

ABREVIACOES	3
RESUMO	4
SUMMARY	5
1. INTRODUAO	6
1.1 O SISTEMA DE ESTUDO <i>RHYNCHOSCIARA AMERICANA</i>	6
1.2 CROMOSSOMOS POLITENICOS	8
1.3 ENOVELAMENTO DE PROTEINAS.....	17
1.4 SISTEMAS DE CHAPERONAS.....	17
1.4.1 <i>Hsp70</i>	18
1.4.2 <i>Hsc70</i>	21
1.4.3 <i>Hsp90</i>	23
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAIS E METODOS	28
3.1 DISSECAO DE <i>RHYNCHOSCIARA AMERICANA</i>	28
3.2 EXTRAAO DE DNA E RNA DE <i>RHYNCHOSCIARA AMERICANA</i>	28
3.3 CONSTRUAO DA BIBLIOTECA DE CDNA.....	29
3.4 TRANSFORMAAO DE BACTERIAS COMPETENTES	29
3.5 SEQENCIAMENTO ALEATORIO DA BIBLIOTECA DE CDNA	31
3.6 PCR DE SEQENCIAMENTO.....	31
3.7 ANLISE DAS SEQENCIAS.....	32
3.8 ISOLAMENTO DE CLONE GENMICO DE <i>RHYNCHOSCIARA AMERICANA</i> EM BIBLIOTECA DE FAGO	32
3.81 <i>Plaqueamento e transferncia dos clones genmicos</i>	32
3.82 <i>Hibridizao</i>	33
3.83 <i>Purificao de fagos recombinantes</i>	33
3.9 DIGESTO DE DNA COM ENZIMAS DE RESTRIO	34
3.10 SOUTHERN BLOT	34
3.11 NORTHERN BLOT.....	35
3.12 REMOO DE MARCAO (<i>STRIPPING</i> DE MEMBRANAS).....	35
3.13 SUBCLONAGEM DE INSERTOS ISOLADOS	35
3.14 EXTRAAO DE DNA PLASMIDEAL EM LARGA ESCALA	36
3.15 EXTRAAO DE DNA PLASMIDEAL EM LARGA ESCALA COM KIT	37
3.16 AMPLIFICAO POR PCR DE SEQENCIAS DE HSP90	37
3.17 CLONAGEM DO PRODUTO DE AMPLIFICAO	38
3.18 SUBCLONAGEM DOS FRAGMENTOS DE FAGO POSITIVOS.....	38
3.19 CONSTRUAO DE <i>PRIMERS</i>	39
3.20 ELETROELUIO	40
3.21 PURIFICAO DE DNA	41
3.22 CHOQUE TRMICO DAS LARVAS DE <i>RHYNCHOSCIARA AMERICANA</i>	41
3.23 GEL 10% POLIACRILAMIDA	41
3.23.1 <i>gel de corrida</i> :.....	41
3.23.2 <i>gel de empilhamento</i> :.....	42
3.24 WESTERN BLOT.....	42
3.25 QUANTIFICAO DE PROTEINAS.....	43

3.26	IMUNOLocalização.....	44
3.27	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA	45
3.27.1	<i>Hibridização in situ</i>	45
3.27.2	<i>Análise ao microscópio confocal</i>	45
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	SEQÜENCIAMENTO ALEATÓRIO DO BANCO DE CDNA DE <i>RHYNCHOSCIARA AMERICANA</i>	46
4.2	SEQÜÊNCIA DE ALGUNS CLONES ENCONTRADOS EM BANCO DE CDNA DE <i>RHYNCHOSICARA AMERICANA</i>	51
4.3	ISOLAMENTO DOS CLONES GENÔMICOS <i>HSC70</i> E <i>HSP83</i> DE <i>RHYNCHOSCIARA AMERICANA</i> EM BIBLIOTECA GENÔMICA DE FAGO	67
4.4	<i>SHOTGUN</i> (SUBCLONAGEM DOS FRAGMENTOS GENÔMICOS DE <i>HSC70-4</i> E <i>HSP83</i>)	68
4.5	ANÁLISE DOS GENES <i>HSC70</i> E <i>HSP83</i>	71
4.6	EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DOS GENES <i>HSC70</i> E <i>HSP83</i>	75
4.7	ESTUDO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA <i>HSC70</i> E <i>HSP83</i> POR WESTERN BLOT.....	77
4.8	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA (<i>IN SITU</i>) DOS GENES <i>HSC70</i> E <i>HSP83</i>	85
4.9	LOCALIZAÇÃO CELULAR.....	89
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS	94
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
8.	SÚMULA CURRICULAR.....	103

