UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA 80K-H, POSSÍVEL SUBSTRATO DA PROTEÍNA QUINASE C

BETTINA MALNIC

ORIENTADOR: RICARDO RENZO BRENTANI

SÃO PAULO
1991

CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEINA 80K-H, SUBSTRATO DA PROTEINA QUINASE C

BETTINA MALNIC

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Quimica da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessarios a obtenção do grau de Mestre em Bioquimica.

Aprovada por:

Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani
(Orientador e Presidente)

Profa. Dra. Suely Lopes Gomes, IQ-USP

Profa. Dra. Beatriz Amaral de C. Valavicius, EPM

SÃO PAULO, SP

10 DE DEZEMBRO DE 1991

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ricardo Renzo Brentani, Jorge Sabbaga, Cecília L.S. Santos, Maria de Lourdes Junqueira, Luisa Lina Villa, Sandro J. de Souza, Roger Chammas, Nathalie Cella, Marcelo de Macedo Brígido, Lionel C. B. De Sousa e todos que direta ou indiretamente tornaram este período de trabalho extremamente enriquecedor para a minha formação.

Em especial, ao professor Ricardo Renzo Brentani por oferecer a preciosa oportunidade de frequentar o Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer.

ÍNDICE

RESUMO.....1

ABREVIAÇÕES.....2

INTRODUÇÃO.....3

OBJETIVO E ABORDAGEM EXPERIMENTAL.....28

MATERIAIS E MÉTODOS.....30
1-Produção de anticorpos policlonais anti-plaquetas.....30
2-Varredura imunológica da biblioteca de cDNA.....30
3-Caracterização dos clones de lambda gt11 por "Western blot".....32
3.1-Preparação rápida de extrato proteico recombinante..32
3.2-Análise dos extratos proteicos por Western blot.....32
3.3-Purificação de anticorpos específicos.....33
4-Amplificação dos clones recombinantes.....34
5-Caracterização do DNA dos clones recombinantes.....34
5.1-Preparação rápida de DNA de bacteriófago lambda.....34
5.2-Análise do DNA por eletroforese em gel de agarose...35
5.3-Análise do DNA por hibridização ("Southern blot")...35
6-Subclonagem dos insertos de DNA.....38
6.1-Preparação do vetor.....38
6.2-Ligação dos insertos ao vetor.....40
6.3-Transformação.....40
6.4-Preparação rápida de DNA plasmidiano.....41
6.5-Maxi preparação de plasmídeos.....41
6.6-Subclonagem dos insertos de cDNA para sequenciamento de regiões inacessíveis à polimerase.....43
7-Sequenciamento dos clones de CDNA.....43
7.1-Denaturação do DNA.....44
7.2-Anelamento dos iniciadores.....44
7.3-Reação de marcação.....44
7.4-Reação de terminação.....45
7.5-Eletroforese em gel denaturante.....45
7.6-Sequenciamento com Taq polimerase.....46
7.7-Sequenciamento direto do lambda gt11 recombinante...48
7.8-Análise das sequências no computador.....50
8-Produção de lisógenos.....50
8.1-Transfecção e seleção dos clones lisógenos.....50
8.2-Preparo de extrato proteico dos clones lisogênicos..51
9-Produção de soros policlonais contra as proteínas de fusão.....52
10-Eletroforese bidimensional.....53
11-Hibridização RNA-RNA ("Northern blot").....54
11.1-Extração de RNA total de células de mamíferos em cultura.....54
11.2-Análise do RNA poe eletroforese em gel de glioxal..55
11.3-Transferência do RNA para membrana de nylon.....55
11.4-Hibridização RNA-RNA.....56
12-Cultivo de células.....57

13-Preparo de extratos proteicos e análise em "Western blot".....57
13.1-Preparo de extrato proteico a partir de células em cultura.....57
13.2-Preparo de extrato proteico a partir de plaquetas..58
13.3-Análise dos extratos em "Western blot".....58
14-Imunofluorescência indireta.....59
15-Preparo de frações subcelulares.....59
15.1-Fracionamento subcelular.....59
15.2-Análise das frações em "Western blot".....60
16-Fosforilação "in vivo" em células intactas.....60
16.1-Incubação de células com ácido fosfórico [^{32}P].....60
16.2-Análise das proteínas fosforiladas em "Western blot" de eletroforese bidimensional.....61

RESULTADOS.....62
1-Varredura da biblioteca de cDNA.....62
2-Análise dos clones isolados.....62
2.1-Através de "Western blots".....62
2.2-Através de hibridização DNA-DNA ("Southern blot")...66
3-Subclonagem dos insertos de DNA.....68
4-Análise das sequências obtidas.....72
4.1-Análise das fases de leitura.....72
4.2-Procura de sequências homólogas.....74
5-Análise dos anticorpos policlonais contra as proteínas recombinantes.....76
6-Caracterização de 80K-H.....80
6.1-Análise em "Western blots".....80
6.2-Análise do ponto isoelétrico.....80
6.3-Análise por "Northern blot".....82
7-Localização celular de 80K-H.....85
7.1-Através de imunofluorescência indireta.....85
7.2-Através da análise das frações subcelulares.....85
8-Análise da fosforilação "in vivo" de 80K-H.....89

DISCUSSÃO.....91

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....105

RESUMO

Plaquetas apresentam um papel importante no desenvolvimento de metástases tumorais. Os eventos que levam à ativação plaquetária, como agregação e secreção de proteínas, podem significar etapas importantes neste papel. O agonista plaquetário trombospondina está envolvido no processo de agregação plaquetária. Com o intuito de clonar o receptor de trombospondina GpIIIb, produziu-se um soro policlonal contra uma banda eluída de SDS PAGE de extrato proteico de plaquetas, que apresentava peso molecular igual ao de GpIIIb (denominada banda 80kD). Uma biblioteca de cDNA de endotélio de cordão umbilical humano construída em lambda gt11 foi varrida com este soro anti-80kD. Dois clones diferentes foram isolados, seus insertos foram subclonados no vetor pGEM-3Z e sequenciados. Através de consulta ao Genbank observou-se que um dos clones não apresentou homologia significativa com nenhuma proteína até então clonada. O outro clone, por sua vez, apresentou 100% de homologia com a proteína **80K-H**, substrato de proteína quinase C. Levando em consideração o fato de que as vias de transdução de sinal que utilizam **PKC** apresentam extrema importância nos processos de ativação plaquetária decidiu-se prosseguir com a caracterização de **80K-H**. Para isto foi produzido um soro policlonal contra a proteína de fusão **80K-H**, que foi utilizado em ensaios bioquímicos e imunoquímicos que permitiram caracterizar a proteína **80K-H** quanto a alguns aspectos como distribuição em diferentes tipos celulares, localização celular e fosforilação. Além de estar presente em plaquetas, a proteína **80K-H** foi encontrada em todas as linhagens celulares testadas, parecendo portanto ser uma proteína ubíqua. Os dados obtidos indicaram que, apesar de apresentar uma sequência N-terminal que é clivada "in vivo" muito semelhante a um peptídeo sinal, **80K-H** não é secretada nem é de membrana plasmática, mas sim citoplasmática. Em ensaios de fosforilação "in vivo" não se detectou fosforilação de **80K-H**. Portanto, apesar de **80K-H** ser um bom substrato para **PKC** "in vitro", ela não o é "in vivo", ao menos nas células analisadas, ou é fosforilada de uma forma extremamente rápida e transiente.

ABREVIAÇÕES

amp - ampicilina
AMPc - adenilato cíclico
APS - persulfato de amônia
BCIP - 5- bromo- 4- cloro 3- indolil fosfato
BSA - albumina sérica bovina
cDNA - DNA complementar
CSF-1 - fator estimulador de colônia
Ci - Curie
DAG - diacilglicerol
DMSO - dimetilsulfoxido
DTT - ditiotreitol
EDTA - etileno diamina tetracético
ELISA - enzima imuno ensaio
FIE - focalização isoelétrica
IkB - inibidor do NFkB
IP3 - inositol trifosfato
IPTG - isopropil beta- D- tiogalactopiranosideo
kD - milhares de daltons
mRNA - RNA mensageiro
NBT - nitroblue tetrazolium
NFkB - fator nuclear kB
(d) NTP - (desoxi) nucleosideo trifosfato
PAF - fator de ativação plaquetário
PAGE - eletroforese em gel de acrilamida
PBS - solução salina tamponada com fosfato 20mM pH7,4
PEG - polietileno glicol
pfu - unidade formadora de placa
PKC - proteina quinase C
PKA - Proteína quinase A
PLC - fosfolipase C
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila
PS - fosfatidilserina
PtdIns - fosfatidilinositol
ras Gap - proteina ativadora da atividade GTPásica de ras
rEGF - receptor do fator de crescimente epitelial
rPDGF - receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
SDS - laurilsulfeto de sódio
TBS - solução salina tamponada com Tris 10mM pH 8,0
TCA - ácido tricloroacético
TEMED - N,N,N,N- tetrametilenodiamina
TPA - 12- O- tetradecanoil forbol- 13- acetato
TRE - elemento responsivo a TPA
U - unidade enzimática
U.V. - ultravioleta
X-gal - 5- bromo- 4 cloro- 3 indolil- beta- D- galactopiranosideo

INTRODUÇÃO

Alterações no comportamento das células de um instante para o outro são governadas por sistemas de sinalização que traduzem informações externas para um repertório limitado de sinais internos, os mensageiros secundários. Receptores da superfície celular funcionam como "antenas" que detectam informações externas (como hormônios, fatores de crescimento, neurotransmissores ou luz) que são então transduzidas e amplificadas em mensageiros secundários intracelulares que controlam vários processos celulares como secreção, contração, proliferação e metabolismo (Berridge e Irvine,1984). Poderíamos imaginar que vários tipos de sinais poderiam ser originados através da ocupação do receptor pelo seu ligante, mas a necessidade óbvia de integrar uma grande variedade de sinais externos sugere que deve haver um número limitado de mecanismos efetuadores, cada um ligado a múltiplos receptores. Sistemas de transdução de sinais apresentam várias propriedades em comum. Deve haver necessariamente um alto grau de sensibilidade ao estímulo, mas apenas uma pequena energia da ligação é disponível do receptor ativado. Portanto a geração de respostas internas significantes exigem que os mecanismos de sinalização apresentem uma amplificação considerável. Outro pré-requisito é que o sistema de sinalização possa ser ligado e desligado rápida e eficientemente. Os geradores de sinais

devem estar sujeitos a regulações que permitam potenciações assim como inibições autólogas ou heterólogas.

Proteínas quinases e as respectivas fosfoproteínas fosfatases representam sistemas ideais para a geração e transmissão de sinais na célula. A fosforilação de proteínas é reconhecidamente um meio de se modular a atividade de proteínas de forma rápida e reversível. Além disto, proteínas quinases e fosfatases atuam cataliticamente produzindo amplificação de sinais. Atuam também pleiotropicamente, de forma que cada tipo de quinase ou fosfatase é capaz de utilizar substratos proteicos diferentes. Em princípio, um sinal pode ser transduzido tanto por fosforilação como por defosforilação de uma proteína alvo. Claramente a geração de um sinal requer que ou a proteína quinase ou a fosfatase ou ambas, apresentem uma atividade que seja regulada diretamente ou indiretamente pelo estímulo em questão (Hunter,1986). Vários tipos de proteínas quinases apresentam atividades que podem ser moduladas por metabólitos difundíveis, como nucleotídeos cíclicos ou diacilglicerol, outros por fatores de crescimento (Taylor et al,1990; Bell,1986; Hunter,1991).

Um sinal de fosforilação gerado na membrana plasmática pode ser propagado de várias maneiras. A proteína alvo pode ser por exemplo uma enzima cuja atividade é aumentada com a fosforilação. Eventos de transdução que ocorrem na membrana plasmática poderiam ser decorrentes do movimento de proteínas alvo fosforiladas no plano da membrana até seu

sítio de ação. Alternativamente um composto difundível que interage com algum componente da membrana poderia ser produzido por um destes passos em uma cascata de eventos. Eventos nucleares, como a indução da expressão gênica podem ser engatilhados devido a migração de proteínas alvo fosforiladas para o núcleo.

Mecanismos de transdução de sinais

Os mecanismos primários de transdução de sinais podem ser classificados como:

1- Mediados por proteínas que apresentam atividade de tirosina quinase. Estas proteínas subdividem-se em:

a) Proteínas transmembrânicas - inclue receptores para fatores de crescimento cuja atividade quinase é regulada pelos respectivos ligantes. Ex: receptor de EGF (rEGF), receptor de PDGF (rPDGF).

b) Não-transmembrânicas - a proteína pp60C-SRC (revisada por Cantley et al,1991) representa o mais bem estudado exemplo. Além do domínio quinase, comum às proteínas tirosina quinases, pp60C-SRC apresenta sequências conservadas adicionais. Estas regiões incluem um sítio para adição de ácido mirístico, e dois outros domínios denominados Src homology 2 e 3 (SH-2 e SH-3). A adição de ácido mirístico é necessária para a localização na face interna da membrana plasmática. Os domínios SH-2 e SH-3 estão presentes também

em proteínas não relacionadas a tirosinas quinases. O domínio **SH-2** apresenta a capacidade de ligar-se a proteínas tirosina fosforiladas. Portanto a fosforilação de tirosinas cria sítios específicos para proteínas que apresentam domínios **SH-2** e desta forma regula a **associação entre** proteínas dentro da célula. A maioria **das proteínas que** contêm o domínio **SH-2** apresentam também **o domínio SH-3.** Drubin e colegas,1990, mostraram que proteínas contendo o domínio **SH-3** são encontradas associadas com o citoesqueleto de actina cortical, uma rede proteica submembranosa que é importante na regulação da forma, aderência e movimento celular. Estas proteínas, como alfa espectrinas, miosina 1b e ABP 1 (proteína ligante de actina de levedura) não apresentam domínios **SH-2**, indicando que **SH-2** e **SH-3** não são parceiros obrigatórios (Koch et al,1991). Apesar de as proteínas tirosina quinases não-transmembrana não apresentarem domínios extracelulares há evidências de que estas quinases sejam ativadas por fatores de crescimento e outros ativadores celulares (Ferrel e Martin,1988; Gould e Hunter,1988; Nasmith et al,1989).

2- Mediados por receptores acoplados a proteínas G - a ligação do agonista (hormônios, neurotransmissores e outros fatores biologicamente ativos) leva à ativação de proteínas G específicas. As subunidades alfa de proteínas G ativadas modulam a atividade de alvos específicos como a adenilato ciclase, fosfolipases A e C e canais iônicos.

3- Mediados por receptores nucleares de hormônios esteróides - a ativação destes receptores pelos seus ligantes induzem ou reprimem a expressão gênica (revisado por Shepel e Gorski,1988).

4- Mediados por canais iônicos - a ligação do agonista controla a abertura e fechamento dos canais de forma direta, quando o próprio canal é o receptor (Brown e Birnbaumer,1988), ou de forma indireta, quando utilizam mensageiros secundários citoplasmáticos após ativação de enzimas como adenilato ciclase ou fosfolipase C por proteínas G acopladas a receptores específicos (Reuter,1987).

5- Mediados por receptores fosfotirosina fosfatase - a ativação destes receptores pode causar aumento ou inibição da atividade intrínseca do domínio catalítico (revisado por Hunter,1989).

6- Mediados por integrinas - Proteínas de matriz extracelular influenciam o crescimento e diferenciação de células eucarióticas. Pelo menos parte desta influência é delegada à ligação de proteínas de matriz extracelular aos receptores de superfície, denominados de integrinas. Integrinas são glicoproteínas transmembrânicas que ligam estruturalmente a matriz extracelular ao citoesqueleto (Hynes,1987). Hirst et al (1986) observaram que integrinas são fosforiladas em fibroblastos de embrião de galinha transformados com o vírus de sarcoma de Rous (RSV), e que se co-localizam com pp60V-SRC. Integrinas, pp60V-SRC e proteínas

associadas a citoesqueleto apresentam-se concentradas nas placas de adesão (Rohrschneider,1980; Sealock et al,1986; Marchisio et al,1987; Burridge et al,1990). Estas, além de servirem como pontos estáticos de contato ao substrato, funcionam também em aspectos mais dinâmicos da atividade celular. Quando células se movem, novas placas de adesão são formadas próximas às extremidades anteriores dos **lamellipodia** (extensões celulares planas características de células que se movem sobre o substrato), enquanto que as placas de adesão posteriores da célula se dissolvem (Darnell,1990). Acredita-se que estas placas de adesão estão envolvidas na organização de filamentos de actina que estão associados à membrana plasmática, e que podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pela organização de proteínas de superfície, como fibronectina, nestes sítios (Darribere et al, 1990). Estas observações sugerem que modificações pós-traducionais de integrinas poderiam regular a formação de pontes fibronectina-integrina-citoesqueleto, modulando assim a adesão das células ao substrato.

Pouco é conhecido a respeito da função biológica e regulação da $pp60^{c-src}$, que por enquanto é ainda uma quinase a procura de um ligante regulatório. Ferrel e Martin (1989) sugerem que integrinas poderiam ser tais ligantes regulatórios para $pp60^{c-src}$, ou seja, integrinas poderiam modular a atividade de tirosinas quinases. Desta maneira, tirosinas quinases excessivamente expressadas ou ativadas por mutações específicas poderiam contribuir para

transformação maligna de células devido à sinalização errônea de interações célula-matriz extracelular, e portanto induzindo a proliferação celular de forma independente de ancoragem.

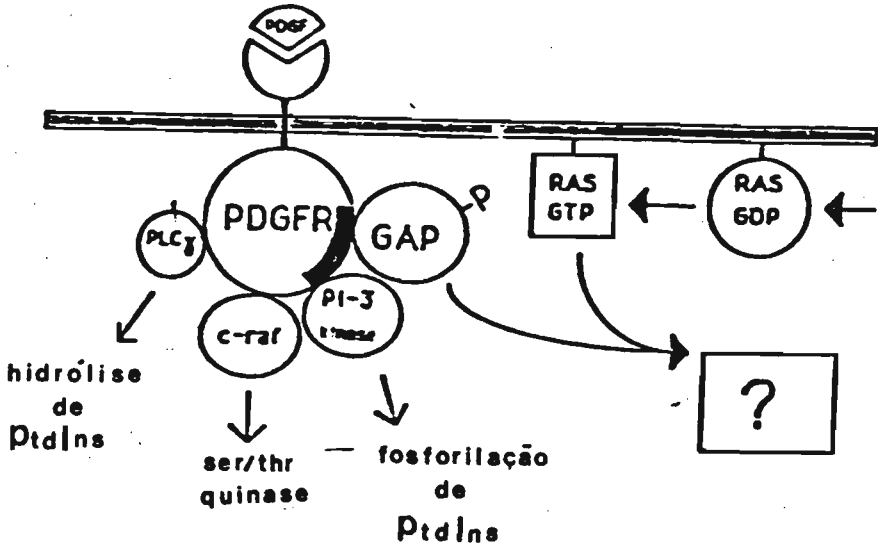
Dentre os mecanismos de transdução de sinais citados aqui, os que envolvem proteínas tirosina quinases e receptores acoplados a proteínas G, são os mais conhecidos. Estes dois mecanismos serão portanto melhor descritos a seguir.

Receptores com atividade de tirosina quinase

Estes receptores apresentam um domínio citossólico com atividade de tirosina quinase que é regulada pela ligação do agonista ao domínio extracelular. O mecanismo pelo qual respostas secundárias são estimuladas vem tornando-se mais claro nos últimos anos. A ligação dos agonistas permite que domínios citossólicos adjacentes em dímeros de receptores fosforilem-se, uns aos outros, nos resíduos de tirosina, causando desta forma uma mudança conformacional que aumenta a atividade quinase em relação a outros substratos. A autofosforilação ou fosforilação cruzada dos receptores, causada pela ligação do ligante, não apenas aumentaria a atividade de tirosina quinase do receptor mas também criaria sítios de ligação para recrutamento de enzimas específicas. Enzimas como fosfatidilinositol 3-quinase (PtdIns 3-

quinase), fosfolipase C (**PLC**)e proteína ativadora de GTPase de **ras** (**ras GAP**) apresentam domínios **SH2** e **SH3** que como em pp60^{c-src} possuem a capacidade de ligar-se a proteínas tirosina fosforiladas(**SH-2**) e à rede cortical de actina (**SH-3**). Estas enzimas são encontradas associadas a receptores com atividade de tirosina quinase.

O r**PDGF**, em resposta a seu ligante, dimeriza e fosforila suas tirosinas, altera sua conformação citoplasmática e aumenta sua capacidade de fosforilar tirosinas de outras proteínas (Kaplan et al,1990). A observação de que alguns receptores tirosina quinase ativados associam-se aos seus substratos facilitou o estudo e caracterização destes substratos sinalizadores, que vêem sendo identificados através da imunoprecipitação dos receptores. Enzimas como **ras GAP**, **PLC**, PtdIns 3-quinase e **c-raf-1** (serina/treonina quinase) foram encontradas associadas ao r**PDGF** e são por ele fosforiladas (revisado por Cantley et al,1991) (Esquema 1). O efeito da fosforilação destas e outras enzimas pelo receptor ativado ainda não é bem conhecido. Notavelmente estas enzimas possuem substratos na membrana plasmática, portanto o seu recrutamento para a membrana pelo r**PDGF** já poderia contribuir para a sua ativação.



Esquema 1- O receptor de **PDGF** estimulado complexa-se com uma variedade de moléculas sinalizadoras (adaptado de Hall,1990).

As células eucarióticas apresentam, como já mencionado, uma densa rede de microfilamentos (filamentos de actina mais proteínas associadas) em associação próxima com a membrana plasmática, o citoesqueleto cortical celular. As alterações morfológicas frequentemente verificadas em resposta a fatores de crescimento refletem modificações na organização deste sistema de filamentos de actina. O aumento da atividade do ciclo de PtdIns induzido pela interação fator de crescimento-receptor parece estar relacionado com a organização destes filamentos de actina (Lassing e Lindberg,1985). A enzima PtdIns 3-quinase converte os três fosfoinositóis PtdIns, PtdIns(4)P e PtdIns(4,5)P_2 a

PtdIns(3)P, PtdIns(3,4)P2 e PtdIns(3,4,5)P3, respectivamente. Os fosfoinositóis fosforilados na posição 3 não são substrato para nenhuma das fosfolipases C conhecidas. Uma possibilidade seria que eles promovessem rearranjos nos filamentos de actina, que é uma resposta comum ao estímulo por fatores de crescimento e pelo menos parcialmente responsável pelas alterações morfológicas celulares observadas (Severinsson et al,1990).

A relevância do recrutamento e fosforilação das tirosinas de **ras GAP** também não é clara. Uma possibilidade é que esta modificação ativaria a via de **ras** por bloqueamento da atividade "down" regulatória de **ras** por **ras GAP** (revisado por Hunter,1991).

A ativação da **PLC** estimularia a via comum do PtdIns, gerando uma elevação nos níveis intracelulares de cálcio e ativação da proteína quinase C. A fosforilação da **PLC** pelo **rEGF** parece aumentar sua atividade catalítica (Nishibe et al,1990).

Raf-1 é homóloga a **v-raf**, o gene transformante do vírus de sarcoma murino 3611 (Rapp et al,1983). O produto do gene **raf-1** é uma proteína citossólica de 74 kD que apresenta atividade serina/treonina quinase. A identidade e localização celular dos substratos de **raf-1** são desconhecidos. A sua associação com o **rPDGF** pode servir para ativar sua atividade quinase através de fosforilação em tirosinas e localizar **raf-1** na membrana celular onde esta pode possuir substratos. Alternativamente, **raf-1** poderia

dissociar-se do receptor e fosforilar substratos no citoplasma (Morrison et al,1989).

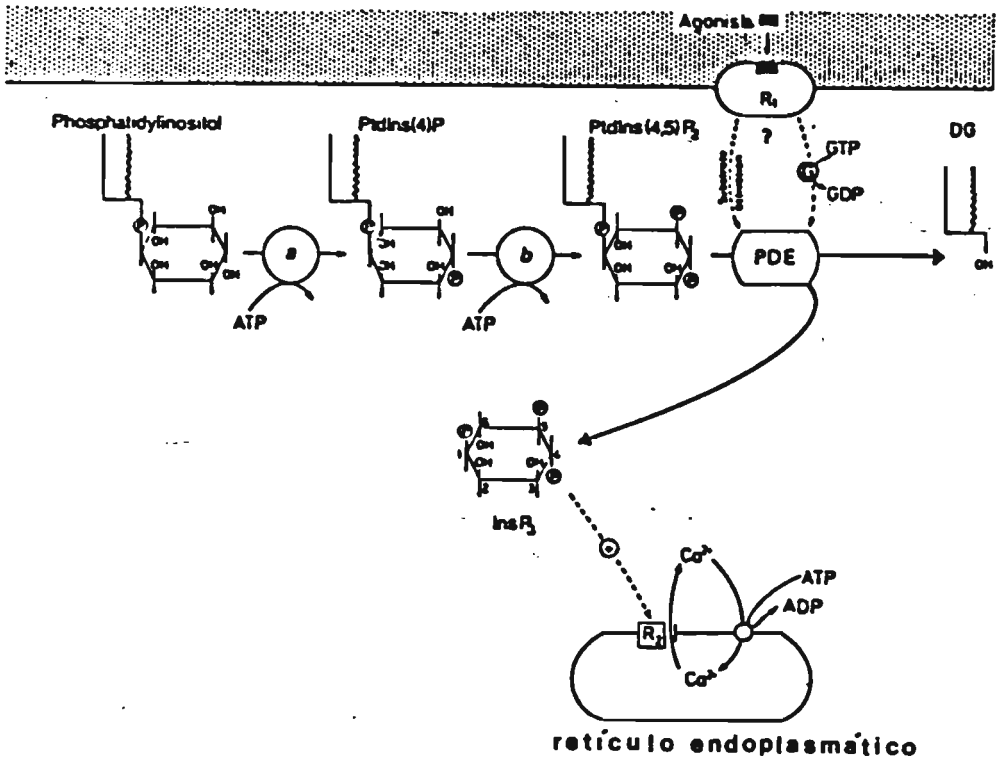
Outros receptores como os de insulina, de **EGF** e do fator estimulador de colônia-1 (**CSF-1**), assim como $pp60^{c-src}$ também são capazes de formar estes complexos multipotentes cuja função ainda é desconhecida mas que devem desempenhar importante papel na transdução de sinais (Cantley et al,1991).

