

BC/13099

IB/81350

CF
Pess. neg

81350

Imp.



CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE UMA SEQUÊNCIA DO CROMOSSOMO Y HUMANO

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida pelo candidato Rogério Carlos Novais e aprovada pela Comissão Julgadora

Solange Farah

31/10/90

91009/15-18

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Genética.

Rogério Carlos Novais

Orientador: Profa. Dra. Solange Bento Farah

1990

T/UNICAMP

N856_c



CM00010674-5

CLASSIF.	1
AUTOR.	h856c
V.	EX
TOMBO	13099
	BR 1000

Aos meus pais, Rui e Adélia,
e ao meu irmão, Ricardo,
pelo carinho e confiança
dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, Profa. Dra. Solange Bento Farah, pela orientação, paciência na correção dos manuscritos, e amizade.

A Profa. Dra. Yoko Bomura Rosato, pela correção dos manuscritos, amizade e abertura de fronteiras.

A Profa. Dra. Christine Hackel, pela amizade, correção dos manuscritos, sugestões e pelo exemplo de "savoir vivre".

Finalmente, mas não por fim, A Andréa, pelo amor, broncas, protocolos, sugestões, fins-de semana, dias de semana, brigas, enfim, pelos dois maravilhosos anos de cumplicidade e genética que passamos juntos.

AGRADECIMENTOS

A todos os docentes do Depto. de Genética Médica - FCM - UNICAMP, em especial ao Prof. Dr. Bernardo Belguelman, e ao Prof. Dr. Luis Alberto Magna.

A Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Otobonni, pela correção dos manuscritos e amizade.

A Profa. Dra. Maricilda Palandi Mello, pelas sugestões.

Aos colegas do laboratório de DNA Recombinante : Janete, Edi, Marilda, Carmem, Fátima, Dulce e Armando pelo coleguismo, convívio diário e sugestões, e aos colegas da Pós: Letícia e Nilma.

A "mãe campineira" Isa, por todos quebra-galhos profissionais ou não, sugestões e amizade e à Madá, pela lavagem do material, cafézinhos e inesgotável bom humor.

A "cúpula" campineira: Paulinho e Henry, pela grande amizade e inúmeras "saideiras".

Aos funcionários do Depto. de Genética Médica: Jô, Toninho, Carlos, Sônia, Dona Gê, Edinaldo, Suzete e Cláudia.

A secretária da Genética, Sílvia, pela enorme atenção e prestatividade.

As minhas duas famílias, Carlos e Novais, pelo carinho.

Ao Sr. Airton Franco e família, e à Sra. Cinira Azevedo e família.

Agradecimentos "cariocas": Alexandre "Godzilla", Cristiane, Alex, Adri e Profa. Elza, pela força. Agradecimentos "paulistas": Lutti, Horácio, Takita, Alejandro, Fanca e Suzete, pela amizade.

Ao CNPq, pela bolsa, que me permitiu dedicação integral à tese e à FAPESP; FAP-UNICAMP e FINEP, pelo apoio financeiro.

ABREVIATURAS

Amp	-- ampicilina
atm	-- atmosfera
C	-- Celsius
cat	-- cloranfenicol acetil-transferase
cam	-- cloranfenicol
c-DNA	-- ácido deoxiribonucleico complementar
cen	-- centrômero
cm	-- centímetros
dNTPs	-- deoxiribonucleotídeos trifosfatados
DNA	-- <u>ácido deoxiribonucleico</u>
D.O	-- densidade ótica
i	-- isocromossomo
Kb	-- kilobases
M	-- molaridade
mg/ml	-- miligramas por mililitro
mM	-- milimol
N	-- normalidade
ng	-- nanogramas
ng/ul	-- nanogramas por microlitros
nm	-- nanômetros
qsp	-- quantidade suficiente para
RNA	-- ácido ribonucleico
rpm	-- rotações por minutos
Sxr'	-- região de deteminação testicular em camundongos
TDF	-- fator de determinação testicular

Tdy - fator de determinação testicular em camundongos
ter - porção cromossômica terminal
U/ul - unidades por microlitro
UV - ultra-violeta
v - volume
Yq - braço longo do cromossomo Y
Yp - braço curto do cromossomo Y
uCi - microCurie
ug - micrograma
ul - microlitro
um - micromol
1A2 - sub divisão do intervalo 1 do mapa de deleção

	página
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Apresentação	1
1.2 O Cromossomo Y: Estrutura e Função	2
1.3 O Antígeno H-Y	8
1.4 Genes localizados no cromossomo Y	11
1.5 Sequências localizadas no cromossomo Y	16
1.5.1 Sequências específicas em baixo número de cópias	16
1.5.2 Sequências repetidas	19
1.5.2.1 Sequências repetidas Y-específicas	21
A sequência 2.1 Kb	23
A sequência 3.4 Kb	24
1.5.3 Sequências homólogas ao cromossomo X localizadas na região de pareamento normal	25
1.5.4 Sequências homólogas ao cromossomo X	

	fora da região de pareamento normal	25
1.5.5	Sequências do cromossomo Y homólogas à cromossomos autossômicos	27
2.	OBJETIVOS	28
3.	MATERIAL E MÉTODOS	
3.1	A sequência Y-1	29
3.2	Linhagens bacterianas e plasmídios utilizados	31
3.3	Transformação bacteriana	33
3.4	Mini-preparação e extração de DNA plasmidial em larga escala	34
3.5	Mapa de restrição do fragmento Y-1	35
3.5.1	Digestão do DNA com enzimas de restrição	35
3.5.2	Eletroforese em gel de agarose	36
3.6	Isolamento dos sub-fragmentos	36
3.6.1	Purificação dos fragmentos	37
3.7	Análise do DNA genômico pelo método de Southern	38
3.7.1	Extração de DNA genômico	38
3.7.2	Transferência pelo método de Southern	40
3.7.3	Marcação das sondas com isótopo radioativo	41
3.7.4	Hibridização	42
3.8	Clonagem do fragmento Y-1 no plasmídio	43

	pKK232-8	
3.8.1	Digestão do vetor e ligação dos fragmentos	44
3.8.2	Transferência dos clones recombinantes	45
3.8.3	Isolamento e verificação da orientação fragmento Y-1 nos clones recombinantes	45
4. RESULTADOS		
4.1	Mapa de restrição da sequência Y-1	46
4.2	Isolamento dos sub-fragmentos	48
4.3	Hibridização da sequência Y-1 e dos sub-fragmentos	49
4.4	Clonagem da sequência Y-1 no plasmídio pKK232-8	53
4.4.1	Seleção dos clones recombinantes	53
4.4.2	Verificação da orientação da sequência Y-1 nos clones recombinantes	56
5.	DISCUSSÃO	58
6.	CONCLUSÕES	64

7. APENDICE

65

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

74

1. INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO

O estudo molecular dos cromossomos sexuais, em particular do cromossomo Y, tem se constituído nos últimos anos, em uma fonte incessante de informações. Como resultado, um acúmulo significativo de dados importantes tem sido gerado para um maior entendimento do papel desse cromossomo. O grande interesse que se verifica nesse estudo está no fato de que, ao contrário dos outros cromossomos, poucos genes estão localizados no cromossomo Y, e destes, muito poucos foram isolados e mapeados.

Na verdade, há muito tempo, o mecanismo pelo qual o sexo dos indivíduos é determinado e a participação do cromossomo Y nesse processo vem sendo objeto de especulação científica. Mesmo com avanços recentes e utilização de técnicas de Biologia Molecular e Engenharia Genética nessa área específica, muitas questões permanecem ainda sem esclarecimento. Devido a esse fato, pesquisadores têm voltado a atenção, para o isolamento e estudo aprofundado de sequências do cromossomo Y, alcançando dessa forma, um maior detalhamento na localização das regiões cromossômicas que contém genes e que tenham participação ou não do processo de determinação sexual.

Com o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico pré-natal, diversos grupos têm utilizado sequências Y-específicas para melhor apreciação de anomalias do desenvolvimento sexual (MULLER *et al.*, 1987c; GAL *et al.*, 1987; DISTECHE *et al.*, 1986).

Além disso, um estudo molecular mais aprofundado de sequências do cromossomo Y poderia também revelar possíveis regiões promotoras, facilitando assim a localização de genes e fornecendo dados sobre a atividade funcional desse cromossomo.

Sendo assim, torna-se de grande importância o isolamento e caracterização à nível molecular de sequências do cromossomo Y, o que, além de fornecer informações gerais acerca da estrutura física deste cromossomo, contribui no esclarecimento do papel ainda obscuro do cromossomo Y no processo de diferenciação sexual masculina.

1.2 O CROMOSSOMO Y: ESTRUTURA E FUNÇÃO

No homem, o cromossomo Y é um dos menores cromossomos, compreendendo aproximadamente 50.000 Kb (BISHOP *et al.*, 1984). Ele é um cromossomo acrocêntrico, comparável em tamanho aos cromossomos autossômicos do grupo G. Cinquenta a setenta por cento do cromossomo é constituído por uma região heterocromática, aparentemente sem atividade genética, fluorescente à coloração de bandas Q e localizada na extremidade distal do braço longo do cromossomo Y(Yq) (COOKE *et al.*, 1979; SCHEMPP & MULLER, 1982). Variações nas dimensões dessa região tornam esse cromossomo de tamanho extremamente variável, inclusive em indivíduos normais.

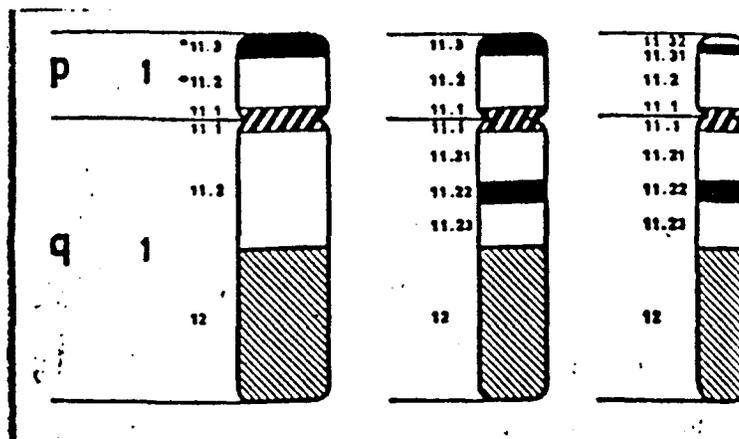


Figura 1 : Representação esquemática das bandas cromossômicas no cromossomo Y observadas com os métodos de coloração Q, R, G.

-  Bandas R positivas
-  Bandas Q e G positivas
-  Bandas R negativas
-  Bandas variáveis

Um grande número de anormalidades estruturais envolvendo o cromossomo Y tem sido descrito (EIBERS, 1973; BULHER, 1980). Muitas destas sendo correlacionadas com organização testicular alterada e espermatogênese anormal ou ausente (RETIÉF, 1987). Um fato importante a ser acrescentado é que estudos moleculares utilizando linhagens portadoras de aberrações envolvendo o cromossomo Y têm sido de grande valia na localização e mapeamento de sequências importantes e novas sondas, e inclusive, no mapeamento de alguns genes (AFFARA *et al.*, 1987; FERCUSSON-SMITU *et al.*, 1987).

Desse modo, vale a pena destacar a construção do mapa físico de deleção proposto por VERGNAUD *et al.*, (1986) e cuja nomen-

clatura vem sendo recentemente utilizada de modo sistemático por alguns autores. Utilizando uma extensa coleção de sondas (vinte e três fragmentos de restrição específicos para o cromossomo Y), foi analisado o genoma de vinte e sete indivíduos: dezenove homens 46,XX, dois homens hermafroditas XX e seis indivíduos portando alterações estruturais microscopicamente detectáveis. Com os resultados obtidos, os autores propuseram um mapa para este cromossomo, no qual a totalidade dos fragmentos testados foi assegurada a sete intervalos de deleção distintos. Em todos os intervalos descritos, pelo menos um dos fragmentos testados foi considerado de hibridização positiva. Segundo este estudo, o braço curto foi subdividido em três intervalos (intervalos 1,2 e 3), a região que compreende o centrômero, estabelecida no intervalo 4, e o braço longo, compreendendo os intervalos 5,6 e 7 (fig. 2).

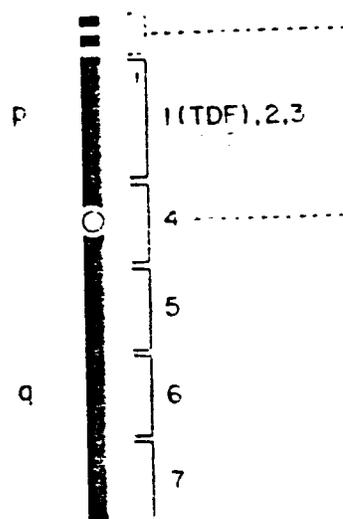


Figura 2: Mapa Físico de Deleção do cromossomo Y proposto por VERGNAUD *et al.* (1986).

Em mamíferos, incluindo o homem, a presença do cromossomo Y é suficiente para a produção de um fenótipo masculino independente do número de cromossomos X presentes. Por outro lado, embriões com ausência desse cromossomo, desenvolvem ovários e fenótipo feminino (JACOBS & STRONG, 1959). Essa informação permite atribuir ao cromossomo Y um importante papel na determinação sexual, ou seja, no desenvolvimento da gônada primitiva indiferenciada em testículo.

A partir da sétima semana de desenvolvimento intra-uterino, embriões derivados de zigotos que carregam pelo menos um cromossomo Y começam a sofrer transformações. Tais transformações se manifestam basicamente na subdivisão gonadal para formação dos cordões testiculares, que, posteriormente, darão origem aos canais seminíferos; na diferenciação das células sexuais primitivas em células germinativas e na formação da túnica albugínea.

Após ser desencadeado o processo de transformação das gônadas bissexuais em testículos, a diferenciação sexual masculina passa então a depender de hormônios produzidos exclusivamente pelo próprio testículo fetal. Dessa forma, ocorrerá a regressão dos ductos de Muller (através da liberação do hormônio anti-Mulleriano pelas células de Sertoli), desenvolvimento dos ductos de Wolff produzindo os epidídimos, canais deferentes, vesículas seminais, ductos ejaculatórios e diferenciação da genitália externa masculina (DEIGUELMAN, 1982).

Apesar de atualmente se ter conhecimento do processo fisiológico de diferenciação sexual, muito pouco se sabe a respeito da participação do cromossomo Y e a que nível, na determinação genética, ele atua. Não está claro, por exemplo se essa determinação ocorre apenas com a participação de genes estruturais localizados no próprio cromossomo, ou ainda, se existe um complexo regulatório nesse cromossomo que opere regulando positiva ou negativamente genes localizados no próprio cromossomo Y ou mesmo em autossomos.

Alguns autores ainda especulam sobre a participação do cromossomo X conjuntamente com o cromossomo Y nesse processo (PAGE *et al.*, 1987) visto que sequências candidatas à possuir gene ou genes que supostamente tenham função na determinação sexual, possuem uma cópia idêntica no cromossomo X. Se realmente isto for confirmado, supõe-se que essas sequências homólogas poderiam sofrer algum tipo de inativação à nível transcripcional (PAGE *et al.*, 1987). O fato é que, a própria estrutura e características físicas do cromossomo Y (número excessivo de sequências repetidas, grande porção cromossômica inativa geneticamente) tornam-se um grande empecilho na obtenção de algumas dessas respostas.

Porém, nem só à nível de determinação sexual reside a participação do cromossomo Y. Também a estreita relação entre o cromossomo Y e espermatogênese normal tem sido intensamente estudada. Deleções detectadas citogeneticamente no cromossomo Y em muitos homens com falhas espermatogênicas, levam a crer que, afastada devidamente qualquer natureza clínica para esta anormalidade, fatores que atuam à

nível de espermatogênese devam ser codificados por genes localizados no braço longo do cromossomo Y (ANDERSSON *et al.*, 1988). Uma das primeiras descrições que sugerem esse fato é de autoria de TIEPOLO & ZUFARDI (1976), na qual, através do estudo citogenético de seis indivíduos azoospermicos, foram detectadas deleções na porção distal do segmento eucromático de braço longo do cromossomo Y.