Abreviações

- 2^oP - animais no segundo período de desenvolvimento
- IR - Início de Rede, animais no início de síntese do casulo comum
- B2 - pufe na região 2 do cromossomo B em fase de expansão
- C3 - pufe na região 3 do cromossomo C em fase de expansão
- C8 - pufe na região 8 do cromossomo C em fase de expansão
- Hsp70 - Heat Shock Protein de 70kDa
- Hsc70 - Heat Shock Cognate Protein de 70kDa
- Hsp90 - Heat Shock Protein de 90kDa
- Hip - Heat shock Interacting Protein
- Hop - Heat Shock Organizing Protein
- DNA - Ácido Desoxirribonucléico
- RNA - Ácido Ribonucléico
- S1 - Seção 1 da glândula salivar
- S2 - Seção 2 da glândula salivar
- S3 - Seção 3 da glândula salivar
- ATP – Adenosinatrifosfato
- ADP - Adenosinadifosfato
- ORF - Open Reading Frame
- CCV - Clathrin-Coated Vesicles
- EcR - Ecdysone Receptor
- USP - Ultraspiracle
- HRE - Hormone Response Element
- LBD - Ligand Binding Domain
- cDNA - DNA Complementar
- IPTG – Isopropiltio-β-D-galactosidase
- X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactosidase
- EST - Expressed Sequence Tag
- mRNA - RNA mensageiro

Resumo

Com a idéia de identificar proteínas envolvidas no processo de enovelamento das proteínas sintetizadas na glândula salivar de *Rhynchosciara americana*, no início deste projeto adotou-se como estratégia o seqüenciamento de uma biblioteca de cDNA. Esta biblioteca foi construída utilizando-se glândulas salivares de *Rhynchosciara americana* do período de seu desenvolvimento onde tem início a síntese de seu casulo. Mensagens de proteínas envolvidas no processo de enovelamento, transporte e proteólise foram isoladas, alguns exemplos são *hsc70*, *hsp83*, *hip*, *hop*, *dnaJ*, *trap1* e prolil isomerase, *sec61 α/β* , *sec23*, peptidase de sinal, *rab7*, partícula reconhecedora de sinal (*srp*), enzima conjugadora de ubiquitina e complexo regulatório proteassomo 26, cop 1 e ubiquitina ligase.

A identificação destes genes permitiu o isolamento de clones genômicos através de triagem em banco de fagos e caracterização dos genes *hsc70* e *hsp83* para verificação de sua organização em *Rhynchosciara americana*. A expressão dos seus respectivos mRNAs foi avaliada em vários períodos do último estágio larval. A localização por hibridização *in situ* mostrou que estes genes estão localizados em regiões dos cromossomos politênicos próximas a dois pufes de DNA, C3 e C8.

O estudo dos níveis de expressão das proteínas codificadas pelos genes *hsc70* e *hsp83* mostrou a diferença de comportamento destes genes sob condições de estresse térmico e que a expressão destas proteínas deve ser regulada pelo período de desenvolvimento das larvas de *Rhynchosciara americana*. Quando evidenciada por imunofluorescência a proteína Hsc70 mostra localização predominantemente no citoplasma.

Summary

With the idea of identify some of these proteins involved in the folding process of the proteins synthesized on the *Rhynchosciara salivary* gland, this project started adopting the shotgun cDNA sequencing strategy. This cDNA library was constructed utilizing salivary glands of *Rhynchosciara americana* at a developmental period where the cocoon construction begins. Messengers of important proteins involved in the folding, transport and proteolysis process were isolated, some examples are *hsc70*, *hsp83*, *hip*, *hop*, *sec61 α/β* , *sec23*, signal peptidase, *rab7*, signal recognition particle (srp), ubiquitin conjugating enzyme e 26 proteasome regulatory complex, cop 1 and ubiquitin ligase.

Identification of these genes allowed the screening of genomic clones from a phage library; *hsc70* and *hsp83* characterization was carried out to verify the arrangement of these genes on genome of *Rhynchosciara americana*. The study of these genes will contribute with phylogenetic information about the specie. The mRNA expression of these genes was analyzed during several periods of the last larval developmental stage.