Receptores acoplados a proteínas G

As proteínas G compreendem uma família de proteínas associadas à membrana que transduzem sinais extracelulares em uma diversa gama de respostas celulares (Gilman,1987). Todas estas proteínas ligam e hidrolizam GTP, que regula as suas interações com enzimas efetoras. Receptores podem estimular a enzima adenilato ciclase via proteína G, controlando desta forma os níveis intracelulares de AMPc. Todos os efeitos celulares conhecidos de AMPc ocorrem via a ativação da proteína dependente de AMPc (**PKA**) (Taylor et al,1990). Sabe-se que o AMPc media a estimulação hormonal de vários genes de eucariotos através de um elemento responsivo conservado, o CRE (**cAMP responsive element**), presente nas regiões regulatórias destes genes (Montminy et al,1986). A **PKA** media a fosforilação de fatores críticos para a resposta de transcrição.

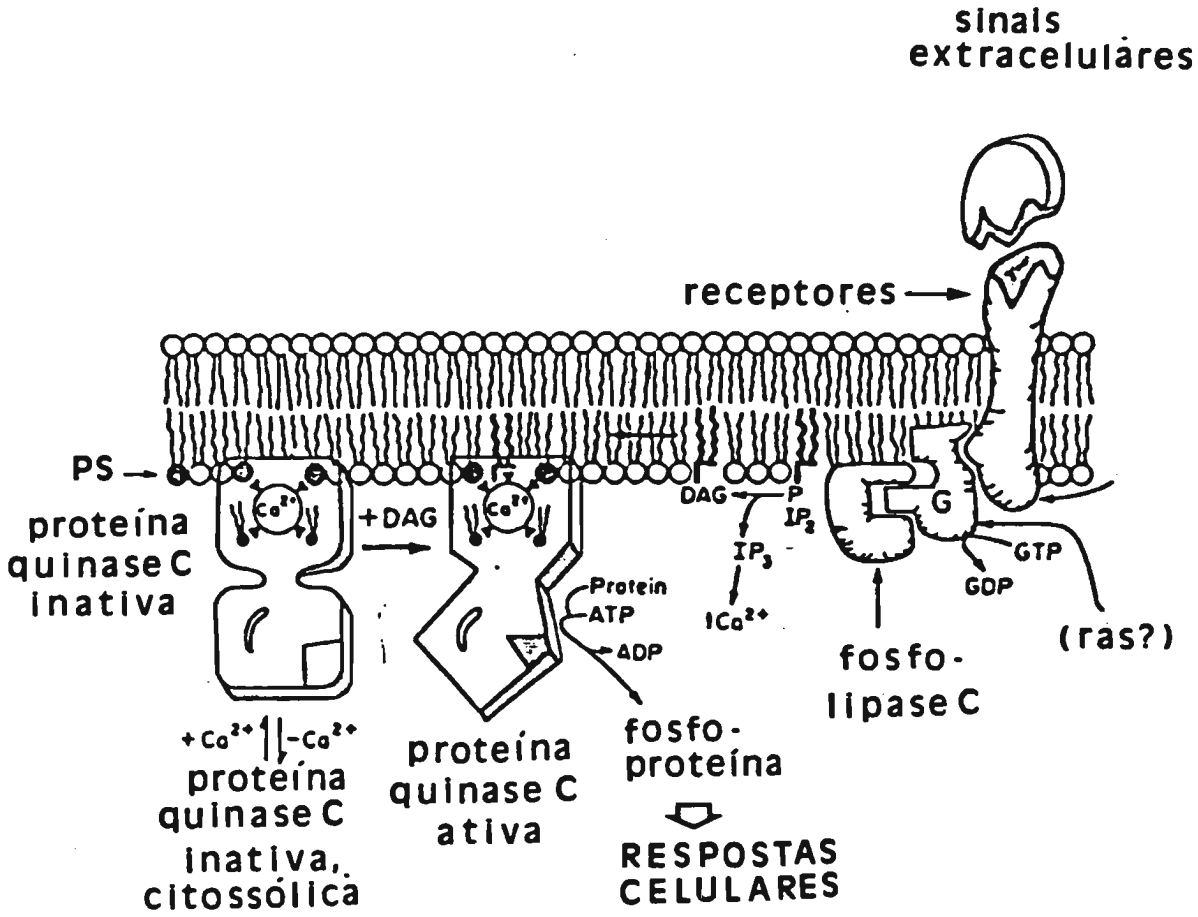
A hidrólise de fosfatidilinositóis mediada por receptores via proteína G representa um mecanismo importante de transdução de sinais para dentro da célula, tais como os de hormônios, neurotransmissores, alguns fatores de crescimento e outras substâncias biologicamente ativas. O fosfatidilinositol (4,5) bifosfato (PtdIns(4,5)P_2) é um inositol lipídio localizado na face interna da membrana plasmática e é formado através de dois estágios de fosforilação do fosfatidilinositol (PtdIns) por quinases específicas. Há também fosfatases correspondentes que convertem PtdIns(4,5)P_2 a PtdIns. A ocupação do receptor pelo agonista ativa a **PLC** que cliva o PtdIns(4,5)P_2 em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3)(Berridge e Irvine,1984) (Esquema 2). Ambos, DAG e IP3 estão presentes transientemente após a estimulação e são rapidamente degradados.

O IP3 é responsável pela mobilização do cálcio de reservas intracelulares, como o retículo endoplasmático, aumentando seus níveis citoplasmáticos (Berridge e Irvine,1984).



Esquema 2 - Hidrólise de PtdIns(4,5)P_2 induzida pela estimulação do agonista. (PDE=fosfodiesterase; a=PtdIns quinase; b=PtdIns-4 quinase; R2=receptor específico para inositol 3 fosfato) (Berridge e Irvine,1984).

O outro mensageiro secundário, DAG, ativa a proteína serina/treonina quinase dependente de cálcio e fosfolipídeos (**PKC**) (Nishizuka,1984). O esquema 3 apresenta um modelo para a ativação da **PKC** por DAG:



Esquema 3 - Mecanismo de ativação da **PKC** por diacilglicerol (DAG) (Bell,1986).

Quatro moléculas de fosfatidilserina (**PS**) formam uma estrutura na superfície da membrana e ligam cálcio através de seus grupos carboxila. **PKC** liga-se a este complexo de **PS** e cálcio. Neste caso a enzima está posicionada mas inativa. DAG é produzido em resposta a sinais extracelulares (através de uma sequência de eventos que envolvem a ativação da **PLC** dependente da proteína G), move-se rapidamente no plano

lateral da membrana e interage com o complexo **PKC-4PS-Ca^{2+}**. Uma alteração conformacional resultante desta ligação ativa a enzima, que poderia ser inativada quando da atenuação dos sinais transmembrana (Bell,1986). Os ésteres de forbol promotores de tumores podem substituir DAG e ativar permanentemente a **PKC**. Aparentemente os ésteres de forbol e o DAG competem pelo mesmo sítio de ligação na **PKC**, mas apresentam maior afinidade que o DAG. Isto, aliado ao fato de que estes promotores tumorais não são rapidamente metabolizados é que leva a seus extraordinários efeitos fisiológicos (Nishizuka,1984).

Proteína quinase C (PKC)

Nishizuka e colegas foram os primeiros a identificar a **PKC** como uma proenzima que requer concentrações milimolares de cálcio para sua atividade (Takai et al,1977). Após ativação irreversível por calpaína, uma protease presente nos extratos celulares, observava-se uma alteração no peso molecular da **PKC**, de 80 kD para 50 kD. Mais tarde foi demonstrado por Nishizuka (1984) ativação reversível da enzima com aproximadamente 10 uM de cálcio e ácido fosfolipídico e que as concentrações de ativação para estes dois efetuadores poderiam ser reduzidas por DAG.

PKC é uma enzima ubíquamente distribuída, tendo sido encontrada em praticamente todos os tecidos testados (Nishizuka,1984; Kuo et al,1980). É particularmente concentrada no sistema nervoso e provavelmente desempenha importante papel em transmissões sinápticas. Sua ampla distribuição, no entanto, sugere que também desempenhe papéis importantes no controle ou modulação de vários outros processos biológicos. **PKC** é acídica, com um pI entre 5.0 e 5.5 e composta de uma única cadeia polipeptídica com um peso molecular aparente de 79 - 83 kD em SDS PAGE. Sabe-se hoje que **PKC** faz parte de uma grande família de proteínas, com várias subespécies que apresentam características enzimológicas sutilmente individuais (Nishizuka,1988; Carpenter et al,1987). Alguns membros da família apresentam padrões distintos de expressão tecidual e localização

intracelular. Quinases diferentes apresentam provavelmente funções distintas no processamento e modulação de uma variedade de respostas a sinais externos.

As isoenzimas **PKC** consistem de um domínio catalítico (carbóxi-terminal) e um domínio regulatório (amino-terminal) (Nishizuka,1988). O domínio catalítico contém sequências incluindo o sítio de ligação para ATP, que são homólogas a outras proteínas quinases. Os domínios regulatórios de algumas isoenzimas apresentam sítios para ligação de cálcio, e todas apresentam um motivo denominado de pseudosubstrato no seu domínio regulatório. Este motivo pseudosubstrato, identificado por House e Kemp (1987a) pode interagir com o sítio ativo da enzima, inativando-a na ausência de fatores ativadores.

Aminoácidos básicos próximos aos resíduos de serina ou treonina fosforilados são fatores importantes dos sítios fosforilados pela **PKC**. Em contraste com a **PKA**, não foi determinada ainda uma sequência consenso para fosforilação pela **PKC** (House et al,1987b). Todas as **PKC** requerem resíduos básicos mas há uma variação considerável na justaposição e escolha de arginina ou lisina ao redor do sítio de fosforilação (Kemp e Pearson,1990). Peptídeos sintéticos contendo o motivo XRXX**S**XRX (onde X representa qualquer aminoácido) tendem a ser os melhores substratos. Arranjo muito parecido está presente no pseudosubstrato autoregulador da enzima, só que este apresenta uma alanina ao invés da serina ou treonina no sítio de fosforilação:

RFARKGALRQKNV (House e Kemp,1987a). Analisando vários peptídeos análogos a substratos de **PKC**, House e colegas (1987b) chegaram a conclusão de que um único aminoácido básico, preferencialmente arginina, é o determinante mais importante para a fosforilação, mas que resíduos básicos adicionais podem influenciar a cinética de fosforilação dos peptídeos. Além disto, **PKC** pode reconhecer estes determinantes em qualquer lado do sítio de fosforilação (House et al,1987b). **PKC** é também capaz de se autofosforilar em três regiões diferentes de sua sequência primária, o que provavelmente implica em uma autoregulação de sua função biológica (Flint et al,1990).

Substratos e algumas funções da PKC

A estimulação da hidrólise de fosfatidilinositóis é uma resposta comum a tratamento com fatores de crescimento (Hunter,1987). Como consequência da ativação de DAG vários eventos de fosforilação por **PKC** são detectados após tratamento com mitógenos. **PKC** está presente na maioria dos tipos celulares, indicando que apresenta várias funções celulares críticas (Nishizuka,1984).

O fato de que a ativação da **PKC** é uma resposta comum a quase todos os mitógenos, e que promotores tumorais são mitogênicos para certos tipos celulares, levou a uma busca intensiva de substratos para **PKC**. Apesar de **PKC** poder

fosforilar um grande número de proteínas **in vitro**, tem sido extraordináriamente difícil identificar funções num número menor de proteínas que são fosforiladas em células intactas.

Vários substratos de PKC foram identificados utilizando-se os critérios de que a fosforilação da proteína deveria aumentar em células tratadas com **TPA** e que a proteína purificada deveria ser fosforilada **in vitro** no mesmo sítio pela **PKC** purificada (Woodget et al,1987). Devido a suposta localização da enzima ativa, não é surpreendente que vários destes substratos são proteínas associadas à membrana. Na realidade diferentes isozimas de **PKC** podem translocar-se para sítios celulares distintos, o que explica a variedade de repostas celulares por ela controladas (Mochly-Rosen et al,1990).

Uma importante função da **PKC** parece estar intimamente relacionada com o controle negativo de receptores de superfície celular (**down regulation**). A fosforilação do rEGF pela **PKC** causa inibição da sua atividade tirosina quinase (Cochet,1984); diminuição da afinidade de ligação do receptor a EGF (Davis e Czech,1986), e parece promover a internalização do receptor (Fearn e King,1985). Da mesma forma, a fosforilação do receptor de insulina pela **PKC** leva a uma redução na capacidade de ligação da insulina assim como inibição da sua atividade de tirosina quinase (Takayama et al,1984).

A demonstração de que vários oncogenes codificam para proteínas envolvidas em vias de transdução de sinal enfatiza

uma ligação entre os mecanismos de regulação de crescimento celular e usurpação destes processos em neoplasias. Membros da família gênica **ras** codificam para um grupo de proteínas de 21 kD localizadas na membrana plasmática que lembram proteínas G porque ligam nucleotídeos de guanina e apresentam atividade GTPásica (Sweet et al,1984). Possivelmente, proteínas **ras** no estado GTP ligado ou ativo estimulam a via de fosfolipase C continuamente, levando a uma ativação persistente da **PKC** (Fleishman et al,1986;Smith et al,1990).

Em células eucarióticas a taxa de transcrição de vários genes é alterada em resposta a estímulos externos. Alterações na expressão de genes em resposta a agentes como hormônios esteróides, fatores de crescimento, promotores tumorais, choques térmicos e íons de metais pesados são mediados através de sequências de DNA que agem em **cis**, como os **enhancers** (Maniatis et al,1987). O fator nuclear kB (**NFk-B**), que foi primeiro detectado devido a sua capacidade de ligar-se ao **enhancer** da cadeia leve k de imunoglobulina (Sen e Baltimore,1986a), é importante também para a expressão regulada de outros genes. **NFk-B** está presente em uma forma nuclear ligante de DNA em linfócitos B e macrófagos maduros, mas em forma citoplasmática e incapaz de ligar-se ao DNA em várias outras células (Sen e Baltimore,1986b). A forma citoplasmática é ligada a um inibidor **IkB**, do qual ela pode ser liberada através da estimulação por ésteres de forbol (Sen e Baltimore,1986b). A fosforilação de **IkB** pela **PKC** em

um complexo **NFk-B/IkB** pode liberar **NFk-B** da inibição, permitindo que este transloque-se para dentro do núcleo e ative seus genes alvo (Ghosh e Baltimore,1990).

Entre os genes cuja transcrição é induzida por **TPA** estão os proto-oncogenes **c-fos**, **c-sis**, **c-myc** e o gene da colagenase (Greenberg e Ziff,1984; Colamonici et al,1986; Whitham et al,1986) . A via responsável pela transdução do sinal gerado pela ativação da **PKC** até a maquinaria de transcrição não é conhecida. Uma sequência conservada está presente nas regiões regulatórias dos genes induzíveis por **TPA**. Esta sequência denominada **TRE** (**TPA responsive element**) serve como sítio de ligação para o fator de transcrição **AP-1** (Angel et al,1987). O complexo **AP-1** consiste dos produtos dos oncogenes **fos** e **jun**, cuja transcrição é induzida por **TPA** (Verma e Sassone-Corsi,1987). Parece portanto que **fos** e **jun** estão envolvidos na resposta celular à via de transdução de sinal dependente de **PKC**.

Há vários substratos de **PKC** localizados no citoesqueleto e estes podem servir de instrumento para as rápidas modificações morfológicas documentadas em células tratadas com fatores de crescimento ou **TPA**. Sabe-se que **PKC** fosforila proteínas de filamentos intermediários como vimentina, desmina e neurofilamento L, causando a sua despolimerização reversível (Inagaki et al,1987; Kitamura et al,1989; Hisanaga et al,1990). Mochly-Rosen e colegas (1990) observaram que a isozima CK1.4 de **PKC** ativada transloca-se

para elementos de citoesqueleto em miócitos cardíacos e para microfilamentos em fibroblastos.

Uma proteína acídica, de peso molecular real 31.950, e que em SDS PAGE apresenta um peso molecular aparente de 80-87 kD foi identificada como um dos substratos majoritários para **PKC** (Wu et al,1982; Rozengurt et al,1983; Albert et al,1986; Patel e Klingman,1987). Esta proteína foi denominada **MARCKS** (**myristoylated, alanine-rich C-kinase substrate**) (Stumpo et al,1989). **MARCKS** é uma proteína ligante de actina (Hartwig et al, dados não publicados) e de calmodulina (Graff et al,1989) cuja ligação à membrana plasmática aderente ao substrato é regulada pela **PKC**. Sendo assim, representa uma molécula candidata ideal através da qual **PKC** poderia regular a associação reversível do citoesqueleto de actina com a membrana plasmática aderente ao substrato, que é um pre-requisito para a locomoção assim como outras alterações morfológicas celulares.

Plaquetas e transdução de sinais

Plaquetas são pequenos fragmentos de citoplasma que se destacam de células muito grandes chamadas megacariócitos, localizados na medula óssea. As plaquetas são anucleadas e não proliferativas e apresentam uma capacidade limitada de sintetizar RNA ou proteínas. Apesar disto os mecanismos

intracelulares regulatórios de plaquetas ativadas são complexos.

A essência da função plaquetária é sua resposta a estímulos. Quando ativadas, as plaquetas apresentam modificações dramáticas: elas modificam sua forma, agregam e secretam os conteúdos de seus grânulos. Uma grande variedade de agonistas plaquetários, incluindo trombina, trombospondina, colágeno e o fator de ativação plaquetário (**PAF**), atuam em receptores de membrana específicos. As interações destes agonistas com seus receptores de superfície estão presumivelmente acopladas às respostas plaquetárias através de vários mensageiros secundários intracelulares.

Plaquetas têm sido amplamente utilizadas para a investigação de mecanismos de transdução de sinal, particularmente aqueles que envolvem a hidrólise de $PtdInsP_2$, em que os mensageiros secundários DAG e IP3 ativam respectivamente a **PKC** e a liberação de Ca^{++} das reservas intracelulares (Nishizuka,1986). A elevação dos níveis intracelulares de Ca^{++} e ativação da **PKC** são passos essenciais na transdução de sinais de agonistas em plaquetas que levam à agregação e secreção (Berridge e Irvine,1984). Acredita-se que trombospondina esteja envolvida em agregação plaquetária (Lawler,1986). A glicoproteína IIIb ou IV é uma das proteínas majoritárias da superfície de plaquetas e atua como sítio receptor para trombospondina (Mc Gregor et al,1989).

Na maioria dos tecidos a atividade enzimática de **PKC** é comparável a de **PKA**. Em plaquetas, no entanto, a atividade de **PKC** excede muito a de **PKA** sendo aproximadamente 20 vezes mais ativa (Minakuchi et al,1981), devendo portanto desempenhar papéis de extrema importância na ação de vários mensageiros extracelulares. Apesar de várias funções plaquetárias serem controladas pela **PKC** poucos de seus substratos são conhecidos e tampouco a maneira pela qual estes produzem estas respostas celulares. Agonistas como trombina causam a fosforilação via **PKC** de uma proteína de aproximadamente 40 kD que usualmente precede a secreção dos conteúdos de grânulos plaquetários (Haslam e Linham,1977;Kawahara et al,1980). Esta proteína, denominada p47 ou **pleckstrin (platelet and leukocyte C kinase substrate)**, foi clonada recentemente por Tyers e colegas (1988) de células HL60, que tornam-se enriquecidas de p47 quando induzidas a diferenciar com ácido retinóico. A p47 apresenta um provável sítio de fosforilação (QKARKSTRRSIRL) que lembra muito o sítio pseudosubstrato de **PKC**. Não apresentou homologia significativa com nenhuma proteína conhecida, e sua função ainda é desconhecida.

Uma variedade de substratos não identificados de **PKC** são fosforilados durante a ativação plaquetária. Além da p47 outras proteínas de pesos moleculares de 80, 56, 27 e 20 kD são fosforiladas em plaquetas ativadas por trombina (Wallace e Bensusan,1980). O tratamento de plaquetas com ésteres de forbol resulta na fosforilação de vários peptídeos,

incluindo a cadeia pesada e a cadeia leve de 20 kD da miosina (Kawamoto et al,1989). O significado biológico da fosforilação das cadeias de miosina ainda não é conhecido. O complexo glicoproteico GpIIb-IIIa é uma integrina multifuncional abundante em plaquetas. GpIIIa é fosforilada pela **PKC** (Parise et al,1990). Quando as plaquetas são ativadas, GpIIb-IIIa é convertida de uma forma que não liga fibrinogênio a uma forma que liga. Além disto seu domínio intracelular adquire capacidade de ligar-se ao citoesqueleto. A fosforilação de GpIIIa pode representar um mecanismo através do qual as funções de GpIIb-IIIa possam ser reguladas.

Um complexo contendo PtdIns 3-fosfato foi detectado em plaquetas estimuladas com trombina (Mitchell et al,1990). No entanto proteínas contendo fosfotirosinas não foram detectadas. O mecanismo de formação de complexos contendo PtdIns 3-fosfato pode ser diferente em plaquetas em relação a outros sistemas. A estimulação da formação destes complexos em plaquetas por trombina implica talvez que fosfoinositóis com 3 fosfato apresentam alguma função não envolvida exclusivamente com proliferação celular.

Além de ativar a **PLC** e consequentemente a **PKC**, trombina ativa proteínas tirosina quinase em plaquetas (Ferrel e Martin,1988). Plaquetas expressam altos níveis de atividade de $pp60^{c-src}$, níveis estes compatíveis com os de células transformadas com o vírus de sarcoma de Rous (Golden et al,1986). A detecção destes elevados níveis de $pp60^{c-src}$ em

plaquetas indica que esta atividade não é exclusivamente relacionada ao controle de crescimento, mas que pode estar envolvido em outras funções celulares.

OBJETIVOS E ABORDAGEM EXPERIMENTAL

Plaquetas podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de metástases tumorais (Karpatkin e Pearlstein,1981). Sendo assim, os eventos que levam à ativação plaquetária como secreção e agregação podem significar etapas importantes na disseminação de células invasivas (Tuszynski et al,1987).

O objetivo inicial deste trabalho foi clonar e caracterizar proteínas plaquetárias envolvidas no processo de agregação plaquetária. Com o intuito de clonar o receptor do agente agregante trombospondina, GpIIIb, produziu-se um soro policlonal contra uma banda eluída de **SDS PAGE** 7.5% de extrato proteico de plaquetas humanas, que apresentava peso molecular igual ao de GpIIIb (banda 80 kD). O soro policlonal foi utilizado para varrer uma biblioteca de cDNA de endotélio de cordão umbilical humano e dois clones foram isolados, e sequenciados. Os clones não apresentaram homologia com GpIIIb, que foi clonada em 1989 por Oquendo e colegas. Um dos clones apresentou 100% de homologia com a

proteína 80K-H, substrato de PKC, e o outro, não apresentou homologia com nenhuma proteína até então clonada.

Como vários agonistas plaquetários utilizam a via de ativação da PKC para desencadear suas respostas, e como os substratos de PKC em plaquetas e em células em geral são pouco conhecidos, decidiu-se caracterizar a proteína 80K-H utilizando-se um soro policlonal específico contra esta proteína obtido a partir da imunização de camundongos com a proteína de fusão correspondente. Este soro policlonal (anti-80K-H) foi utilizado em ensaios bioquímicos e imunoquímicos que permitiram analisar a proteína 80K-H quanto a alguns aspectos como localização subcelular, fosforilação "in vivo" e distribuição em diferentes tipos celulares.

MATERIAIS E MÉTODOS

1-Produção de anticorpos policlonais anti-plaquetas

Camundongos foram injetados com uma banda extraída de **SDS PAGE** 7.5% de extrato proteico de plaquetas, que apresentava peso molecular igual ao de Gp IIIb (denominada banda 80 kD). A banda foi macerada em PBS (2mM Na_2HPO_4, 5mM NaH_2PO_4, 140mM NaCl) e injetada intraperitonialmente com intervalos de 10 dias. Após 3 ou 4 imunizações, a especificidade e o título dos soros obtidos foram testados pelo método de **ELISA** (Engvall,1980). Outros camundongos foram injetados com pedaços de poliacrilamida macerados em PBS da mesma maneira, porém sem o componente proteico, e seus soros foram utilizados como controle negativo.

2- Varredura imunológica da biblioteca de cDNA (Glover,1985)

A biblioteca de cDNA utilizada foi cedida por David Ginsburg da Universidade de Michigan. O cDNA foi construído a partir de mRNA de endotélio umbilical humano utilizando-se hexanucleotídeos randômicos. O cDNA obtido foi ligado no vetor de expressão lambda gt11 (Ginsburg et al,1985).

Fagos recombinantes foram adsorvidos (10^4 pfu/placa de Petri) em E.coli RY1090 (Promega) a 37°C por 20 minutos e plaqueados em LB amp (10 g/l bacto triptona, 5 g/l extrato de levedura, 10 g/l NaCl, pH 7,5, 15 g/l agar, 100 mg/l ampicilina) a 42°C por 3 a 4 horas. Um filtro de nitrocelulose (Schleicher e Schuell) seco, previamente saturado com 10 mM IPTG (BRL) foi colocado sobre cada uma das placas de Petri que foram então incubadas a 37°C por mais duas horas. A posição dos filtros em relação às placas foi marcada com um alfinete. Os filtros foram retirados, lavados em TBS (150mM NaCl, 20mM TrisHCl,pH 8,0), bloqueados uma hora com TBS 3% BSA e incubados por duas horas com o soro anti-80 kD diluído 1:2000 em TBS 1% BSA. Anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Sigma) foi utilizado como segundo anticorpo e a revelação foi realizada com NBT e BCIP (Promega) em tampão de fosfatase alcalina (100mM NaCl, 100mM TrisHCl pH9,5, 5mM $MgCl_2$).

