

da Veiga, F. C.<sup>1</sup>; Sobreira, D. R.<sup>1</sup>; Alvares, L. E.<sup>1</sup>;

<sup>1</sup> Departamento de Histologia e Embriologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

Palavras-Chave: Dact1, isoforma, clonagem. E-mail: fernandaveiga6@gmail.com

## Introdução

Os genes da família Dact (Dact1, Dact2 e Dact3) codificam proteínas multifuncionais que desempenham importantes funções na embriogênese e na manutenção da homeostase pós-natal. Em particular, estas proteínas são importantes moduladoras das vias de sinalização Wnt e TGF-beta, sendo requeridas para regular os níveis de sinalização parácrina em diferentes contextos celulares, maximizando a eficiência de vários processos biológicos. Estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa identificaram duas isoformas do gene Dact1 expressas durante o desenvolvimento embrionário de diversos vertebrados. Estas duas variantes diferem pela inserção de um fragmento de aproximadamente 111 pb na isoforma maior ( $\alpha$ ) de Dact1 por *splicing* 3' alternativo do exon 4. Esta inserção ocorre sem que haja alteração no quadro de leitura do mRNA, o que reforça a hipótese de que esta isoforma é funcional. Considerando que as funções da variante maior ( $\alpha$ ) do gene Dact1 não são conhecidas, pois apenas a isoforma menor ( $\beta$ ) vem sendo estudada nos trabalhos publicados até o momento, este projeto tinha como objetivo clonar a isoforma maior ( $\alpha$ ) do gene Dact1 no vetor de expressão pCS2+ através da substituição do fragmento 5' do clone contendo o cDNA completo da isoforma menor ( $\beta$ ), visando possibilitar futuros estudos em cultura de células com o intuito de comparar as funções das isoformas maior ( $\alpha$ ) e menor ( $\beta$ ) de Dact1.

