAATTGGATTTGCCTATATACTTTTCAATTTTATCTTTAAATTTAATAACTCT  
K K E N I H K A F P E Y R

2601 AGTTTTCTAAATTTCAGGAGAGCAAAATTACGCTGAAACAGTCGCATTATCAAGACGAAATTCGAGGCGCTTTCCAATAACCCGAAGAAGACATTC  
E Q N Y A E T V A F I K T K F E A L S N N P K K T F Y

2701 GTGCACGAAACATGCGCAACAGACACAAATCAAGTGCAAAAGATTTTGGATTCAGTAATTTTCGATGATTATTCAAAGTAACCTACACAAATCTGGACT  
V H E T C A T D T N Q V Q K I L D S V I S M I I Q S N L H K S G L

2801 ATTAAGCCTATTTAGACTATTTTGTGCTCTATGTCTGTTGTGCTACGTGTATCTGGTGTATGTCTATTGACAATCAATCGATTATTTATACCC  
\*

2901 TAAACATGAACATTTTTGAAATTGTAATTTCTTCGTTAGAAGGATATTC CAACGATCTTGTGCTCTTAGATCTCCATGAAAAAGTATTTTGATTTACAF

3001 GTGTCAATTATCCTCATTTCCTCGCTTGTTC AATCATTTCCTCGATTTTAAACTCATTTC CAGTTATTCATTTCATCCCTTTTCAACTGTTTCATT

3101 AAAAATCAAAAAGTTTTTGTCAATCAAAAATCAATAAAGATTAATTTAAGATCTTGGATTGAAACTAGCACATCCCAAATGGGAAAGCTCAATTGAGT

3201 ATCCAGTAGATCCTTGAACTTTTGCTCCGATGGTTCATCGAATTTCCATTTAGCAACTCCAGAATCGCAATGCAAGTTGTACTTTGCTGCCACATC

3301 GGATGTCATTTCCATTGATAATCTAAAATAATTATGTTTTCGAACCTTTGCAAAATTTCTACTTACATATTGATCATTGAAGAACATAATTGCCTTTT

3401 ATGATGAACAGATCATAGATACATGTTGACATCCGACAGTATAAGTAAA ACTAGGGGTTCCGAATGTGAATTTTGTGTTGGAAAGTTAAAGGCATA

3501 TTTATCAAAGATAGTTTTCGTTATAAGTTGCGGAGGTTTCGAGCAGTTGCAATCTGAAAATTACATAAAA ACTTAAATTTCCAAAACAAAAATTTGCAT

Apendice 2

Comparação da sequência do polipeptideo referente ao gene Gα de *Caenorhabditis elegans* com outros polipeptideos.

---A---

Gpa-2                    MGLQQ--SEEEKVGTLKSRAIDKEIKOLTSEERTVKLLLLGAGECGKSTVLKQMRLLTS  
Rat Gia2                MG-CTVSAE-DKAAAERSKMIDKNLREDGEKAAREVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHE  
Drosophila DGa1       MG-CAVSTARDKEAIERSKNIDRALRAEGERAASEVKLLLLGAGESGKSTIVKQMKIIHD

Gpa-2                    KOYTDEELLTOAKLVYTNIVIEMDHLVKAMAAGLNFSDPMREHDV-HMLTLYIKDMQHK  
Rat Gia2                DGYSEEECROYRAVVYSNTIQSIMAIVKAMNLQIDFADPORADDARQLFALSCAAEEQ  
Drosophila DGa1       TGYSOEECEEYRRVVFSNTVQSLMVIIRAMGRLKIEFADPSRTDIAROFFTHASAADEGI

Gpa-2                    NFQODAADHVEKLWKDPVVKRLYAERKELNIRDIGDNTEYFFENIPRISKEDYHPNATDT  
Rat Gia2                MLPEDLSGVIRRLWADHGVOACFGRSREY-QLNDSAAYLNDLERIAQSDYIPTOODV  
Drosophila DGa1       LLPE-IVLLMKKLWADGGVOOTFARSREY-QLNDSAGYLNSLDRIAOPNYIPTOODV

---C---

Gpa-2                    LLLRTKTTGIVEVGFEIKKVKFRVFDVGGORSERKKWIHCFEDVNAIIFIAALSEYNEVL  
Rat Gia2                LRTRVKTTGIVETHFTFKDLHFKMFDVGGORSERKKWIHCFEGVTAIIFCVALSAYDLVL  
Drosophila DGa1       LRTRVKTTGIIETHESCKOLHFKLFDVGGORSERKKWIHCFEGVTAIIFCVALSGYDLVL

---G---

Gpa-2                    FEDETTNRMIESMRLFESICNSRWFHNTNIILFLNKKDLFEEKIKKENIHKAFPEYRGEO  
Rat Gia2                AEDEEMNRMHESMKLFDSICNNKWFTDTSIILFLNKKDLFEEKITQSPLTIOFPEYTGAN  
Drosophila DGa1       AEDEEMNRMIESLKLFDSICNSKWFVETSIILFLNKKDLFEEKIKRSPLTIOFPEYTGTN