Os sinais positivos obtidos foram retirados das placas com pipeta Pasteur e guardados em Eppendorfs contendo 0.5 ml de SM (5,8 g/l NaCl, 2,0 g/l $MgSO_4.7H_2O$, 6,0 g/l TrisHCl pH 7,5, 0,1 g/l gelatina). Como controle negativo para a varredura com o soro anti-80kD foi utilizado soro normal de camundongo e nenhum sinal positivo foi obtido. Os dez sinais mais fortes foram selecionados para mais duas varreduras onde os fagos eram cada vez mais diluídos até se obter placas de lise completamente isoladas. Desta forma foram então isolados 10 clones positivos.

3- Caracterização dos clones de lambda gt11 por Western blot

3.1-Preparação rápida de extrato proteico recombinante

O extrato proteico foi preparado segundo protocolo de Dalton, 1987. Resumidamente, 10^4 fagos de cada clone foram adsorvidos em E.coli RY1090 e plaqueados em LB amp a 37°C por 6 horas. As placas foram cobertas com 6 ml do tampão lambda diluente (2,0 g/l $MgSO_4.7H_2O$, 6,0 g/l TrisHCl pH 7,5) e mantidas em agitação durante a noite a 4°C. O tampão foi então retirado das placas e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi aliquotado e guardado a -20°C.

3.2-Análise dos extratos proteicos por Western blot

Aproximadamente 50 ug de extrato proteico de cada clone foram resolvidos em **SDS PAGE** reduzido 7.5% (Laemmli,1970) e o gel foi transferido para um filtro de nitrocelulose (Towbin et al,1979). Após a transferência o filtro foi corado com Ponceau S 1% ácido acético por 5 minutos e descorado com água até que se pudesse visualizar bem as bandas. O filtro foi bloqueado com TBSM 5% (TBS acrescido de 5% leite Molico) por 1 hora e depois incubado com o soro anti-80kD por 2 horas. Soros dos camundongos imunizados apenas com poliacrilamida foram utilizados como controle negativo da reação. Após 3 lavagens de 5 minutos em TBSM 5% o filtro foi incubado por mais 1 hora com anti IgG de camundongo conjugada a fosfatase alcalina e novamente

lavado. A revelação foi feita com NBT e BCIP (Promega) em tampão de fosfatase alcalina.

3.3- Purificação de anticorpos específicos (Ozaki et al,1986)

Anticorpos específicos para cada proteína de fusão foram purificados do soro anti 80 kD. Os fagos recombinantes foram plaqueados a uma densidade de 10^4 pfu por placa de Petri e incubados a 37°C por 3 horas. Um filtro de nitrocelulose previamente mergulhado em 10 mM IPTG (BRL) foi blotado sobre cada placa por 2 horas a 37°C. Após ser lavado em TBSM 5% o filtro foi incubado com o soro anti-80 kD diluído 1:5000 por 2 horas. Em seguida o filtro foi lavado 3 vezes em TBSM 5% e os anticorpos ligados foram eluídos com 3 ml de tampão de eluição (0.2 M glicina pH 2.8) por 5 minutos. O eluato foi imediatamente neutralizado com uma solução básica (0.25 M Tris base, 8 x TBS).

Os eluatos foram então utilizados em Western Blot de extrato proteico de plaquetas. Trezentos ug de extrato de plaquetas (1 mg/ml) foram resolvidos em gel preparativo **SDS PAGE** 7.5% (Laemmli,1970) e transferidos para um filtro de nitrocelulose (Towbin et al,1979). O filtro foi cortado em tiras e cada tira, depois de bloqueada com TBSM 5%, foi incubada com um eluato diferente. Um eluato do soro encubado em lambda gt11 não recombinante foi utilizado como controle negativo. As bandas foram visualizadas com segundo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina

revelado com NBT e BCIP (Promega) em tampão de fosfatase alcalina.

4- Amplificação dos clones (Maniatis,1982)

De cada clone, 10^4 fagos foram adsorvidos em E.coli RY1090 por 20 minutos a 37°C, plaqueados em LB amp e mantidos a 42°C por 14 horas. Cada placa foi coberta com 5 ml de SM (5,8 g/l NaCl, 2,0 g/l $MgSO_4.7H_2O$, 6,0 g/l TrisHCl pH 7,5, 1,1 g/l gelatina) e mantida a 4°C durante a noite. O sobrenadante foi recuperado, adicionado de 5% de clorofórmio, mantido por 15 minutos a temperatura ambiente e centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos. Depois foi aliquotado com 0.3% de clorofórmio e estocado a 4°C. Desta forma foi possível obter uma amplificação a um título de 10^{10} fagos/ml.

5- Caracterização do DNA dos clones

5.1- Preparação rápida de DNA de bacteriófago lambda (Maniatis et al,1982)

E.coli RY1090 foram adsorvidas com fagos (10^4 pfu) e plaqueadas em NZYCM sólido (10,0 g/l NZ amina, 5,0 g/l NaCl, 5,0 g/l extrato de levêdo, 1,0 g/l casamino ácidos, 2,0 g/l $MgSO_4.7H_2O$, 15,0 g/l agar) e 50 ug/ml de ampicilina por 12

horas a 42°C. Adicionou-se 5 ml de SM a cada placa que foram então agitadas durante duas horas a temperatura ambiente. O tampão foi retirado e centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi tratado com 1 ug/ml de DNAse I e RNAse A por 30 minutos a 37°C. Os fagos foram precipitados com PEG 20% e 2 M NaCl em SM durante 1 hora no gelo e recuperados por centrifugação a 10000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspendido em 0.5 ml de SM e novamente centrifugado, a 8000 rpm 2 minutos. O sobrenadante foi tratado com 5 ul de SDS 10% e 5 ul de 0.5 M EDTA pH 8.0 a 68°C durante 15 minutos. O DNA foi extraído duas vezes com fenol clorofórmio e uma vez com clorofórmio. A fase aquosa foi precipitada com 1 volume igual de isopropanol a -70°C por 20 minutos e centrifugada em Eppendorf por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com 0.5 ml de etanol 70%, seco a vácuo e ressuspendido em 25 ul de TE (10mM TrisHCl pH8,0, 1mMEDTA).

5.2- Análise do DNA por eletroforese em gel de agarose

Do DNA da preparação rápida, 10 ul foram digeridos com 10 U de ECO RI por 2 horas a 37°C e resolvidos por eletroforese em gel de agarose 0.8% na presença de 0.5 ug/ml de brometo de etídio. As bandas foram visualizadas através de iluminação com UV.

5.3- Análise do DNA por hibridização (Southern blot)

- Purificação de insertos de cDNA a partir de agarose:

As bandas do gel que continham os insertos foram retiradas e os insertos purificados com o kit Gene Clean da BIO 101. A agarose foi macerada com 2,5 volumes de NaI saturado por 5 minutos a 50°C. Os insertos foram recuperados com 5 ul de pó de sílica ultra fina por 5 minutos no gelo. A sílica foi lavada 3 vezes com 700 ul de tampão NEW (solução concentrada de NaCl, Tris pH 8.0 e EDTA). O DNA foi finalmente eluído em tampão de baixa força iônica (TE) e utilizado sem qualquer outra purificação.

- Marcação isotópica do DNA com alta atividade específica (Feinberg e Vogelstein,1983):

A marcação dos insertos foi feita com a utilização do kit "Random Primers DNA Labeling System" da BRL. Da preparação de insertos, 4 ul foram fervidos por dois minutos e depois mantidos no gelo por 5 minutos. A marcação foi feita com 1 U de Klenow na presença de 5 ul de 5 x OLB (0.67M HEPES, 0.17M Tris HCl, 17mM MgCl2, 33M 2-mercaptoetanol, 1.33 mg/ml BSA, 18 DO/ml de iniciadores oligodeoxinucleotídeos hexâmeros), 2 ul de dGTP 0.5 mM e 5 ul de [alfa ^{32}P] ATP (10 uCi/ul) por duas horas a temperatura ambiente. Após interromper a reação com 100 ul de TES a sonda foi recuperada por gel filtração em Sephadex G50 a 3000 rpm por 2 minutos. O rendimento da reação foi medido com 2 ul da sonda purificada diluída em aquasol no cintilador. As atividades específicas obtidas para as sondas foram em média 1x10^{8} cpm/ug.

- Transferência alcalina (Maniatis et al,1982):

Da preparação rápida de DNA, 10 ul foram digeridos com 10 U de ECO RI por 2 horas a 37°C e resolvidos por eletroforese em agarose 0.65% na presença de 0.5 ug/ml de brometo de etídio. Após a corrida o gel foi tratado com 0.2 N HCl por 15 minutos a temperatura ambiente com agitação lenta, duas vezes e depois com 0.5 M NaOH e 1.5 M NaCl por 45 minutos. Em seguida o gel foi montado para a transferência em tampão de transferência (0.25 M NaOH 1.5 M NaCl) utilizando-se o filtro Hybond N. Após a transferência o DNA foi fixado ao filtro com exposição a UV do transiluminador por 5 minutos e guardado a vácuo.

- Hibridização com DNA:

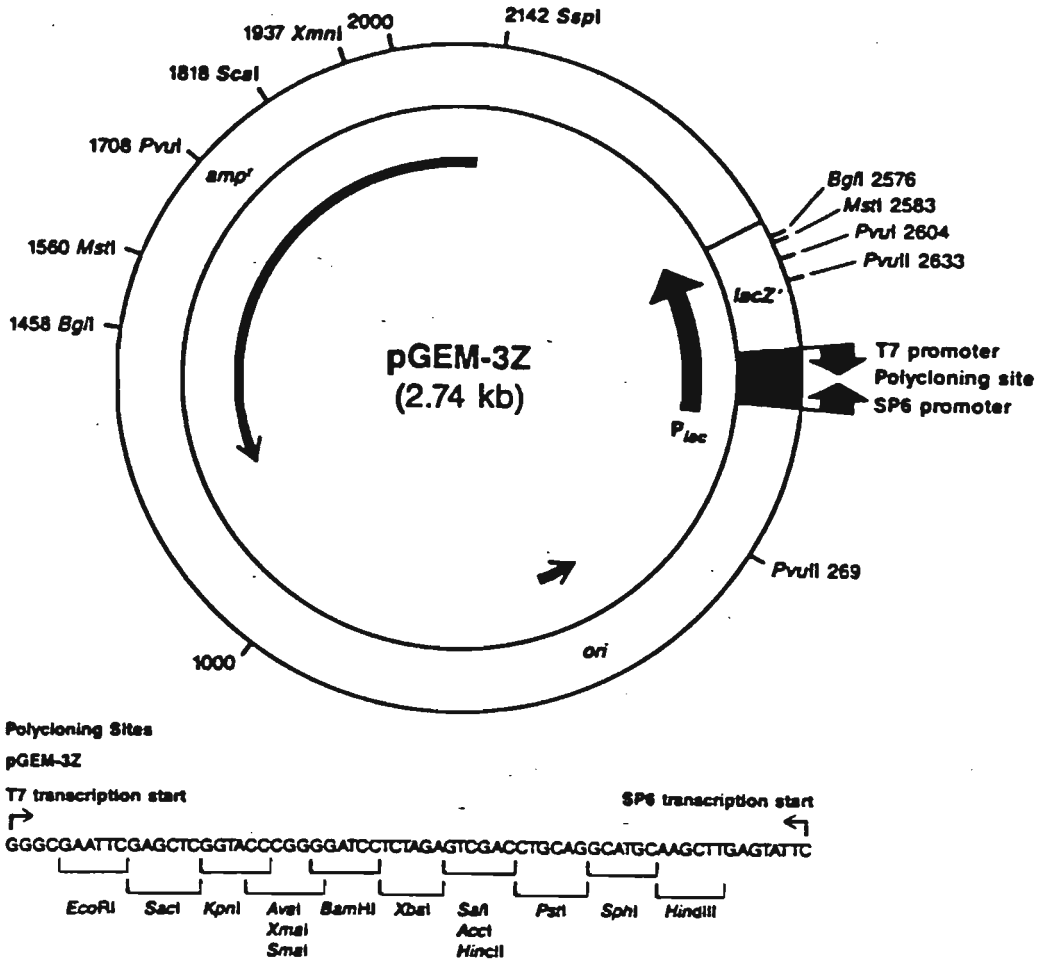
O filtro foi pré-hibridizado a 50°C com 42% de formamida, 6 x SSC (0,09M citrato de sódio, 0.9M NaCl), 0.1% SDS, 5 x Denhardt (10,0 g/l Ficoll, 10,0 g/l Polivinilpirrolidona, 10,0 g/l BSA) e 200 ug/ml de DNA de esperma de salmão, por 4 horas. A hibridização foi feita por 30 a 48 horas em solução de pré hibridização fresca contendo a sonda radioativa. O filtro foi lavado em 2 x SSC 0.1% SDS por 15 minutos a temperatura ambiente com agitação duas vezes e depois em 0.1 x SSC e 0.5% SDS a 68°C por 20 minutos com agitação também duas vezes. O filtro foi seco a temperatura ambiente e coberto com um filme de raio X por uma noite a -70°C com uma placa intensificadora.

6- Subclonagem dos insertos de cDNA

6.1- Preparação do vetor

O vetor utilizado para a subclonagem foi pGEM-3Z (Promega) que apresenta um sítio múltiplo de clonagem flanqueado por regiões promotoras para RNA polimerase dos fagos SP6 e T7 (Esquema 1). Além disto, pGEM-3Z apresenta o gene para o peptídio lac alfa que pode ser complementado pelo produto do gene lacZ M15 da célula hospedeira para produzir uma beta galactosidase funcional. Bactérias contendo o gene lacZ M15 e o vetor pGEM-3Z tornam-se azuis quando plaqueadas em meio com X-Gal. Mas se o gene para o peptídio lac alfa for rompido por subclonagem no sítio múltiplo de clonagem do pGEM-3Z a complementação deixa de ocorrer e as colônias permanecem brancas.

Três ug do vetor foram digeridos com 40 U de Eco RI por 2 horas a 37°C. O material foi em seguida precipitado com etanol 70% e 0.3 M acetato de sódio pH 6.0, recuperado por centrifugação e desfosforilado com 1 U de fosfatase alcalina na presença de SDS 0.05% a 55°C por 1 hora. Em seguida o DNA foi purificado por extração com fenol clorofórmio e precipitado com etanol e acetato de sódio. O vetor foi ressuspendido de modo a ficar 0.1 ug/ul em TE e estocado a -20°C.



Esquema 1- pGEM-3Z com seu sítio múltiplo de clonagem e regiões promotoras para RNA polimerase dos fagos SP6 e T7.

6.2- Ligação dos insertos ao vetor

Os insertos foram purificados como descrito anteriormente com o auxílio do kit Gene Clean. Em seguida, foram divididos em alíquotas de 1, 3 e 6 ul e 100 ng de vetor foram adicionados. A mistura foi ligada com 1 U de T4 DNA ligase na presença de 2 ul de 5X tampão de reação de ligação (250 mM Tris pH 7.6, 50 mM $MgCl_2$, PEG 25% 8000. 5 mM ATP e 5 mM DTT) a 26°C por 2 horas. As misturas de ligação foram diluídas 1:5 em TE e utilizadas para transformar E.coli DH5 alfa (BRL).

6.3- Transformação

A transformação foi realizada segundo o protocolo "Max Efficiency DH5 Alfa Competent Cells" No8258SA da BRL. Um ul da mistura de ligação diluída 1:5 em TE foi adicionada a 20 ul de bactérias E.coli DH5 alfa que foram então mantidas por 30 minutos a 0°C seguidos de um choque térmico de 45 segundos a 42°C. Após o choque térmico as bactérias foram colocadas rapidamente no gelo, por 2 minutos. As bactérias foram acrescentadas de 80 ul de SOC (20,0 g/l triptona. 5,0 g/l extrato de levedura, 0,6 g/l NaCl, 0,19 g/l KCl, 0,95 g/l $MgCl_2$, pH 7,5, 3,6 g/l glicose), agitadas a 37°C por 1 hora e em seguida 100 ul foram plaqueados em LB amp contendo 0.05 mg/ml X-Gal (BRL) por 15 horas a 37°C. As colônias brancas foram analisadas para a presença de inserto.

6.4- Preparação rápida de DNA plasmidiano

A preparação foi feita pelo método rápido da fervura (Maniatis 1982). As colônias brancas foram crescidas em 2 ml de LB amp por 18 horas e recuperadas por centrifugação a 4°C por 3 minutos. O sedimento foi ressuspendido em 200 ul de STELT (sacarose 8%, TritonX-100 5%, 50 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA e 0.5 mg/ml de lisozima) e fervido por 60 segundos. Em seguida a mistura foi centrifugada a 4°C por 15 minutos e o sedimento removido com um palito estéril e descartado. O sobrenadante foi tratado com RNAse por 15 minutos a 37°C, extraído com fenol clorofórmio , precipitado com 1 volume de 7.5M acetato de amônio e 2.5 volumes de etanol no gelo por 15 minutos e centrifugado por 20 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com etanol 80%, seco a vácuo e ressuspendido em 15 ul de TE.

Cinco ul da preparação foram digeridos com 10 U de EcoRI por 2 horas a 37°C e resolvidos em gel de agarose 0.8%. Seis colônias brancas foram analisadas para cada inserto. Colônias brancas que continham os insertos de tamanho esperado foram escolhidas para uma maxi preparação de plasmídios.

6.5- Maxi preparação de plasmídios

A maxi preparação foi feita pelo método da lise alcalina (Maniatis,1982). Cento e vinte e cinco ml de LB (10,0 g/l bacto triptona, 5,0 g/l extrato de levedura, 10,0 g/l NaCl, pH 7,5) contendo 100 ug/ml de ampicilina foram

inoculados com uma colônia branca e a mistura incubada por 12 horas a 37°C. As bactérias foram recuperadas por centrifugação a 5000 rpm, 4°C,15 minutos, ressuspendidas em 3 ml de 25mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, sacarose 15% e 2 mg/ml de lisozima e mantidas por 10 minutos no gelo. A suspensão foi então lisada com 2 volumes de 0.2 N NaOH SDS 1% por 10 minutos a 0°C, neutralizada com 3.75 ml de 3M NaAc pH 4.6 e centrifugada a 12000 rpm. O sobrenadante foi tratado com 2.5 ug/ml de RNAse por 15 minutos a 37°C e extraído duas vezes com fenol clorofórmio e uma vez com clorofórmio. O sobrenadante foi então novamente precipitado com 2 volumes de etanol a -20°C durante 30 minutos e centrifugado a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C. Ao sedimento adicionou-se 0.2 ml de 4M NaCl e 1 ml de PEG 13%, sendo este então precipitado por 1 hora a 0°C e centrifugado a 12000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspendido em 150 ul de TE.

O DNA foi dosado no espectrofotômetro (conc. de DNA = 50 X A_{260} X diluição x mg/ml) e sua pureza foi verificada através da relação A_{260}/A_{280} (Maniatis et al,1982).

O DNA também foi analisado eletroforeticamente em gel de agarose 0.8% onde foram analisados plasmídios digeridos com 10 U de ECO RI por 2 horas a 37°C lado a lado com o DNA dos fagos recombinantes lambda gt11, também digeridos com Eco RI. Os insertos dos plasmídios foram testados por hibridização com os insertos dos lambda gt11 recombinantes

para verificar se não representavam artefatos (dados não mostrados).

6.6-Subclonagem dos insertos para sequenciamento de regiões inacessíveis à polimerase

Para o sequenciamento das regiões centrais dos insertos, os mesmos precisaram ser fragmentados e subclonados novamente. Através do mapeamento de enzimas de restrição foi possível escolher enzimas que clivassem os insertos em fragmentos de tamanhos adequados para o sequenciamento. Após a digestão com as enzimas adequadas os fragmentos resultantes foram resolvidos em gel de agarose 1%. As bandas correspondentes aos fragmentos foram retiradas do gel, purificadas com o kit Gene Clean, ligadas ao vetor pGEM-3Z (previamente digerido com as enzimas de restrição escolhidas) e utilizadas para transformar bactérias DH5 alfa como descrito nos ítens anteriores.

7- Sequenciamento dos clones de cDNA

Para o sequenciamento dos diversos fragmentos de cDNA foi utilizado o sistema da Sequenase (USB), com a exceção da denaturação, que foi feita de acordo com o manual técnico "Sistemas de Sequenciamento" da Promega. O vetor utilizado foi pGEM-3Z e o sequenciamento foi feito com dupla fita.

7.1- Denaturação do DNA

Dois ug de plasmídio foram pipetados em 18 ul de água destilada e 2 ul de 2 M NaOH e 2 mM EDTA em Eppendorfs e mantidos por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram neutralizados com 3 ul de 3M acetato de sódio pH 5.0 e 7 ul de água destilada e precipitados com 75 ul de etanol absoluto por 15 minutos no gelo seco. O DNA foi recuperado por 10 minutos de centrifugação a 4°C, o sedimento foi lavado em etanol 70%, seco à vácuo e ressuspendido em 7 ul de água destilada. Dois tubos destes foram preparados para cada clone.

7.2- Anelamento dos iniciadores

Ao DNA denaturado foram adicionados 2 ul do tampão da Sequenase 5 X (200 mM Tris HCl pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$, 250 mM NaCl) e 1 ul do primer (SP6 em um dos tubos e T7 no outro - Promega) e os tubos foram incubados a 37°C durante 30 minutos.

7.3- Reação de marcação

As misturas de anelamento foram acrescidas de 1 ul de 0.1M DTT, 2 ul de mistura de marcação diluída 1:5 (7.5 mM dGTP, 7.5 mM dCTP, 7.5 mM dTTP), 1 ul de [^{35}S]dATP (10 uCi/ul) e 5 U de Sequenase e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente.

7.4- Reação de terminação

4 tubos rotulados G, A, T e C foram previamente preparados pipetando-se 2.5 ul das misturas de terminação ddGTP, ddATP,ddTTP e ddCTP respectivamente nos tubos G,A,T e C, que foram tampados e pré aquecidos a 37°C. Ao fim da reação de marcação 3.5 ul da mistura de marcação foram transferidos para o tubo de terminação G que foi incubado por mais 5 minutos a 37°C. O mesmo foi feito com os tubos A,T e C. Ao término da incubação 4 ul de solução stop (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% de bromofenol azul e 0.05% de xileno cianol) foram acrescentados a cada tubo.

7.5- Eletroforese em gel denaturante (Howe e Ward,1989)

Depois de exaustivamente lavadas com água quente e detergente as placas foram lavadas com etanol e a menor foi impermeabilizada com dimetil silano (Sigmacote-Sigma) por duas vezes e lavada novamente. As placas foram montadas com auxílio de espaçadores e bem seladas com fita adesiva plástica. Sessenta ml da solução estoque de gel de sequência (90 g de uréia, 18 ml de 10 X BTE pH 8.3, 22.5 ml de bis acrilamida 40% e 70 ml de água destilada) foram misturados a 600 ul de APS 10% e 30 ul de TEMED e despejados lentamente entre as placas, mantidas a um ângulo de 45°C de inclinação sobre a bancada, tomando-se o cuidado de não formar bolhas. Um pente de face lisa foi colocado e um peso foi depositado sobre a boca do gel até que este polimerizasse. Depois de polimerizado o pente foi invertido para formar as canaletas

e o gel foi armado no suporte apropriado. O gel foi pré corrido por 30 minutos a 2000 V.

As amostras foram fervidas por 2 minutos, e aplicadas nas canaletas obedecendo a ordem GATC e corridas por 2 horas a 2000 V. Ao final da corrida o gel foi desmontado, a placa siliconizada foi separada com o auxílio de uma espátula e uma folha de papel Whatman foi colocada sobre o gel de forma que este ficou aderido ao papel e pode ser removido e seco por 40 minutos a 80°C a vácuo na secadora de gel. O gel foi coberto em cassete por um filme de raio X a temperatura ambiente por 36 a 48 horas. O filme foi então revelado e as sequências lidas com o auxílio de um transiluminador.

Os fragmentos menores foram totalmente sequenciados com apenas uma corrida de gel de 2 horas. Os maiores, porém, necessitaram de uma corrida adicional de 4 horas, para que se pudesse ler com maior maior precisão a região superior do gel. Para se poder ler as bases próximas aos primers foram feitas reações de Sequenase utilizando a mistura de marcação diluída 1:20 ao invés de 1:5, e correndo-se o gel por apenas 1 hora e meia. Desta forma foi possível ler todas as bases adjacentes aos sítios de restricão de Eco RI e PstI de todos os fragmentos de cDNA.

7.6- Sequenciamento com Taq polimerase

Para a eliminação de compressões nas regiões ricas em G e C foi utilizado o sistema de reação com Taq polimerase (Taq Track Sequencing System - Promega). Este sistema

apresenta a vantagem de que a reação de marcação é realizada a 70°C, pois a Taq polimerase funciona bem a esta temperatura. Nestas condições as pontes de hidrogênio intramoleculares entre G e C, que são as responsáveis pelo efeito de compressão no gel de sequência, tornam-se instáveis, permitindo que a polimerase extenda sem problemas.

Quatro ug de plasmídeo foram denaturados da mesma forma que descrito para reação com Sequenase. O DNA denaturado foi ressuspendido em 7 ul de água destilada e foram acrescentados 2 pmoles de primers (SP6 ou T7 - Promega), 5 ul de tampão 5X de Taq polimerase (Tris-HCl pH 9.0, 50 mM $MgCl_2$) e 2 ul de mistura de extensão (Taq Track Sequencing System - Extension/Labeling Protocol) e o anelamento foi feito a 37°C durante 20 minutos.

A reação de extenção foi iniciada adicionando-se 2 ul de [alfa ^{35}S] dATP (1000 Ci/mmol) e 1.5 ul de Taq DNA polimerase (5 U/ul) por 5 minutos a 37°C e terminada aliquotando-se 6 ul desta mistura de marcação para cada um dos tubos de terminação, ddG, ddA, ddT e ddC que continham, respectivamente, 1 ul das misturas de terminação 250 uM dNTP + 50 uM ddGTP; 250 uM + 50 uM ddATP; 250 uM dNTP + 50 uM ddTTP e 250 uM dNTP + 50 uM ddCTP. A terminação foi realizada por 5 minutos a 70°C e ao final deste tempo 4 ul de solução stop (10mM NaOH, formamida 95%, azul de bromofenol 0.05%, xileno cianol 0.05%) foram acrescentados a

cada tubo. A corrida destas amostras no gel foi feita exatamente da mesma forma que para reação com Sequenase.