Recentemente se denominou o gene hipotético relacionado à infertilidade de *AZF* (*Azoospermia factor*). Tanto dados citogenéticos (RETIEF, 1987) como aqueles obtidos com a utilização de sondas de DNA (ANDERSSON *et al.*, 1988) sugerem sua localização na região Yq11, correspondendo ao intervalo 6 do mapa de deleção proposto por VERGNAUD *et al.*, (1986). Contrapondo essa hipótese, existem estudos em que foram relatados homens azoospermicos apresentando deleções na porção distal da região heterocromática do braço longo, porém, sem perda da região eucromática, na qual estariam localizados esses genes (COHEN *et al.*, 1983). Mais ainda, alguns estudos realizados em pacientes azoospermicos utilizando sondas que mapeam a região Yq11, não demonstraram perda cromossômica nessa região (THO *et al.*, 1987).

Também têm sido descritas na literatura, associações entre fatores como estatura masculina (YUNES *et al.*, 1977) e tamanho de dentes (ALVESALO & de la CHAPELLE, 1981) com fertilidade masculina, sugerindo uma proximidade de genes que regulam essas características, à região de espermatogênese normal.

A existência de uma determinada região do cromossomo Y que demonstra possuir homologia com o cromossomo X, também têm sido estudada à nível molecular. Essa região apresenta homologia genética entre determinadas sequências localizadas nos braços curtos de ambos cromossomos e mantém pareamento cromossômico normal, sofrendo *crossing-over* obrigatório durante a meiose masculina. Devido a essas peculiaridades, tem sido denominada de **Região Pseudoautosômica**.

Esta região foi evidenciada citogeneticamente há muito tempo por KOJLER & DARLINGTON (1934), porém apenas recentemente pôde ser confirmada por estudos moleculares (SIMMLER *et al.*, 1985). Uma característica marcante é a sua hipervariabilidade, causada por variações alélicas devido ao grande número de cópias de sequências nucleotídicas repetidas, o que gera a presença de inúmeros fragmentos polimórficos ou RFLPs (*Restrictions Fragments Length Polimorfisms*) nessa região (WEISSENBACH *et al.*, 1987).

1.3 O ANTÍGENO H-Y

O antígeno H-Y foi a primeira molécula associada a determinação primária do sexo. A partir da observação de que fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6 rejeitavam transplantes de pele de machos da sua própria linhagem, sugeriu-se a existência de um antígeno

de superfície celular exclusivo do sexo masculino (EICHWALD & SILMSER, 1955). Uma vez que numa linhagem isogênica todas as diferenças genéticas podem ser atribuídas ao cromossomo Y, o antígeno responsável pela rejeição foi denominado H-Y, significando histocompatibilidade Y (BIL- LINCAM & SILVERS, 1960).

A detecção sorológica do antígeno H-Y foi estabelecida por GOLDBERG *et al.*, (1971). Os autores demonstraram que o soro anti H-Y, produzido em fêmeas multitransplantadas com pele de machos da mesma linhagem, era citotóxico para espermatozoides murinos na presença de complemento de coelho.

O alto grau de conservação evolutiva do antígeno H-Y foi constatado por WACHTEL *et al.*, (1974, 1975a), observando que células do sexo heterogamético de várias espécies de mamíferos (rato, coelho, cobaija e homem), aves e anfíbios, absorviam anticorpos H-Y murinos. Portanto, o antígeno H-Y que havia sido inicialmente definido como macho específico é na verdade específico para o sexo heterogamético na maioria dos vertebrados. Essas e outras observações levaram os autores a propor que o antígeno H-Y seria o produto primário do gene que desempenha a função de induzir a gônada embrionária a se desenvolver em testículo, ou ovário no sexo heterogamético (WACHTEL *et al.*, 1975b).

KOO *et al.*, (1977), analisando a presença de antígeno H-Y em 17 indivíduos com anomalias estruturais do cromossomo Y, concluíram que o gene responsável pela expressão desse antígeno estaria

localizado na região proximal do braço curto do cromossomo Y (Yp). Mais ainda, a constatação de que o antígeno H-Y está presente em quantidade aumentada num indivíduo com cariótipo 45,X/46,X,i(Yp), mas está ausente no indivíduo 46,X,i(Yq), apóia a sugestão de que o braço curto do cromossomo Y é essencial para a expressão desse antígeno (MOREIRA-FILHO *et al.*, 1979).

Recentemente o papel do antígeno H-Y na determinação gonadal tem sido muito questionado. SIMPSON *et al.*, (1987) refutaram a hipótese de que o antígeno H-Y fosse o produto primário do gene responsável pela determinação sexual, demonstrando que o antígeno H-Y e o fator de diferenciação testicular eram determinados por dois genes localizados em regiões bem distantes no cromossomo Y, tendo sido o primeiro atribuído ao Yq e o outro ao Yp. Além disso, hermafroditas verdadeiros XX, nos quais não se detecta material do cromossomo Y, apresentam expressão do antígeno H-Y. Isto sugere que o gene do antígeno H-Y não estaria ligado ao cromossomo Y (WOLFE, 1987).

Nesse sentido, LAU *et al.*, (1986) demonstraram o envolvimento de um *locus* autossômico na determinação gonadal. Usando anticorpo monoclonal anti H-Y, os autores isolaram de um banco de c-DNA, preparado a partir de testículos de camundongo, uma sequência muito conservada com expressão em células testiculares, mas não em células ovarianas. Tal sequência foi mapeada no cromossomo 6 humano.

1.4 GENES LOCALIZADOS NO CROMOSSOMO Y

Embora poucos genes tenham sido localizados no cromossomo Y, alguns deles já foram caracterizados à nível molecular. Um hipotético gene, candidato ao principal papel no processo de determinação sexual, é o TDF (*testicular determining factor*), que foi primeiramente admitido por McKUSICK (1975), e que recentemente têm sido objeto de pesquisa por vários autores (PAGE, 1987; MULLER, 1987b).

Na verdade, atualmente muito pouco se sabe em relação a sua natureza bioquímica, forma de regulação, modo de ação ou mesmo número de produtos gênicos (PAGE *et al.*, 1988; De La CHAPELLE 1986).

Várias localizações desse suposto gene têm sido propostas. A partir de observações citogenéticas e da relação cariótipo-fenótipo, alguns autores sugeriram que tanto o braço curto quanto o braço longo do cromossomo Y seriam necessários para a diferenciação testicular (SIEBERS *et al.*, 1973; BULHER, 1980). No entanto, estudos mais recentes apontam fortemente que genes da determinação sexual estariam localizados no braço curto do cromossomo Y (MULLER *et al.*, 1986; VERONAUD *et al.*, 1986; De La CHAPELLE, 1986; SIMPSON *et al.*, 1987). Hibridizações do DNA de homens 46,XX e mulheres 46,XY com sequências Y específicas, têm permitido mapear sequências bastante próximas à região de determinação sexual (AFFARA *et al.*, 1987; MULLER *et al.*, 1986).

VERGNAUD *et al.*, (1986) propuseram a localização deste suposto gene para a porção distal do braço curto do cromossomo Y, mais precisamente, para o intervalo 1 do mapa físico de deleção, porém fora da região de homologia com o cromossomo X. Além disso, alguns estudos demonstram que pelo menos em alguns homens XX, o suposto *TDF* teria sido transferido para o cromossomo X paterno, durante a meiose, sendo dessa forma por eles herdado (ANDERSSON *et al.*, 1986).

PAGE *et al.*, (1988), relatou a existência de um gene *ZFY* (*Y-linked zinc finger protein*) localizado na mesma região do suposto *TDF*, e que está ausente em uma mulher 46,XY com 99,8% desse cromossomo. Esse gene codifica uma proteína que se liga de maneira específica à molécula de DNA ou RNA atuando na regulação da transcrição gênica. Dada a semelhança física da proteína *ZFY* com outras proteínas que também possuem função semelhante, o autor sugere que essa proteína poderia atuar na regulação gênica de fatores importantes para a determinação sexual.

Curiosamente, foi localizado também no braço curto do cromossomo X, um gene *ZFX* (*X-linked homologue of ZFY*) (PAGE, 1987; MULLER *et al.*, 1987a), que é uma cópia homóloga ao *ZFY*. Sendo realmente comprovado o *ZFY* como um gene importante na determinação sexual, deve-se no futuro considerar novos modelos de determinação sexual que acomodem também a hipótese de participação de genes localizado no cromossomo X nesse processo (PAGE, 1987).

PALMER *et al.*, (1990) descrevem entretanto, a análise de hibridizações do DNA de 4 homens 46,XX, com sondas que mapeam 100 Kb da porção distal do braço curto do cromossomo Y (HFO.2, H2.1, PO.9, E1.3, 27A e GCGY3) imediatamente adjacente à região pseudoautosômica. Com isso, foi verificado que a região do cromossomo Y presente nesses indivíduos não inclui a região definida por PAGE *et al.*, (1987) (140 Kb compreendidos no intervalo 1A2 do mapa de deleção proposto por VERGNAUD *et al.*, 1986).

Estendendo os achados de PALMER *et al.*, (1990), SINCLAIR *et al.*, (1990), descrevem um gene SRY (*sex determining region on Y chromosome*) que está contido numa região de 35 Kb no braço curto do cromossomo Y, que seria indispensável para a determinação do sexo em mamíferos segundo PALMER *et al.*, (1990). Esse gene codifica uma proteína com características físicas que sugerem também um papel na regulação transcricional. Com a hibridização de uma sonda (pY53.3) isolada dessa região à RNAs extraídos de diversos tecidos celulares (ovário, testículo, pulmão e rim), pôde ser verificada a existência de um transcrito de 1.1 Kb somente em tecido testicular e em nenhum outro tecido testado. Esse dado, juntamente à verificação da alta conservação dessa região em muitos mamíferos e a sua especificidade ao cromossomo Y tornam também essa sequência um candidato bastante provável ao principal papel na determinação do sexo em mamíferos.

Uma sequência homóloga a essa (p4.2.2) foi descrita também em cromossomo Y de camundongo e é mapeada na região *Skr'*, que supostamente possui o gene *Tdy*, correspondente ao TDF em camundongos e que teria a função de determinação sexual (GUBBAY *et al.*, 1990).

Um dos primeiros genes do cromossomo Y que foi clonado, o **MIC2**, está localizado na porção mais proximal da região pseudoautosômica (GOODFELLOW *et al.*, 1983; GOODFELLOW *et al.*, 1988). A análise genética e molecular desse gene tem sido de grande valia para a determinação dessa região, sendo que o **MIC2** é o único gene bem definido como pertencente a ela. No cromossomo X, tal gene foi localizado na região Xpter-Xp22-32.

O **MIC2** codifica em ambos *loci*, nos cromossomos X e Y (**MIC2X** e **MIC2Y**) um antígeno de superfície celular de função desconhecida que é reconhecido pelo anticorpo monoclonal 12E7. Com a utilização de um sistema de expressão do fago λ gt11 em *E.coli*, um produto primário de um clone de c-DNA isolado por DARLING *et al.*, (1986) é reconhecido por este anticorpo. Utilizando-se de um sistema de células somáticas híbridas homem-camundongo, os autores observaram que células que retinham o cromossomo Y ou X expressavam o antígeno 12E7.

Além disso, o estudo genético do **MIC2** tem servido como ferramenta no estudo da inativação do cromossomo X e de forma geral para o ainda pouco conhecido controle da expressão gênica em mamíferos, já que este gene e todos os genes da região pseudoautosômica escapam à inativação pelo cromossomo X (GOODFELLOW *et al.*, 1988). Em consequência disto, genes dessa região são herdados em dose dupla em indivíduos XX e XY, e em uma única dose em indivíduos XO, representando assim para esses indivíduos uma real deficiência do produto primário desses genes (BURGOYNE, 1982).

A análise genética da atividade da enzima esteróide sulfatase (*STS*) tem indicado que o gene necessário para a expressão desta enzima estaria localizado no cromossomo X (CRAIG *et al.*, 1987), também possuindo uma cópia correspondente no cromossomo Y.

Um clone de c-DNA isolado por BALABIO *et al.* (1984), permitiu localizar este gene na região Xp22.3 do cromossomo X, correspondendo portanto à região pseudoautosômica. Este clone, quando hibridizado ao DNA de indivíduos portadores de ictiose e deficientes para a *STS*, demonstrou que todos indivíduos haviam perdido material cromossômico desta região (FRASER *et al.*, 1987). Porém alguns autores sustentam que o *STS* na verdade não seria pseudoautosômico, e sim localizado no cromossomo X, adjacente à esta região, o que está de acordo com a informação de que este gene não sofre permuta durante a meiose masculina (FRASER, *et al.*, 1987).

No cromossomo Y, a região correspondente ao *STS* têm sido intrigantemente assegurada ao braço longo (FRASER, 1987; De La CHAPPELLE, 1987), correspondendo na verdade à apenas uma cópia incompleta desse gene. É possível supor que a cópia do gene *STS* na região pseudoautosômica tenha sido perdida durante a evolução (GOODFELLOW *et al.*, 1988).

1.5 SEQUÊNCIAS LOCALIZADAS NO CROMOSSOMO Y

Além dos genes mapeados no cromossomo Y, um número muito maior de sequências de DNA desse cromossomo foi isolado na tentativa de se localizar outros genes. De acordo com o "*Report of the committee on the genetic constitution of the Y chromosome*" (GOODFELLOW *et al.*, 1980), sequências definidas como possuindo cópias ou pertencentes ao cromossomo Y estão relacionadas em cinco categorias gerais: sequências Y-específicas com baixo número de cópias, sequências repetidas, sequências com homologia ao cromossomo X dentro da região de pareamento, sequências com homologia ao cromossomo X porém fora da região de pareamento e sequências com homologia ao cromossomo X e à cromossomos autossômicos. Essas categorias são dependentes das condições de estrigência (concentração de sais e temperatura) na qual o experimento de hibridização é realizado.

1.5.1 Sequências específicas em baixo número de cópias:

É de grande interesse o isolamento de sequências Y-específicas de cópia única ou em baixo número de cópias pois representa uma poderosa ferramenta analítica para o estudo direto da estrutura do cromossomo Y e da expressão gênica.

Sequências Y-específicas geralmente podem ser classificadas de duas maneiras. Primeiramente, sequências especificamente masculinas, seriam aquelas que não estariam representadas no genoma feminino hibridizando especificamente com o cromossomo Y. Segundo, sequências que fornecem um padrão de reação diferentes para o homem e mulher após o experimento de hibridização, isto é, estariam também representadas no genoma feminino, porém com padrão de bandas diferente quando comparado ao visualizado em DNA genômico masculino.

Na tentativa de se obter essas sequências, pesquisadores tem utilizado basicamente dois métodos de isolamento do cromossomo Y. O isolamento a partir de um sistema de células híbridas homem-camundongo (BISHOP *et al.*, 1983, BISHOP *et al.*, 1984) ou o isolamento por citometria de fluxo ou "*flow-sorter*" (MULLER *et al.*, 1986).

BISHOP *et al.* (1983), através do isolamento do cromossomo Y de células híbridas, que contém pelo menos uma cópia do cromossomo Y humano, e construção de um banco genômico parcial em cosmídio, pôde isolar trinta sondas do cromossomo Y, das quais, em condições de baixa estringência, seis apresentavam-se específicas para esse cromossomo Y e quatro, apresentavam um padrão de reação macho-fêmea diferente (BISHOP *et al.*, 1984).

CUELLAEN *et al.*, (1984) utilizando algumas dessas sondas, além de verificar sua especificidade ao cromossomo Y, pôde demonstrar pela primeira vez à nível molecular a presença de material cromossômico do Y em alguns homens 46,XX.

Com o isolamento do cromossomo Y a partir da célula híbrida 3E7 que contém 4 cópias desse cromossomo, WOLFE *et al.*, (1984), construíram um banco cromossômico em cosmídio. Dois dos clones estudados (cos 69 e cos 116) demonstraram conter sequências únicas e específicas ao cromossomo Y e estas foram localizadas na região heterocromática do braço longo desse cromossomo.