---I---

Gpa-2                    NYAETVAFIKTKFEALSN-NPKKTFYVHETCATDTNOVQKLDSVISMITQSNLHKSGLY  
Rat Gia2                KYDEAASYIQSKFEDLNKRKDTKEIYTHFTCATDTKNVQFVFDAVTDVIIKNNLKDCGLF  
Drosophila DGa1       TFEEAANYIRMKFENINKRKDOKEIYTHLTCATDTNNVKFVFDAVTDVIIKNNLKOIGLF

\*

### Apêndice 3 : Soluções usadas

---

#### **Agar**

1,5 %                    7,5 g                    para                    500 ml de LC

Autoclavar a 120 °C durante 20 min..

---

#### **Top agarose**

0,75 %                    0,75 g para 100 ml de LC

Autoclavar a 120 °C durante 20 min..

Adicionar : 1 ml de MgSO<sub>4</sub> a 1 M

                  1 ml de maltose 20 %

MgSO<sub>4</sub> - para estabilizar os fagos.

Maltose - para induzir expressão de receptores de fagos lambda  
(tem o mesmo receptor que maltose).

---

#### **Agarose para gel de eletroforese**

Para 500 ml de TAE

1 % agarose = 0,5g

Misturar bem num vidro tampado e autoclavar durante 5 min..

---

#### **Meio LC**

10,0 g Trypton

5,0 g extrato de levedura

8,0 g NaCl

2,4 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

Completar com água destilada para 1 litro, acertar o pH (7,2-7,5), autoclavar como acima.

---

#### **Solução para denaturação**

Estoque	Utilizado	Volume total
---------	-----------	--------------

NaOH 10 M	0,5 M	250 ml
-----------	-------	--------

Volume de NaOH = 12,5 ml (10 M)

Volume de H<sub>2</sub>O = 162,5 ml

---

**Solução para neutralização**

Estoque	Utilizado	Volume total
NaCl 5 M	1,5 M	250 ml
Tris-HCl 1 M	0,5 M	250 ml
Na <sub>2</sub> EDTA 0,5 M	0,001 M	250 ml

Volume de NaCl = 75 ml (5 M)

Volume de Tris-HCl = 125 ml (1 M, pH 7,2)

Volume de EDTA = 0,5 ml (0,5 M, pH 8,0)

---

**Solução de pré-hibridização (300 ml)**

Solução	Volume	Concentração final
20 X SSC	90 ml	6 X
50 X Denhart's	6 ml	1 X
10 % SDS	15 ml	0,5 %

---

**Tampão SM**

NaCl 5,8 g

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 2,0 g

Tris-HCl 1 M 50 ml

pH 7,5

Gelatina 2 % 5 ml

Completar para 1.000 ml com água destilada, e esterilizar por autoclavagem.

---

**Meio para crescimento de bactéria NM538**

20 ml de LC

0,2 % de maltose

---

**20 X SSC**

NaCl a 3,0 M 175,00 g

Na<sub>3</sub>citrato 0,3 M 88,23 g

Completar para 1000 ml com água destilada.

---

**PEG (Polietilenoglicol) 20 %**

NaCl 2 M 29,22 g

PEG 20 % 50,00 g

Completar para 250 ml com tampão SM

---

**Tampão para DNase**

NaCl 0,15 M                    5 ml de NaCl 1,5 M  
Glicerol 50 %                25 ml de glicerol 100 %  
DNase                            1,0 mg/ml  
Volume final 50 ml (completar com água destilada).

---

**Tampão L1**

RNase (20 mg/ml), DNase I (6 mg/ml) em EDTA a 10 mM, Tris-HCl 100 mM, NaCl 300 mM, BSA (0,2 mg/ml) pH 7,5.  
Para 10 ml :

NaCl 1,5 M                    2 ml  
EDTA 0,5 M                    200 µl  
Tris 1 M                        100 µl  
BSA                              2 mg  
DNase                            60 mg  
RNase                            200 mg

---

**TE      pH 8,0**

Tris-HCl            10 mM            pH 8,0  
EDTA                1 mM             pH 8,0

---

**Solução para placa de eletroforese**

Alcool                            5 ml  
Acido acético 10 %            165 µl  
"Bind"                            15 µl  
Misturar bem, aplicar na placa, deixar secar durante 2 min., e limpar bem com álcool.

---

**Gel de acrilamida**

Uréia                    125 g  
TBE (5x)                50 ml  
Acryl 40 %            25 ml  
Completar com água destilada para 250 ml.  
Adicionar 2 colheres (pequenas) de rexin, aquecer (37 °C) e agitar durante 15 min., filtrar em papel de filtro.  
Utilizar 60 ml e filtrar em filtro de 40 µm .  
Adicionar 2 X 66 µl de APS (persulfato de amonio) e 66 µl de TEMED, para acelerar a polimerização.

---

**Agarose low melting para eletroforese**

Agarose low melting            200 mg  
TAE                                20 ml

Derreter em magnetron e completar com água destilada para 20 ml.