7.7- Sequenciamento direto do lambda gt11 recombinante (Byung e Collen,1990)

Para se determinar a fase de leitura dos insertos estes foram sequenciados diretamente do vetor de expressão lambda gt11 em que foram isolados e onde portanto estavam necessariamente em fase com a beta galactosidase.

O DNA dos fagos recombinantes foi isolado rapidamente de acordo com o mesmo protocolo já descrito no item 5. O primer do sítio EcoRI de lambda gt11 (forward-BIOLABS, representado no esquema abeixo) que anela-se na região da beta galactosidase permite o sequenciamento da junção da beta galactosidase com o inserto.

primer 5 GACTCCTGGAGCCCG

gt11 3 CCACCGCTGCTGAGGACCTCGGGCAGTCATAGCCGCCTTAAGGTCGAC
EcoRI

Este primer foi marcado de acordo com o Manual Técnico de Sequenciamento Taq Track da Promega da seguinte maneira: a 50 ng de primer foram acrescentados 3 ul de [gama ^{32}P] ATP (3000 Ci/mmol), 1 ul de tampão 10X da T4 polinucleotideo quinase (500mM Tris HCl pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$, 50 mM DTT, 1 mM espermidina), 0.5 ul de T4 polinucleotídeo quinase (10 U/ul), água destilada até 10 ul

e incubou-se tudo a 37°C por 10 minutos. A quinase foi inativada a 90°C por 2 minutos e o primer foi utilizado desta maneira sem qualquer purificação.

Vinte ug do DNA dos fagos recombinantes foram denaturados em 100 ul de água destilada com 10 ul de 2M NaOH e 2mM EDTA por 5 minutos a temperatura ambiente, neutralizados com 10 ul de acetato de sódio pH 4.6 e precipitados com 373 ul de etanol absoluto. O DNA denaturado foi ressuspendido em 7 ul de água destilada e adicionou-se 2 ul do tampão de sequenciamento 5X da Sequenase (200mM Tris HCl pH 7.5, 100mM $MgCl_2$, 250 mM NaCl) e 1 ul do primer marcado e o anelamento foi realizado por 30 minutos a 37°C. Ao término deste tempo foram acrescentados 1 ul de 0.1M DTT, 2 ul de TE e 2 ul de Sequenase diluída 1:7 no tampão de diluição de Sequenase (10mM Tris HCl pH 7.5, 5 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA) e a mistura foi mantida por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida 3.3 ul foram transferidos para cada um dos tubos de terminação (G,A,T e C) que foram incubados a 37°C durante 15 minutos e depois 4 ul de solução stop (Sequenase) foram acrescentados a cada tubo.

Estas amostras foram resolvidas no gel de sequência como já descrito sem modificações, durante 1 hora e meia, o gel foi seco, exposto a um filme de raio X até o dia seguinte e revelado.

7.8- Análise das sequências no computador

As sequências dos fragmentos de cDNA foram analisadas em microcomputador do tipo AT utilizando-se o programa STADEN PLUS (Amersham) e PC/GENE da IntelliGenectics,Inc., California.

8 - Produção de lisógenos (Glover,1985)

8.1- Transfecção e seleção dos clones lisógenos

E.coli RY1089 (Promega) foi crescida em LB contendo maltose 0.2% e 50 ug/ml de ampicilina por 14 horas a 37°C. As bactérias foram recuperadas por centrifugação (3000 rpm, 10 minutos, 4°C) e ressuspendidas em SM de modo que DO_{600}=3. As bactérias competentes foram mantidas a 4°C por até 5 dias.

Trinta e três ul da suspensão de bactérias foram inoculadas em 10 ml de LB contendo maltose 10%, 1M $MgSO_4$, ampicilina 50 ug/ml e 100 ul dos fagos recombinantes amplificados. A cultura foi crescida a 32°C com agitação lenta até DO_{600}=0.5 e as bactérias foram plaqueadas de forma a se obter de 50 a 100 cfu por placa (normalmente utilizou-se alíquotas de 10, 25 e 50 ul da cultura diluída 1000 vezes). As placas foram incubadas a 32°C por 12 horas e as colônias foram carimbadas para duas outras placas de LB amp que foram incubadas respectivamente a 42°C e 32°C por 18 horas. As colônias que cresceram a 32°C mas não a 42°C,

portanto lisogênicas, foram pré-inoculadas em 5 ml de LB contendo 100 ul de maltose 10% e 50 ug/ml de ampicilina e crescidas a 32°C por mais 18 horas. Quatro ml do pré-inóculo foram estocados em 15% glicerol a -70°C.

8.2- Preparo de extrato proteico dos clones lisogênicos

Cem ml de LB contendo 2 ml de maltose 10% e 50 ug/ml de ampicilina foram inoculados com 1 ml do pré-inóculo e crescidos a 32°C com agitação lenta até DO_{600}=0.5. A cultura teve então sua temperatura rapidamente elevada a 45°C por 20 minutos sob agitação vigorosa. Ao final deste tempo foi acrescentado 10 mM de IPTG final (5 ml da cultura foram separados e não induzidos com IPTG) e a incubação foi continuada por mais 1 hora a 37°C. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 5000 rpm a 26°C e ressuspendidas em 4 ml de TEP (100mM Tris HCl pH 7.4, 10 mM EDTA e 1 mM PMSF). As bactérias foram lisadas com 2 ciclos de gelo e degelo em N_2 líquido e sonicadas com pulsos de 30 segundos até que a solução perdesse a viscosidade. O extrato foi aliquotado e armazenado a -70°C.

Os extratos dos clones induzidos e não induzidos foram resolvidos em **SDS PAGE** 7.5%. Um extrato de lambda gt11 não recombinante induzido foi utilizado como controle negativo.

9- Produção de soros policlonais contra as proteínas de fusão

Bandas que correspondiam às proteínas de fusão foram extraídas de géis preparativos **SDS PAGE 7.5%**, maceradas em PBS e injetadas intraperitonialmente em camundongos. Este procedimento foi repetido mais duas vezes de 15 em 15 dias. Os soros foram testados pelo método de **ELISA** (Engvall,1980) onde as placas eram sensibilizadas com a banda 80 kD (proteínas eluídas de gel de extrato proteico de plaquetas) e com beta galactosidase 2 ug/ml. Soro normal de camundongo foi utilizado como controle negativo.

10-Eletroforese Bidimensional (O'Farrel,1975)

Tubos de vidro previamente siliconizados foram preenchidos com a solução de gel acrilamida 30% para FIE (5,5 g de uréia, 2 ml de água destilada, 2 ml de NP40 10%, 1,33 ml de acrilamida 30%, 0.3 ml de anfolitos Pharmalyte - Pharmacia pH 4-6,5 e 0,2 ml de anfolitos pH 3-10) com o auxílio de uma seringa, e deixados para polimerizar à temperatura ambiente por um tempo mínimo de 2 horas. Em seguida os tubos foram colocados na cuba especial para FIE, com a solução H_3PO_4 0.01M no reservatório inferior. Acrescentou-se 50 ul de tampão de amostra para FIE (1,14 g de uréia, 20 ul de DTT 1M, 0.4 ml de NP40 10%, 60 ul anfolitos pH 4-6,5, 40 ul anfolitos pH 3-10) em cima do gel, completou-se com a solução do reservatório superior (NaOH 0.02M) e iniciou-se a pré corrida para o estabelecimento do gradiente de pH no gel (a pré-corrida foi de 30 minutos a 200 V, 30 minutos a 300 V e 30 minutos a 400 V). Após a pré-corrida procedeu-se a aplicação das amostras (300 ug de proteína total). Trezentos ul de extrato de plaquetas (1mg/ml) foram precipitados com 2 volumes de TCA 10% e o precipitado foi ressuspendido em 70 ul do tampão de amostra. As amostras foram cuidadosamente aplicadas e cobertas com 30 ul de solução de cobertura para FIE (0,72 g de uréia., 0,4 ml de NP40 10%, 20 ul de DTT 1M, 60 ul de anfolitos pH 4-6,5, 40 ul de anfolitos pH 3-10). O volume foi completado com o tampão do reservatório superior e a corrida foi feita

por 17 horas a 400 V. Ao final da corrida os géis foram retirados dos tubos, tiveram seus lados básicos marcados, foram equilibrados por 30 minutos à temperatura ambiente com solução O (glicerol 10%, DTT 1M, SDS 2,3%, Tris-HCl 0.0625M pH 6.8), congelados em gelo seco e armazenados a -70°C. Imediatamente antes de correr a segunda dimensão (Laemmli,1970), os géis foram equilibrados por 30 minutos em solução O fresca. Para medir o gradiente de pH do gel correu-se um dos tubos sem amostra, cortou-se este gel em pedaços de 1.0 cm que foram colocados em tubos contendo 1 ml de água destilada. Após 2 horas mediu-se o pH de cada tubo e pode-se assim traçar uma curva pH x cm.

11- Hibridização RNA-RNA ("Northern blot")

11.1- Extração de RNA total de células de mamíferos em cultura (Maniatis et al,1982)

Foi utilizado o método de extração com guanidina/CsCl. Células MG 63 (linhagem de osteossarcoma humano) crescidas em garrafas foram lisadas com 4M isotiocianato de guanidina e o homogenizado resultante foi depositado sobre um "colchão" de 2 ml de CsCl 5,7 M. A densidade do RNA em CsCl é muito maior que a dos outros componentes celulares. Durante a ultracentrifugação (35000 rpm por 20 horas) o RNA forma um precipitado no fundo do tubo enquanto que o DNA e as proteínas permanecem no sobrenadante. O RNA é então

ressuspendido em água destilada autoclavada e precipitado com 0.1 V de 3M acetato de sódio pH 5.2 e 2.2 V de etanol. O sedimento obtido desta maneira foi ressuspendido em água destilada autoclavada e dosado.

11.2- Análise do RNA por eletroforese em gel de glioxal (Carmichael e McMaster,1980)

Dois ug de cada amostra de RNA foram incubados com glioxal 1M e DMSO 50% por 1 hora a 50°C. O glioxal liga-se às guaninas em PHs < 7, evitando a formação de pontes entre guaninas e citosinas e mantendo portanto as moléculas livres de estruturas secundárias. As amostras podem então ser resolvidas em gel de agarose 1% em tampão fosfato de sódio 10mM pH 7. Durante a corrida o tampão da cuba deve ser agitado para que o pH não se torne básico e o glioxal não se desligue das guaninas. Após a corrida o gel foi corado por 5 minutos com acridine orange (30 ug/ml), e descorado com água destilada por 12 horas. As bandas foram visualizadas através de iluminação com UV. As moléculas simples fita são visualizadas como bandas laranjas e as dupla fita como bandas verdes.

11.3- Transferência do RNA para membrana de nylon

Um gel de glioxal como descrito acima mas não corado com acridine orange, foi transferido para uma membrana de nylon (Hybond-Amersham) da mesma maneira descrita anteriormente para Southern blot, mas em tampão 20 x SSC e

sem o tratamento anterior com 0.2 N HCl e 0.5 M NaOH, 1.5M NaCl. Após a transferência o filtro foi mantido por 1 hora em estufa a vácuo 80°C para a remoção do glioxal e exposto por 5 minutos a UV. A região do gel que continha a amostra de peso molecular não foi transferida, mas cortada do gel antes da transferência e corada.

11.4- Hibridização RNA-RNA

Uma sonda de RNA foi preparada através do sistema Riboprobe - Promega a partir dos subclones em pGEM-3Z.

Um ug de plasmídeo linearizado foi encubado por 1 hora a 37°C com RNA polimerase T7 na presença dos nucleotídeos ATP, GTP e CTP, e [alfa ^{32}P] UTP (50uCi) de acordo com o protocolo Promega. Terminada a reação o DNA foi removido com DNAse e a eficiência da marcação contada no cintilador. O filtro de nylon foi pré-hibridizado de 1 a 3 horas em solução de hibridização (formamida 50%, 20 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 1 x solução de Denhardt, 50 ug/ml de esperma de salmão e 5 x SSC). Depois o filtro foi incubado por 16 horas a 55°C em solução de hibridização fresca contendo a sonda. Ao final da hibridização o filtro foi lavado por 5 minutos em 2 x SSC, três vezes, e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente em 2 x SSC contendo 1 ug/ml de RNAse A. O filtro foi por fim lavado durante 30 minutos a 50°C em 0.1 x SSC 0.1% SDS, seco e exposto a um filme de raio X.

12- Cultivo de células

Células das linhagens tumorais humanas HL60 (leucemia promielocítica), MG63 (osteossarcoma, originada do La Jolla Cancer Research Foundation)) e MEL85 (melanoma) foram cultivadas em garrafas de plástico contendo o meio de cultura RPMI 1640 (Morton,1970) acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de L-glutamato em estufas de 5% de CO_2 a 37°C. As subculturas foram feitas a partir de culturas confluentes. Para cada passagem as células aderidas foram soltas com PBS EDTA 0.02% e alíquotas da suspensão celular transferidas para novas garrafas com meio fresco.

13- Preparo de extratos proteicos e análise em Western blot

13.1- Preparo de extrato proteico a partir de células em cultura

As células foram crescidas como descrito acima até atingir confluência. O meio foi retirado das garrafas por centrifugação, no caso de células não aderentes (HL60), ou por aspiração, no caso de células aderentes (MG63 e MEL85). As células aderentes foram soltas da garrafa com PBS EDTA 0.02% e centrifugadas. Os precipitados foram lavados 5 vezes com PBS. Adicionou-se ao ultimo precipitado 1 X o seu volume de tampão de extração (0.04 M $MgCl_2$, 0.001 M $CaCl_2$, 50 mM

octyl). Depois de agitados por 10 minutos a 4°C, o extrato foi centrifugado a 14000 rpm a 4°C durante 20 minutos e os sobrenadantes foram aliquotados e dosados. As alíquotas foram estocadas a -70°C.

13.2- Preparo de extrato proteico a partir de plaquetas

O extrato proteico de plaquetas foi preparado de maneira idêntica ao de células em cultura. Plaquetas, com prazo de viabilização para transfusão vencido, foram generosamente cedidas pelo Banco de Sangue do Hospital Antonio Prudente.

13.3- Análise dos extratos em Western blot

De cada extrato 150 ug foram resolvidos em géis **SDS PAGE** 7.5% preparativos (Laemmli,1970), em condições redutoras e não redutoras, e transferidos para filtros de nitrocelulose (Towbin et al,1979). Fitas dos filtros de nitrocelulose foram cortadas e bloqueadas em TBSM 5% e incubadas por 2 horas com o anticorpo primário diluído 1:5000, lavadas 3 vezes por 5 minutos em TBSM 5% e incubadas por mais 1 hora com anti IgG de camundongo conjugada a fosfatase alcalina. Depois de bem lavadas novamente as fitas foram reveladas com NBT e BCIP em tampão de fosfatase alcalina.

14- Imunofluorescência indireta

Células de linhagem de osteossarcoma humano (MG63) foram aderidas em lâminas de vidro (LABTEK) e fixadas com acetona, formaldeído e PBS (na proporção 90:1:9) por 20 minutos a -20°C, para permeabilização das células, ou com glutaraldeído 2% em PBS para não permeabilização. A lâmina foi então lavada com PBS e incubada com 50 ul do anticorpo primário diluído 1:50 por 1 hora a 37°C. Depois de extensivamente lavadas em PBS as lâminas foram incubadas com anti IgG de camundongo conjugada com isotiocianato de fluoresceína por mais 1 hora a 37°C e novamente bem lavadas em PBS. Como controle negativo foi utilizado um soro policlonal anti-beta galactosidase na mesma diluição. Finalmente as lâminas foram montadas em glicerol tamponado 10% e observadas em microscópio de imunofluorescência.

15- Preparo de frações subcelulares

15.1- Fracionamento subcelular

Cinco garrafas de células MG63 em confluência (aproximadamente $5x10^7$ células) foram ressuspendidas em 4 ml de solução 250mM sacarose, 10mM Tris PH 7.4, 3mM PMSF e trituradas com auxílio de um homogeneizador manual de vidro. Em seguida o homogeneizado foi submetido às seguintes centrifugações: 1000 x g por 10 min, 3300 x g por 10 min,

16300 x g por 20 min e 100000 x g por 30 min, para a separação, respectivamente, das frações "nuclear", mitocondrial, lisossomal, microssomal e citossólica.

15.2- Análise das frações em Western blot

As concentrações proteicas das diversas frações foram determinadas através do ensaio Bio-Rad (adaptado do método de Bradford,1976). 100 ug de cada fração foram resolvidos em **SDS PAGE** 7,5% em condições reduzidas (Laemmli,1970) e transferidos eletroforeticamente para um filtro de nitrocelulose (Towbin,1979). A reação com o soro anti-**80K-H** foi realizada como já descrito no item 13.3.

16- Fosforilação "in vivo" de células intactas

16.1- Incubação de células com [^{32}P] ortofosfato (Wallace,1980)

Aproximadamente 10^7 células MG63 foram ressuspendidas em 1 ml de tampão A (25 mM Tris, 140 mM NaCl, 0.3 mM EDTA e 5 mM glicose, pH 7.4) e incubadas à temperatura ambiente sob agitação com 0.5 mCi de ^{32}Pi. Após 30 minutos de incubação a suspensão foi centrifugada 14000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido mais uma vez em 1 ml de tampão A e o procedimento da centrifugação foi repetido. As células

lavadas foram então lisadas em tampão de amostra FIE acrescentado de 10mM molibidato de sódio e 3 mM PMSF.

16.2- Análise de proteínas fosforiladas em Western blot de eletroforese bidimensional (O'Farrel,1975)

Trezentos ug do extrato de células MG63 marcadas com ^{32}Pi foram resolvidos em eletroforese bidimensional como descrito no item 10. O gel da segunda dimensão foi transferido para um filtro de nitrocelulose que foi tratado para uma reação de **Western blot** com anti-**80K-H** como também já descrito, seco e exposto a um filme de raio X a -70°C com placa intensificadora.

RESULTADOS

1-Varredura da biblioteca de cDNA

O soro policlonal anti-80 kD apresentou alta atividade quando testado em **Western blot** de extrato de plaquetas (Fig.1) e reagiu cruzadamente com poucas bandas menores que 80 kD. O soro anti-80 kD foi utilizado para varrer a biblioteca de cDNA de endotélio umbilical humano e 10 clones positivos foram isolados. Esta biblioteca foi escolhida para a varredura porque células endoteliais apresentam muitas proteínas em comum com plaquetas (Febbraio e Silverstein,1990). Como controle negativo utilizou-se na varredura soro normal de camundongo ao invés do soro anti-80 kD e nenhum sinal positivo foi obtido, indicando que os sinais positivos eram específicos para o soro anti-80 kD (dados não mostrados).

2- Análise dos clones isolados

2.1- Através de Western blots

A expressão correta de DNA estranho no vetor de expressão lambda gt11 depende da orientação e da fase de leitura do inserto de DNA em relação ao lac Z. Portanto apenas 1/6 dos lambda gt11 recombinantes produzirão beta

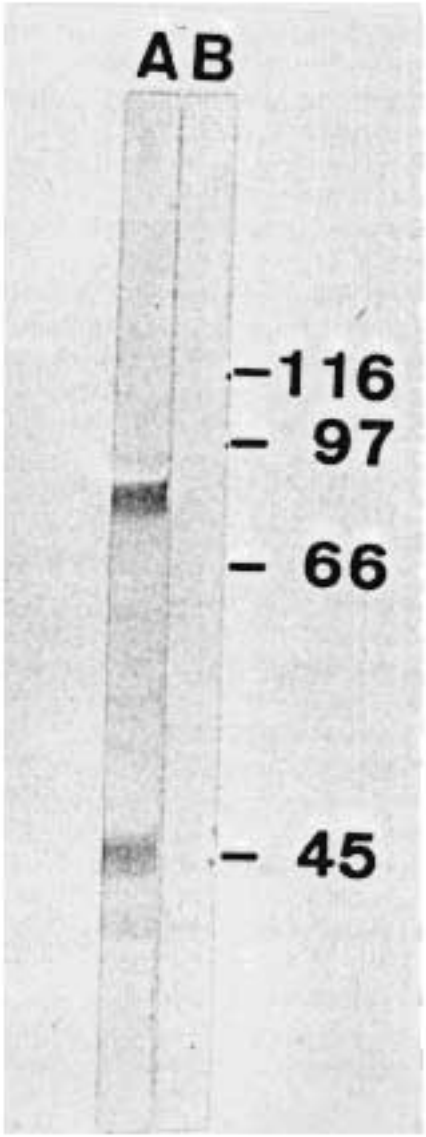


FIG.1- Análise do soro anti-80kD em Western blot de extrato de plaquetas:

A- anti-80kD

B- soro normal de camundongo

galactosidases fundidas a proteínas de interesse (Young e Davis,1983). Grande parte dos fagos recombinantes codificam então para "artefatos" que podem gerar epitopos a partir de traduções anômalas (fora de fase) dos insertos de DNA (Brígido et al,1990).

Os extratos proteicos dos 10 clones recombinantes obtidos pelo método de Dalton (1987) permitiram uma análise rápida quanto a presença de proteínas de fusão e seus tamanhos (Fig.2). Todos os clones apresentaram proteínas de fusão maiores que o peso da beta galactosidase (116 kD), com a exceção do clone F1, que não apresentou nenhuma reação com anti-80 kD e portanto deve ter sido isolado inespecificamente. Os clones A1, A2, B1, C1, D1 e F3 apresentaram as maiores proteínas de fusão (aproximadamente 180 kD). Os outros clones, B2, E7 e E8 apresentaram proteínas de fusão menores. Produtos de degradação das proteínas recombinantes foram encontrados em quase todos os clones, apesar de a E.coli RY1090 apresentar a mutação lon$^-$ que dimunui a proteólise (Young e Davis,1983). Nenhum dos clones apresentou reatividade positiva em **Western blots** com soro de camundongos imunizados apenas com poliacrilamida (dados não mostrados).

Os clones A1, A2, B1, D1 e F3 apresentaram um padrão muito semelhante de tamanho e degradação indicando fortemente que representavam o mesmo inserto de cDNA. Quatro clones que diferiam entre si (A1, C1, D1 e E8) foram escolhidos para as análises seguintes.

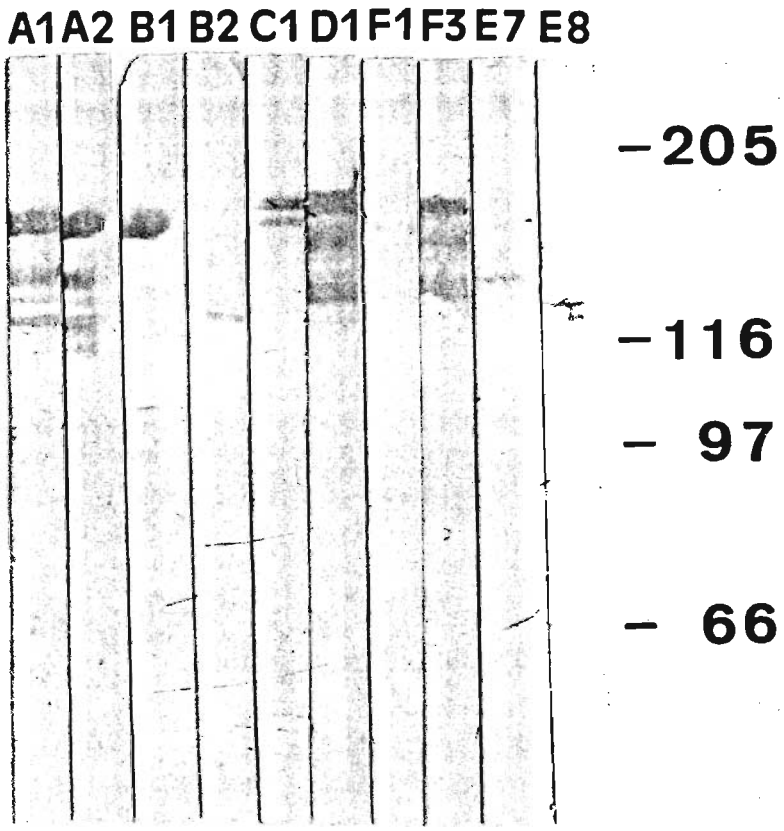


FIG.2- Análise das proteínas de fusão dos clones lambda gt11 recombinantes em Western blot com o soro anti-80 kD.

Para verificar se os clones estavam produzindo proteínas artefatuais purificou-se do soro anti-80kD os anticorpos específicos para cada proteína de fusão e utilizou-se estes eluatos em **Western blot** de extrato de plaquetas (Fig.3). Os anticorpos específicos anti clones A1 e D1 (fitas A e B) apresentaram padrão idêntico, apenas reagindo com a banda de 80 kD; os anticorpos anti C1 e E8 (fitas C e D) também apresentaram padrões idênticos entre si, reagindo com a banda de 80 kD e também com outras bandas menores. Um eluato do soro anti-80 kD em lambda gt11 não recombinante, utilizado como controle negativo, não apresentou reação (fita E).

Portanto os clones representam proteínas existentes em extrato de plaquetas, de aproximadamente 80 kD, e não são artefatos. Além disso os padrões obtidos no **Western blot** sugerem que os clones A1 e D1 representam a mesma proteína, o mesmo ocorrendo com C1 e E8.

2.2- Através de hibridização DNA-DNA (Southern blot)

Todos os clones apresentaram insertos que foram liberados por digestão com EcoRI. Os insertos A1 e D1 apresentaram aproximadamente 1200 pb, C1 1100 pb e E8 860 pb.