Ainda com a utilização desse sistema no isolamento do cromossomo Y, e a construção de um banco genômico parcial em fago Charon 4A, BURK *et al.*, (1985) estudaram uma sequência (4B-2) de 3.3 Kb, selecionada a partir de hibridização com DNA de homem 47,XYY, que é um fragmento de cópia simples e está localizado na porção proximal do braço longo do cromossomo Y. Estudos evolutivos dessa sequência demonstraram a existência de sequências semelhantes à esta em DNA de outros primatas (gorila, chimpanzé, orangotango) mas não em DNA de fêmeas dessas espécies. Além disso, por falhar em hibridizar com DNA de homens 46,XX o autor sugere que sua presença pode não ser necessária para a determinação sexual.

A partir da construção de um banco genômico de fago enriquecido para a porção eucromática do cromossomo Y, obtido por "flow-sorter", MULLER *et al.*, (1986), selecionaram 25 clones que hibridizavam preferencialmente com o cromossomo Y humano, e destes, 2 clones (Y-202 e Y-214) possuíam um reduzido número de cópias e eram específicos para o cromossomo Y.

Com a utilização dessas sequências e outras isoladas da mesma maneira, o autor pôde sugerir a sub-divisão do braço curto do cromossomo Y em 5 regiões (YpI-YpV) sendo que as regiões YpIII e YpIV (Yp11.2-Ypter) foram demonstradas pelo autor como sendo definidas por sondas Y-específicas ou em adição à sequências autossômicas (Y-280, Y-286, Y-228, Y-227).

PACE *et al.*, (1987) descrevem 4 sequências, isoladas de diferentes bancos cromossômicos: pDP307, pDP1007, pDP10035 e pDP1039. Todas essas sequências demonstraram ser específicas ao cromossomo Y. Uma delas, pDP1007, candidata segundo o autor ao principal papel na determinação sexual, detecta um locus altamente conservado nos cromossomos X e Y em diferentes mamíferos testados. Esse fato evidencia o alto grau de conservação dessas sequências e a evolução destas, partir de um gene ancestral comum.

1.5.2 Sequências repetidas:

Há diversas razões para o estudo molecular de sequências repetidas do cromossomo Y. A primeira delas é que existe uma altíssima proporção de sequências repetidas neste cromossomo (aproximadamente 70 %) e um número limitado de genes funcionais conhecidos. Segundo, esta significativa parcela constituída de várias famílias de sequências repetidas, são geneticamente "não codificantes" e sugere-se que este fato tenha papel fundamental na regulação da expressão gênica (COOKE, 1982). Além disso, o cromossomo Y humano tem uma origem evolu-

tiva recente, em que a maioria de suas sequências tem homologia com o cromossomo X e/ou autossomos humanos e existe mesmo, grande homologia entre o cromossomo Y com o cromossomo X e autossomos de outros primatas (SMITH *et al.*, 1987; SZADO *et al.*, 1987). Sendo assim o estudo dessas sequências poderia muitas vezes fornecer informações importantes à nível evolutivo.

Das sequências de DNA repetido que se encontram dispersas no genoma, algumas foram descritas como possuindo cópias no cromossomo Y. Entre elas, a sequência *Aiu*, a sequência *Bkm*, a sequência "alphoid", localizada no centrômero, além de sequências repetidas Y-específicas, dependentes das condições de estringência, entre as quais destacam-se as sequências 3.4kb e 2.1k.b.

A família de sequências *Aiu* apresenta por volta de 300.000 cópias dispersas em todo o genoma. Esta sequência é homóloga à pequenos RNAs nucleares e transcrita "*in vitro*" pela RNA Polimerase III (DUNCAN *et al.*, 1979). No cromossomo Y humano é visível apenas que o espectro dessas sequências *Aiu* difere do esperado no resto do genoma em relação ao número de cópias, sendo que em baixa estringência poucas sequências são observadas no cromossomo Y (SMITH *et al.*, 1987).

A sequência *Bkm* (*Banded Krait minor satellite DNA*) está associada ao sexo heterogamético em cobras hibridizando preferencialmente ao cromossomo W (ARNEMANN *et al.*, 1986). Esta sequência apresenta repetições simples de quadrupletes CATA e GACA, e em camundongos está relacionada à região pericentrômérica do cromossomo Y (SMITH *et al.*, 1987). ARNEMANN *et al.*, (1986) selecionaram entre 68 clones iso-

lados de um banco de cosmídio contendo fragmentos do cromossomo Y, 9 clones que apresentavam forte hibridização com oligonucleotídeos sintéticos CATA e CACA, demonstrando, portanto, a presença de homologia com a sequência *BKM*. Dois desses clones analisados, hibridizavam especificamente com DNA de origem masculina, localizando-se tanto no braço curto como no braço longo do cromossomo Y.

A maioria das espécies de mamíferos possui uma família de DNA repetido ao acaso, agrupado no centrômero e em outros sítios heterocromáticos denominada "*alphoid DNA repeats*" (SMITH *et al.*, 1987). No cromossomo Y este "*alphoid DNA*" está organizado numa estrutura de aproximadamente 5 a 7kb que se repete, compreendendo 400Kb da região centromérica. Extensiva análise de restrição revelou que essas sequências podem ser "cromossômicas específicas" e parecem ter evoluído muito rapidamente devido ao fato que muitas diferenças ocorrem entre as espécies (TYLER-SMITH & DROWN, 1987).

1.5.2.1 Sequências repetidas Y-específicas:

Setenta por cento do cromossomo Y humano é constituído por sequências Y-específicas repetidas. O maior componente dessa família de sequências repetidas é um fragmento de 3.4 kb espaçado por sítios de restrição para a enzima *HaeIII* e que constitui aproximadamente quarenta por cento do cromossomo Y. Outra sequência altamente repetida, de 2.1 kb, encontra-se também espaçada pela mesmo sítio de restrição e constitui vinte por cento do cromossomo Y. Essas sequên-

cias encontram-se "in tandem", situadas na porção heterocromática do cromossomo Y, sendo que variações no tamanho desta região tem sido relacionadas ao número de cópias da sequência 3.4 kb (McKAY *et al.*, 1978).

TYLER SMITH *et al.*, (1988), descreveram uma sequência de DNA altamente repetida, específica e hipervariável constituindo-se de unidades de 20.3 Kb e localizadas no braço curto do cromossomo Y. Estas unidades estariam dispostas em um bloco maior hipervariável em tamanho de 540 à 800 Kb, e um bloco menor de tamanho constante de 60 Kb. Sequências de DNA já descritas anteriormente como as sondas Y-156, Y-190, Y-223a (MULLER *et al.*, 1987) foram verificadas nessa sequência.

A função das sequências repetidas Y-específicas é enigmática como o é a da maioria das sequências repetidas do DNA eucariótico, entretanto, está claro que pelo menos as sequências 3.4 Kb e 2.1 Kb não estão envolvidas diretamente na determinação sexual, uma vez que fêmeas normais que possuem essas sequências translocadas à cromossomos autossômicos são encontradas na população numa frequência de 1:3000 (COOKE *et al.*, 1979).

A sequência 2.1 kb:

Esta sequência foi clonada (COOKE *et al.*, 1982) no plasmídeo pHy2.1 e hibridiza em uma banda de 2.1 kb no DNA de homem. Hibridização "*in situ*" desta sequência demonstrou que ela está localizada preferencialmente na porção proximal da região Yq12 (SCHIMDTKE & SCHMID, 1980) ; apesar de BOSTOCK *et al.*, (1978) sugerirem que algumas cópias desta sequência também possam estar localizadas na porção não-fluorescente.

A análise de restrição dessa sequência demonstra que ela está incluída em um elemento altamente repetido de 2.4 Kb. Além disso, é importante ressaltar que a sequência 2.1 Kb (*locus DYZ2*) não se hibridiza à sequência 3.4 Kb.

Em relação à sua especificidade ao cromossomo Y, apesar de já ter sido demonstrado que esta sequência é altamente dispersa no genoma humano, possuindo cópias em praticamente quase todos os cromossomos, o material cromossômico não específico ao cromossomo Y desta sequência está presente em menor número de cópias que fragmentos Y-específicos. Pode-se afirmar portanto que a sequência 2.1 Kb é muito mais específica ao Y que a outros cromossomos (SMITH *et al.*, 1987).

Outro dado importante em relação a essa sequência foi a descrição de sítios *HpaII* metilados, os quais estariam envolvidos na

sua inativação gênica, confirmando a hipótese de que metilações sítios específicas devem estar envolvidas de alguma maneira, na regulação de genes em eucariotos (COOKE *et al.*, 1982).

A sequência 3.4 Kb:

A sequência 3.4 Kb (*locus DYZ1*) é a maior representante da família de sequências repetidas localizadas no cromossomo Y. Seu número de cópias é estimado em aproximadamente 7000, correspondendo à 0,4% do DNA genômico masculino (BISHOP *et al.*, 1984). Hibridizações com DNA feminino sob condições de baixa estringência demonstraram, à exemplo da sequência 2.1 Kb, que ela também possui alguma homologia com cromossomos autossômicos, principalmente os cromossomos 9 e 15.

Os fragmentos de 3.4 Kb são na verdade uma mistura heteróloga de sequências que têm em comum a ocorrência regular de sítios de *HaeIII* a cada intervalo de 3.4 Kb e uma organização "*in tandem*" em vários sítios sobre o braço longo do cromossomo Y (SMITH *et al.*, 1987). Apesar de apresentar homologia com menor número de cromossomos autossomos quando comparada à 2.1 Kb, esta sequência, no entanto, apresenta menor especificidade com o cromossomo Y que a outra, pois o número de fragmentos específicos para esse cromossomo é relativamente menor.

1.5.3 Sequências homólogas ao cromossomo X localizadas na região de pareamento normal:

A região de pareamento normal do cromossomo Y com o X está localizada nas porções distais dos braços curtos de ambos cromossomos (VERGNAUD *et al.*, 1986; YEN *et al.*, 1988) e é compreendida basicamente por cinco *loci*: DXYS14, detectado pela sonda 29C1 (COOKE *et al.*, 1985); DXYS15, pelas sondas 113b e 113d (SIMMLER *et al.*, 1985); o *locus* DXYS17, detectado pela sonda 602 (SIMMLER *et al.*, 1985); e ainda os *loci* DXYS20 e MIC2 correspondendo respectivamente às sondas pDP230 (PAGE *et al.*, 1987) e pSG1 e p19B (GOODFELLOW *et al.*, 1986), sendo a sonda pSG1, um c-DNA correspondente ao anticorpo 12E7, que é o produto primário do gene *MIC2*.

1.5.4 Sequências homólogas ao cromossomo X fora da região de pareamento normal:

A existência de sequências do cromossomo Y homólogas ao cromossomo X, mesmo fora da região de pareamento normal entre esses dois cromossomos, é uma evidência concreta da evolução desses cromossomos a partir de um ancestral comum (KOENING *et al.*, 1985).

A partir de um banco genômico humano construído por FRITSCH & MANIATIS, PAGE *et al.*, (1982), isolaram um recombinante (Λ -Hs4813) contendo um inserto de 13,5 Kb. Dois fragmentos foram

obtidos desse recombinante (sondas A e B). Um desses fragmentos (sonda A) detecta um segmento polimórfico de 14,6 Kb derivado do cromossomo Y e possui uma cópia homóloga na região Xp22.2-qter. Essa se constitui na primeira descrição de homologia entre os cromossomos Y e X fora da região pseudoautosômica.

A partir de dois bancos cromossômicos Y-específicos (um obtido por "flow sorter" e outro, a partir de células híbridas homem-hamster) e um banco cromossômico X-específico (obtido por "flow sorter"), AFFARA *et al.*, (1986) isolaram vinte recombinantes aparentemente de cópia simples para o cromossomo Y. Doze deles foram localizados na região Yp, e oito na região Yq.

Muitos desses fragmentos mostraram homologia ao cromossomo X fora da região de pareamento. Por exemplo, em diversos níveis de estringência, quatro deles (GMCXY4, GMCXY5, GMCXY6, p2F(2)) localizados no braço curto (Yp), porém fora da região de pareamento normal, detectam sequências homólogas no cromossomo X entre as regiões Xq13-24. A sonda GMCXY3 localizada entre Yq11-11.22 detecta homologia em Xpter-Xp22.3, e mesmo uma sequência localizada em Yp11.2-Ypcen (GMCXY2) apresenta homologia com a região Xq13-Xq24.

Além disso, um fragmento de 4.9 kb (sonda p75/78), isolado a partir de um banco parcial de cosmídio, foi sub-clonado no plasmídio pAT153 e selecionado de forma a não apresentar qualquer sequência repetida, mapea no braço longo do cromossomo X. Este fragmento detecta, em baixa estringência, uma sequência de 3.4 Kb na região eucromática do braço longo do cromossomo Y (WOLFE *et al.*, 1984).

Em um outro trabalho, a sequência 2:13 do braço longo do Y, localizada entre as regiões Yqcen-q11.1, detecta um locus altamente homólogo no cromossomo X (BICKMORE & COOKE, 1987) na região Xq26-27. Segundo os autores, esta sequência teria sido recentemente transposta do cromossomo X para o Y uma vez que em chimpanzés e gorilas ela ocorre somente no cromossomo X, fornecendo assim um significativo dado à nível evolutivo.

1.5.5 Sequências do cromossomo Y homólogas à cromossomos autossômicos:

A homologia entre o cromossomo Y e vários autossomos tem sido verificada e acredita-se seja consequência de uma série de eventos de duplicação e transposição no decorrer do processo evolutivo (AFFARA *et al.*, 1986). BISHOP *et al.*, (1984), estudando um conjunto de vinte e seis sequências Y-específicas detectaram que quatro delas apresentavam homologia com cromossomos autossômicos e uma sonda exibia homologia com o cromossomo X e autossomos.

AFFARA *et al.*, (1986), localizaram entre as regiões Ypter-Yq11 seis sequências (CMGY3, CMGY4a,b,c, CMGXY2, GMGY11, GMGY1, GMGY2, GMGY5), isoladas a partir de três bancos cromossômicos. Além disso, os autores puderam demonstrar distinta homologia dessas sequências com autossomos uma vez que esses fragmentos falharam em hibridizar com células híbridas portando somente cromossomo X, mas hibridizavam com os cromossomos 1, 2, 3, 5, 6, 11, 17, 18, 21 e 22.

2. OBJETIVOS

- Verificar se uma sequência, denominada Y-1, isolada de um banco do cromossomo Y, é específica para esse cromossomo.

- Determinar o mapa de restrição da sequência Y-1.

- Isolar sub-fragmentos da sequência Y-1 original — e caracterizá-los também quanto a sua especificidade ao cromossomo Y.

- Selecionar o fragmento mais específico ao cromossomo Y, visando a sua utilização em rotina laboratorial tanto para fins acadêmicos quanto clínicos.

- Verificar a possível existência de sequências promotoras na sequência Y-1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 A SEQUÊNCIA Y-1

A Sequência Y-1 foi obtida a partir da triagem de um banco do cromossomo Y (código LLOYNS01), construído pelo método de citometria de fluxo na Divisão de Ciências Biomédicas, Laboratório Nacional Lawrence Livermore, CA 94550 sob os auspícios do Laboratório Nacional do Projeto do Banco Gênico, o qual recebe apoio do Departamento de Energia dos Estados Unidos.

Esse método baseia-se no fato de que o DNA é um constituinte estável e característico dos cromossomos. Cromossomos metafásicos corados com fluorocromos, quando excitados com raio laser, emitem uma intensidade de fluorescência que depende do seu conteúdo de DNA. Assim, é possível identificar e isolar um cromossomo em particular.

Cromossomos Y, isolados a partir de fibroblastos humanos diplóides (linhagem 811), com uma pureza estimada de 95%, foram digeridos com a enzima de restrição *HindIII*, gerando fragmentos de restrição contendo em média 4 Kb, os quais foram então clonados no vetor viral Charon 21A. A digestão dos cromossomos Y isolados com a enzima *HindIII* implica num enriquecimento do banco cromossômico para sequências oriundas da eucromatina, uma vez que a porção heterocromática do Y é virtualmente desprovida de sítios de restrição para essa enzima, não sendo, portanto, possível de clonagem após a digestão.