In situ localization showed that these genes are located in polytene chromosomes regions near two DNAs puffs, C3 and C8.

The expression levels of the proteins codified by genes *hsc70* and *hsp83* showed different behaviors of these genes under heat stress conditions and mainly, that the regulation of the proteins Hsc70 and Hsp83 can be related to the period of development of the larvae of *Rhynchosciara americana*. When revealed by immunofluorescence, Hsc70 protein shows localization predominantly on the cytoplasm.

1. Introdução

1.1 O sistema de estudo *Rhynchosciara americana*

Os cromossomos politênicos de glândulas salivares de dípteros tiveram importante papel no desenvolvimento da fisiologia cromossômica. Essa relevância evidenciou-se depois da publicação de trabalhos sobre este tipo de cromossomos em *Bibio* e *Drosophila* (Dreyfus *et al*, 1951). Os cromossomos politênicos constituem o material mais favorável para estudos citogenéticos, por serem muito longos e largos e por apresentarem, quando corados, uma diferenciação em bandas e interbandas devido justaposição dos cromômeros e por se encontrar, cada cromossomo, no mais nítido pareamento com seu homólogo. Dada a importância da contribuição dos trabalhos sobre cromossomos politênicos no desenvolvimento da genética, grande foi a procura de organismos que apresentassem este mesmo tipo de cromossomos.

Conhecemos entre os dípteros, cerca de uma dúzia de gêneros nos quais o estudo detalhado destes cromossomos é possível. Entretanto, não se conhecia um organismo onde se pudesse observar os cromossomos politênicos em outros órgãos, que não nas glândulas salivares. Os chamados cromossomos politênicos não são característicos destas glândulas apenas, mas também podem ser encontrados no epitélio do intestino, túbulos de Malpighi e outros tecidos de dípteros.

Rhynchosciara possui, nesse particular, certas características que a tornam um interessante material de estudo. As células dos tubos de Malpighi têm cromossomos politênicos que chamam a atenção pelo seu tamanho quando comparados com os de outros dípteros. Esses cromossomos são tão nítidos e favoráveis para o estudo detalhado de sua estrutura morfológica quanto os cromossomos das glândulas salivares da maioria das espécies de *Drosophila*. Outra particularidade apresentada por *Rhynchosciara* é a presença de cromossomos politênicos em certa parte da vesícula seminal, cuja estrutura morfológica é bastante nítida para permitir a sua comparação com os de outros órgãos (Dreyfus *et al*, 1951).

O gênero *Rhynchosciara* foi estabelecido por Wiedemann (1821) (apud Breuer, 1969) e teve sua taxonomia revista por Breuer (1969). São conhecidas doze espécies que estão separadas em três grupos baseados principalmente na forma do *hypoginium* da fêmea. Grupo 1: *R. americana*, *R. hollanderi*, *R. baschanti*, *R. villosa*, *R. argentinensis*, *R. guimaraesi* e *R. papaveroi*. Grupo 2: *R. milleri* e *R. grelleti*. Grupo 3: *R. brevicornis*, *R. busaccai* e *R. mathildae* (Stocker *et al*, 1993). Contudo muitas destas espécies diferem

apenas na morfologia da cabeça ou do órgão genital. *R. americana* e *R. hollanderi*, as duas espécies que têm sido mais estudadas são difíceis de diferenciar devido a similaridades em sua morfologia. Assim como outros sciarídeos a fêmea de *Rhynchosciara* copula apenas uma vez, seus ovos eclodem ao mesmo tempo a partir de um conjunto de centenas a milhares de ovos. Diferente da maioria dos outros sciarídeos este grupo de larvas tem o desenvolvimento sincronizado e permanecem no estado larval por aproximadamente 60 dias em uma temperatura de 22^oC, constroem um casulo comum no final do quarto estadio onde ocorre a metamorfose para a forma adulta. Em cada grupo todas as larvas são da mesma idade, estão no mesmo estágio de desenvolvimento e são todas do mesmo sexo (Pavan e da Cunha, 1969; Stocker *et al*, 1993).