Para verificar se os 4 clones eram diferentes entre si ou não os insertos foram analisados por hibridização. Todos os clones foram analisados por **Southern blot** utilizando-se o inserto A1 como sonda. Apenas os clones A1 e D1 hibridizaram

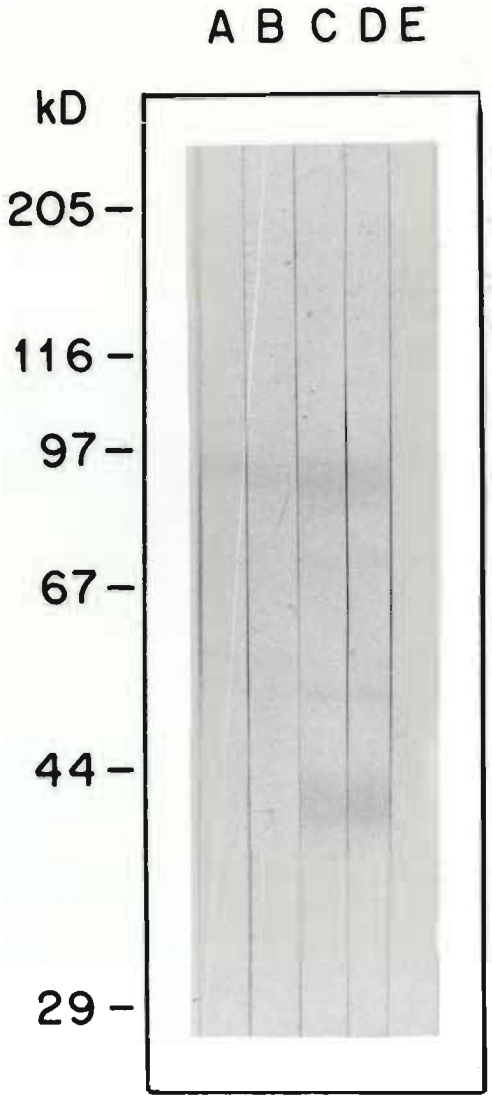


FIG.3- Western blot de extrato proteico de plaquetas com os anticorpos específicos para cada clone (eluatos):

A- eluato do clone A1

B- eluato do clone D1

C- eluato do clone C1

D- eluato do clone E8

E- eluato de lambda gt11 não recombinante

com esta sonda (Fig.4a). Quando o inserto E8 foi utilizado como sonda, apenas os clones E8 e C1 hibridizaram (Fig.4b).

Portanto os clones A1 e D1 compartilham a mesma sequência de DNA, assim como os clones C1 e E8, sendo que estes, muito provavelmente, representam tamanhos diferentes de um mesmo cDNA. Estes resultados confirmam a evidência observada no **Western blot** com eluatos dos clones de que ao todo 2 proteínas diferentes estavam sendo representadas pelos 4 clones.

3- Subclonagem dos insertos de cDNA

O vetor pGEM-3Z é na realidade um vetor de transcrição que possui os sítios promotores para a RNA polimerase dos fagos SP6 e T7, mas pode também ser usado como vetor para sequenciamento, utilizando-se primers para as regiões SP6 e T7.

Os insertos A e C foram subclonados no sítio de EcoRI do pGEM-3Z com alta eficiência, isto é, praticamente todas as colônias brancas analisadas apresentaram os insertos. A identidade dos insertos subclonados foi verificada através de Southern blot com a sonda A e a sonda C (dados não mostrados). Como os insertos A e C são bastante grandes (aproximadamente 1200 e 1100 pb), foi necessária nova subclonagem para tornar possível o seu sequenciamento. Para determinar quais enzimas de restrição clivam os insertos de

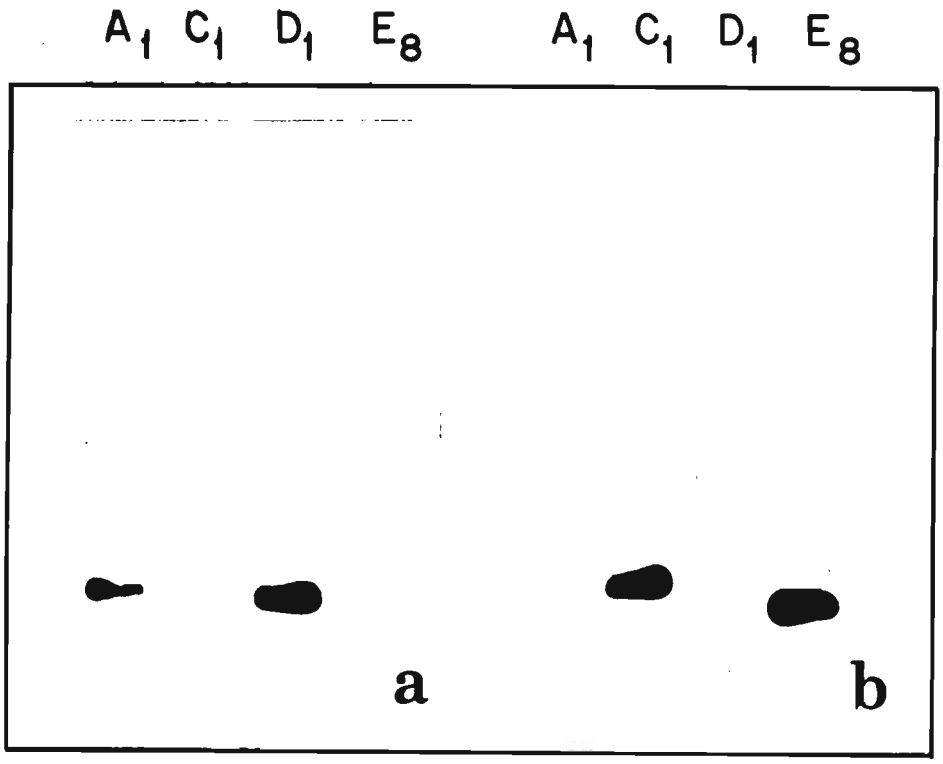
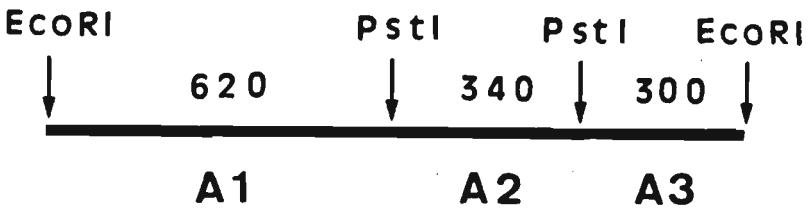
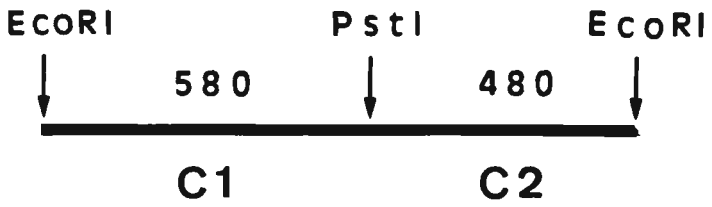


FIG.4- Southern blot dos clones recombinantes com o inserto A1 como sonda (a) e com o inserto E8 como sonda (b).

forma a originar fragmentos de tamanhos adequados para o sequenciamento foi feito um mapa de restrição a partir da digestão dos plasmídeos recombinantes pGEM/A e pGEM/C. Os plasmídeos foram digeridos sempre com EcoRI e mais uma segunda enzima que não apresentasse sítio de clivagem no pGEM-3Z. Os produtos das digestões estão apresentados na FIG.5a. Os insertos A e C não apresentam sítios de clivagem para BamHI ou HindIII. O inserto A apresenta 2 sítios para PstI e o inserto C apresenta 1 sítio para PstI. A banda que se observa no pGEM/C digerido com EcoRI e PstI na mesma altura do próprio inserto C provavelmente é resultante de uma digestão parcial do inserto C, pois as somas dos 3 insertos ultrapassa muito o tamanho de C.

Os fragmentos originados por digestão do inserto A com PstI foram denominados A1, A2 e A3, e os originados pela digestão de C com PstI de C1 e C2. Seus tamanhos foram aproximadamente determinados e estão representados no esquema abaixo.





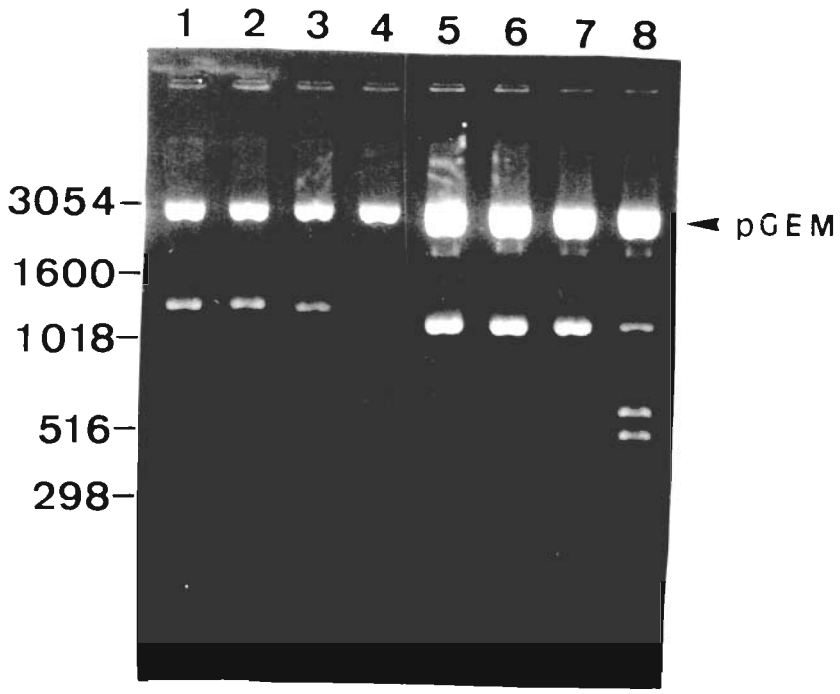


FIG.5a- Digestão dos plasmídeos recombinantes pGEM/A (1-4) e pGEM/C (5-8) com:

1 e 5 - EcoRI

2 e 6 - EcoRI + BamHI

3 e 7 - EcoRI + HindIII

4 e 8 - EcoRI + PstI

Os fragmentos foram subclonados em pGEM-3Z previamente digerido com EcoRI e PstI no caso dos fragmentos A1,A2, C1 e C2 e apenas com PstI para o fragmento A2. Os subclones estão representados na Fig.5b onde todos os plasmídeos recombinantes foram digeridos com EcoRI e PstI, a não ser pGEM/A2 que foi digerido apenas com PstI.

4- Análise das sequências obtidas

4.1-Análise das fases de leitura

Os sublones pGEM/A1, pGEM/A2, pGEM/A3, pGEM/C1 e pGEM/C2 foram sequenciados com o sistema da Sequenase utilizando-se os primers SP6 e T7 que anelam-se nas regiões dos promotores para SP6 e T7 respectivamente. Com os plasmídeos que contêm insertos pequenos como A2 e A3 (340 e 300 pb), pode-se obter a sobreposição das sequências lidas com SP6 e T7 apenas com uma única corrida do gel de sequência de 2 horas. Já para os insertos maiores C1, C2 e A1 (580, 480 e 620pb), foi necessária mais uma corrida de gel de 4 horas para se poder ler com precisão a região superior do gel que fica muito comprimida com 2 horas de corrida.

O fragmento A1 apresenta regiões repetitivas ricas em G e C que originam compressões no gel que dificultam sua leitura. Estas compressões foram eliminadas através de uma reação com Taq polimerase.

pGEM - subclones

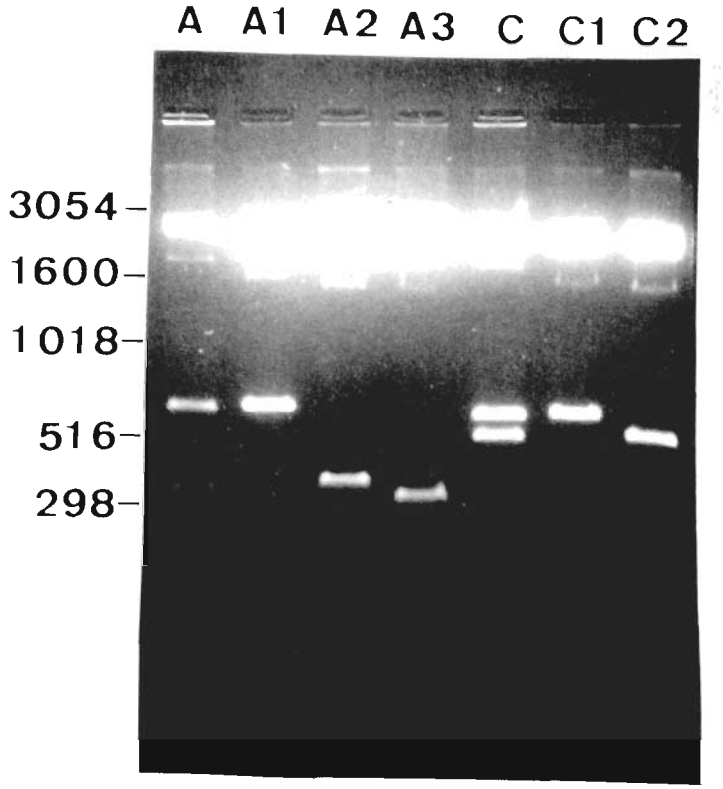


FIG.5b- Maxi preparação dos plasmídeos recombinantes:

A- pGEM/A - EcoRI + PstI

A1- pGEM/A1 - EcoRI + PstI

A2- pGEM/A2 - PstI

A3- pGEM/A3 - EcoRI + PstI

C- pGEM/C - EcoRI + PstI

C1- pGEM/C1 - EcoRI + PstI

C2- pGEM/C2 - EcoRI + PstI

Para determinar com certeza a fase de leitura dos insertos A e C foi feito um sequenciamento direto dos lambda gt11 recombinantes. Foi possível ler para os dois casos o final do gene da beta galactosidase, o sítio de EcoRI e o começo do inserto de cDNA. Os insertos estão necessariamente em fase com a beta galactosidase e desta forma foi possível determinar a fase de leitura correta para cada inserto. As sequências foram introduzidas no programa de computador Staden Plus e traduzidas. O sentido da sequência C1 em relação à sequência C2 foi facilmente determinado pois estes fragmentos apresentavam diferentes sítios de restrição nas suas extremidades (EcoRI-PstI).

As sequências de A1, A2 e A3 poderiam ser posicionadas uma em relação às outras de duas maneiras diferentes, com o fragmento A2 (PstI-PstI) nos dois sentidos possíveis. Porém quando as sequências A1, A2 e A3 foram posicionadas nas duas maneiras possíveis e traduzidas, apenas um dos sentidos de A2 gerou fase aberta de leitura, evidenciando portanto com certeza o sentido correto de inserção.

4.2-Procura de sequências homólogas

Através de consulta ao **GenBank** observou-se que o inserto A apresentou 100% de homologia com a fosfoproteína 80K-H, substrato de proteína quinase C. Essa sequência de cDNA de **80K-H** já conhecida havia sido obtida da linhagem tumoral de carcinoma humano Ca9-22 (Sakai,1985) e está indicada na Fig.6.

```
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
GGAACCGCGGCTGCTGG 17

ACAAGAGGGGTGCGGTGGATACTGACCTTTGCTCCGGCCTCGTCGTGAAGACACAGCGCATCTCCCCGCTGTAGGCTTCTCCCACAGAACCCGTTTCGGGCCTCAGAGCGTCTGGTGAG 136

ATG CTG TTG CCG CTG CTG CTG CTG CTA CCC ATG TGC TGG GCC GTG GAG GTC AAG AGG CCC CGG GGC GTC TCC CTC ACC AAT CAT CAC TTC 216
Met Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Met Cys Trp Ala Val Glu Val Lys Arg Pro Arg Gly Val Ser Leu Thr Asn His His Phe 16
                                                        -1  1

TAC GAT GAG TCC AAG CCT TTC ACC TGC CTG GAC GGT TCG GCC ACC ATC CCA TTT GAT CAG GTC AAC GAT GAC TAT TGC GAC TGC AAA GAT 316
Tyr Asp Glu Ser Lys Pro Phe Thr Cys Leu Asp Gly Ser Ala Thr Ile Pro Phe Asp Gln Val Asn Asp Asp Tyr Cys Asp Cys Lys Asp 46

GGC TCT GAC GAG CCA GGC ACG GCT GCC TGT CCT AAT GGC AGC TTC CAC TGC ACC AAC ACT GGC TAT AAG CCC CTG TAT ATC CCC TCC AAC 406
Gly Ser Asp Glu Pro Gly Thr Ala Ala Cys Pro Asn Gly Ser Phe His Cys Thr Asn Thr Gly Tyr Lys Pro Leu Tyr Ile Pro Ser Asn 76

CGG GTC AAC GAT GGT GTT TGT GAC TGC TGC GAT GGA ACA GAC GAG TAC AAC AGC GGC GTC ATC TGT GAG AAC ACC TGC AAA GAG AAG GGC 496
Arg Val Asn Asp Gly Val Cys Asp Cys Cys Asp Gly Thr Asp Glu Tyr Asn Ser Gly Val Ile Cys Glu Asn Thr Cys Lys Glu Lys Gly 106

CGT AAG GAG AGA GAG TCC CTG CAG CAG ATG GCC GAG GTC ACC CGC GAA GGG TTC CGT CTG AAG AAG ATC CTT ATT GAG GAC TGG AAG AAG 586
Arg Lys Glu Arg Glu Ser Leu Gln Gln Met Ala Glu Val Thr Arg Glu Gly Phe Arg Leu Lys Lys Ile Leu Ile Glu Asp Trp Lys Lys 136

GCA CGG GAG GAG AAG CAG AAA AAG CTC ATT GAG CTA CAG GCT GGG AAG AAG TCT CTG GAA GAC CAG GTG GAG ATG CTG CGG ACA GTG AAG 676
Ala Arg Glu Glu Lys Gln Lys Lys Leu Ile Glu Leu Gln Ala Gly Lys Lys Ser Leu Glu Asp Gln Val Glu Met Leu Arg Thr Val Lys 166

GAG GAA GCT GAG AAG CCA GAG AGA GAG GCC AAA GAG CAG CAC CAG AAG CTG TGG GAA GAG CAG CTG GCT GCT GCC AAG GCC CAA CAG GAG 766
Glu Glu Ala Glu Lys Pro Glu Arg Glu Ala Lys Glu Gln His Gln Lys Leu Trp Glu Glu Gln Leu Ala Ala Ala Lys Ala Gln Gln Glu 196

CAG GAG CTG GCG GCT GAT GCC TTC AAG GAG CTG GAT GAT GAC ATG GAC GGG ACG GTC TCG GTG ACT GAG CTG CAG ACT CAC CCG GAG CTG 856
Gln Glu Leu Ala Ala Asp Ala Phe Lys Glu Leu Asp Asp Asp Met Asp Gly Thr Val Ser Val Thr Glu Leu Gln Thr His Pro Glu Leu 226

GAC ACA GAT GGG GAT GGG GCG TTG TCA GAA GCG GAA GCT CAG GCC CTC CTC AGT GGG GAC ACA CAG ACA GAC GCC ACC TCT TTC TAC GAC 946
Asp Thr Asp Gly Asp Gly Ala Leu Ser Glu Ala Glu Ala Gln Ala Leu Leu Ser Gly Asp Thr Gln Thr Asp Ala Thr Ser Phe Tyr Asp 256

CGC GTC TGG GCC GCC ATC AGG GAC AAG TAC CGG TCC GAG GCA CTG CCC ACC GAC CTT CCA GCA CCT TCT GCC CCT GAC TTG ACG GAG CCC 1036
Arg Val Trp Ala Ala Ile Arg Asp Lys Tyr Arg Ser Glu Ala Leu Pro Thr Asp Leu Pro Ala Pro Ser Ala Pro Asp Leu Thr Glu Pro 286

AAG GAG GAG CAG CCG CCA GTG CCC TCG TCG CCC ACA GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAA GAA GAG GCT GAA GAA GAG GAG GAG 1126
Lys Glu Glu Gln Pro Pro Val Pro Ser Ser Pro Thr Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Glu Glu Glu Glu Glu 316

GAG GAG GAT TCC GAG GAG GCC CCA CCG CCA CTG TCA CCC CCG CAG CCG GCC AGC CCT GCT GAG GAA GAC AAA ATG CCG CCC TAC GAC GAG 1216
Glu Glu Asp Ser Glu Glu Ala Pro Pro Pro Leu Ser Pro Pro Gln Pro Ala Ser Pro Ala Glu Glu Asp Lys Met Pro Pro Tyr Asp Glu 346

CAG ACG CAG GCC TTC ATC GAT GCT GCC CAG GAG GCC CGC AAC AAG TTC GAG GAG GCC GAG CGG TCG CTG AAG GAC ATG GAG GAG TCC ATC 1306
Gln Thr Gln Ala Phe Ile Asp Ala Ala Gln Glu Ala Arg Asn Lys Phe Glu Glu Ala Glu Arg Ser Leu Lys Asp Met Glu Glu Ser Ile 376

AGG AAC CTG GAG CAA GAG ATT TCT TTT GAC TTT GGC CCC AAC GGG GAG TTT GCT TAC CTG TAC AGC CAG TGC TAC GAG CTC ACC ACC AAC 1396
Arg Asn Leu Glu Gln Glu Ile Ser Phe Asp Phe Gly Pro Asn Gly Glu Phe Ala Tyr Leu Tyr Ser Gln Cys Tyr Glu Leu Thr Thr Asn 406

GAA TAC GTC TAC CGC CTC TGC CCC TTC AAG CTT GTC TCG CAG AAA CCC AAA CTC GGG GGC AGC CCC ACC AGC CTT GGC ACC TGG GGC TCA 1496
Glu Tyr Val Tyr Arg Leu Cys Pro Phe Lys Leu Val Ser Gln Lys Pro Lys Leu Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Gly Thr Trp Gly Ser 436

TGG ATT GGC CCC GAC CAC GAC AAG TTC AGT GCC ATG AAG TAT GAG CAA GGC ACG GGC TGC TGG CAG GGC CCC AAC CGC TCC ACC ACC GTG 1576
Trp Ile Gly Pro Asp His Asp Lys Phe Ser Ala Met Lys Tyr Glu Gln Gly Thr Gly Cys Trp Gln Gly Pro Asn Arg Ser Thr Thr Val 466

CGC CTC CTG TGC GGG AAA GAG ACC ATG GTG ACC AGC ACC ACA GAG CCC AGT CGC TGC GAG TAC CTC ATG GAG CTG ATG ACG CCA GCC GCC 1656
Arg Leu Leu Cys Gly Lys Glu Thr Met Val Thr Ser Thr Thr Glu Pro Ser Arg Cys Glu Tyr Leu Met Glu Leu Met Thr Pro Ala Ala 496

TGC CCG GAG CCA CCG CCT GAA GCA CCC ACC GAA GAC GAC CAT GAC GAG CTC TAG CTGGATGGGCGCAGAGAACCTCAAGAAGGCATGAAGCCAGCCCCTGC 1747
Cys Pro Glu Pro Pro Pro Glu Ala Pro Thr Glu Asp Asp His Asp Glu Leu ***                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 513

AGTGCCGTCCACCCGCCCTCTGGGCCTGCCTGTGGCTCTGTTGCCCTCCTCTGTGGCGGCAGGACCTTTGTGGGGCTTCGTGCCCTGCTCTGGGGCCCAGGCGGGGCTGGTCCACATT 1896

CCCAGGCCCCAACAGCCTCCAAAGATGGGTAAAGGAGCTTGCCCTCCCTGGGCCCCCCCACCTTGGTGACTCGCCCCACCACCCCCAGCCCTGTCCCTGCCACCCCTCCTAGTGGGGACT 2005

AGTGAATGACTTGACCTGTGACCTCAATACAATAAATGTGATCCCCCACCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2075
```

FIG.6- Sequência nucleotídica do cDNA da proteína 80K-H e sua sequência de aminoácidos predita (Sakai et al,1989). A região correspondente ao clone A1 está delimitada por parênteses.

O clone C, cuja sequência nucleotídica está apresentada na figura 7, não apresentou homologia significativa com nenhuma proteína até então clonada.

5-Análise dos anticorpos policlonais contra as proteínas recombinantes

Os extratos proteicos dos clones lisogênicos A e C foram analisados em **SDS PAGE** 7.5%. Os extratos que foram induzidos com IPTG apresentaram as respectivas proteínas de fusão, maiores que 116 kD e de tamanhos correspondentes aos que haviam sido observados anteriormente (aproximadamente 180 kD). Os extratos não induzidos com IPTG não apresentaram as proteínas recombinantes (Fig.8).

A partir dos lisógenos induzidos com IPTG pode-se então obter quantidades suficientes das proteínas recombinantes para a imunização de camundongos. Desta forma foi possível obter um soro contra a proteína recombinante A (denominado soro anti-**80K-H**) que apresentou um bom título contra a banda de 80 kD de plaquetas em ensaio de ELISA (Fig.9a). O melhor soro obtido contra a proteína recombinante C, no entanto, apresentou baixa reatividade com a banda de 80 kD de plaquetas. Um soro normal de camundongos foi utilizado como controle negativo.