Após a infecção da bactéria LE 392 por partículas de vírus recombinantes e inoculação do material em placas de petri, as placas de lise que se formaram foram transferidas em duplicatas para membranas de nylon (Colony/Plaque Screen). Os clones obtidos foram selecionados quanto a sua especificidade para o cromossomo Y através de sucessivas hibridizações com DNA genômico extraído de indivíduos 47, XYY e 45, X. Clones que hibridizavam com 47, XYY, mas não com 45, X foram então considerados específicos para o cromossomo Y humano.

Esses clones foram amplificados e após a extração de DNA e digestão com a enzima *HindIII*, o fragmento humano liberado foi subclonado no plasmídio de expressão pIBI76 (International Biotechnologies Inc. cat nº 33850). Desse modo, diversas sequências de DNA originárias do cromossomo Y foram obtidas e, entre elas, a sequência Y-1 (PARAB *et al.*, trabalho não publicado).

3.2 LINHAGENS BACTERIANAS E PLASMÍDIOS UTILIZADOS :

HIB101 : *E. coli* (F⁻, hsdS20 (r⁻_g, m⁻_g), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Smr), xyL-5, mtl-1, supE44, λ) utilizada como receptora nos experimentos de transformação e na manutenção e propagação dos plasmídios pIBI76, pKK232-8 e pKK232-8/Y-1

Plasmídios	Características	Procedência
pIBI76	resistência à ampicilina ---	International Biotechnolo- gies, Inc.
pKK232-8	resistência à ampicilina, resistência à cloranfenicol quando ligado à um promotor	BROSIUS (1984)
pKK232-8/Y-1	resistência à ampicilina resistência à cloranfenicol quando ligado à sequência Y-1	este trabalho

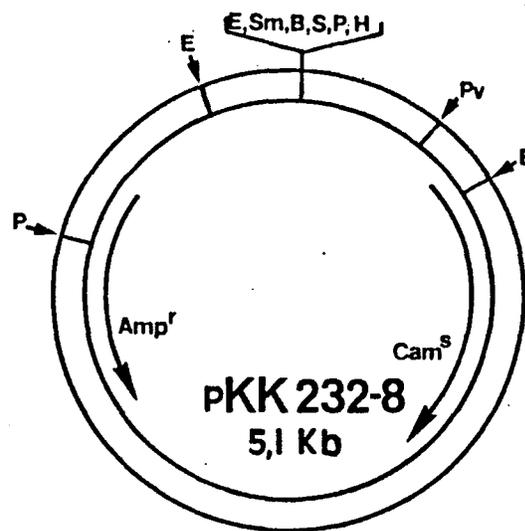


Figura 3: Mapa de restrição do plasmídio pKK232-8

E - EcoRI; Sm - SmaI; B - BamHI; S - SalI; P - PstI;

H - HindIII; Pv - PvuII;

Amp^r - resistência à ampicilina Cam^s - sensível à cloranfenicol

3.3. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA :

(MANDEL, M. & HIGA, A., 1970 - modificado)

Afim de amplificarmos e posteriormente isolarmos em maior escala o plasmídeo pIB176 contendo o fragmento Y-1, realizamos a transformação da bactéria HB101 com esse plasmídeo. Todas as soluções utilizadas nesse método e nos descritos a seguir encontram-se no apêndice.

1. Uma única colônia de *E. coli*- HB101 foi crescida em 5 ml de meio L, por 16 horas à 37°C. Ao final desse período inoculou-se 800 ul dessa cultura novamente em meio L e esta foi crescida até ter atingido D.O 550nm = 0,4. A cultura foi refriada por alguns minutos, centrifugada (15 minutos, 2500 rpm, 4°C), e o sobrenadante descartado.

2. O sedimento foi ressuspendido gentilmente em 10 ml de solução CaCl₂/Tris-HCl e incubado em gelo por uma hora. Novamente centrifugou-se, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 1 ml da solução CaCl₂/Tris-HCl. 200 ul da suspensão celular foram alíquotados e adicionou-se 500 ng do plasmídeo pIB176 incubando-se em gelo por uma hora. A seguir, as células foram submetidas à um choque térmico de noventa segundos à 42°C e imediatamente devolvidas ao gelo.

3. Foram adicionados 800 ul de meio L e incubou-se por mais uma hora à 37°C. Finalmente plaqueou-se 100 ul desse sistema por espalhamento das células em placas contendo meio L acrescido de ampicilina (50 ug/ml) e as placas foram incubadas em estufa por uma noite à 37°C.

Ao final desse processo, os clones recombinantes foram submetidos à mini-preparação plasmidial e extração em grande escala para o isolamento do plasmídeo pIB176.

3.4 MINI-PREPARAÇÃO E EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM LARGA ESCALA:

(MANIATIS & cols., 1982 - modificado)

Os plasmídios pIB176 contendo o fragmento Y-1 foram isolados da bactéria HB101 a partir de extração em pequena (mini-preparação a partir de 5 ml de cultura) e larga escala (a partir de 50 ml). Descreveremos aqui somente a extração em larga escala, pois para mini-preparação plasmidial utilizamos o mesmo protocolo porém em volumes reduzidos.

1. Um pré-inóculo da bactéria HB101 contendo o plasmídio pIB176 crescido à 37°C na presença de ampicilina (100 ug/ml) foi adicionado à 50ml de meio LB, e incubado sob agitação por 16 horas à 37°C. A seguir centrifugou-se (10 minutos, 5000 rpm) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com 20ml da solução de STE gelada e mantido no gelo.

2. Centrifugou-se novamente e o sedimento foi ressuspenso em 500 ul da solução I gelada e lisozima (10 mg/ml) e mantido à temperatura ambiente por cinco minutos. Adicionou-se então 1 ml da solução II previamente preparada e incubou-se no gelo por 10 minutos.

3. Adicionou-se 1,5 ml da solução III gelada e o material foi centrifugado (12000 rpm por quarenta e cinco minutos à 4°C). O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde adicionou-se RNase (20 ug/ml), e incubou-se por uma hora à 37°C.

4. Após a incubação, o material foi extraído por duas vezes com 2 ml de fenol/cloroformio/alcool isoamílico (25:24:1) homo-

geneizado por inversão e centrifugado à 5000 rpm por dez minutos à 4°C para separação das fases.

5. A fase aquosa superior foi retirada e extraída com clorofórmio, homogeneizada por inversão e centrifugada (5000 rpm por 10 minutos à 4°C). Transferiu-se o material para um novo tubo e precipitou-se com 0,6 volumes de isopropanol.

6. Após a incubação por 20 minutos à temperatura ambiente, o DNA plasmidial foi recuperado por centrifugação por 45 minutos à 7000 rpm, à temperatura ambiente. O sedimento foi lavado com 5 ml de etanol 70% (v/v), secado e ressuspendido em 200 μ l de TE pH 7,5.

3.5 MAPA DE RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO Y-1:

Após o isolamento do plasmídeo recombinante pIB176, determinamos o mapa de restrição do fragmento Y-1 por digestões consecutivas desse plasmídeo com nove enzimas: *HindIII*, *BamHI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HincII*, *KpnI*, *PstI*, *Sall* e *XbaI*. Todas as enzimas de restrição utilizadas foram adquiridas a *BRL-Bethesda Research Laboratories Life Technologies, Inc Gaithersburg, MD 20877 USA*. As reações de digestão foram realizadas com uma ou mais enzimas e o resultado das digestões foi verificado após corrida eletroforética em gel de agarose.

3.5.1 Digestão do DNA com enzimas de restrição:

As reações de digestão do DNA plasmidial foram realizadas com um excesso de 2 vezes de enzima (2 U de enzima por μ g de DNA). As reações foram, na maioria das vezes, incubadas de um dia

para o outro à 37°C, exceção feita à enzima *TaqI* cuja temperatura de incubação é de 65°. Os tampões de reação utilizados, do tipo **React**, foram adquiridos juntamente com as enzimas de restrição e diluídos no volume final da reação a concentração de 1x.

3.5.2 Eletroforese em gel de agarose:

Em cada amostra adicionou-se 1/6 do volume final de reação de azul de bromofenol. Os fragmentos foram então separados eletroforéticamente em gel de agarose 0,8% preparado com TBE 1x numa voltagem média de 40 V, utilizando-se como tampão de corrida TBE 1x. Como marcador de peso molecular utilizamos DNA de fago λ digerido com a enzima *HindIII* e/ou 1 Kb DNA ladder (*BRL, Inc. cat nº 58125A lot nº 64101*). Ao final da corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo por 20 minutos e o DNA visualizado por exposição à luz UV.

3.6 ISOLAMENTO DOS SUB-FRAGMENTOS:

Após a verificação do mapa de restrição do fragmento Y-1, foram realizadas digestões combinadas do plasmídeo pIB176, contendo o fragmento Y-1, com as enzimas *HindIII*, *EcoRI* e *BamHI*, visando o isolamento dos sub-fragmentos. Aproximadamente 15 ug de DNA plasmidial foram digeridos em cada reação, conforme descrito no item 3.5.1. Os produtos das reações de digestão foram separados por eletroforese em gel de agarose e visualizadas à luz UV. As bandas correspondentes aos fragmentos a serem isolados, foram retiradas do gel com o auxílio de um bisturi estéril e estocadas em um frasco estéril.

3.6.1 Purificação dos fragmentos:

Após a extração das bandas relativas aos fragmentos desejados do gel, utilizou-se o Kit "*gene clean*" adquirido do laboratório *BIO L01 Inc.* P.O Box 2284 La Jolla, CA 92038-2284 na purificação dos fragmentos de restrição.

1. Incubou-se as amostras por 5 minutos à 50°C, para a dissolução da agarose, em 2,5 volumes de solução de NaI. A seguir adicionou-se 5 ul da matrix silicosa "*glassmilk*" para cada 5ug de DNA (para cada 0,5 ug adicional, acrescentava-se 1 ul de sílica). O material foi incubado por uma noite à 4°C para permitir a ligação das moléculas de DNA à sílica.

2. O material foi então centrifugado por dois minutos a 4°C e o "sedimento silicoso" foi lavado e ressuspendido por três vezes com a solução "NEW WASH" gelada que acompanha o Kit. Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspendido em tampão TE 1x pH 7,5 e incubado por três minutos à 50°C.

3. Novamente, centrifugou-se por trinta segundos e o sobrenadante, correspondendo ao DNA purificado, foi coletado em um novo tubo estéril.

3.7 ANÁLISE DO DNA GENÔMICO PELO MÉTODO DE SOUTHERN:

As sequências isoladas foram avaliadas quanto à sua especificidade para o cromossomo Y utilizando-se o método de Southern (SOUTHERN, 1975). Filtros preparados com DNA genômico extraído de leucócitos periféricos de indivíduos normais do sexo masculino e feminino foram hibridizados com a sequência Y-1 e os sub-fragmentos isolados.

3.7.1 Extração de DNA genômico:

1. 20 ml de sangue foram coletados com anticoagulante EDTA 10% e o plasma foi descartado após centrifugação por 10 minutos à 2000 rpm à 4°C.

2. A lise celular foi procedida em duas etapas. Primeiro, os glóbulos vermelhos foram lisados com igual volume da solução tampão apropriada. Segundo, adicionou-se à amostra 10 ml de solução de lise de glóbulos brancos e 1 ml de SDS 20%. O material foi então incubado por 10 minutos à 37°C.

3. Feito isto, procedeu-se a duas extrações do DNA com igual volume de fenol:clorofórmio:alcool isoamílico (25:24:1) centrifugando-se por 20 minutos, 2500 rpm à 4°C, e uma extração com clorofórmio:alcool isoamílico (24:1).

4. A fase superior aquosa foi recuperada por outra centrifugação e transferida para um novo tubo estéril.

5. Precipitou-se o DNA com etanol absoluto gelado e estocou-se à -20°C por uma noite. O material foi então novamente centrifugado (5000 rpm, 4°C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O "pellet" de DNA foi lavado por duas vezes com etanol 70% e centrifugado (2500 rpm, 4°C, 10 minutos) e deixado secar.

6. Após a secagem, ressuspendeu-se o sedimento com 1 ml da solução TE 1x e o DNA solubilizado foi dialisado contra uma solução TE_d com três trocas em intervalos de uma hora e meia à temperatura ambiente. As concentrações das amostras foram determinadas em leitura espectrofotométrica, a 260 nm, e a pureza do material, verificada pela relação das leituras 260/280 nm.

7. A seguir, 10 ug de DNA genômico foram digeridos (conforme descrito no sub-ítem 3.5.1) com um excesso de 5 vezes de diferentes enzimas de restrição num volume final de 100 ul. Após a precipitação do DNA fracionado pela adição de 1 ul de RNA de levedura (100 ug/ml), 20 ul de acetato de sódio 2M e 2,5 volumes de etanol absoluto pH 7,5 e incubação por uma noite à -20°C, o sedimento recuperado por centrifugação foi lavado 2 vezes com etanol 70 % e deixado secar.

8. As amostras foram ressuspendidas em 15 ul de TE 1x pH 7,5 contendo 3 ul de azul de bromofenol e aplicadas em um gel de agarose. A eletroforese deu-se nas mesmas condições descritas no ítem 3.5.2.

3.7.2 Transferência pelo método de Southern:

(SOUTHERN, E.M., 1975 - modificado)

Antes da transferência dos fragmentos de DNA contidos no gel para a membrana de nylon (S&S Nytran lote nº 04199, Keene nit 03431) procedeu-se à desnaturação do gel, de acordo com o seguinte tratamento:

1. Uma lavagem com solução ácida por 15 minutos.
2. Duas lavagens com uma solução alcalina por 30 minutos.
3. Duas lavagens com uma solução neutralizante por 40 minutos cada.

Após esse tratamento o gel foi colocado em uma cuba contendo uma solução de 20x SSC e procedeu-se a transferência dos fragmentos de restrição nele contido com o auxílio de pontes de papel Whatmann 3 MM previamente embebidas em uma solução de 20x SSC. Sobre o gel colocou-se uma membrana de nylon umedecida em água estéril, mais duas folhas de papel 3 MM também umedecidos em 20xSSC e uma boa quantidade de papel absorvente. Sobre todo o conjunto acrescentou-se um peso homogeneamente distribuído. As bordas do gel foram isoladas com Vitafilm, evitando a passagem da solução diretamente para o papel absorvente. Após um período de 12 à 18 horas, o sistema foi desmontado e a membrana após ser secada, foi incubada em estufa à vácuo à 80°C por duas horas.

3.7.3 Marcação das sondas com isótopo radioativo:

A marcação do fragmento Y-1 e dos sub-fragmentos para posterior hibridização, foi feita pelo método de "random primer" (FEINBERG & VOCELSTEIN, 1983) com nucleotídeos radioativos adquiridos à Amersham International, Amersham UK PB10204.

A reação foi realizada da seguinte forma:

100 ng de DNA a ser marcado, foi diluído em água estéril qsp 50 ul, já levando em conta a adição dos outros reagentes à reação. O DNA foi então desnaturado à 95°C por 5 minutos.

Ao DNA desnaturado foram adicionados os seguintes reagentes:

- 10 ul da solução OLB
- 2 ul de BSA
- 3 ul de [α - 32 P] dATP (30 uC)
- 2 ul de DNA polimerase-Klenow

A reação foi realizada no gelo e logo após, incubada por aproximadamente 20 horas à 37°C, após o que, foi interrompida com 100 ul de TE 1x pH 8,0.

Os nucleotídeos livres, não incorporados à sonda, foram separados por centrifugação em coluna de Sephadex G-50 equilibrada com TE 1x pH 7,5. A incorporação pela sonda de nucleotídeos marcados foi

avaliada em equipamento de cintilação líquida. Um mínimo de 2×10^6 cpm por ml de solução de hibridização foi utilizado para cada filtro.