Outra característica deste animal é o fato de na natureza ser encontrado em locais úmidos, originalmente encontrado em folhas bananeiras caídas as quais devem fornecer o material necessário para sua alimentação. No laboratório é mais comumente a alimentação baseada em folhas de batata doce, que se acredita suprir os animais com nutrientes necessários. A criação destes animais em laboratório não é uma tarefa muito fácil, mesmo simulando as condições de temperatura, umidade e alimentação naturais, algumas vezes ocorre a morte de alguns grupos ainda no estado larval, ou os indivíduos adultos não produzem descendentes. Mesmo quando descendentes são produzidos o fato de nascerem animais do mesmo sexo limita o número de gerações obtidas.

Baseando-se em observações fisiológicas e morfológicas o ciclo de vida de *Rhynchosciara americana* foi dividido em quatro estadios. O quarto e mais longo estadio divide-se em seis períodos; neste ultimo estadio que o grupo de larvas inicia a síntese de um casulo comum onde completam sua metamorfose para a fase adulta. Os estágios da construção do casulo são bem definidos e também podem ser correlacionados com mudanças na forma das larvas (Terra *et al*, 1973).

Na glândula salivar de *Rhynchosciara* é possível distinguir três regiões, estas são as regiões proximal, mediana e distal contendo respectivamente cerca de 50, 200 e 60 células (Dreyfus *et al*, 1951). Nestas células durante o quarto estadio onde ocorre o ultimo ciclo de replicação dos cromossomos politênicos (Breuer e Pavan, 1955; Machado-Santelli e Basile, 1973; Glover *et al*, 1982) pode-se observar o fenômeno de politenização dos cromossomos e os chamados pufes que ocorrem em determinados períodos do desenvolvimento do animal, estes têm um padrão de expressão ligado aos estágios de construção do casulo. Os pufes observados nos cromossomos politênicos podem ser de dois tipos: de RNA ou DNA (Pavan, 1965).

1.2 Cromossomos politênicos

Cromossomos politênicos são característicos de células de vários tecidos de Dípteros, tanto durante o período de larva quanto durante a fase adulta. Eles são o resultado de um processo de endociclos (politenia) os quais ocorrem durante o desenvolvimento na grande maioria dos tecidos destes animais. Durante este processo o material cromossômico replica sucessivas vezes. Os novos elementos formados não se separam ficando unidos aos antigos formando um conjunto de “fitas” que se comportam como um só elemento.

Os endociclos são uma variação do ciclo celular no qual a fase S é alternada com outros estágios da divisão celular ocorrendo a replicação do DNA, mas a célula não se divide. Este mecanismo tem sido extensivamente estudado em artrópodes, principalmente em *Drosophila melanogaster*. Durante a embriogênese deste animal muitos tecidos apresentam os endociclos, estes tecidos incluem o intestino, epiderme, túbulos de malpighi, traquéia e glândulas salivares. Os endociclos também podem ser encontrados em tecidos adultos como nas células foliculares do ovário e células *nurse*.

Em células que estão proliferando, eventos de fosforilação disparados por ciclinas quinase dependentes (CDKs) controlam o mecanismo de divisão celular. As células que apresentam os endociclos não expressam algumas destas ciclinas levando a diferentes tipos de endociclos em diferentes tipos de célula (Edgar e Orr-Weaver, 2001).

Os cromossomos politênicos apresentam alta atividade metabólica e grande parte de seu DNA está menos condensado e embora individualizados, estão na interfase.

As glândulas salivares geralmente apresentam os cromossomos politênicos maiores, e atingindo máximo volume durante o período de pré-pupa. O volume de um cromossomo politênico ou de uma de suas partes individuais depende do grau de politenia assim como do estágio de atividade em RNA ou da quantidade de proteína em um determinado momento (Pavan, 1965.).

Os cromossomos politênicos apresentam um padrão definido de bandas e interbandas transversais pelas quais um cromossomo específico ou partes de um cromossomo pode ser identificado. A quantidade de fitas cromatínicas que forma um cromossomo politênico depende do tecido assim como do estágio de desenvolvimento considerado.

Determinações citofotométricas da quantidade de DNA em núcleos de glândula salivar de *Drosophila melanogaster* indicaram que os valores máximos seriam $1024C$ ou $2^{10}C$ (se considerarmos C como a quantidade haplóide de DNA). Utilizando –se a mesma

técnica foi feito um estudo detalhado da quantidade de DNA em núcleos da glândula salivar de *R. americana*, durante o desenvolvimento larval. Agrupando os valores das razões da absorvância de núcleos politênicos pela do diplóide em classes, observou-se que no fim do 2^o estadio encontram-se os valores correspondentes a 2⁴C e 2⁵C (Machado-Santelli, 1974).