Os mesmos soros foram testados contra beta galactosidase em ELISA (Fig.9b). Ambos apresentaram

```
ArgLysThrHisGluAlaGluIleValGluGlyGluAsnHisThrTyrCysIleArgPhe
CGCAAGACCCATGAGGCCGAGATCGTGGAAGGGGAGAACCACACCTACTGCATCCGCTTT
        10        20        30        40        50        60

ValProAlaGluMetGlyThrHisThrValSerValLysTyrLysGlyGlnHisValPro
GTTCCCGCTGAGATGGGCACACACACAGTCAGCGTGAAGTACAAGGGCCAGCACGTGCCT
        70        80        90       100       110       120

GlySerProPheThrAlaArgValThrGlyAspAspSerMetArgMetSerHisLeuLys
GGCAGCCCCTTCACTGCTCGGGTCACAGGTGACGACTCCATGCGTATGTCCCACCTAAAG
       130       140       150       160       170       180

ValGlySerAlaAlaAspIleProIleAsnIleSerGluThrAspLeuSerLeuLeuThr
GTCGGCTCTGCTGCCGACATCCCCATCAACATCTCAGAGACGGATCTCAGCCTGCTGACG
       190       200       210       220       230       240

AlaThrValValProProSerGlyArgGluGluProCysLeuLeuLysArgLeuArgAsn
GCCACTGTGGTCCCGCCCTCGGGCCGGGAGGAGCCCTGTTTGCTGAAGCGGCTGCGTAAT
       250       260       270       280       290       300

GlyHisValGlyIleSerPheValProLysGluThrGlyGluHisLeuValHisValLys
GGCCACGTGGGGATTTCATTCGTGCCCAAGGAGACGGGGGAGCACCTGGTGCATGTGAAG
       310       320       330       340       350       360

LysAsnGlyGlnHisValAlaSerSerProIleProValValIleSerGlnSerGluIle
AAAAATGGCCAGCACGTGGCCAGCAGCCCCATCCCGGTGGTGATCAGCCAGTCGGAAATT
       370       380       390       400       410       420

GlyAspAlaSerArgValArgValSerGlyGlnAlaPheThrLysAlaThrProLeuSer
GGGGATGCCAGTCGTGTTCGGGTCTCTGGTCAGGCCTTCACGAAGGCCACACCTTTGAGC
       430       440       450       460       470       480

LeuGlnSerLeuSerLeuIleProAlaMetGlnAlaMetValGlySerAlaCysProLeu
CTGCAGAGTTTATCATTGATACCCGCGATGCAGGCTATGGTGGGCTCAGCCTGTCCATTG
       490       500       510       520       530       540

ArgAspProSerLysValAspIleAsnThrGluAspLeuGluAspGlyThrCysArgVal
AGGGACCCCAGCAAGGTGGACATCAACACAGAGGACCTGGAGGACGGGACGTGCAGGGTC
       550       560       570       580       590       600

ThrTyrCysProThrGluProGlyAsnTyrIleIleAsnIleLysPheAlaAspGlnHis
ACCTACTGCCCCACAGAGCCAGGCAACTACATCATCAACATCAAGTTTGCCGACCAGCAC
       610       620       630       640       650       660

ValProGlySerProPheSerValLysValThrGlyGluGlyArgValLysGluSerIle
GTGCCTGGCAGCCCCTTCTCTGTGAAGGTGACAGGCGAGGGCCGGGTGAAAGAGAGCATC
       670       680       690       700       710       720

ThrArgArgArgArgAlaProSerValAlaAsnValGlySerHisCysAspLeuSerLeu
ACCCGCAGGCGTCGGGCTCCTTCAGTGGCCAACGTTGGTAGTCATTGTGACCTCAGCCTG
       730       740       750       760       770       780

LysIleProGluIleSerIleGlnAspMetThrAlaGlnValThrSerProSerGlyLys
AAAATCCCTGAAATTAGCATCCAGGATATGACAGCCCAGGTGACCAGCCCATCGGGCAAG
       790       800       810       820       830       840

ThrHisGluAlaGluIleValGluGlyGluAsnHisThrTyrCysIleArgPheValPro
ACCCATGAGGCCGAGATCGTGGAAGGGGAGAACCACACCTACTGCATCCGCTTTGTTCCC
       850       860       870       880       890       900

AlaGluMetGlyThrHisThrValSerValLysTyrLysGlyGlnHisValProGlySer
GCTGAGATGGGCACACACACAGTCAGCGTGAAGTACAAGGGCCAGCACGTGCCTGGGAGC
       910       920       930       940       950       960

ProPheGlnPheThrValGlyProLeuGlyGluGlyGlyAlaHisLysValArgAlaGly
CCCTTCCAGTTCACCGTGGGGCCCCTAGGGGAAGGGGGAGCCCACAAGGTCCGAGCTGGG
       970       980       990      1000      1010      1020

GlyProGlyLeuGluArgAlaGluAlaGlyValProAla
GGCCCTGGCCTGGAGAGAGCTGAAGCTGGAGTGCCAGCC
      1030      1040      1050
```

FIG.7- Sequência nucleotídica do clone C e sua tradução

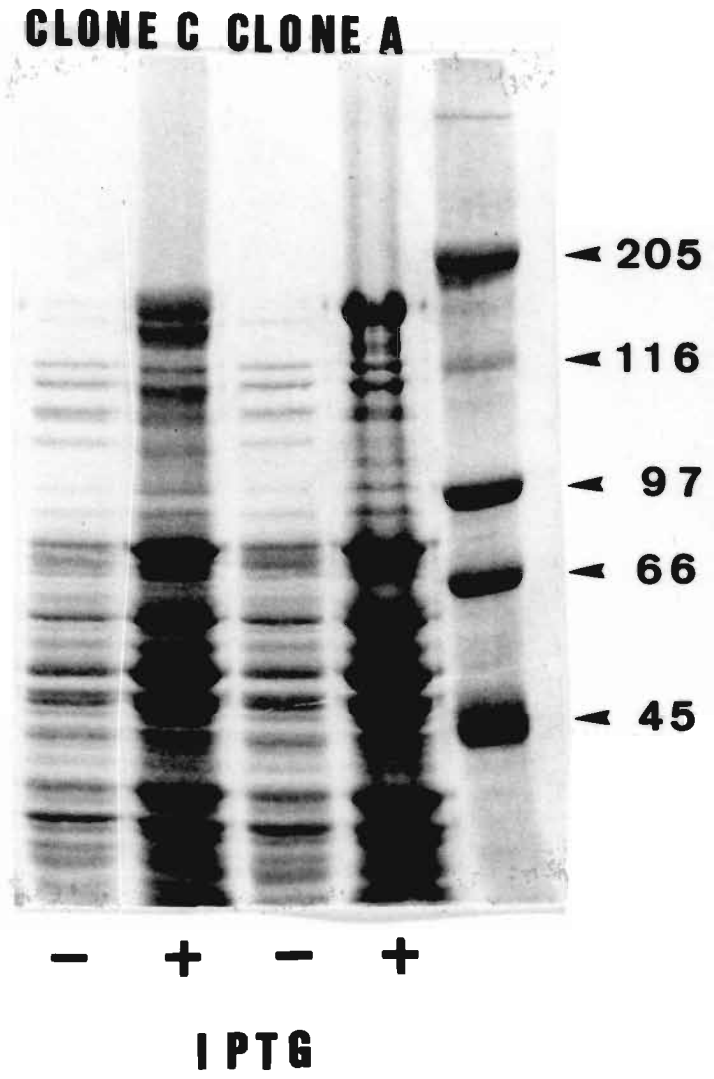


FIG.8- Análise dos extratos dos clones lisogênicos induzidos e não induzidos com IPTG em SDS PAGE 7,5%.

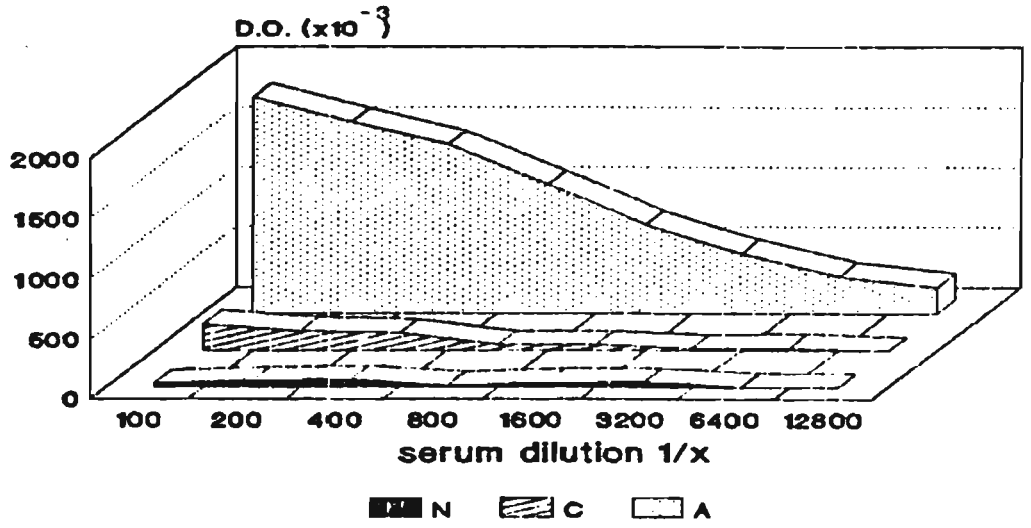


FIG.9a- Titulação dos soros de camundongo imunizados com as proteínas de fusão A e C contra a banda de 80kD de plaquetas em ELISA.

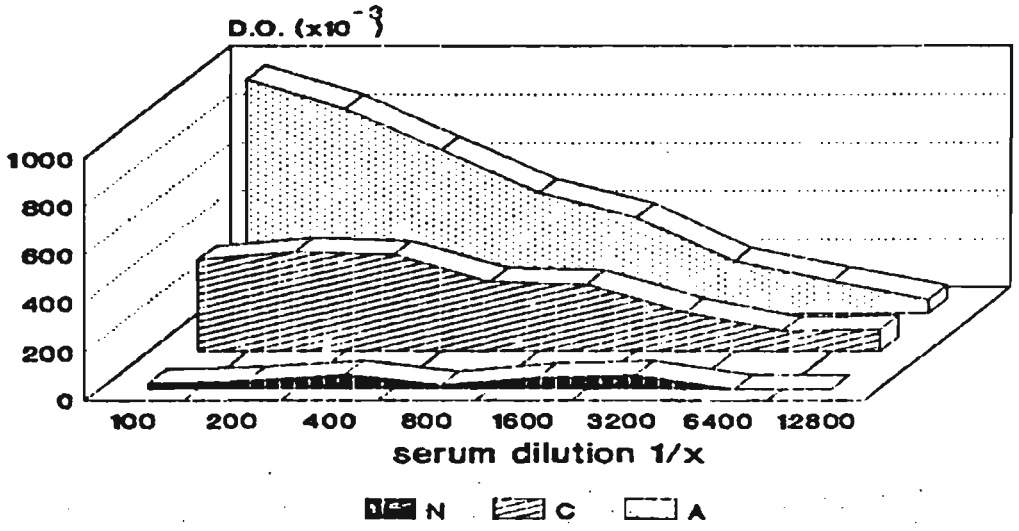


FIG.9b- Titulação dos soros de camundongo imunizados com as proteínas de fusão contra beta galactosidase em ELISA.

reatividade positiva, porém o soro contra a proteína recombinante A respondeu neste caso também bem melhor que o soro contra a proteína recombinante C.

6-Caracterização de 80K-H

6.1-Análise em Western blots

Diferentes linhagens tumorais humanas foram testadas quanto a presença de **80K-H** em **Western blot.** As linhagens escolhidas foram MG63 (osteossarcoma), HL60 (leucemia promielocítica) e MEL85 (melanoma). Todas apresentaram reação positiva do soro anti-**80K-H** com uma mesma banda de 80 kD em condições reduzidas (Fig.10). Em todas a linhagens esta mesma banda apresentou migração mais rápida em condições não reduzidas, indicando que a proteína **80K-H** consiste de uma única cadeia polipeptídica que deve apresentar ponte(s) dissulfeto intracadeia. Em plaquetas o padrão é o mesmo, com a diferença de que se detecta, em condições reduzidas, reação cruzada com uma proteína menor. As mesmas linhagens celulares, quando testadas em ensaios com soro de camundongo normal resultaram negativas (dados não mostrados).

6.2- Análise do ponto isoelétrico

Um **SDS PAGE** 7.5% bidimensional de extrato de plaquetas foi transferido para nitrocelulose e submetido a reação de

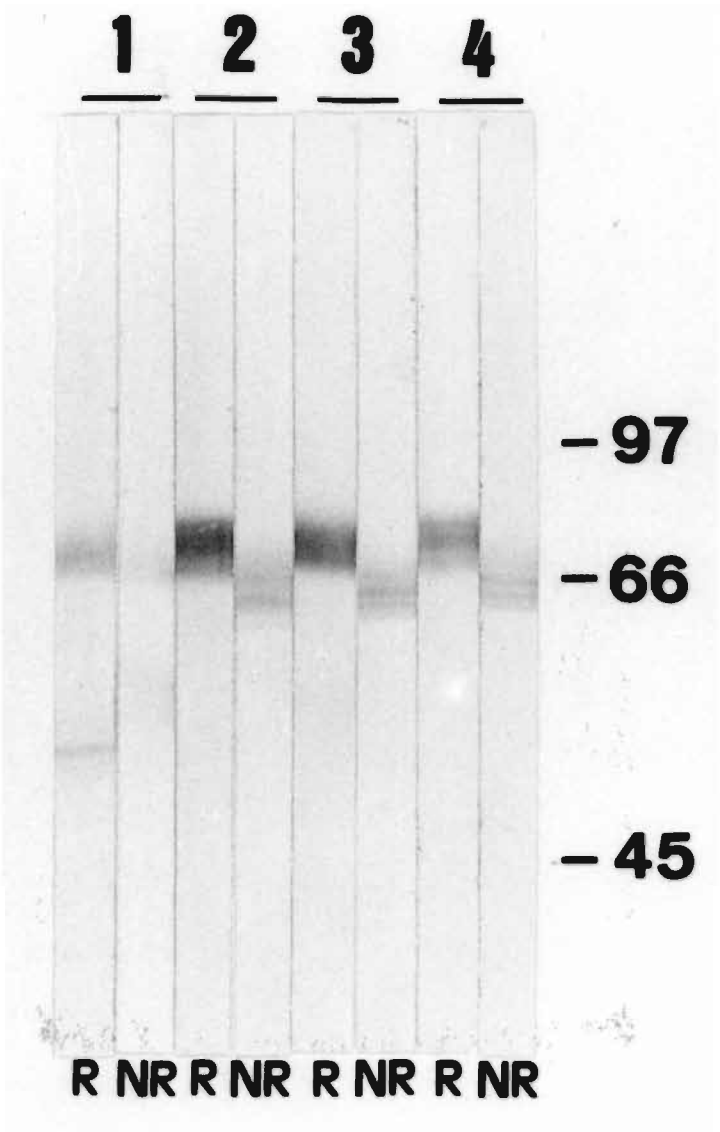


FIG.10- Análise da proteína 80K-H por Western blot em plaquetas (1), HL60 (2), MG63 (3) e MEL85 (4), utilizando-se o soro policlonal anti-80K-H.

Western blot com o soro anti-**80K-H**. Este soro demonstrou-se altamente específico para uma única proteína de peso molecular 80 kD e de pI de aproximadamente 5.5 (Fig.11). Não foi detectada nenhuma reação cruzada com outra proteína.

6.3- Análise por Northern blot

Células MG63 foram utilizadas para a extração de RNA total e análise em **Northern blot**.

Para a hibridização foi utilizada uma sonda de RNA sintetizada através do sistema Riboprobe-Promega utilizando o plasmídeo pGEM/A como molde. Como nesse sequenciamento a leitura obtida por SP6 a partir de pGEM/A é a que origina a fita codificadora (igual ao RNAm), utilizou-se a polimerase T7 para a transcrição, e desta forma foi obtida uma sonda complementer ao RNAm. Para a síntese da sonda o pGEM/A precisou ser linearizado. Como o inserto A não apresenta sítio de clivagem para BamHI e como o sítio de BamHI no pGEM-3Z é depois do sítio de EcoRI em relação a T7 (esquema 1), esta enzima foi escolhida para a linearização do plasmídeo. A vantagem da utilização de uma sonda de RNA foi a possibilidade de poder tratar o filtro, após a incubação com a sonda, com RNAse que digeriu todas as fitas de RNA que estiverem simples fita, eliminando a hibridização inespecífica.

Dois tamanhos de RNAm foram detectados em células MG63 (Fig.12). O maior, de aproximadamente 3.5 kb, corresponde

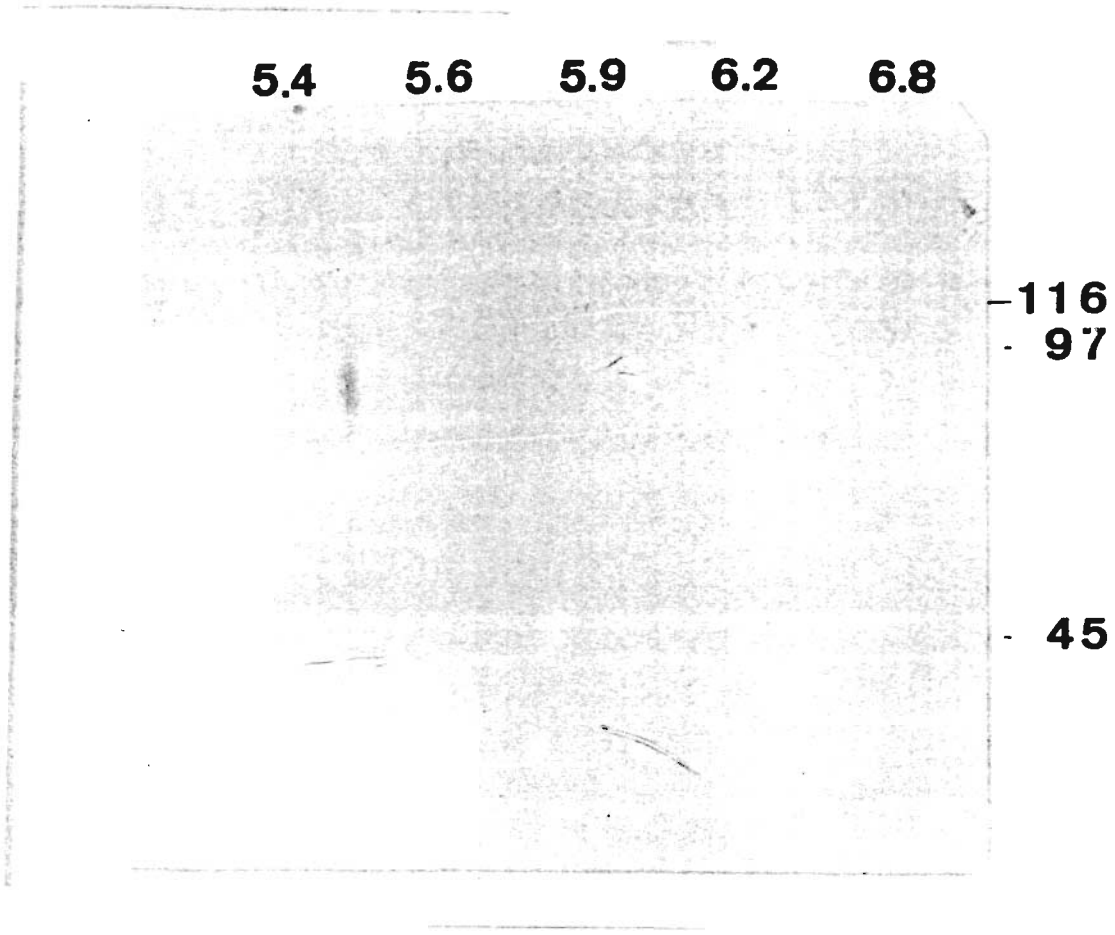


FIG.11- Western blot de eletroforese bidimensional de extrato de plaquetas com o soro anti-80K-H.

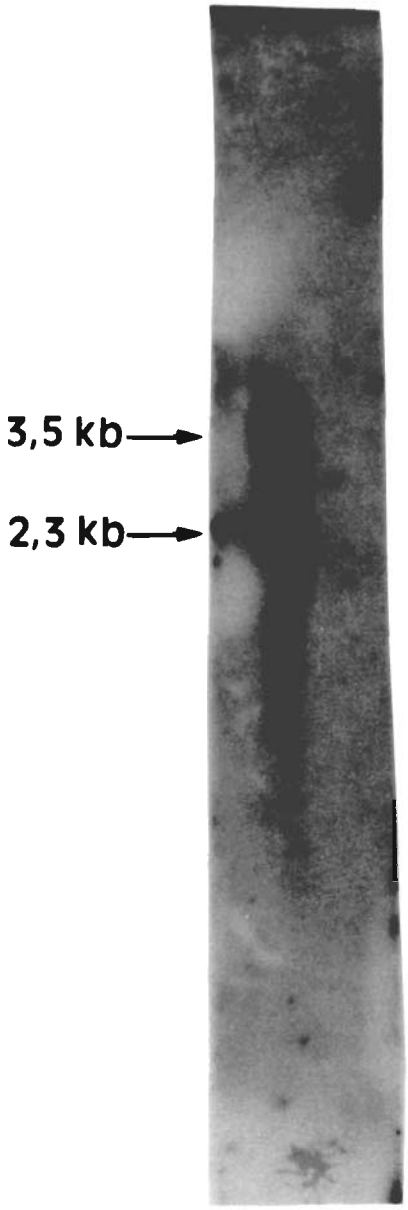


FIG.12- Northern blot de RNA total de MG63 utilizando como sonda RNAm antisense de 80K-H.

provavelmente ao RNA nuclear. O RNAm menor apresenta aproximadamente 2.3 kb e corresponde ao RNAm processado.

7- Localização celular de 80K-H

7.1- Através de imunofluorescência indireta

A técnica de imunofluorescência indireta em células em cultura não é tão sensível como a de **Western blot**, por exemplo, pois a proteína de interesse pode estar distribuida por toda a célula, e não concentrada em uma banda. Por isto foi necessário utilizar o soro anti-**80K-H** mais concentrado (1:50).

Foram novamente utilizadas as células MG63 nesses ensaios. Em células não permeabilizadas a reação foi muito fraca, praticamente inexistente, quando comparada com a positividade obtida em células permeabilizadas (dados não mostrados). Em células permeabilizadas a reação foi muito específica, citoplasmática, apresentando a região de Golgi nitidamente negativa (Fig.13).

7.2- Através da análise das frações subcelulares

A presença da proteína **80K-H** foi verificada nas diferentes frações subcelulares de células MG63, através de ensaio de Western blot com o soro anti-**80K-H** (Fig.14). A fração "nuclear" apresentou alta positividade com o soro como esperado, já que nesta fração estão contidas também as

FIG.13- Imunofluorescência indireta em células MG63 com o soro anti-80K-H em condições permeabilizantes. A seta indica a região de Golgi.

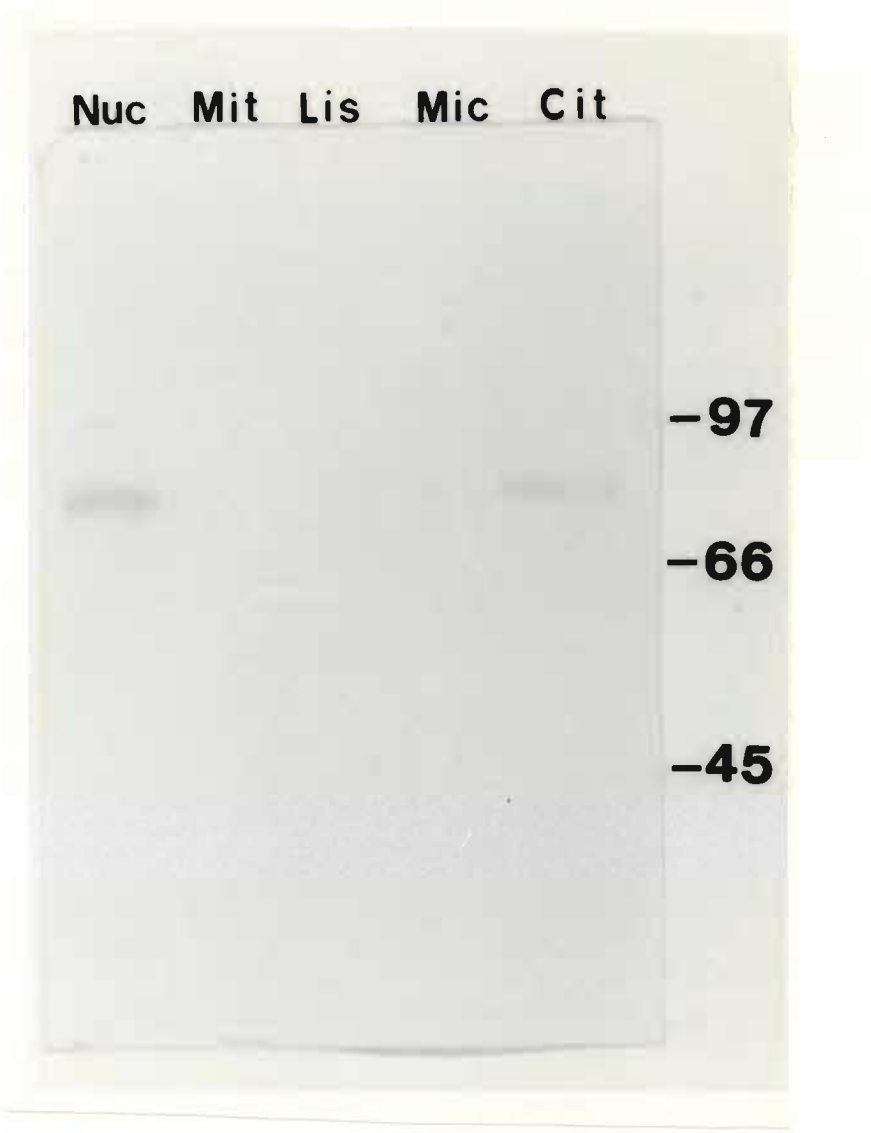


FIG.14- Análise das frações subcelulares (nuclear, mitocondrial, lisossomal, microssomal e citossólica) de MG63 em Western blot com o soro anti-80K-H.

células não lisadas no processo de homogeneização, e portanto, não representa uma fração pura, mas sim um extrato proteico total. As outras frações podem ser consideradas como bastante puras, sem, no entanto, poder-se descartar a possibilidade de pequenas contaminações de uma fração para a outra. Apenas na fração citossólica observou-se uma concentração da proteína **80K-H**. Uma pequena positividade foi observada na fração microssomal. Como o isolamento desta fração precede a da fração citossólica (na centrifugação a 100000 x g os microssomos precipitam e as proteínas citossólicas permanecem no sobrenadante) esta pequena positividade da fração microssomal pode ser fruto de uma contaminação da fração microssomal com a fração citossólica. Para verificar se as frações citossólica e microssomal foram realmente bem separadas, testou-se a reatividade destas frações em **Western blot** com a lectina GNA (**galanthus nivalis agglutinin**) que reconhece manoses terminais, que são marcadores específicos de retículo endoplasmático. A fração microssomal apresentou maior intensidade de reação com esta lectina do que a fração citossólica (dados não mostrados) indicando que na fração microssomal houve concentração das proteínas de retículo endoplasmático.