3.7.4 Hibridização:

(MANIATS & col., 1982 - modificado)

Os filtros foram colocados em um saco plástico onde adicionou-se a solução de pré-hibridização em quantidade suficiente para umedecer o filtro. Após incubação por no mínimo 4 horas a 42°C sob agitação, a solução foi descartada e se adicionou uma solução de hibridização com dextran sulfato numa proporção 4:1 e a sonda desnaturada. O material foi novamente incubado por 16 horas à 42°C sob constante agitação.

A lavagem dos filtros deu-se em condições de alta e baixa estringência. Os filtros hibridizados com os sub-fragmentos Y-1.a e Y-1.c foram lavados uma vez com a solução A, por 15 minutos à temperatura ambiente e por duas vezes com a solução B, por uma hora à 50°C (em condições de baixa estringência). Os filtros hibridizados com o fragmento Y-1 e os sub-fragmentos Y-1.b1 e Y-1.b2 foram lavados uma vez por 40 minutos com a solução C à temperatura ambiente, duas vezes com a solução D por 45 minutos à 56°C e uma última vez com a solução E, rapidamente à temperatura ambiente (em condições de alta estringência).

Cada membrana foi então envolvida em vitafilm e exposta à filme X-OMAT AR (Kodak diagnostic film cat 1651454) na presença de placas intensificadoras (Quanta III - Sigma) por períodos variáveis de 3 à 15 dias estocados à -70°C .

3.8 CLONAGEM DO FRAGMENTO Y-1 NO PLASMÍDIO pKK232-8

Visando verificar se a sequência Y-1 poderia ativar a expressão gênica, realizamos a clonagem dessa sequência no plasmídeo pKK232-8, gentilmente cedido pelo Laboratório de Genética Molecular de Bactérias - CBMEG - UNICAMP.

O plasmídeo pKK232-8 é um plasmídeo característico de uma família de plasmídios "*promoters-probe*" (WEST & RODRIGUES, 1982; BROSIUS, 1984) e foi descrito por BROSIUS, 1984. Esse plasmídeo apresenta um gene (*CAT*), que confere, à bactéria transformada, resistência ao antibiótico cloranfenicol. O gene *CAT* codifica uma enzima, cloranfenicol acetil-transferase, que acetila o cloranfenicol inativando-o. Entretanto no plasmídeo original o gene *CAT* aparece inativo. Fragmentos clonados em posição anterior à esse gene e que possuam uma ou mais sequências promotoras, podem ativar a expressão do gene *CAT*. Portanto, a presença de sequências promotoras, num fragmento clonado nesse plasmídeo, pode ser verificada pela resistência adquirida da bactéria transformada ao antibiótico cloranfenicol. Desse modo, o plasmídeo pKK232-8 tem sido utilizado na seleção de sequências promotoras.

3.8.1 Digestão do vetor e ligação dos fragmentos:

8 µg do plasmídeo pKK232-8 foram digeridos com a enzima *HindIII*, durante a noite, à 37°C. Após este período, o DNA plasmídial foi extraído duas vezes com fenol e precipitado com 1 volume de acetato de amônia 7,5 M e 2,5 volumes de etanol absoluto por uma noite à 20°C. Após a precipitação, centrifugou-se (30 minutos, 4°C) e ressuspendeu-se o sedimento em 10 µl de água estéril.

A seguir o plasmídeo digerido foi incubado com 250 unidades da enzima *BAP* (*Bacterial Alkaline Phosphatase* - BRL cat nº 8235 5A) e Tris-HCl 500mM pH 8,0 por 1 hora à 65°C visando a desfosforilação do vetor e, com isso, aumentar a eficiência de ligação da sequência Y-1 ao plasmídeo. Após esse tratamento, procedeu-se a outra extração de enzima, conforme descrito anteriormente.

Aproximadamente 400 ng do plasmídeo pKK232-8 digerido e desfosforilado, foram então ligados à 250 ng de inserto Y-1 com 10 unidades da enzima ligase (*BRL- M13 system cloning* - cat nº8235 5A) por 20 horas à 16°C. 120 ng da reação de ligação pKK232-8/Y-1 foram utilizados na transformação da bactéria HB 101 (ver item 3.3). As células transformadas foram espalhadas para uma primeira seleção, em placas contendo meio de cultura e ampicilina e incubadas durante a noite à 37°C.

3.8.2 Transferência dos clones recombinantes

As colônias crescidas nas placas contendo ampicilina foram reinoculadas por palitagem em placas contendo ampicilina (100 ug/ml) e consecutivamente, em placas contendo cloranfenicol em três concentrações diferentes (5 ug/ml, 10 ug/ml e 30 ug/ml). Além das colônias obtidas, foram também palitados como controle experimental, células de uma colônia da linhagem HB101 não transformadas e células transformadas com o plasmídeo pKK232-8 sem o inserto Y-1. Após o palitagem, as placas foram novamente incubadas em estufa à 37° C por uma noite.

3.8.3 Isolamento e verificação da orientação do fragmento Y-1 nos clones recombinantes:

Os plasmídios de 10 clones recombinantes, que cresceram tanto na presença de ampicilina como de cloranfenicol, foram extraídos por mini-preparação, e 6 deles, extraídos em larga escala (ver ítem 3.4). Após a digestão de 1,5 ug de DNA plasmidial com a enzima *HindIII* verificou-se a liberação do fragmento Y-1 em mini-gel.

Também com a digestão de 1,5 ug de DNA do plasmídeo recombinante pIBN176 com a enzima *BamHI*, obtivemos a posição de inserção do fragmento Y-1 no plasmídeo. As bandas correspondentes aos fragmentos resultantes da digestão com a enzima *BamHI* também puderam ser verificadas após a corrida eletroforética destes em gel de agarose.

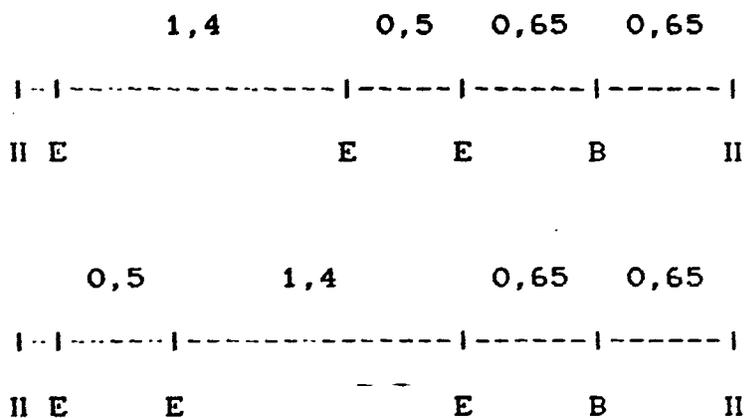
4. RESULTADOS

4.1 MAPA DE RESTRIÇÃO DA SEQUÊNCIA Y-1:

A estratégia e os métodos, bem como as enzimas utilizadas no mapa de restrição da sequência Y-1 estão descritos no item 3.5. O gel apresentando os fragmentos obtidos após as digestões do plasmídeo recombinante pIBI76 contendo o fragmento Y-1, pode ser observado na figura 5. Os resultados obtidos permitiram sugerir as seguintes possibilidades para o mapa de restrição da sequência Y-1:

Figura 4

A SEQUÊNCIA Y-1 (3,2 Kb):



OBS: II= *HindIII*, B= *BamHI*, E= *EcoRI*. As unidades representadas correspondem ao tamanho aproximado dos fragmentos em Kilobases de DNA (1Kb= 1000 pares de base).

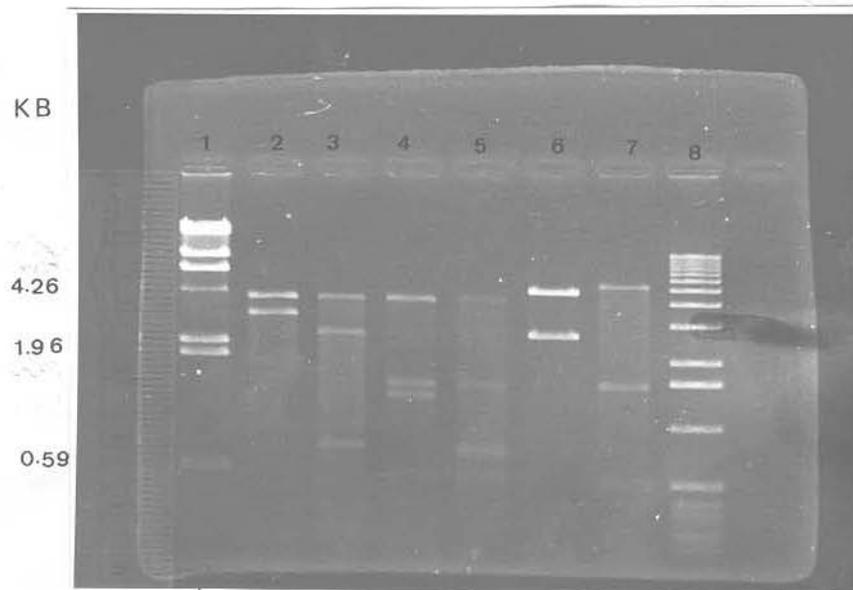


Figura 5 Perfil de digestão do plasmídio recombinante pIBI76 com as enzimas *HindIII* (2), *HindIII/BamHI* (3), *HindIII/EcoRI* (4), *HindIII/BamHI/EcoRI* (5), *BamHI* (6), *EcoRI* (7). DNA de fago λ digerido com *HindIII* (1), 1 Kb DNA ladder (8).

4.2 ISOLAMENTO DOS "SUB-FRAGMENTOS":

As reações de digestão realizadas para o isolamento dos sub-fragmentos, bem como a metodologia utilizada na sua purificação estão descritas no item 3.6. Os fragmentos foram isolados a partir de duas digestões combinadas, *EcoRI/BamHI* e *HindIII/BamHI*.

Os fragmentos após o isolamento foram designados da seguinte forma:

Y-1.a = fragmento de 1,4 Kb de extremidades *EcoRI/EcoRI*.

Y-1.b1 = fragmento de 0,65 Kb de extremidades *EcoRI/BamHI*.

Y-1.b2 = fragmento de 0,65 Kb de extremidades *HindIII/BamHI*.

Y-1.c = fragmento de 0,5 Kb de extremidades *EcoRI/EcoRI*.

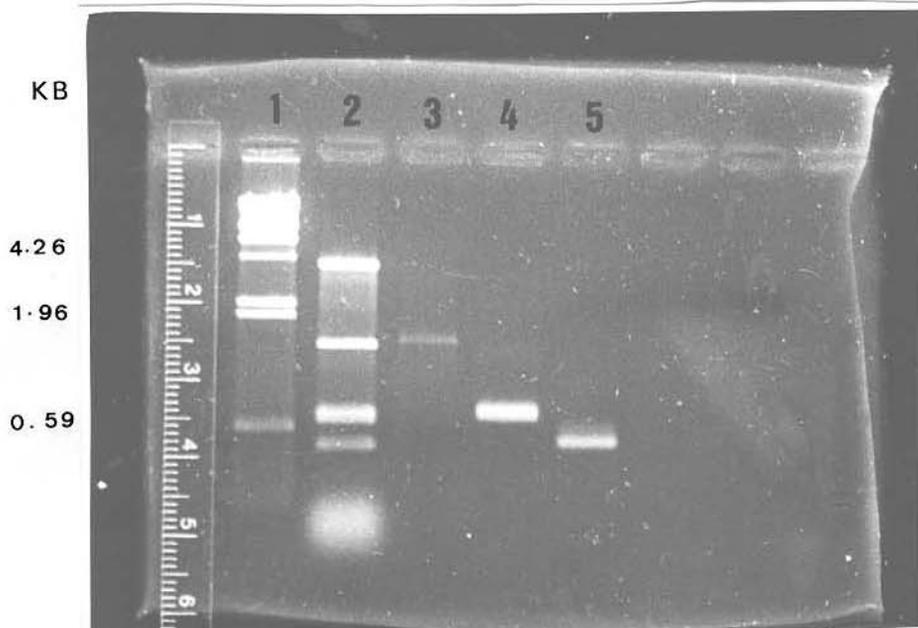


Figura 6 Perfil dos sub-fragmentos Y-1.a (3), Y-1.b1(4), Y-1.c (5). DNA de fago λ digerido com *HindIII* (1), plasmídeo pIB176 digerido com as enzimas *HindIII/BamHI/EcoRI*.

4.3 HIBRIDIZAÇÃO DA SEQUÊNCIA Y-1 E SUB-FRAGMENTOS:

A sequência Y-1 foi marcada e hibridizada conforme descrito no item 3.7 com filtro contendo DNA genômico de indivíduos normais do sexo masculino e feminino digeridos com as enzimas *BglIII*,

TaqI, *XmnI* e *HincII* e lavado sob condições de alta estrin-
gência.

As hibridizações revelaram que apesar de apresentar certa homologia com DNA genômico feminino, visualizado pelo padrão de bandas observado no experimento de hibridização, a sequência Y-1 apresenta algumas bandas Y-específicas.

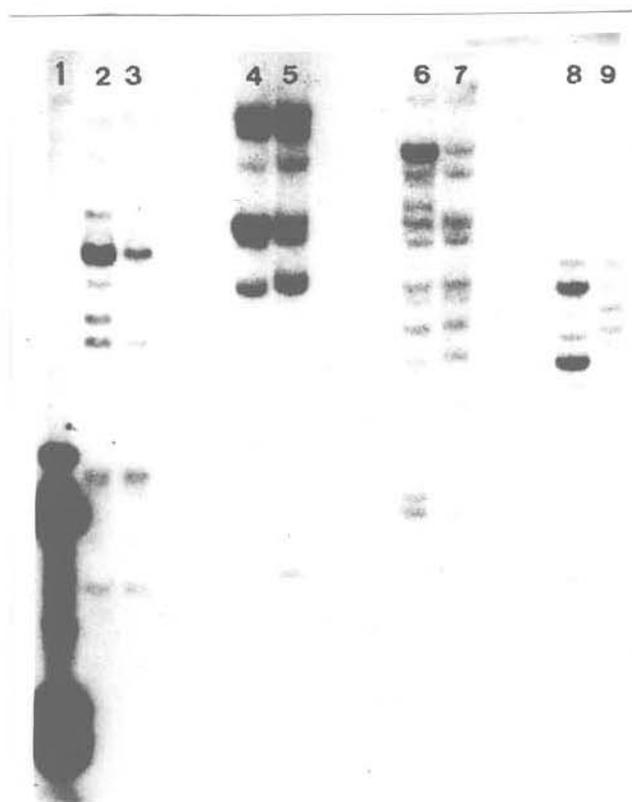


Figura 7 Hibridização da sequência Y-1 com DNA genômico de homem e mulher normais digeridos respectivamente com as enzimas *BglIII* (colunas 2 e 3), *XmnI* (colunas 4 e 5), *HincII* (colunas 6 e 7), *TaqI* (colunas 8 e 9). DNA de fago λ digerido com *HindIII*(1).

Os sub-fragmentos isolados foram também hibridizados com filtros contendo DNA genômico, visando selecionar um fragmento que se apresentasse mais específico ao cromossomo Y que o fragmento Y-1.

O fragmento Y-1.a hibridizado com filtro preparado com a enzima *EcoRI* demonstra uma banda Y-específica. A hibridização do fragmento Y-1.b2 com filtro contendo DNA genômico de homem e mulher normais digerido com as enzimas *BglIII* e *EcoRI* demonstra um padrão de bandas diferente para cada sexo, incluindo uma banda só visualizada na coluna correspondente ao DNA genômico feminino.

Sob condições de alta estringência, o fragmento Y-1.b1 hibridizou apenas com DNA genômico masculino, no filtro preparado com a enzima *XbaI*, demonstrado por uma banda única de 9,4 Kb. Em uma outra hibridização dessa sonda com filtro preparado com a enzima *HincII*, observamos um padrão de bandas específico para cada sexo, verificado pela presença de duas bandas de 11,8 e 6,2 Kb, sendo a banda de peso molecular 11,8 Kb, específica para o cromossomo Y.

A hibridização do fragmento Y-1.c com DNA genômico de homem e mulher digeridos com as enzimas *BglIII* e *EcoRI*, demonstrou homologia com DNA genômico feminino, porém, como o fragmento Y-1 original, algumas bandas só foram verificadas nas colunas correspondendo a DNA genômico masculino.