---

**Agar com X-gal, IPTG e antibiótico.**

Preparar o ágar como descrito anteriormente e quando ele estiver a uma temperatura de aproximadamente 40 °C adicionar, para 250 ml, 400 µl de X-gal, 200 µl de IPTG e 50 µl do antibiótico (ampicilina ou canamicina, no nosso caso). Misturar bem e despejar nas placas de petri, deixar solidificar e secar em estufa a 65 °C.

---

**STET**

8,0 % de sacarose (peso/volume)  
0,1 % de Triton-X-100 (volume/volume)  
50 mM de EDTA  
50 mM de Tris-HCl    pH 8,0

---

**TAE (X 40)**

Trizma Base                    19,38  
NaAc                            10,886 g  
NaCl                            4,208 g  
Na<sub>2</sub>-EDTA                    2,978 g

Ajustar o pH = 8,05 com HAC e completar para 100 ml com água bidestilada.

---

**Brometo de Etídio**

Para 20 ml : 160 mg diluir em água destilada.

Conservar protegido da luz na geladeira.

Solução em uso : 0,5 µg/ml

100 µl                    8 000 µg    estoque

1 µl                        8 µg

Para volume de 100 ml :

V = 6,25 µl

6,25 µl da solução estoque para 100 ml de tampão TAE.



---

**100 x DENHART'S (Segundo Fillows)**

0,5 g de PVP

0,5 g de Ficol 400

Completar para 25 ml e autoclavar.

BSA 2 % 0,5g

Volume desejado = 25 ml

Colocar mais ou menos 20 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril nas 0,5 g de BSA; ajustar pH = 3,0 com HCl 2 N; ferver durante 15 min. em banho-maria, deixar esfriar um pouco e deixar no gelo durante 10 min.; ajustar novamente o pH = 7,5 com NaOH 2 N, colocar numa proveta e acertar o volume para 25 ml (não autoclavar). Misturar os dois, aliquotar e congelar.

---

**Tampão tris para fagos**

Tris-HCl 10 mM pH 7,4

MgCl<sub>2</sub> 10 mM

NaCl 20 mM

---

**TBE x 5**

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (96%) 9,8 ml

Trizma base 378 g pH 9,0

Volume final 1 000 ml

---

**Tampão para tanque x 5**

Acido bórico 43,5 g

Trizma base 435,0 g pH 9,0

Volume final 1 000 ml

---

**Sefadex G-50**

Sefadex G-50 30 g

TE (pH 8,0) 250 ml

Aquecer a 65 °C durante 1-2 h, deixar esfriar e decantar .

Desprezar o sobrenadante e adicionar novamente o mesmo volume de TE (pH 8,0). Armazenar a 4 °C em vidro tampado.

-----  
*Componentes do tampão*

	Concentração final em mmol/l				
	A	B	L	M	H
Tris-acetato	33	-	-	-	-
Tris-HCl	-	10	10	10	50
Mg-acetato	10	-	-	-	-
MgCl <sub>2</sub>	-	5	10	10	10
K-acetato	66	-	-	-	-
NaCl	-	100	-	50	100
DTE	-	-	1	1	1
DTT	0,5	-	-	-	-
2-mercaptoetanol	-	1	-	-	-
pH a 37 °C	7,9	8,0	7,5	7,5	7,5

DTE = dithioerythritol

DTT = dithiothreitol

#### Apendice 4

Simbolos e abreviações usados.

ADP	adenosina difosfato
BB1 t/m BB10	fragmentos de H.3.9 cortados com Bam HI e Hind III
CTAB	Cetiltrimetilamonio brometo
dATP	dioxi-adeninatrifosfato
dCTP	dioxi-citosinatrifosfato
ddATP	dideoxi-adeninatrifosfato
DEAE	diethylaminoetil
dGTP	dioxi-guaninatrifosfato
DNA	ácido desoxiribonucleico
DO	densidade óptica
DTT	ditiotreitól
dTTP	dioxi-thiminatrifosfato
E10 t/m E21	fragmentos de $\lambda$ 3 cortados com Eco RI e clonados em pk18
EDTA	ethylenodiaminotetracético ácido
GMP	guanina monofosfato
H.3.9	fragmento de $\lambda$ 3 cortado com Hind III e clonado em bluescript
H1 t/m H10	fragmentos de H.3.9 cortados com Hind II e clonados em pk18
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo
marker	$\lambda$ -DNA cortado com Eco RI e Hind III
pb	pares de base
PEG	polietilenoglicol
ras	oncogene ras
rpm	rotações por minuto
SDS	sódio dodecilsulfato
src	oncogene src
SSC	saline sodiocitrato
STET	sacarose triton-X-EDTA-tris
TAE	tris-acetato-EDTA
TBE	tris-borato-EDTA
Tc1	transposon c1
TE	tris-EDTA
UNC	uncoordinated mutant
UV	ultravioleta
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoíl $\beta$ -D-galactosídeo
$\Delta$	deleção