8-Análise da fosforilação "in vivo" da proteína 80K-H

Várias proteínas são fosforiladas "in vivo" em células MG63, nas condições analisadas. A separação das proteínas fosforiladas por eletroforese bidimensional, seguida de uma reação de Western blot com o soro anti-**80K-H** e exposição deste mesmo filtro de nitrocelulose a um filme de raio X, permitiu a identificação de **80K-H** entre as proteínas fosforiladas. Sobrepondo-se a autorradiografia com o filtro de nitrocelulose foi possível detectar uma banda fosforilada com pI e peso molecular muito semelhantes ao "spot" correspondente a **80K-H** do **Western blot** (Fig.15). No entanto, não houve uma sobreposição exata das bandas, que além disto apresentaram formas bastantes diferentes. Quando a mesma nitrocelulose havia sido corada com Ponceau, pode-se visualizar uma banda horizontal imediatamente acima da **80K-H**, que apresentou uma forma mais semelhante à forma da banda fosforilada da autorradiografia. Portanto, tudo indica que nestes ensaios não foi possível detectar fosforilação "in vivo" da proteína **80K-H**.

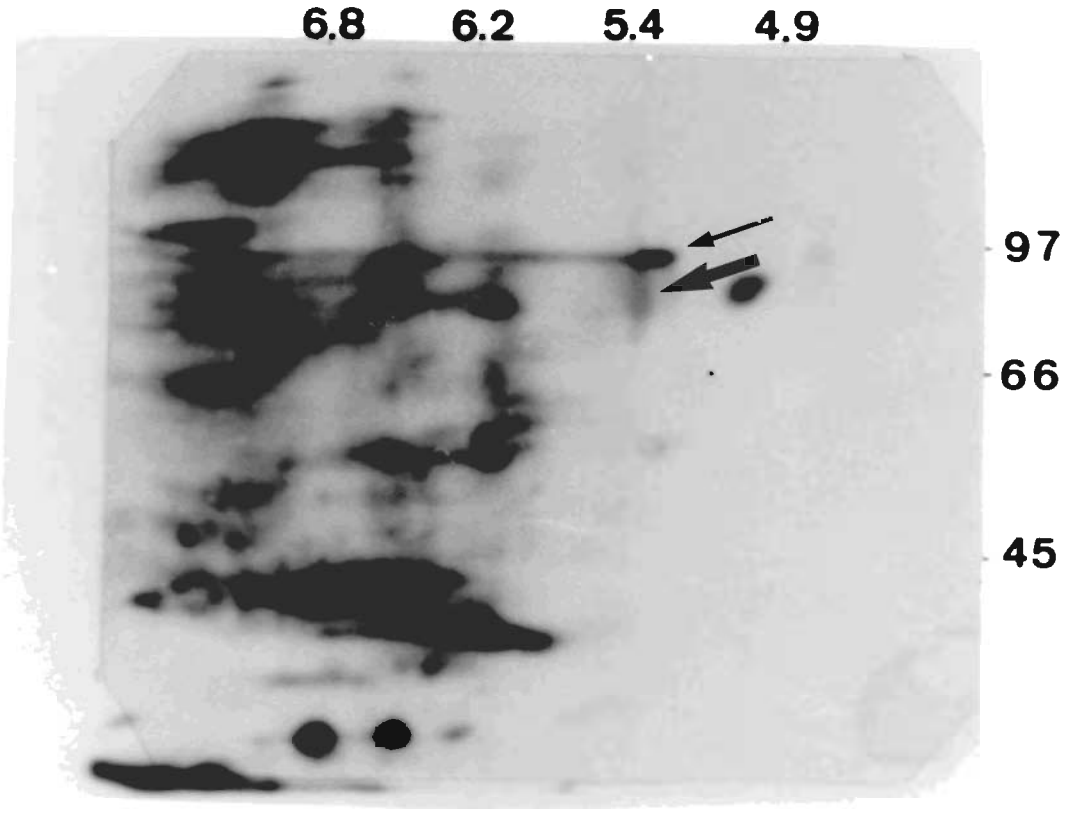


FIG.15- Sobreposição do Western blot (com anti-80K-H) com a autorradiografia de eletroforese bidimensional de células MG63 marcadas com ^{32}Pi. A flecha maior indica o "spot" do Western blot e a menor indica a banda fosforilada da autorradiografia.

DISCUSSÃO

Plaquetas apresentam um papel importante no desenvolvimento de metástases tumorais (Karpatkin e Pearlstein,1981). Parece haver uma correlação entre a habilidade de células tumorais agregarem plaquetas e seu potencial metastático (Honn et al,1987; Ugen et al,1988). Além disso, alguns agentes anti-plaquetários diminuem ou alteram a produção de certas metástases (Honn et al,1987).

O agonista plaquetário trombospondina está envolvido no processo de agregação plaquetária (Lawler,1986). Com o intuito de clonar o receptor de trombospondina GpIIIb (Mc Gregor et al,1989), produziu-se um soro policlonal contra uma banda eluída de **SDS PAGE** 7.5% de extrato proteico de plaquetas, que apresentava peso molecular igual ao de GpIIIb (denominada banda 80 kD). O soro policlonal anti-80 kD obtido desta maneira, reconheceu como esperado a banda de 80 kD em Western blot de extrato proteico de plaquetas (Fig.1). Este soro foi utilizado para varrer uma biblioteca de cDNA de endotélio humano. Dez sinais especificamente positivos para anti-80 kD foram isolados e analisados. Praticamente todos os sinais isolados apresentaram proteínas de fusão maiores que 116 kD (Fig.2). Como alguns clones apresentaram proteínas de fusão com padrões muito semelhantes quando analisadas em Western blot, quatro clones que pareciam diferir entre si (A1, C1, D1 e E8) foram escolhidos para as análises seguintes. Através de Western blot de extrato de

plaquetas utilizando os anticorpos do soro anti-80 kD específicos para cada um destes clones certificou-se que todos codificavam para proteínas de 80 kD existentes em plaquetas (Fig.3). Este resultado, juntamente com o resultado de hibridização entre os insertos de cDNA dos 4 clones (Fig.4), indicou que duas proteínas diferentes estavam representadas nestes clones.

Os insertos dos clones A1 e C1 foram subclonados no vetor pGEM-3Z para sequenciamento. Para se alcançar as regiões inacessíveis à polimerase foi necessário subclonar os insertos novamente, em fragmentos menores. A digestão dos insertos com as enzimas de restrição PstI e EcoRI produziu fragmentos de tamanhos adequados para o seu sequenciamento. A fase de leitura correta para cada clone foi determinada a partir do sequenciamento dos insertos diretamente dos clones recombinantes de lambda gt11.

Através de consulta ao GenBank observou-se que o clone C não apresentou homologia significativa com nenhuma proteína conhecida. O clone A, por sua vez, apresentou 100% de homologia com a proteína **80K-H**, substrato de **PKC** (Sakai et al,1989). Nenhum dos dois clones apresentou homologia com a sequência nucleotídica de GpIIIb (Oquendo et al,1989) quando analisados em dot matrix (dados não mostrados).

Em uma banda de **SDS PAGE** podem localizar-se várias proteínas. Um antisoro contra uma banda dificilmente será específico para uma única proteína. O soro anti-80 kD reconheceu duas proteínas diferentes da desejada.

Explicações para este fato incluem a possibilidade de estas proteínas serem mais antigênicas que GpIIIb, ou então de que estas existam em quantidades maiores nos extratos proteicos de plaquetas. Antes de se utilizar um determinado soro para a varredura de uma biblioteca de DNA, ensaios que indiquem que este reagente reconhece especificamente a proteína de interesse devem ser realizados.

A atividade da **PKC** é especialmente alta em plaquetas, chegando a ser 20 vezes maior que a atividade da **PKA** (Minakuchi et al,1981). Levando em consideração o fato de que as vias de transdução de sinal que utilizam **PKC** apresentam extrema importância nos processos de ativação plaquetária, como agregação e secreção (Haslam e Lynham,1977; Kawahara et al,1980; Wallace e Bensusan,1980; Sano et al,1983), decidiu-se prosseguir com a caracterização da proteína **80K-H**, descrita até então apenas na linhagem tumoral Ca9-22 (Sakai et al,1989).

A indução da fosforilação de uma proteína de 80-87 kD em resposta ao tratamento de células com ésteres de forbol ou mitógenos vinha sendo observada há aproximadamente uma década, em fibroblastos (Rozengurt et al, 1983) e cérebro de boi e rato (Blackshear et al,1983; Albert et al,1986). Stumpo e colegas (1989) isolaram o cDNA da proteína de 80 kD, que passou a ser denominada de **MARCKS** (myristoylated alanine- rich, C kinase substrate), por apresentar migração anômala em **SDS PAGE**, ser extremamente rica em alaninas e

possuir um sítio consenso para miristoilação em sua extremidade N-terminal.

Hirai e Shimizu (1990) purificaram da linhagem de carcinoma Ca9-22 duas frações de proteínas de 80 kD, designadas **80K-H** (a mais pesada) e **80K-L** (a mais leve), ambas substratos para **PKC**. Resultados de sequenciamento peptídico de **80K-L** revelaram que esta proteína era a **MARCKS** (Hirai e Shimizu,1990). O cDNA correspondente a **80K-H** foi isolado (Sakai et al,1989) e não apresentou homologia com nenhuma proteína conhecida.

Para a caracterização de **80K-H** produziu-se um soro policlonal contra a proteína recombinante A obtida em grandes quantidades de um clone lisogênico. Este soro (denominado soro anti-**80K-H**) mostrou-se altamente específico nos ensaios realizados.

Vale ressaltar aqui, que a tentativa de produzir um soro policlonal contra a proteína de fusão do clone C foi frustrada, como indicado na Fig. 9a, o que impossibilitou a caracterização da proteína produzida por este clone.

A proteína **80K-H** apresenta peso molecular real de 59.300, apesar de em **SDS PAGE** apresentar peso molecular aparente de 80 kD. Diferenças similares ocorrem com outros substratos de **PKC**, como a proteína de neurofilamento L (Geisler et al,1985), **GAP-43** (Karns et al,1987), **MARCKS** (Stumpo et al,1989) e pleckstrin (Tyers et al,1988), que como **80K-H** apresentam pI acídico. Proteínas acídicas,

provavelmente devido à ligação restrita de SDS, apresentam pesos moleculares aparentes muito altos em **SDS PAGE** (Kaufman et al,1984). Além disto a presença de grupos fosfato também podem contribuir para uma superestimação do peso molecular em **SDS PAGE** (Lozano et al,1990).

As linhagens tumorais HL60, MG63 e MEL85 foram testadas quanto a presença de **80K-H** através de **Western blot**. Todas elas apresentaram a proteina **80K-H** com padrões idênticos (Fig.10), o que sugere fortemente que **80K-H** é uma proteína bastante conservada entre estes tipos celulares, diferentemente de **MARCKS**, que apresenta pesos moleculares variados como 87 kD em cérebro de boi (Stumpo et al,1989), 67 kD em cérebro de galinha (Stumpo et al,1989), 68 kD em macrófago murino (Seykora et al,1991) e 80 kD em fibroblastos (Erusalimsky et al,1991). A comparação destas diferentes sequências de **MARCKS** indicou que apenas o domínio amino terminal (que contém o sítio para miristoilação) e o domínio alvo de fosforilação (que também contém os sítios de ligação para calmodulina e actina) são conservados. O restante da proteína é divergente, e deve ser responsável em parte pelas variações dos pesos moleculares (Seykora et al,1991).

A redução da migração de **80K-H** observada em condições não reduzidas de **SDS PAGE** indicam que esta proteína é constituida de uma única cadeia polipeptídica que apresenta ponte(s) dissulfeto intracadeia (Fig.10).

A proteína **80K-H** apresenta pI acídico aproximadamente igual a 5.5 e apresenta-se como um único "spot" (Fig.11). O pI acídico deve-se provavelmente ao alto número de ácidos glutâmicos (15% do total de aminoácidos) presente. Uma região extremamente rica em ácidos glutâmicos é observada entre os aminoácidos 299 e 322 (Fig.6). Várias proteínas apresentam sequências contínuas longas de um mesmo aminoácido (Ambler,1990). A proteína do grupo de alta mobilidade de bezerro apresenta 25 ácidos glutâmicos consecutivos (Fasman,1989). As vezes estas sequências surgem abruptamente como intrusões em sequências normalmente prosaicas. Por exemplo, a sequência de bezerro pode ser alinhada com uma proteína homóloga de truta. No entanto, a sequência de bezerro apresenta a repetição de ácidos glutâmicos que a proteína de truta não apresenta (Fasman,1989). Domínios transativadores de fatores de transcrição apresentam um excesso de cargas negativas que apresentam uma conformação e sequências de aminoácidos indefinidas que funcionam como sítios de contato proteína-proteína para a RNA polimerase II (Sigler,1987). As interações são mantidas através de pontes de hidrogênio entre os aminoácidos acídicos e os hidroxilados (Sigler,1987). Um "cluster" acídico foi identificado na Subunidade Regulatória II (RII) da **PKA** tipo II (Scott et al,1990). Esta quinase localiza seus substratos específicos através da ligação das suas subunidades regulatórias dimerizadas a proteínas ancorantes. A localização de **PKA** no

citoesqueleto ocorre através da interação do dímero RII com a proteína associada a microtúbulos 2 (**MAP2**). Peptídeos sintéticos que mimetizam esta região acídica de RII inibem a ligação de RII a **MAP2**, indicando que esta região acídica pode fazer parte do sítio de ligação para **MAP2** (Scott et al,1990). A maneira pela qual estas repetições longas de aminoácidos se originam em diferentes proteínas assim como as suas consequências estruturais e funcionais permanecem desconhecidas. Pode-se especular que a sequência rica em ácidos glutâmicos de 80K-H represente um sítio de contato com outras proteínas, como nos casos descritos acima.

Em células MG63 foram detectados em Northern blot dois transcritos que hibridizaram com o RNA **antisense** de **80K-H**, de tamanhos (2,3 e 3,5 kb) idênticos aos identificados por Sakai et al (1989) em células Ca 9-22 (Fig.12). Segundo Sakai e colegas o transcrito maior poderia ser originado através de "splicing" alternativo devido a uso alternativo de sinais de poliadenilação, ou poderia corresponder a algum RNA homólogo. Alternativamente, o transcrito maior pode corresponder ao RNAm não processado, uma vez que não se detectou polimorfismo da proteína **80K-H** nos tipos celulares analisados (Fig.10).

A proteína **80K-H** apresenta portanto características em comum com **MARCKS**, tais como: pI acídico, migração anômala em **SDS PAGE**, uma composição incomum de aminoácidos (alta em ácidos glutâmicos), ambas são substratos para **PKC**. As sequências proteicas de **80K-H** e **MARCKS**, no entanto, não

apresentam nenhuma homologia quando comparadas por **dot matrix** (dados não mostrados). Diferentemente de **80K-H**, a proteína **MARCKS** já está bastante bem caracterizada. Em macrófagos uma fração de **MARCKS** esta associada com a membrana, enquanto que a forma fosforilada da proteína é citossólica (Aderem et al,1988). Rosen e colegas (1990) demonstraram através de estudos de imunofluorescência que em macrófagos não estimulados, **MARCKS** apresenta uma distribuição pontuada na superfície de aderência dos **filopodia** ao substrato, onde ela se co-localiza com vinculina e talina. **MARCKS** é deslocada destas placas de adesão através de fosforilação por **PKC**, evento este que é acompanhado por uma alteração morfológica do macrófago. Este mesmo tipo de translocação foi observado em neutrófilos ativados com ésteres de forbol (Thelen et al,1991). Em terminações nervosas, a fosforilação de **MARCKS** por **PKC** provoca a sua translocação da membrana para o citossol (Wang et al,1989). **MARCKS** é uma proteína ligante de actina (Hartwig et al, dados não publicados) e de calmodulina (Graff et al,1989) cuja ligação à membrana plasmática aderente ao substrato é regulada pela **PKC**. Sendo assim, sua função parece estar intimamente relacionada com a regulação da associação reversível do citoesqueleto de actina com a membrana plasmática aderente ao substrato, um passo fundamental para a locomoção e outras alterações morfológicas celulares.

Com o objetivo de se obter algum conhecimento a respeito da função de **80K-H** procurou-se localizar a sua posição subcelular através de ensaios de imunofluorescência. Células MG63 foram utilizadas para os ensaios. A proteína **80K-H** mostrou-se inacessível para o reconhecimento pelo anticorpo em células não permeabilizadas, indicando que localiza-se intracelularmente. Em células permeabilizadas o padrão observado foi bem positivo, com a região do Aparelho de Golgi nitidamente negativa (Fig.13). O aspecto perinuclear da positividade não significa que **80K-H** localiza-se preferencialmente nesta região da célula. Na realidade, este adensamento de citoplasma na região perinuclear é característico de células que se movem sobre o substrato. Estas células apresentam na sua periferia extensões planas e muito finas (0,1 a 0,4 um) denominadas de **lamellipodia**, que não contêm organelas mas apenas uma malha de microfilamentos de actina (Darnell et al,1990).

A proteína **80K-H** é altamente polar e não apresenta domínios transmembrana. Sakai e colegas (1989) observaram através da análise da extremidade amino terminal que algum processamento pós-traducional ocorre na proteína **80K-H**. O peptídeo amino terminal clivado é altamente hidrofóbico (Fig.6) lembrando um peptídeo sinal. Proteínas secretadas, de membrana plasmática ou lisossômicas são inseridas no retículo endoplasmático (RE) através de peptídeos sinais ou através de sequências sinais internas (Gierash,1989). Após modificações no RE, as proteínas movem-se em pequenas

vesículas transportadoras para o Aparelho de Golgi. Desta organela, proteínas de membrana, enzimas lisossômicas e proteínas secretadas são enviadas para seus respectivos sítios celulares (Griffiths e Simons,1986). Analisando-se a sequência proteica de **80K-H** através do programa PCGENE, verificou-se que a sua sequência N-terminal satisfaz as exigências para a predição de sequências peptídeo sinais pelo método de von Heijne (1986). Além disto o mesmo método indica que o sítio de clivagem mais provável nesta sequência peptídeo sinal fica entre a primeira alanina e a primeira valina, como indicado na Figura 6. Ao sequenciar a proteína **80K-H** purificada, Sakai e colegas (1989) obtiveram uma valina como o primeiro aminoácido da extremidade N-terminal, seguida de Glu, Val, Lys, Arg, Pro etc., indicando que houve clivagem "in vivo" da sequência N-terminal, nesta mesma posição predita.

Se a extremidade N-terminal de **80K-H** atua como um peptídeo sinal, esta proteína deveria entrar no RE, mas no entanto, o achado de que a região de Golgi não se cora em ensaios de imunofluorescência com um soro específico para **80K-H** (Fig.13) sugere que diferentemente das outras proteínas que entram no RE, **80K-H** não seguiria para o Golgi. A proteína **80 K-H** poderia então ser retida no RE, não seguindo a via comum às proteínas secretadas, lisossômicas ou de membrana plasmática. Munro e Pelham (1987) demonstraram que a sequência de 4 aminoácidos KDEL (Lys, Asp, Glu e Leu) na extremidade C-terminal de proteínas de RE

representa o sinal que media a retenção destas proteínas no RE em eucariotos superiores. A proteína **80K-H** não apresenta a sequência KDEL, mas sim HDEL na sua extremidade C-terminal (Fig.6). A sequência HDEL também tem sido identificada como mediadora de retenção de proteínas no RE de leveduras (Pelham et al,1988). A análise das frações celulares de células MG63 demonstrou que a proteína **80K-H** não se encontra na fração microsomal, mas sim na fração citossólica (Fig.14). Este resultado é compatível com os dados de Pelham e colegas (1988), que concluiram, através da construção de proteínas de fusão contendo lisozima com as sequências KDEL ou HDEL na extremidade C-terminal, que sequências HDEL não funcionam como um sinal de retenção eficiente em células animais, mas funciona apenas em levedura. Os dados obtidos indicam portanto que a sequência HDEL da extremidade C-terminal de **80K-H** não apresenta função de retenção no RE, e a sequência N-terminal, apesar de apresentar características compatíveis com um peptídeo sinal, não apresenta esta função. Qual poderia ser então o papel de uma sequência extremamente hidrofóbica na extremidade N-terminal de **80K-H**? Proteínas integrais de membrana, ou seja, aquelas que se ligam à bicamada fosfolipídica através de interações hidrofóbicas, podem apresentar estruturas variadas (Wickner e Lodish,1985). A extremidade N-terminal de 80K-H apresenta um índice de hidrofobicidade suficiente para ser classificada como sendo um segmento transmembrânico, segundo o método de Klein e colegas (1985). Os resultados obtidos

não excluem a possibilidade da existência de uma fração membrânica de **80K-H**.

Em ensaios de fosforilação "in vitro" **80K-H** mostrou-se substrato para as **PKC I**, **II** e **III** (Hirai e Shimizu,1990). As **PKC I** (ou gama) ocorrem no tecido nervoso central e coluna espinhal, as **PKC II** (ou beta) ocorrem em alguns tecidos enquanto que as **PKC III** (ou alfa) são as mais ubíquas, estando presentes em vários tipos celulares e representando a **PKC** predominante em plaquetas (Tsukuda et al,1988). Um grande problema no estudo de fosforilação de proteínas é que "in vitro" a maioria das quinases fosforila muitas proteínas, sendo que apenas algumas delas são substratos fisiológicos. As possibilidades de que as espécies de **PKC** respondam diferentemente a seus ativadores "in vivo" e que algumas das preferências pelos seus substratos resultarão de sua localização assim como da localização das próprias quinases nos compartimentos intracelulares, complicam muito a procura de proteínas alvo fisiologicamente verdadeiras para as **PKCs**.

Em ensaios de fosforilação "in vivo" não foi possível detectar a fosforilação de **80K-H** em células MG63 (Fig.15). Hirai e Shimizu (1990) não observaram indução de fosforilação de **80K-H** em células induzidas com **TPA** ou **EGF**, como ocorre com **MARCKS** (Rozengurt et al,1983; Blackshear et al,1980; Hirai e Shimizu,1989). Estes dados sugerem que a proteína **80K-H** ou não representa um substrato funcional para

PKC "in vivo", ou é fosforilada de forma rápida e transiente nas células examinadas.

A determinação da função biológica de uma proteína representa uma abordagem muito complicada. É extremamente difícil padronizar ensaios biológicos que possam esclarecer a respeito destas funções. A determinação de sequências consenso para modificações pós-traducionais e domínios funcionais encontrados em diversas proteínas, assim como sítios para miristoilação, para fosforilação por quinases específicas, para ligação à actina, para ligação a DNA, para localização subcelular e muitos outros, podem sugerir, através da análise da sequência primária da proteína em estudo, algo a respeito de sua função. No entanto, deve-se ter em mente que a presença de uma destas sequências consenso em uma proteína não significa necessariamente que neste caso ela seja funcional, como é o caso das sequências HDEL e N-terminal de **80K-H**.

A caracterização da proteína **80K-H** através de métodos imunoquímicos, indicou que esta proteína está presente em vários tipos celulares e de forma não polimórfica. Além disto, apresenta localização celular citoplasmática e não foi encontrada em frações celulares microssomais. Sua caracterização como um substrato fisiológico para PKC não pode ser demonstrada, ao menos na célula testada.

Plaquetas têm sido amplamente utilizadas para a investigação de mecanismos de transdução de sinal, particularmente aqueles que envolvem a hidrólise de PtdIns

$(4,5)P_2$ em que os mensageiros secundários DAG e IP3 ativam respectivamente a **PKC** e a liberação de Ca^{++} das reservas intracelulares (Nishizuka,1986). No entanto, poucos substratos de **PKC** estão bem caracterizados até hoje, apesar de esta quinase estar implicada em uma série de eventos celulares. A caracterização de seus substratos é de extrema relevância para a compreensão dos mecanismos de transdução celular por ela mediados, que resultam em tão variadas respostas celulares. Os dados apresentados neste trabalho contribuem para a determinação do papel fisiológico da proteína **80K-H** na biologia celular.