Os resultados das hibridizações podem ser visualizados nas figuras 8 à 11.



Figura 8 Hibridização do fragmento Y-1.a com DNA genômico de homem (coluna 2) e mulher (coluna 3) normais digerido com *EcoRI*. DNA de fago λ digerido com *HindIII* (coluna 1).



Figura 9 Hibridização do fragmento Y-1.b2 com DNA genômico de homem e mulher normais digerido com *BglIII* (colunas 1 e 2) e *EcoRI* (colunas 3 e 4).

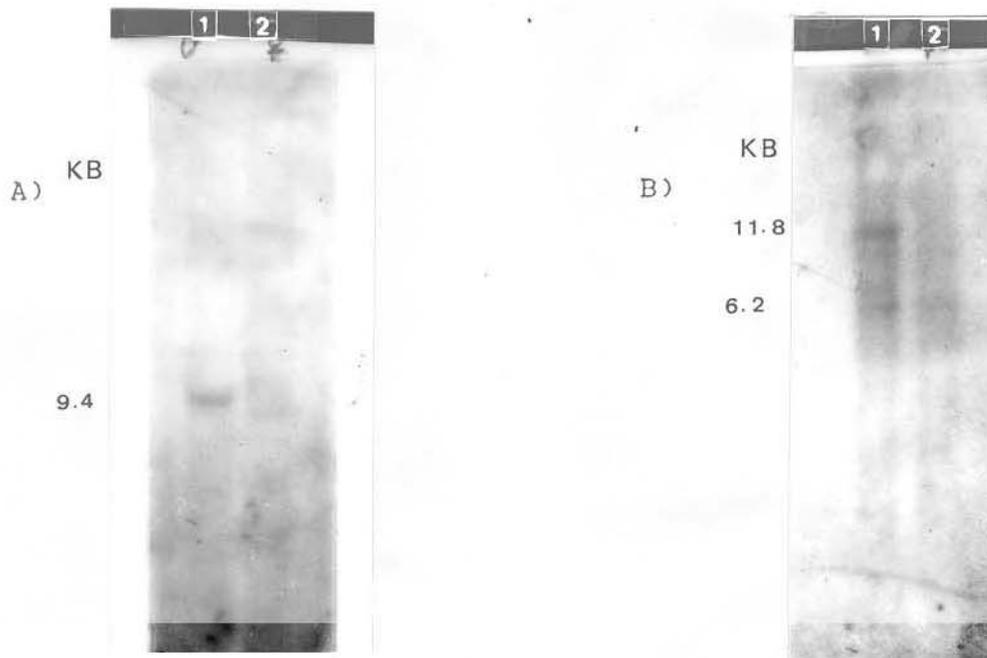


Figura 10 Hibridizações do fragmento Y-1.b1 com DNA genômico de homem e mulher normais digeridos com *Xba*I (figura 10-A, colunas 1 e 2) e *Hinc*II (figura 10-B, colunas 1 e 2).



Figura 11 Hibridização do fragmento Y-1.c com DNA genômico de homem e mulher normais digeridos com a enzima *Eg*III (colunas 1 e 2) e *Eco*RI (colunas 3 e 4).

4.4 CLONAGEM DA SEQUÊNCIA Y-1 NO PLASMÍDIO pKK232-8:

No intuito de verificarmos se a sequência Y-1 seria capaz de promover a expressão gênica, o que poderia indicar a existência de sequências promotoras em seu interior, utilizamos o sistema de clonagem do plasmídeo pKK232-8 descrito por BROSIUS (1984).

Para esse fim, a sequência Y-1 foi clonada no sítio de restrição *HindIII* do plasmídeo pKK232-8. O plasmídeo recombinante contendo agora a sequência Y-1 foi denominado pKK232-8/Y-1.

4.4.1 Seleção dos clones recombinantes:

— —

Numa primeira seleção dos recombinantes contendo o inserto Y-1, em meio de cultura contendo ampicilina (100 ug/ul), após o espalhamento de 100 ul de células transformadas, obtivemos um total aproximado de 150 clones. Somente as células da linhagem HB101 transformadas pelo plasmídeo, cresceriam em meio contendo o antibiótico.

Os recombinantes selecionados inicialmente em placa contendo ampicilina foram transferidos para placas contendo cloranfenicol nas concentrações de 5, 10 e 30 ug/ml. Como controle de crescimento e de competência das células, utilizamos a bactéria HB101 transformada com o plasmídeo pKK232-8 sem inserto e a bactéria não transformada.

Diversas colônias, transferidas da seleção inicial com ampicilina para placas contendo cloranfenicol sobreviveram nesse meio

tanto nas concentrações de 10 ug/ml como 30 ug/ml de cloranfenicol. Nessas concentrações de antibiótico não foi observado qualquer crescimento dos controles utilizados. Com 5 ug/ml de cloranfenicol, observamos tanto o crescimento dos clones recombinantes como dos controles utilizados. Desse modo, a concentração mínima de cloranfenicol exigida para diferenciar os clones recombinantes é de 10 ug/ml.

Dez clones, selecionados entre aqueles que cresceram em meio sólido contendo tanto ampicilina como cloranfenicol foram submetidos à uma mini-preparação plasmidial para verificar a presença do plasmídio pKK232-8/Y-1. Após a mini-preparação, todos os clones selecionados possuíam o plasmídio (figura 12). Em seis clones realizamos extração em maior escala de plasmídios, que foram depois, digeridos

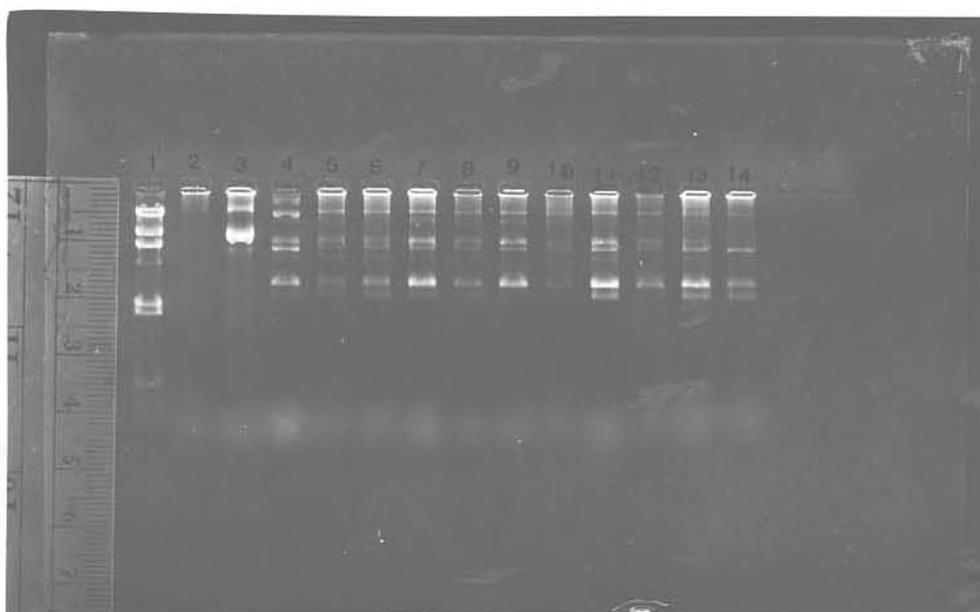


Figura 12 Perfil dos plasmídios extraídos por minipreparação. DNA de fago λ digerido com *HindIII* (1), HB101 não transformada (2) Plasmí-
dio pMFY-40 usado como controle de extração (3), pKK232-8 (4), plasmí-
dios extraídos dos clones (5 à 14).

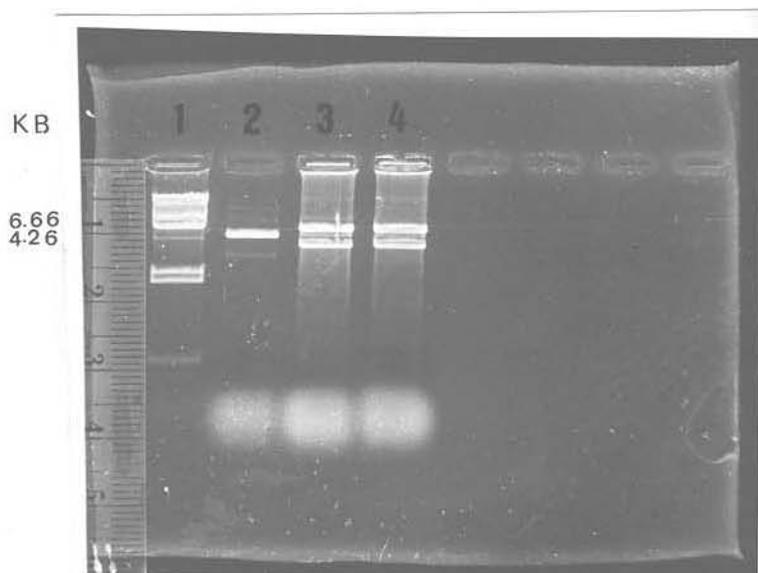


Figura 13 Perfil da digestão do plasmí-
dio pKK232-8/Y-1 com a en-
zima *HindIII*. DNA de fago λ digerido com *HindIII*(1). Plasmí-
dio

pKK232-8 digerido com *HindIII*(2). Clone C52 digerido com *HindIII* liberando um fragmento de 3.2 Kb (3). Clone C3 digerido com *HindIII* (4).

4.4.2 Verificação da orientação da sequência Y-1 nos clones recombinantes:

A construção do mapa de restrição do fragmento Y-1 possibilitou nos verificar a orientação do fragmento no plasmídio pKK232-8. Para este fim, realizamos uma digestão do plasmídio pKK232-8/Y-1 com a enzima *BamHI*. Como pode ser observado na figura 14, a digestão produziu 2 bandas de 2,55 kb e 5,75 kb, aproximadamente, que, permite demonstrar o sub-fragmento Y-1.b2 como sendo a região mais próxima ao início da transcrição do gene *CAT*, como pode ser observado na figura 15.

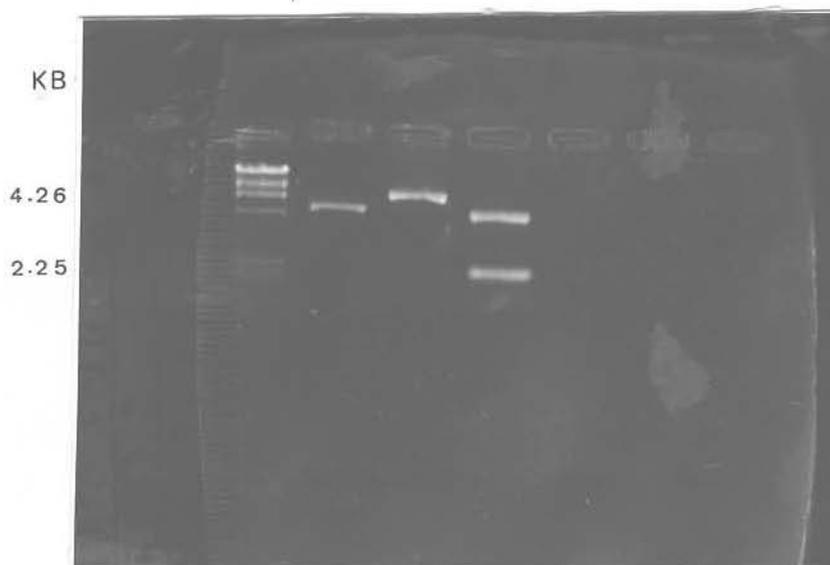


Figura 14 Perfil do plasmídio pKK232-8/Y-1 digerido com a enzima *BamHI* (4). DNA de fago λ digerido com *HindIII* (1), pKK232-8 digerido com *HindIII* (2), pKK232-8/Y-1 digerido parcialmente com *BamHI*(3).

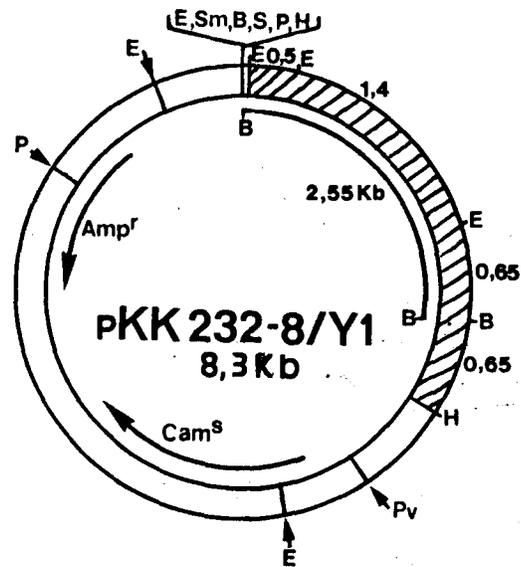


Figura 15 Mapa de restrição do plasmídeo pKK232-8/Y-1. A linha determinando tamanho em Kb corresponde ao fragmento gerado pela digestão do plasmídeo pKK232-8/Y-1 com a enzima *BamHI*.

E - EcoRI; P - PstI; Sm - SmaI; B - BamHI; S - SalI;

H - HindIII; Pv - PvuII; Amp^r - resistência à ampicilina

Cam^S - sensibilidade à cloranfenicol.

5. DISCUSSÃO

O isolamento da sequência Y-1 a partir de um banco cromossômico enriquecido para a porção eucromática do cromossomo Y e a utilização de técnicas de DNA recombinante, permitiu-nos uma série de estudos moleculares, visando utilizar essa sequência do cromossomo Y à nível de rotina laboratorial e pesquisar a existência de sequências promotoras nesse fragmento.

Experimentos de hibridização utilizando o fragmento Y-1 forneceram algumas informações importantes para um conhecimento mais aprofundado dessa sequência. A hibridização da sequência Y-1 com filtros contendo DNA genômico de homem e mulher digerido com diferentes enzimas de restrição, possibilitou-nos observar que esta apresenta um grau de homologia também com DNA genômico feminino, verificado em todas as hibridizações realizadas. Entretanto, paralelamente demonstrou sempre algumas bandas Y-específicas para o cromossomo Y, que são visualizadas nas linhas correspondentes ao DNA genômico masculino.

A determinação do mapa de restrição dessa sequência permitiu-nos entre outros aspectos, o isolamento de fragmentos menores a partir do fragmento original e com isso tivemos a oportunidade de também caracterizá-los e analisar a especificidade destes para o cromossomo Y.

Um dos fragmentos isolados (Y-1.b1), mostrou em todas as hibridizações realizadas, apresentar um padrão de bandas específico para o cromossomo Y. Hibridizado com DNA genômico digerido com *XbaI* demonstrou uma banda única de 9,4 Kb, apenas com DNA genômico de origem masculina. Em uma outra hibridização dessa sonda realizada com DNA genômico masculino e feminino digerido com a enzima *HincII*, observamos a presença de duas bandas, de 11,8 Kb e 6,2 Kb, sendo a banda de 11,8 Kb, específica para o cromossomo Y.

Resultados semelhantes aos nossos foram descritos por BISHOP *et al.*, (1983 e 1984), onde o autor observa uma única banda específica ao cromossomo Y, porém não observamos semelhança em relação ao peso molecular das bandas verificadas pelo autor com os nossos resultados.

Também BISHOP *et al.* (1983), VERGNAUD *et al.*, (1986) e SMITH *et al.*, (1987) descrevem sondas, onde a especificidade ao cromossomo Y era devido a um padrão de hibridização diferente entre DNA genômico feminino e masculino. Como os nossos resultados, estas sondas detectam a presença de duas bandas no DNA genômico masculino enquanto que em DNA de origem feminina somente uma das bandas estava representada.

A aplicação do fragmento Y-1.b1 para fins de diagnóstico sexual é recomendada, já que esse fragmento apresenta à alta estrin-gência, grande especificidade com DNA genômico masculino.

Além disso, visando verificar se a sequência Y-1 possuía alguma sequência promotora que pudesse promover a expressão gênica, utilizamos o sistema de clonagem do plasmídeo pKK232-8.