Na fase inicial do 3^o estadio há grande assincronia de replicação entre os núcleos e no final os valores de DNA distribuem-se entre as classes 2⁶C, 2⁷C e 2⁸C. Estas classes são mantidas durante a fase de pré-pupa, indicando que a iniciação do último ciclo de replicação acontece no 3^o estadio e toda a síntese de DNA posteriormente corresponderia à terminação deste. A inibição de novos ciclos de replicação nos núcleos da glândula salivar seria uma manifestação fisiológica da indução da pupação podendo estar sujeita a controle hormonal (Machado-Santelli, 1974.).

A mudança morfológica mais comum encontrada nos cromossomos politênicos está relacionada com expansões em diferentes graus que ocorrem em bandas específicas ou grupos de bandas durante o desenvolvimento do organismo. Estas alterações estruturais têm sido classificadas como pufes, *bulbs* ou anéis de Balbiani. Contudo o termo pufe é mais comumente utilizado.

As mudanças químicas que ocorrem em certas regiões que sofrem expansão nos cromossomos politênicos estão relacionadas com a síntese e acúmulo de DNA, RNA, e proteínas em locais específicos durante certos períodos do desenvolvimento (Pavan, 1965).

A síntese de RNA é o principal processo que ocorre nos cromossomos politênicos, contudo, a síntese de RNA não é inteiramente restrita aos pufes, mas ocorre em outros sítios. O RNA produzido é normalmente liberado para o nucleoplasma e de lá vai para o citoplasma (Pavan, 1965). Posterior trabalho de Daneholt *et al* (2001) em células de glândulas salivares de *Chironomus tentans* mostra que partículas completas de RNP são liberadas do cromossomo politênico para o nucleoplasma neste momento estas RNPs têm uma conformação semelhante a de um anel. Quando passa para o citoplasma através de poros a fibirila é desdobrada e chega ao citoplasma em uma forma estendida e a síntese de proteína é iniciada. Nestes pufes de RNA a quantidade de DNA aumenta na mesma proporção que as outras bandas do cromossomo ocorrendo grande síntese apenas de RNA (Pavan e da Cunha, 1969).

Durante o final do desenvolvimento da larva ocorre uma dramática mudança no padrão de síntese de RNA e de proteínas. Este fato consiste de uma inibição da síntese de rRNA e a síntese de novas espécies de RNA poli(A)⁺. Este processo é acompanhado pela

inibição da síntese de certos peptídeos e síntese de novos outros já descritos por Winter *et al* (1977a, 1977b) (Glover, *et al*, 1982).

A síntese extra de DNA em regiões localizadas dos cromossomos politênicos pode também ser responsável pelo aumento de certas bandas durante a formação dos pufes. Análise de síntese de DNA em diferentes regiões dos cromossomos politênicos de *Drosophila melanogaster* mostra que um processo similar de síntese extra de DNA ocorre durante estágios iniciais do desenvolvimento deste animal. Essa quantidade extra de DNA sintetizado nos cromossomos foi chamada de “DNA metabólico”. Este DNA metabólico foi inicialmente descrito como qualquer DNA produzido pela replicação de uma região cromossômica independente do processo de replicação (Pavan, 1965). Evidências mostram que além dos dípteros este fenômeno, de aumento localizado da quantidade de DNA, ocorre em ovócitos de anfíbios (Gall, 1968).

O fenômeno de amplificação ocorre pela formação de várias forquilhas de replicação que reutilizam a mesma origem. Este fenômeno de amplificação pode ser visto também nos genes coriônicos de *Drosophila melanogaster*, as proteínas que compõem a casca dos ovos de *D. melanogaster* são sintetizadas e secretadas por células foliculares poliplóides do ovário; os genes que codificam estas proteínas são encontrados em *clusters*. Antes de sua expressão nas células foliculares os genes coriônicos no cromossomo X são amplificados até 16 vezes, enquanto os genes no cromossomo III são amplificados até 60 vezes. Em cada um dos casos citados, a amplificação estende-se por cerca de 45-50 kb em cada lado dos genes coriônicos. Nestas regiões pode haver um gradiente de amplificação nas extremidades do *amplicon* como ilustrado na figura 1.

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