BIBLIOGRAFIA

Aderem,A.A.; Albert,K.A.; Keum,M.M.; Wang,J.K.T.; Greengard,P.; Cohn,Z. (1988) Stimulus- dependent Myristoylation of a Major Substrate for Protein Kinase C. Nature 332:362-364

Albert,K.A.; Walaas,S.I.; Wang,J.K.T.; Greengard,P. (1986) Widespread Occurrence of "87 kDa", a Major Specific Substrate for Protein Kinase C. (1986) PNAS 83:2822-2826

Ambler,R.P. (1990) Proteins of Unusual Sequence Composition. Biochemical Society Transactions 19:517-522

Angel,P.; Imagawa,M.; Chiu,R.; Stein,B.; Imbra,R.J.; Rahmsdorf,H.J.; Jonat,C.; Herrlich,P.; Karin,M. (1987) Phorbol Ester - Inducible Genes Contain a Common "Cis" Element Recognized by a TPA- Modulated "Trans"- Acting Factor. Cell 49:729-739

Bell,R.M. (1986) Protein Kinase C Activation by Diacylglycerol Second Messengers. Cell 45:631-632

Berridge,M.J.; Irvine,R.F. (1984) Inositol Triphosphate, a Novel Second Messenger in Cellular Signal Transduction. Nature 312:315-321

Blackshear,P.J.; Wen,L.; Glynn,B.P.; Witters,L.A. (1986) Protein Kinase C- Stimulated Phosphorylation "in vitro" of a Mr 80,000 Protein Phosphorylated in Response to Phorbol Esters and Growth Factors in Intact Fibroblasts. JBC 261:1459-1469

Bradford,M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein- Dye Binding. Anal. Biochem. 72:248-254

Brigido,M.M.; Sabbaga,J.; Brentani,R.R. (1990) Are Synthetic Petides Suitable for the Detection of Continuous Epitopes Only? Immunology Letters 24:191-198

Brown,A.M.; Birnbaumer,L. (1988) Direct G Protein Gating of Ion Channels. Am. J. Physiol. 254:H401-H410

Burridge,K.; Nuckolls,G.; Otey,C.; Pavalko,F.; Simon,K.; Turner,C. (1990) Actin- Membrane Interaction in Focal Adhesions. Cell Differentiation and Development 32:337-342

Byung,S.K.; Collen,J. (1990) Direct Sequencing of Lambda gt11 Recombinant Clones. BioTecchniques Vol 8:156-159

Cantley, L.W.; Anger,K.R.; Carpenter,C.; Duckworth,B.; Graziani,A.; Kapeleer,R.; Soltoff,S. (1991) Oncogenes and Signal Transduction. Cell 64:281-302

Carmichael, G.G.; Mc Master,G.K. (1980) The analysis of Nucleic Acids in Gels Using Glyoxal and Acridine Orange. Methods in Enzymology 65:380-391

Carpenter,D.; Jackson,T.; Hanley,M.R. (1987) Coping with a Growing Family. Nature 324:107-108

Cochet, C.; Gill, G.N.; Meisenhelder,J.; Cooper, J.A.; Hunter,T. (1984) C- Kinase Phosphorylates the Epidermal Growth Factor Receptor and Reduces its Epidermal Growth Factor Stimulated Tyrosine Protein Kinase Activity. JBC 259:2553-2558

Colamonici,O.R.; Trepel,J.B.; Vidal,C.A.; Neckers,L.M. (1986) Phorbol Esters Induces C-Sis Gene Transcription in Stem Cell Line K-562. Mol. Cell. Biol. 6:1847-1850

Dalton,J.P.; Tom,T.D.; Strand,M. (1987) Cloning of a cDNA Encoding a Surface Antigen of **Schistosoma mansoni** Schistosomula Recognized by Sera of Vaccinated Mice. PNAS 84:4268-4272

Darnell,J.; Lodish,H.; Baltimore,D. (1990) Molecular Cell Biology. Scientific American Books, Inc. NY.

Darribere,T.; Guida,K.; Larjava,H.; Johnson, K.E.; Yamada,K.; Thiery,J.P.; Boucat, J.C. (1990) In Vivo Analysis of Integrin Beta 1 Subunit Function in Fibronectin Matrix Assembly. The Journal of Cell Biology 110:1813-1823

Davis,R.J.; Czech,M.P. (1986) Inhibition of the Apparent Affinity of the Epidermal Growth Factor Receptor Caused by Phorbol Diesters Correlates With Phosphorylation of Threonine- 654 but not Other Sites on the Receptor. Biochem. J. 233:435-441

Drubin,D.G.; Mulholland,J. Zhu,Z.; Botstein,D. (1990) Homology of a Yeast Actin- Binding Protein to Signal Transduction Proteins and Myosin I. Nature 343:288-290

Engvall,E. (1980) Methods in Enzymology 70:419-439

Erusalimsky,J.D.; Brooks,S.F.; Herget,T.; Morris,C.; Rozengurt,E. (1991) Molecular Cloning and Characterization of the Acidic 80-kDa Protein Kinase C Substrate from Rat Brain. JBC 266:7073-7080

Fasman,G. (1989) Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation. Brandeis University. Waltham, Massachussets. Plenum Press NY.

Fearn,J.C.; King,A.C. (1985) EGF Receptor Affinity Is Regulated by Intracellular Calcium and Protein Kinase C. Cell 40:991-1000

Febbraio,M. Silverstein,R.L. (1990) Identification and Characterization of LAMP-1 as an Activation Dependent Platelet Surface Glycoprotein. JBC 265:18531-18537

Feinberg,A.P.; Vogelstein,B. (1983) A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. Analytical Biochemistry 132:6-13

Ferrel,J.E.; Martin,G.S. (1988) Platelet Tyrosine- Specific Protein Phosphorylation Is Regulated by Thrombin. Molecular and Cellular Biology 8:3603-3610

Ferrel,J.E.; Martin,G.S. (1989) Tyrosine- Specific Protein Phosphorylation Is Regulated by Glycoprotein IIb-IIIa in Platelets. PNAS 86:2234-2238

Fleischman,L.F.; Chavala,S.B.; Cantley,L. (1986) Ras-Transformed Cells: Altered Levels of Phosphatidylinositol-4,5- Biphosphate and Catabolites. Science 231:407-410

Flint,A.J.; Paladini,R.D.; Koshland,Jr.D.E. (1990) Autophosphorylation of Protein Kinase C at Three Separated Regions of Its Primary Sequence. Science 249:408-411

Geisler,N.; Plessman,U.; Weber,K. (1985) The Complete Amino Acid Sequence of the Major Mammalian Neurofilament Protein (NF-L) FEBS LETTERS 182:475-478

Ghosh,S.; Baltimore,D. (1990) Activation "in vitro" of NFk-B by Phosphorylation of Its Inhibitor IkB. Nature 344:678-682

Gierasch,L.M. (1989) Signal Sequences. Biochemistry 28:923-930

Gilman,A.G. (1987) G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals. Ann. Rev. Biochem. 56:615-649

Ginsburg,D.; Handin,R.I.; Bonthron,D.T.; Donlon,T.A.; Bruns,G.A.P.; Latt,S.A.; Orkin,S.H. (1985) Human von Willebrand Factor (vWF): Isolation of Complementary DNA (cDNA) Clones and Chromosomal Localization. Science 228:1401-1406

Glover,D.M. (1985) DNA Cloning- A Practical Approach. Vol I. IRL Press, Oxford, Inglaterra.

Golden,A.; Nemeth,S.P.; Brugge,J.S. (1986) Blood Platelets Express High Levels of the pp60[illegible]- Specific Tyrosine Kinase Activity. PNAS 83:852-856

Gould,K.L.; Hunter,T. (1988) Platelet Derived Growth Factor Induces Multisite Phosphorylation of pp60^{c-src} and Increases Its Protein- Tyrosine Kinase Activity. Mol. Cell. Biol. 8:3345-3356

Graff,J.M.; Young,T.N.; Johnson,J.D.; Blackshear,P. (1989) Phosphorylation- Regulated Calmodulin Binding to a Prominent Cellular Substrate for Protein Kinase C. JBC 264:21818-21823

Greenberg,M.E.; Ziff,E.B. (1984) Stimulation of 3T3 Cells Induces Transcription of the c-Fos Proto-oncogene. Nature 311:433-438

Griffiths,G.; Simons,K. (1986) The "Trans" Golgi Network: Sorting at the Exit Site of the Golgi Complex. Science 234:438-443

Hall,A. (1990) Ras and GAP- Who Is Controlling Whom? Cell 61:921-923

Haslam,R.J.; Lynham,J.A. (1977) Relationship Between Phosphorylation of Blood Platelets Proteins and Secretion of Platelet Granule Constituents. I. Effects of Different Aggregating Agents. BBRC 77:714-722

von Heijne,G. (1986) A New Method for Predicting Signal Sequence Cleavage Sites. Nucleic Acids Research 14:4683-4690

Hirai,M.; Shimizu,N. (1989) Stimulation of a Mr 80,000 Protein Phosphorylation by EGF in EGF Receptor- Hyperproducing Human Tumor Cells. Journal of Cellular Physiology 139:9-17

Hirai,M.; Shimuzu,N. (1990) Purification of Two Distinct Proteins of Approximate Mr 80.000 from Human Epithelial Cells and Identification as Proper Substrates for Protein Kinase C. Biochem. J. 270:583-589

Hirst,R.; Horwitz,A.; Buck,C.; Rohrschneider,L. (1986) Phosphorylation of the Fibronectin Receptor Complex in Cells Transformed by Oncogenes thet Encode Tyrosine Kinases. PNAS 83:6470-6474

Hisanaga,S.; Gonda,Y.; Inagaki,M.; Ikai,A.; Hirokawa,N. (1990) Effects of Phosphorylation of the Neurofilament L Protein on Filamentous Structures. Cell Regulation 1:237-248

Honn,K.V.; Steinert,B.W.; Onoda,J.M.; Sloane,B.F. (1987) The Role of Platelets in Metastasis. Biorheology 24:127-137

House,C.; Kemp,B.E. (1987a) Protein Kinase C Contains a Pseudosubstrate Prototope in Its Regulatory Domain. Science 238:1726-1728

House,C.; Wettenhall,R.E.H.; Kemp,B.E. (1987b) The Influence of Basic Residues on the Substrate Specificity of Protein Kinase C. JBC 262:772-777

Howe,C.J.; Ward,E.S. (1989) Nucleics Acids Sequencing - A Practical Approach. IRL Press, Oxford, Inglaterra.

Hunter,T.; Ling,N.; Cooper,J.A. (1984) Protein Kinase C Phosphorylation of the EGF Receptor at a Threonine Residue close to ghe Cytoplasmic Face of the Plasma Membrane. Nature 311:480-483

Hunter,T. (1986) Phosphorylation in Signal Transmission and Transformation. In Oncogenes and Growth Control. Editado por Patricia Kahn e Thomas Graf. Springer- Verlag Berlin Heidelberg.

Hunter,T (1987) The Role of Phosphorylation in Growth Control and Malignant Transformation. In Signal Transduction and Protein Phosphorylation. Plenum Press, NY. Editado por L.M.G. Heilmeyer. Série A: A life Science Vol 135 Cap IV pp329

Hunter,T. (1989) Protein- Tyrosine Phosphatases. Cell 58:1013-1016

Hunter,T. (1991) Cooperation Between Oncogenes. Cell 64:249-270

Hynes,R.O. (1987) Integrins: A Family of Cell Surface Receptors. Cell 48:549-554

Inagaki,M.; Nishi,Y.; Nishizawa,K.; Matsuyama,M.; Sato,C. (1987) Site- Specific Phosphorylation Induces Desassembly of Vimentin Filaments. Nature 328:649-652

Kaplan,D.R.; Morrison,D.K.; Wong,G.; Mc Cormick,F.; Williams,L. (1990) PDGF Beta- Receptor Stimulates Tyrosine Phosphorylation of GAP and Association of GAP with a Signaling Complex. Cell 61:125-133

Karns,L.R.; Ng,S.C.; Freeman,J.A.; Fishman,M.C. (1986) Cloning of Complementary DNA for GAP-43, a Neuronal Growth-Related Protein. PNAS 236:597-600

Karpatkin,S.; Pearlstein,E. (1981) Role of Platelets in Tumor Cell Metastases. Annals of Internal Medicine 95:636-641

Kaufmann,E.; Geisler,N.; Weber,K. (1984) SDS PAGE Strongly Overestimates the Molecular Masses of the Neurofilament Proteins. FEBS LETTERS 170:81-84

Kawahara,Y.; Takai,Y.; Minakuchi,R.; Sano,R.; Nishizuka,Y. (1980) Phospholipid Turnover as a Possible Transmembrane Signal for Protein Phosphorylation During Human Platelet Activation by Thrombin. BBRC 97:309-317

Kawamoto,S.; Bengur,A.R.; Sellers,J.R.; Adelstein,R.S. (1989) "In Situ" Phosphorylation of Human Platelet Myosin Heavy and Light Chains by Protein Kinase C. JBC 264:2258-2265

Kemp,B.E.; Pearson,R.B. (1990) Protein Kinase Recognition Sequence Motifs. TIBS 15:342-346

Kitamura,S.; Ando,S.; Shibata,M.; Tanabe,K.; Sato,C.; Inagaki,M. (1989) Protein Kinase C Phosphorylation of Desmin at Four Serine Residues Within the Non- Alfa- Helical Head Domain. JBC 264:5674-5678

Klein,P.; Kanehisa,M.; De Lisi,C. (1985) The Detection and Classification of Membrane- Spanning Proteins. BBA 815:468-476

Koch,C.A.; Anderson,D.; Moran,M.F.; Ellis,C.; Pawson,T. (1991) SH2 and SH3 Domains: Elements that Control Interactions of Cytoplasmic Signaling Proteins. Science 252:668-674

Kuo,J.F.; Anderson,R.G.G.; Wise,B.C.; Ludmila,M.; Salomon,I.; Brackett,N.L.; Katoh,N.; Shoji,M.; Wrenn,R.W. (1980) Calcium- Dependent Protein Kinase: Widespread Occurence in Various Tissues of the Animal Kingdom and Comparison of Effects of Phospholipid, Calmodulin, and Trifluoperazine. PNAS 77:7039-7043

Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Bacteriophage T4. Nature 227:680-685

Lassing,I.; Lindberg,U. (1985) Specific Interaction Between Phosphatidylinositol 4,5- Biphosphate and Profilactin. Nature 314:427-474

Lawler,J. (1986) The Structural and Functional Properties of Thrombospondin. Blood 67:1197-1209

Lozano,F. Alberola- Ila,J.;Places,L.; Gallart,T.; Vives,J. (1990) Phosphorylation- Mediated Changes in the Electrophoretic Mobility of CDS molecules. Eur.J. Biochem. 193:469-477

Maniatis,T. Fritsch,E.F.; Sambrook,J. (1982) Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.

Maniatis,T.; Goodbown,S.; Fisher,J.A. (1987) Regulation of Inducible and Tissue- Specific Gene Expression. Science 236:1237-1245

Marchisio,P.C.; Arillo,D.; Teti,A.; Zambonin- Zallone,A.; Tarone,G. (1987) Rous Sarcoma Virus- Transformed Fibroblast and Cells of Monocytic Origin Display a Peculiar Dot- Like Organization of Cytoskeletal Proteins Involved in Microfilament- Membrane Interactions. Experimental Cell Research 169:202-214

Mc Gregor,J.L.; Catimel,B.; Parmentier,S.; Clezardin,P.; Dechavanne,M.; Leung,L.L.K. (1989) Rapid Purification and Partial Characterization of Human Platelet Glycoprotein IIIb. JBC 264:501-506

Minakuchi,R.; Takai,Y.; Nishizuka,Y. (1981) Widespread Occurence of Calcium- Activated Phospholipid- Dependent Protein Kinase in Mammalian Tissues. J Biochem. 89:1651-1654

Mitchell,C.A.; Jefferson,A.B.; Bejeck,B.E.; Brugge,J.S. Deuel,T.F.; Majerus,P.W. (1990) Thrombin- Stimulated Immunoprecipitation of Phosphatidylinositol 3- Kinase from Human Platelets. PNAS 87:9396-9400

Mochly- Rosen,D.; Henrich,C.J.; Cheever,L.; Khaner,H.; Simpson,P. (1990) A Protein Kinase C Isozyme Is Translocated to Cytoskeletal Elements on Activation. Cell Regulation 1:693-706

Montminy,M.R.; Sevarino,K.A.; Wagner,J.A.; Mandel,G.; Goodman,R.H.; (1986) Identification of a Cyclic- Amp- Responsive Element Within Rat Somastotatin Gene. PNAS 83:6682-6686

Morrison,D.K.; Kaplan,D.R.; Escobedo,J.A.; Rapp,U.R.; Roberts,T.M.; Williams,L.T. (1989) Direct Activation of the Serine Threonine Kinase Activity of Raf-1 Through Tyrosine Phosphorylation by the PDGF B-Receptor. Cell 58:649-657

Morton,H.J. (1970) A Survey Commercially Avaiable Tissue Culture Media. In Vitro 6:89-108

Munro,S.; Pelham,H.R.B. (1987) A C- Terminal Signal Prevents Secretion of Luminal ER Proteins. Cell 48:899-907

Nasmith,P.E.; Mills,G.B.; Grinstein,S. (1989) Guanine Nucleotides Induce Tyrosine Phosphorylation and Activation of the Respiratory Burst in Neutrophils. Biochem. J 257:893-897

Nishibe,S.; Wahl,M.I.; Hernandez- Sotomayor,S.M.T.; Tonks,N.K.; Rhee,S.G.; Carpenter,G. (1990) Increase of the

Catalytic Activity of Phospholipase C Gama 1 by Tyrosine Phosphorylation. Science 250:1253-1256

Nishizuka,Y. (1984) The Role of Protein Kinase C in Cell-Surface Signal Transduction and Tumor Promotion. Nature 308:693-697

Nishizuka,Y. (1986) Studies and Perspectives of Protein Kinase C. Science 233:305-312

Nishizuka,Y. (1988) The Molecular Heterogeneity of Protein Kinase C and Its Implications for Cellular Regulation. Nature 334:661-665

O Farrel,P.H. (1975) High Resolution Two- Dimensional Electrophoresis of Proteins. JBC 250:4007-4021

Oquendo,P.; Hundt,E.; Lawler,J.; Seed,B. (1989) CD36 Directly Mediates Cytoadherence of **Plasmodium falciparum** Parasitized Erythrocytes. Cell 58:95-101

Ozaki,L.S.; Mattei,D.; Jendoubi,M.; Druihle,P.; Blisnick,T.; Guillotte,M.; Puijalon,O.; Da Silva,L.P. (1986) Plaque Antibody Selection: Rapid Immunological Analysis of a Large Number of Recombinant Phage Clones Positive to Sera Raised against **Plasmodium falciparum** antigens.Journal of Immunological Methods 89:213-219

Parise,L.V.; Criss,A.B.; Nannizzi,L.; Wardell,M.R. (1990) Glycoprotein IIIa Is Phosphorylated in Intact Human Platelets. Blood 75:2363-2368

Patel,J.; Kligman,D. (1987) Purification and Characterization of an Mr 87,000 Protein Kinase C Substrate from Rat Brain. JBC 262:16686-16691

Pelham,H.R.B.; Hardwick,K.G.; Lewis,M.J. (1988) Sorting of Soluble ER Proteins in Yeast. EMBO J 7:1757-1762

Rapp,U.R.; Goldsborough,M.D.; Mark,G.E.; Bonner,T.I.; Groffen,J.; Reynolds,F.H.Jr.; Stephenson,J.R. (1983) Structure and Biological Activity of v-Raf, a Unique Oncogene Transduced by a Retrovirus. PNAS 580:4218-4222

Reuter,H. (1987) Modulation of Ion Channels by Phosphorylation and Second Messengers. NIPS 2:168-171

Rohrschneider,L.R. (1980) Adhesion Plaques of Rous Sarcoma Virus- Transformed Cells Contain the src Gene Product. PNAS 77:3514-3518

Rosen,A.; Keenan,K.F.; Thelen,M.; Nairn,A.C.; Aderem,A. (1990) Activation of Protein Kinase C Results in the Displacement of its Myristoylated, Alanine- Rich Substrate

from Punctate Structures in Macrophage Filopodia. J. Exp. Med. 172:1211-1215

Rozengurt,E.; Rodriguez- Pena,M.; Smith,K.A. (1983) Phorbol Esters, Phospholipase C, and Growth Factors Rapidly Stimulate the Phosphorylation of a Mr 80,000 Protein in Intact Quiescent 3T3 Cells. Pnas 80:7244-7248

Sano,K.; Takai,Y.; Yamanishi,J.; Nishizuka,Y. (1983) A role of Calcium- Activated Phospholipid Dependent Protein Kinase in Human Platelet Activation. JBC 258:2010-2013

Sakai,K.; Hirai,M.; Minoshima,S.; Kudoh,J.; Fukuyama,R. Shimizu,N. (1989) Isolation of cDNAS Encoding a Substrate for Protein Kinase C: Nucleotide Sequence and Chromosomal Mapping of the Gene for a Human 80K Protein. Genomics 5:309-315

Scott,J.D.; Stofko,R.E.; Mc Donald,J.R.; Comer,J.D.; Vitalis,E.A.; Mangili,J.A.; (1990) Type II Regulatory Subunit Dimerization Determines the Subcellular Localization of the cAMP- Dependent Protein Kinase. JBC 265:21561-21566

Sealock,R.; Paschal,B.; Beckerle,M.; Burridge,K. (1986) Talin Is a Post- Synaptic Component of the Rat Neuromuscular Function. Experimental Cell Research 163:143-150

Sen,R.; Baltimore,D. (1986a) Multiple Factors Interact With the Immunoglobulin Enhancer Sequences. Cell 46:705-716

Sen,R.; Baltimore,D. (1986b) Inducibility of k Immunoglobulin Enhancer- Binding Protein NF-kB by a Posttranslational Mechanism. Cell 47:921-928

Severinsson,L.; Ek,B.; Mellstroem,K.; Claesson- Welsh,L.; Heldin,C.H. (1990) Deletion of the Kinase Insert Sequence of the Platelet- Derived Growth Factor Beta Receptor Affects Receptor Kinase Activity and Signal Transduction. Molecular and Cellular Biology 10:801-809

Seykora,J.T.; Ravitech,J.V.; Aderem,A. (1991) Cloning and Molecular Characterization of the Murine Macrophage "68-kDa" Protein Kinase C substrate and its Regulation by Bacterial Lipopolyssacharide. PNAS 88:2505-2509

Shepel,L.A.; Gorski,J. (1988) Steroid Hormone Receptors and Oncogenes. BioFactors 1:71-83

Sigler,P.B. (1988) Acid Blobs and negatine noodles. Nature 333:210-212

Smith,M.R.; Liu,Y.; Kim,H.; Rhee,S.G.; Kung,H. (1990) Inhibition of Serum- and Ras Stimulated DNA Synthesis by Antibodies to Phospholipase C. Science 247:1047-1077

Stumpo,D.J.; Graff,J.M.; Albert,K.A.; Greengard,p.; Blackshear,P.J. (1989) Molecular Cloning, Characterization, and Expression of a cDNA Encoding the "80- to 87- kDa" Myristoylated Alanine- Rich C Kinase Substrate: A Major Cellular Substrate for Protein Kinase C. PNAS 86: 4012-4016

Sweet,R.W.; Yokoyama,S.; Kamata,T.; Feramisco,J.R.; Rosenberg,M.; Gross,M. (1984) The Product of Ras Is a GTPase and the T24 Oncogenic Mutant Is Deficient in this Activity. Nature 311:273-275

Takai,Y.; Kishimoto,A.; Inoue,M.; Nishizuka,Y. (1977) Studies on a Cyclic Nucleotide- Independent Protein Kinase and its Proenzyme im Mammalian Tissues. JBC 252:7603-7609

Takayama,S.; White,M.F.; Lauris,V.; Kahn,C.R. (1984) Phorbol Esters Modulate Insulin Receptor Phosphorylation and Insulin Action in Cultured Hepatoma Cells. PNAS 81:7797-7801

Taylor,S.S.; Buechler,J.A.; Yonemoto,W. (1990) cAMP-Dependent Protein Kinase: Framework for a Diverse Family of Regulatory Enzymes. Annu. Rev. Biochem. 59:971-1005

Thelen,M.; Rosen,A.; Nairn,A.C.; Aderem,A. (1991) Regulation by Phosphorylation of Reversible Association of a Myristoylated Protein Kinase C Substrate with the Plasma Membrane. Nature 351:320-322

Towbin,H.; Staekelin,T.; Gordon,J. (1979) Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose sheets: Procedure and some Applications. PNAS 76:4350-4354

Tsukuda,M.; Asaoka,Y.; Sekiguchi,K.; Kikkawa,U.; Nishizuka,Y. (1988) Properties of Kinase C Subspecies in Human Platelets. BBRC 155:1387-1395

Tuszynski,G.P.; Gasic,T.B.; Rothman,V.L.; Knudsen,K.A.; Gasic,G. (1987) Thrombospondin, a Potentiator of Tumor Cell Metastasis. Cancer Research 47:4130-4133

Tyers,M.; Rachubinski,R.A.; Stewart,M.I.; Varrichio,A.M.; Schorr,R.G.L.; Haslam,R.J. Harley,C.B. (1988) Molecular Cloning and Expression of the Major Protein Kinase C Substrate of Platelets. Nature 333:470-473

Ugen,K.E.; Mahalingam,M.; Klein,P.A.; Kao,K.J. (1988) Inhibition of Tumor Cell- Induced Platelets Aggregation and Experimental Tumor Metastasis by the Synthetic Gly- Arg- Gly- Asp- Ser Peptide. Journal of the National Cancer Institute 80:1461-1466

Verma,I.M.; Sassone- Corsi,P. (1987) Proto-oncogene fos: Complex but Versatile Regulation. Cell 51:513-514

Wallace,W.C.; Bensusan,H.B. (1980) Protein Phosphorylation in Platelets Stimulated by Immobilized Thrombin at 37°C and 4°C. JBC 255:1932-1937

Wang,J.K.T.; Walaas,S.I.; Shira,T.S.; Aderem,A.; Greengard,P. (1989) Phosphorylation and Associated Translocation of the 87- kDa Protein, a Major Protein Kinase C Substrate, in Isolated Nerve Terminals. PNAS 86:2253-2256

Warshaw,A.L.; Laster,L.; Shulman,N.R. (1967) Protein Synthesis by Human Blood Platelets. JBC 242:2094

Whitham,S.E.; Murphy,G.; Angel,P.; Rahmsdorf,H.J.; Smith,B.J.; Lyons,A.; Harris,T.J.R.; Reuynolds,J.J.; Herrlich,P.; Docherty,A.J.P. (1986) Comparison of Human Stromelysin and Collagenase by Cloning and Sequence Analysis. Biochem.J. 240:913-916

Wickner,W.T.; Lodish,H.F. (1985) Multiple Mechanisms of Protein Insertion Into and Across Membranes. Science 230:400-407

Woodget,J.R.; Hunter,T.; Gould,K.L. (1987) Protein Kinase C and its Role in Cell Growth. In Cell Membranes: Methods and Reviews. EL. Elson,W.A. Frazier e L.Glaser. Plenum Publishing Co. NY.

Wu,W.C.S.; Walaas,S.I.; Nairn,A.C.; Greengard,P. (1982) Calcium/Phospholipid Regulates Phosphorylation of a Mr "87K" Substrate Protein in Brain Synaptosomes. PNAS 79:5249-5253

Young,R.A.; Davis,R.W. (1983) Efficient Isolation of Genes by Using Antibody Probes. PNAS 80:1194-1198