O experimento de clonagem do fragmento Y-1 no plasmídeo pKK232-8 permitiu-nos verificar que esse fragmento pode conter sequências que possuam atividade promotora. Essa estratégia já havia sido utilizada anteriormente por BROSIUS (1984), que através da clonagem de fragmentos de DNA total do bacteriófago λ digerido com a enzima *Alu* no plasmídeo "promotor-probe" pKK175-6, pôde obter diversos clones que presumivelmente contém promotores ativos. Mais recentemente, esse sistema foi utilizado na clonagem de sequências de *X.campestris* (sequências procarióticas) (PIMENTA, 1990) e de *T.cruzi* (sequências eucarióticas) (MARCELINO, 1989).

Em nosso experimento, o crescimento das células da linhagem HB101 de *E.coli* transformadas com a ligação pKK232-8/Y-1, em meio de cultura contendo ampicilina, garantiu-nos que estas portavam o plasmídeo pKK232-8, já que células dessa linhagem não transformadas, são sensíveis à concentração de antibiótico utilizada como demonstrado pelos nossos controles. Porém, isso não nos garantia que o plasmídeo portasse o fragmento Y-1.

Após transferência para placas contendo cloranfenicol, vários clones sobreviveram tanto em meio sólido como líquido contendo o antibiótico, nas concentrações de 10 e 30 ug/ml. Dez clones (C3, C5, C8, C9, C13, C40, C52, C89, C90 e C93) tiveram seus plasmídios extraí-

dos por minipreparação e seis (C3, C8, C9, C52, C90, C93) foram submetidos à extração plasmidial em grande escala. Numa análise preliminar, pelo menos dois clones C52 e C3 liberaram o fragmento Y-1 (3.2 Kb) após digestão com a enzima *HindIII*.

Com a demonstração da presença do fragmento Y-1 nesses dois clones, podemos concluir que o crescimento da bactéria em meio contendo cloranfenicol foi decorrente da ativação do gene *CAT* pela sequência Y-1.

A comprovada ativação do gene *CAT* pelo fragmento Y-1, nos permite sugerir a existência nesse fragmento de regiões que possuam uma ou mais sequências com características promotoras, capazes de atuar na ativação desse gene. Um fato que caracteriza essas regiões é a sua proximidade à posição +1 da molécula de DNA, que corresponde à primeira base a ser transcrita. Podendo ser citado como exemplo de constituintes dessas sequências em eucariontes, o quadro TATA e o quadro CAAT localizados respectivamente à -25 e -80 pb do início da transcrição, correspondentes eucarióticos das sequências -10 e -35 em procariontes.

A analogia existente entre essas regiões características de sequências promotoras em procariontes e eucariontes pode ter permitido o reconhecimento de uma sequência promotora no fragmento Y-1 pela maquinaria de transcrição das células de *E. coli*, possibilitando a transcrição do gene *CAT*.

Visando verificar a região do fragmento Y-1 que se encontrava mais próxima ao início da transcrição do gene *CAT*, determinamos a posição de inserção do fragmento Y-1 no plasmídeo pKK232-8 a partir de digestões realizadas com a enzima *BamHI*. Os resultados obtidos permitem supor que sequências promotoras devem estar localizadas na região correspondente ao sub-fragmento Y-1.b2, já que foi verificado ser esta a região mais próxima do início da transcrição do gene e *CAT*.

Conhecendo-se o fato que sequências promotoras estão geralmente situadas numa posição imediatamente anterior a genes, é razoável supor então que a sequência Y-1 possa comportar um gene ou parte de um gene, ou ser uma região bastante próxima à algum gene no cromossomo Y. A confirmação desse fato poderá ser feita utilizando-se as técnicas de sequenciamento possibilitando determinar a existência e o posicionamento de sequências promotoras neste fragmento, uma vez que essas sequências são consensuais apresentando grande similaridade entre diferentes organismos.

Além disso, se com a utilização de técnicas de sequenciamento verificarmos que essa sequência contém parte de um gene, será possível isolarmos a sequência contendo o gene completo aplicando a estratégia de "*chromosome walking*". Para esse fim, um banco cromossômico do Y poderia ser investigado usando-se a sonda Y-1, na expectativa de selecionar outros clones com sequências que se estendam além dos limites do fragmento Y-1.

A utilização de técnicas de Biologia Molecular no estudo de uma sequência isolada do cromossomo Y, nos permitiu um aprofundamento adequado na abordagem de alguns aspectos característicos relativos à sequência Y-1 em particular, e de uma forma geral, pesquisar o ainda complexo e desconhecido funcionamento desse cromossomo. Questões como mecanismos de regulação gênica, existência de sequências geneticamente ativas e de sequências promotoras permanecem ainda pouco esclarecidas. Desta forma, estudos nessa direção poderiam até mesmo contribuir na descoberta e determinação de um maior número de genes localizados nesse cromossomo.

Deve-se também notar a grande contribuição da utilização de técnicas de DNA recombinante na área específica de Genética Humana, atuando muitas vezes como um complemento muito mais sensível do que as técnicas atuais empregadas em citogenética humana. Esta nova abordagem tem permitindo uma análise mais apurada de alguns casos clínicos, nos quais, o emprego sistemático da citogenética não obtém uma resolução ideal na análise cariotípica desses indivíduos.

Finalmente, o emprego rotineiro em uso laboratorial e clínico, e o estudo acadêmico de sequências do cromossomo Y humano, pode e deve acentuar a concentração de informações disponíveis à respeito desse cromossomo e de uma forma mais ampla, ao estudo molecular do genoma humano.

6. CONCLUSÕES:

1. Pudemos concluir que a sequência Y-1, apesar de apresentar bastante homologia com o cromossomo X e/ou autossomos, possui também regiões específicas para o cromossomo Y. A partir das hibridizações realizadas, pudemos determinar que estas regiões correspondem ao sub-fragmento Y-1.b1
2. A partir da clonagem da sequência Y-1 no plasmídeo pKK232-8, verificamos que a sequência Y-1 foi capaz de ativar a expressão gênica. Desse modo podemos sugerir que a ativação gênica pelo fragmento Y-1 tenha sido devido a existência nesse fragmento, de sequências promotoras.
3. O fragmento Y-1.b2 é a região da sequência Y-1 mais próxima ao gene ativado *CAT*. Com isso, podemos sugerir que possíveis sequências promotoras encontram-se nessa região.

7. APÊNDICE

MEIOS DE CULTURA

MEIO LB

Bacto-triptona ----- 1,0%
Extrato de levedura ---- 0,5%
NaCl ----- 1,0%
pH 7,5 ajustado com NaOH ou HCl

MEIO L

Bacto-Triptona ----- 1,0%
Extrato de levedura ---- 0,5%
NaCl ----- 0,5%
pH 7,2 ajustado com NaOH ou HCl

MEIO L para placas

Bacto-Triptona ----- 1,0%
Extrato de levedura ---- 0,5%
NaCl ----- 0,5%
Bacto-agar ----- 1,5%
pH 7,2 ajustado com NaOH ou HCl

OBS: Todos os meios de cultura após sua preparação, foram autoclavados à 127°/ 1,5 atm por vinte minutos.

ANTIBIÓTICOS

Ampicilina

Foram adicionados 25 mg de antibiótico à 1 ml de água estéril. Filtrou-se em membrana porosa (marca milli-pore) estocou-se à -20°C.

Cloranfenicol

Foram adicionados 34 mg do antibiótico à 1 ml de etanol 100 % e estocou-se à -20°C.

SOLUÇÕES

Solução utilizada na transformação bacteriana:

CaCl₂ / Tris-HCl

CaCl₂ --- 50 mM

Tris-HCl ----- 10 mM (pH 8,0)

Soluções utilizadas em mini-preparação e extração de plasmídios
em larga escala:

TE 1x

Tris-HCl ----- 10 mM (pH 7,5)

EDTA ----- 5 mM

STE

NaCl ----- 0,1 M

Tris-HCl ----- 10 mM (pH 8,0)

EDTA ----- 1 mM

Solução de RNase A

RNase A ----- 10 mg/ml

Dissolvida em :

Tris-HCl ----- 10 mM (pH 7,5)

NaCl ----- 15 mM

Fervida em banho-maria por 10 minutos.

Solução I

Tris-HCl ----- 25 mM

EDTA ----- 10 mM

Glicose ----- 50 mM

Solução II

NaOH ----- 0,2 M

SDS ----- 1%

Solução III

Acetato de Potássio -- 5 M (pH 5,2)

Fenol:Clorofórmio:Alcool isoamílico

Fenol bidestilado -- 25x

Clorofórmio ----- 24x

Alcool isoamílico -- 1x

Hidroxiquinolina --- 0,08 %

Após a mistura, tamponava-se com Tris-HCl 20mM
(pH 8,0).

Clorofórmio/Alcool isoamílico

Clorofórmio ----- 96 %

Alcool isoamílico -- 4 %

Etanol 70 %

etanol ----- 70 %

estocado à -20°C.

Soluções utilizadas em Eletroforese:

T.B.E (10 x)

Trizma-base ----- 89 mM

EDTA ----- 2,5 mM

Ácido bórico ----- 89 mM

Azul de bromofenol

Sacarose ----- 25 %

Acetato de sódio -- 5 mM

Azul de bromofenol- 0,05 %

Brometo de Etídeo

Brometo de etídeo -- 8 mg/ml de água estéril

Soluções utilizadas em extração de DNA genômico:

Solução de lise de glóbulos vermelhos:

Tris-HCl ----- 10 mM (pH 7,6)

Mg₂Cl ----- 5 mM

NaCl ----- 10 mM

Solução de lise de glóbulos brancos:

NaCl ----- 300 mM

EDTA ----- 10 mM

Tris-HCl ----- 10 mM (pH 7,5)

TEd (tampão de diálise)

Tris-HCl ----- 1 mM (pH 8,0)

EDTA ----- 100 uM

Soluções de desnaturação das amostras contidas no gel:

Solução ácida

HCl ----- 0,25 N

Solução alcalina

NaOH ----- 0,5 M

NaCl ----- 1,5 M

Solução neutralizante

NaCl ----- 3 M

Tris-HCl ----- 0,5 M (pH 7,5)

Solução utilizada na transferência do DNA para os filtros:

SSC (20 x)

NaCl ----- 3 M

Na Citrato ----- 0,3 M

Soluções utilizadas na marcação da sonda pelo método de "random-primers"

Solução OLB

Soluções A, B, C nas proporções de 100: 250: 150 respectivamente.

Solução A:

solução O	-----	1,0 ml
2-ME	-----	18,0 ul
solução de dTTP	-----	10,0 ul
solução de dGTP	-----	10,0 ul
solução de dCTP	-----	10,0 ul

Solução O:

Tris-HCl	-----	1,25 M (pH 8,0)
Mg ₂ Cl	-----	125,0 mM

Soluções de dNTPs

dNTPs	-----	100,0 mM (pH 7,0)
-------	-------	-------------------

dissolvido em água; pH acertado com trizma base.

Solução B

HEPES 2,0 M (pH 6,6)

Solução C

Hexadeoxirribonucleotídeos -- 90,0 U/ml

Dissolvidos em:

Tris·HCl 3,0 mM (pH 7,4)

EDTA 0,2 mM

Solução de hibridização:

Formamida 25,4 ml

NaPO₄ 1 M 2,5 ml (pH 7,5)

100 x Denhart's 1 ml

20 x SSC 7,5 ml

ssDNA 10 mg/ml de solução

Yeast RNA 7,5 mg

água estéril qsp 40 ml

estocado à -20°C.

Solução de lavagem dos filtros (baixa estrin-
gência):

Solução A

SSC ----- 1x
SDS ----- 0,1%

Solução B

SSC ----- 0,1x
SDS ----- 0,1%

Solução de lavagem dos filtros (alta estringên-
cia):

Solução C

SSC ----- 2x
Denhart's ----- 1x

Solução D

SSC ----- 0,1x
SDS ----- 1%

Solução E

SSC ----- 0,1x

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. AFFARA, N. A.; FLORENTIN, L.; MORRISON, N.; KWOK, K.; MITCHELL, M.; COOKE, A.; JAMIESON, D.; GLASGOW, L.; MEREDITH, L.; BOYD, E. & FERGUSSON-SMITH, M. A. Regional assignment of Y-linked DNA probes by deletion mapping and their homology with X-chromosome and autosome sequences. *Nucl. Acids Res.* **14**: 5353-5373, 1986.

2. AFFARA, N.A., FERGUSSON-SMITH, M. A.; MAGENIS, R. E.; TOLMIE, J.; COOKE, A.; BOYD, E.; JAMIESON, D.; KWOK, K.; MITCHELL, M. & SNADDEN, L. Mapping the testis determinants by an analysis of Y-specific sequences in male with apparent XX and XO karyotypes and females with XY karyotypes. *Nucl. Acids Res.* **15**: 7325-7342, 1987.

3. ALVESALO, L. & De la CHAPELLE, A. Tooth size in two males with deletions of the long arm of the Y chromosome. *Ann.Hum.Genet.* **54**: 49-54, 1981.

4. ANDERSSON, M.; PAGE, D. C. & De la CHAPELLE, A. Chromosome Y-specific DNA is transferred to the short arm of X chromosome in human XX males. *Science* **233**: 786-788, 1986.

5. ANDERSSON, M.; PAGE, D. C.; PETTAY, D.; SUBRT, I.; TURLEAU, C.; De CROUCHY, J. & De la CHAPELLE, A. Y; autosome translocations and mosaicism in the aetiology of 45,X maleness: assignment of fertility factor to distal Yq11. *Hum. Genet* **79**: 2-7, 1988.

6. ARNEMANN, J.; JAKUBICZKA, S.; SCHMIDTKE, S.; SCHAPER, R. & EPPIJEN, J. T. Clustered GATA repeats (Dkm sequences) on the Y chromosome. *Hum. Genet.* **73**: 301-303, 1986.

7. BALLABIO, A.; PARENTI, G.; CARROZZO, R.; SEBASTIO, G.; ANDRIA, G.; BUCKLE, V.; FRASER, N.; CRAIG, I.; ROCCHI, M.; ROMEO, G.; JORSIS, A. C. & PERSICO, M. G. Isolation and characterisation of a steroid sulfatase c-DNA clone: genomic deletions in patients with X-linked ichthyosis. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* **84**: 4519-4523, 1987.

8. BEICUELMAN, B. Citogenética Humana. 3ª edição. São Paulo, Editora Koogan Guanabara, 1982, 243-301.

9. BICKMORE, W. A.; COOKE, H.J. Evolution of homologous sequences on the human X and Y chromosomes, outside the meiotic pairing segment. *Nucl. Acids Res.* **15**: 6261-6271, 1987.

10. BILLINGHAM, R. E.; SILVERS, W. K. Induction of tolerance of skin isografts from male donors in female mice. *Science* **128**: 780-781, 1958.

11. BISHOP, C. E.; GUELLAEN, G.; GELDWERTH, D.; VOSS, R.; FELLOUS, M. & WEISSENBACH, J. Single copy DNA sequences specific for the human Y chromosome. *Nature* **303**: 831-832, 1983.

12. BISHOP, C.; CUELLAEN, G.; GELDEWERTH, D.; FELLOUS, M.; WEISSENBACH, J. Extensive sequence homologies between Y and other human chromosomes. *J. Mol. Biol.* **173**: 403-417, 1984.

13. BOSTOCK, C. J., GOSDEN, J. R.; MITCHELL, A. R. Localisation of a male specific DNA fragment to a sub-region of the human Y chromosome. *Nature* **272**: 324-328, 1978.

14. BROSIUS, J. Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* **936**: 151-160, 1984.

15. DUCKLE, V.; BOYD, Y.; CRAIG, I. W.; FRASER, N.; GOODFELLOW, P. N. & WOLFE, J. Homologous expressed genes in the human sex chromosome pairing region. *Nature* **317**: 739-741, 1985.

16. BULJER, E. A synopsis of the human Y chromosome. *Hum. Genet.* **55**: 145-175, 1980.

17. BURGOYNE, P. S. Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosome of mammals. *Hum. Genet.* **61**: 85-90, 1982.

18. BURK, R. D.; MA, P. & SMITH, K. D. Characterisation and evolution of single copy sequences from the human Y chromosome. *Mol. Cell Biol.* **5**: 576-581, 1985.

19. COHEN, G.; MANUEL, A.; COHEN, M.; FAGAN, K. & GRUNSTEIN, H. A deletion of heterochromatin only of the Y chromosome in an azoospermic male. *Hum. Genet.* **64**: 297-300, 1983.

20. COOKE, H. J. & HINDLEY, J. Cloning of human satellite III DNA: different components are on different chromosomes. *Nucl. Acids Res.* **6**: 3177-3197, 1979.

21. COOKE, H. J.; SCHMIDTKE, J. & GOSDEN, J. R. Characterisation of a human Y chromosome repeated sequence and related sequences in higher primates. *Chromosoma* **87**: 491-502, 1982.

22. COOKE, H. J.; BROWN, W. R. A. & RAPPOLD, G. A. Hypervariable telomeric sequences from the sex chromosomes are pseudoautosomal. *Nature* **317**: 687-692, 1985. — —

23. CRAIG, I.; LEVY, E. & FRASER, N. The mammalian Y chromosome: molecular search for the sex-determining gene. Summary and perspectives. *Development* **101 (Suppl.)**: 185-190, 1987.

24. DARLING, S. M.; BANTING, G. S.; PYM, D.; WOLFE, J. & GOODFELLOW, P. N. Cloning and expressed gene shared by the human sex chromosomes. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* **83**: 135-139, 1986.

25. De La CHAPELLE, A. The etiology of maleness in XX men. *Hum. Genet.* **58**: 105-116, 1986.

26. De La CHAPELLE, A. The Y-chromosomal and autosomal testis-determining genes. *Development* **101 (Suppl.)**: 33-38, 1987.

27. DISTECHE, C. M.; BROWN, L.; SAAL, H.; FRIEDMAN, C.; THULINE, H.C.; HOAR, D. I.; PAGON, R. A. & PAGE, D. C. Molecular detection of a translocation (Y; 15) in a male. *Hum.Genet.* 76: 372-377, 1986.

28. DUNCAN, C.; BIRO, P. A.; CHOUDARY, P. V.; ELDER, S. T.; WANG, R. R. C.; FORGET, B. G.; De RIEL, J. K. & WEISSMAN, S. M. RNA polymerase III transcriptional units are interspersed among human non- α -globin genes. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 76: 5095-5099, 1979.

29. EICHWALD, E. J.; SILMSER, C. R. untitled. *Transplantation Bull* 2: 148-149, 1955.

30. FEINBERG, A. P. & VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13, 1983.

31. FERGUSON-SMITH, M. A.; AFFARA, N. A. & MAGENIS, R. E. Ordering of Y-specific sequences by deletion mapping and analysis of X-Y interchange males and females. *Development* 101(Suppl.): 41-50, 1987.

32. FRASER, N.; BALLABIO, A.; ZOLLO, M.; PERSICO, G. & CRAIG, I. Identification of incomplete coding sequences for steroid sulphatase on the human Y chromosome: evidence for an ancestral pseudoautosomal gene? *Development* 101(Suppl.): 17-132, 1987.

33. CAL, A.; WEBER, B.; NERI, G.; SERRA, A.; MULLER, U.; SCHEMPP, W.; PAGE, D. C. A 45,X male with Y-specific DNA translocated onto chromosome 15. *Am. J. Hum. Genet.* **40**: 477-488, 1987.

34. GOLDBERG, E. H.; BOYSE, E. A.; BENNETT, D.; SCHEID, M.; CARSWELL, E. A. Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. *Nature* **232**: 478-480, 1971.

35. GOODFELLOW, P.; BANTING, G.; SHERR, D.; ROPERS, H. H.; CAINE, A.; FERGUSON-SMITH, M. A.; POREY, S. & VOSS, R. Genetic evidence that a Y-linked gene in man is homologous to a gene on the X chromosome. *Nature* **302**: 346-349, 1983.

36. GOODFELLOW, P. J.; DARLING, S. M.; THOMAS, N. S. & GOODFELLOW, P. N. A pseudoautosomal gene in man. *Science* **234**: 740-743, 1986.

37. GOODFELLOW, P. N.; DAVIES, K. E.; ROPERS, H-H. Report of the Committee on the genetic constitution of the X and Y chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* **40**: 296-352, 1985.

38. GOODFELLOW, P. N.; PYM, B.; PRITCHARD, C.; ELLIS, N.; PALMER, M.; SMITH, M.; GOODFELLOW, P. J. MIC2: a human pseudoautosomal gene. *Phil. Trans. R. Soc. Lond* **322**: 145-154, 1988.

39. GUBRAY, J.; COLLINGTON, J.; KOOPMAN, P.; CAPEL, B.; ECONOMON, A.; MUNSTENBERG, A.; VIVIAN, N.; GOODFELLOW, P.;

LOVELL-BADCE, R. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**: 245-250, 1990.

40. GUEJJAEN, G.; CASANOVA, M.; BISHOP, C.; GELDWERTH, D.; ANDRE, G.; FELLOUS, M. & WEISSENBACH, J. Human XX males with single copy DNA fragments. *Nature* **307**: 172-173, 1984.

41. JACOBS, P. A. & STRONG, J. A. A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature* **183**: 302-303, 1959.

42. KOENING, M.; MOISAN, J. P.; HEILIG, R. & MANDEL, J. L. Homologies between X and Y chromosomes detected by DNA probes: localisation and evolution. *Nucl. Acids Res.* **13**: 5485-5501, 1985.

43. KOLLER, P. C. & DARLINGTON, C. D. The genetical and mechanical properties of the sex chromosomes. *J. Genet.* **29**: 159-173, 1934.

44. KOO, C. C.; WACHTEL, S. S.; SAENGER, P. S.; NEN, M. I.; DOSICK, D.; AMAROSE, A. P.; DOREIS, E.; VENTRUTO, U. H-Y antigen: Expression in human subjects with the testicular feminization syndrome. *Science* **196**: 655-656, 1977.

45. LAU, Y. F.; CHAN, K.; KAN, Y. W. & GOLDBERG, E. Isolation of a male-specific and conserved gene using an anti H-Y antibody. *Am. J. Hum. Genet.* **39**: 142, 1986.

46. MANDEL, M. & HIGA, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53: 159, 1970.

47. MANIATS, T.; FRITSCH, E. F. & SAMBROCK, J. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, USA, 1982.

48. MARCELINO, L. - Comunicação Pessoal, 1989.

49. MARCUS, M.; TANTRAVAHII, R.; DEV, U. G.; MILLER, D. A. & MILLER, O. J. Human-mouse cell hybrid with human multiple Y chromosomes. *Nature* 262: 63-65, 1976.

50. MCKAY, R. D. G.; BORROW, M.; COOKE, H. J. The identification of a repeated DNA sequence involved in the karyotype polymorphism of the human Y chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.* 21: 19-32, 1978.

51. MCKUSICK, U. A. Mendelian inheritance in man. 4th edn. Baltimore: Johns Hopkins University. 1975.

52. MOREIRA-FILHO, C. A.; OTTO, P. G.; FROTA-PESSOA, O. H-Y gene expression in apparent absence of the long arm of the Y chromosome. *Am. J. Med. Genet.* 4: 135-139, 1979.

53. MULLER, U.; LALANDE, M.; DISTECHE, C. M.; LATT, S. A. Construction, Analysis and application to 46,XY Gonadal Dysgenesis of a recombinant Phage DNA Library from Flow-Sorted Human Y chromosomes. *Cytometry* 7: 418-424, 1986.

54. MULLER, U.; DONLON, T.; SCHIMD, M.; FITCH, N.; RICHER, C. L.; LALAN, M.; LATT, S. A. Deletion mapping of the testis determining locus with DNA probes in 46,XX males and in 46,XY and 46,X dic(Y) females. *Nucl. Acids Res.* 14: 6489-6505, 1987a.

55. MULLER, U. Mapping of testis-determining locus on Yp by the molecular genetic analysis of XX males and XY females. *Development* 101(Suppl.): 51-58, 1987b.

56. MULLER, U., LATT, S. A. & DON LON, T. Y-specific DNA sequences in male patients with 46,XX and 47,XXX. *Am. J. med. Genet.* 28: 393-401, 1987c.

57. PAGE, D.; De MARTINVILLE, B.; BARKER, D.; WYMAN, A.; WHITE, R.; FRANCKE, U. & BOTSTEIN, D. Single copy sequences hybridises to polymorphic and homologous loci on human X_e Y chromosome. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 79: 2352-2356, 1982.

58. PAGE, D. C.; MOSHER, R.; SIMPSON, E. M.; FISHER, E. M. C.; MARDON, G.; POLLACK, J.; MCGILLIVRAY, B.; De La CHAPELLE, A. & BROWN, L. G. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51: 1091-1104, 1987.

59. PAGE, D. C. Is ZFY the sex-determining gene on the human Y chromosome? *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **322**: 155-157, 1988.
60. PALMER, M. S.; SINCLAIR, A. H.; BERTA, P.; ELLIS, N. A.; GOODFELLOW, P. N.; ABBAS, N. E. & FELLOUS, M. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* **342**: 937-939, 1990.
61. PIMENTA, A. Expressão do gene da α -amilase (*ami*) de *Bacillus subtilis* sob o controle de um promotor de *Xanthomonas campestris*. Tese de Mestrado, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil, 1990.
62. RETIEF, A. E. Cytogenetics and recombinant technology in male infertility. *Archives of Andrology* **17**: 119-123, 1987.
63. SCHMPP, W. & MULLER, U. High resolution replication patterns of the human Y chromosome. Intra and interindividual variation. *Chromosoma* **86**: 229-237, 1982.
64. SCHMIDTKE, J. & SCHMID, M. Regional assignment of a 2.1 Kb repetitive sequence to the distal part of the human Y heterochromatin. *Hum. Genet.* **55**: 255-257, 1980.
65. SIEBERS, J. W.; VOGEL, W.; HEPP, H.; BOLZE, H. & DITTRICH, A. Structural aberrations of the Y chromosome and the corresponding phenotype. *Human Genetik* **19**: 57-66, 1973.

66. SIMMLER, M. C.; ROUYER, F.; VERGNAUD, G.; NYSTROM-NAHTI, M.; NGO, K. Y.; De La CHAPELLE, A. & WEISSENDACH, J. Pseudoautosomal DNA sequences in the pairing region of the human sex chromosomes. *Nature* **317**: 692-697, 1985.
67. SIMPSON, E.; CHANDLER, P.; GOULMY, E.; DISTECHE, C. M., FEROUJON-SMITH, M. A. & PACE, D. C. Separation of the genetic loci for the H-Y antigen and for testis determination on the human Y-chromosome. *Nature* **326**: 876-878, 1987.
68. SINCLAIR, A. H.; BERTA, P.; PALMER, M. S.; HAWKINS, J. R.; CRIFFITHS, B. L.; SMITH, M. J.; FOSTER, J. W.; FRISCHANT, A-M.; LOVELL, BADGE, R. & GOODFELLOW, P. N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* **346**: 240-244, 1990.
69. SMITH, K. D.; YOUNG, K. E.; TALBOT Jr., C.; SCHEMECKPEPER, B. J. Repeated DNA of the human Y chromosome. *Development* **101**: (Suppl.) 77-92, 1987.
70. SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel eletroforesis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517, 1975.
71. SZABO, P., KUNKEL, L. M.; YU, L. C.; GEORGE, D. & SMITH, K. D. Chromosomal distribution of DNA sequences derived from the human Y chromosome in human and higher primates. *Cytogenet. Cell Genet.* **25**: 212-213, 1987.

72. TIEPOLO, L. & ZUFARDI, O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the non-fluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum. Genet.* **34**: 119-124, 1976.

73. THO, S. P. T.; BEHZADIAN, A.; BYRD, J. R.; TISCHFIELD, J. A.; McDONOUGH, P. G. Use of deoxyribonucleic acid probes to test for Yq11 deletions in males with spermatogenic arrest. *Fertility and Sterility* **48**: 858-860, 1987.

74. TYLER-SMITH, C. & BROWN, W. R. A. Structure of the major block of alphoid satellite DNA on the human Y chromosome. *J. Mol. Biol.* **195**: 457-470, 1987.

75. TYLER-SMITH, C. & MULLER, U. Structure of a hypervariable tandemly repeated DNA sequence on the short arm of the human Y chromosome. *J. Mol. Biol.* **203**: 837-848, 1988.

76. VERGNAUD, G.; PAGE, D. C.; SIMMLER, M. C.; BROWN, L.; ROUYER, F.; NOEL, B.; BOTSTEIN, D.; De La CHAPELLE, A. & WEISSENBACH, J. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* **38**: 109-124, 1986.

77. WACHTEL, S. S.; KOO, G. C.; ZUCKERMAN, E. E.; HAMMER LING, U.; CHEID, M.; BOYSE, E. A. Serological cross reactivity between H-Y (male) antigens of mouse and man. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* **71**: 1215-1218, 1974.

78. WACHTEL, S. S.; KOO, G. C.; BOYSE, E. A. Evolutionary conservation of H-Y(male) antigen. *Nature* **254**: 270-272, 1975a.

79. WACHTEL, S. S.; KOO, G. C.; BREG, W. R.; ELIAS, S.; BOYSE, E. A.; MILLER, O. J. Expression of H-Y antigen in human males with two Y chromosomes. *New Eng. J. Med.* **293**:1070-1072, 1975b.

80. WEISSENBACH, J.; LEILLIERS, J.; PETIT, C.; ROUYER, F. & SIMMLER, M. C. Normal and abnormal interchanges between the human X and Y chromosomes. *Development* **101**:(Suppl.) 67-74, 1987.

81. WEST, R. W. & RODRIGUES, R. L. Construction and characterization of *E.coli* promoters-probe plasmid vectors, I. Cloning of promoters containing DNA fragments. *Gene* **7**: 271-288, 1982.

82. WOLFE, J.; EAICKSON, R. P.; RIGBY, P. W. & GOODFELLOW, P. N. Regional localization of 3 Y-derived sequences on the human X and Y chromosomes. *Ann. Hum. Genet.* **48**: 253-259, 1984.

83. WOLFE, J. Others genes of the Y chromosome. *Development* **101**: 117-118, 1987.

84. YEN, P. H.; MARSH, B.; ALLEN, E.; TSAI, S. P., ELLISON, J.; CONNOLLY, I.; NEISWAUGH, K. & SHAPIRO, L. J. The human X-linked steroid sulfatase gene and a Y-encoded pseudogene; evidence for an inversion of the Y chromosome during primate evolution. *Cell* 55: 1123-1135, 1988.

85. YUNIS, E.; GARCIA-CONTI, F. L.; TORRES DE CADALLERO, O. M.; GIRALDO, A. Yq deletion, aspermia, and short stature. *Hum. Genet.* 39: 117-122, 1977.

RESUMO

Neste trabalho, descrevemos o estudo molecular de uma sequência isolada de um banco do cromossomo Y humano, denominada Y-1. A partir de hibridizações realizadas com essa sequência pudemos verificar que esta apresenta bastante homologia com o cromossomo X e/ou autossomos, porém demonstrando algumas regiões específicas para o cromossomo Y. Com a construção de um mapa de restrição, pudemos isolar sub-fragmentos a partir da sequência original visando determinar um fragmento que se mostrasse mais específico a esse cromossomo. Com os nossos resultados, pudemos determinar que o fragmento Y-1.b1 é altamente específico para o cromossomo Y.

Além disso, com o experimento de clonagem da sequência Y-1 no plasmídeo *promotor-probe* pKK232-8, pôde-se verificar que a sequência Y-1 foi capaz de ativar a expressão da atividade gênica e é provável portanto, que esse fragmento contenha sequências promotoras em seu interior. A partir da verificação da orientação do fragmento Y-1 no plasmídeo pKK232-8, foi verificado que o sub-fragmento Y-1.b2 é o mais provável candidato a conter essas sequências. Devido a proximidade característica dessas sequências a genes, é possível que com a utilização futura de técnicas de sequenciamento seja verificado a presença de um gene ou parte dele nessa região.