## Metodologia



Embriões de Camundongos C57BL/6

Coleta

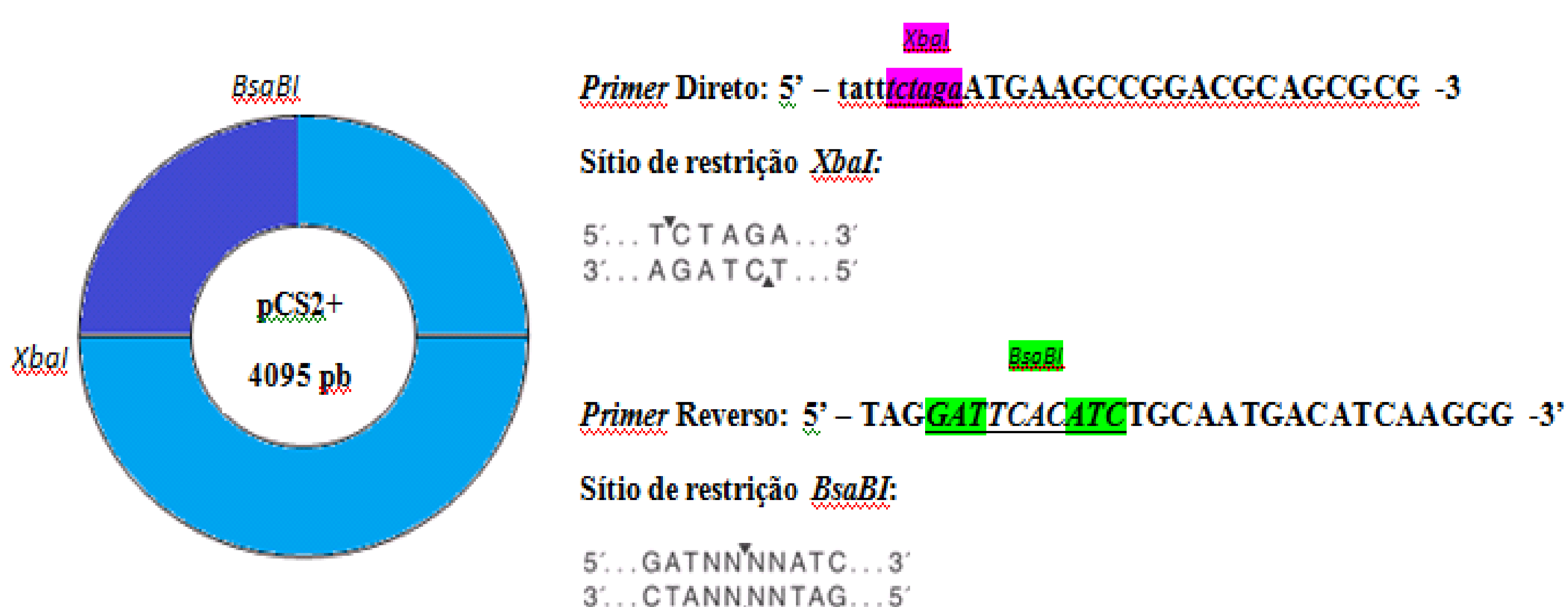
Extração de RNA total

Síntese de DNA complementar

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

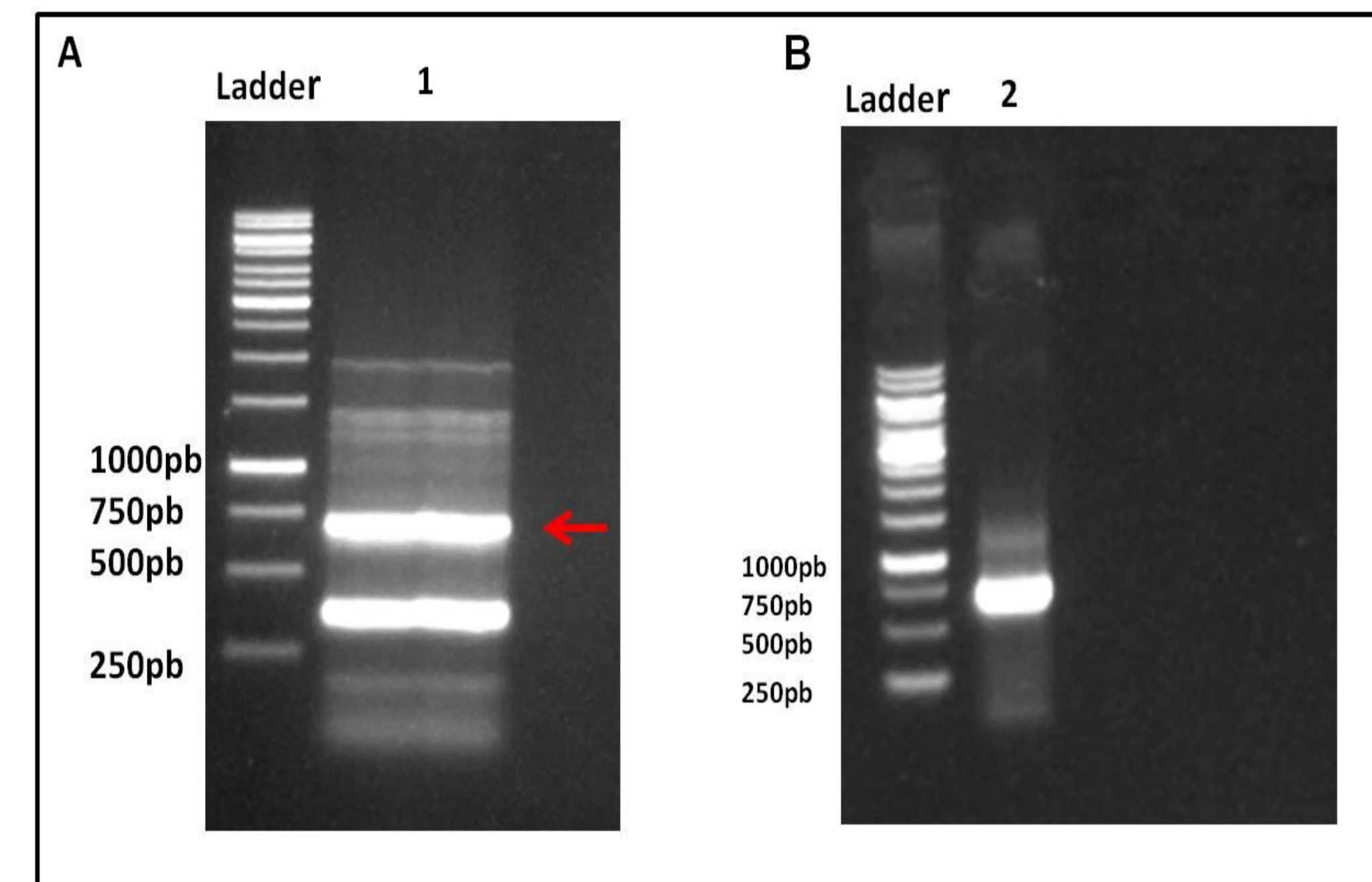
Digestão enzimática dos fragmentos

Ligação



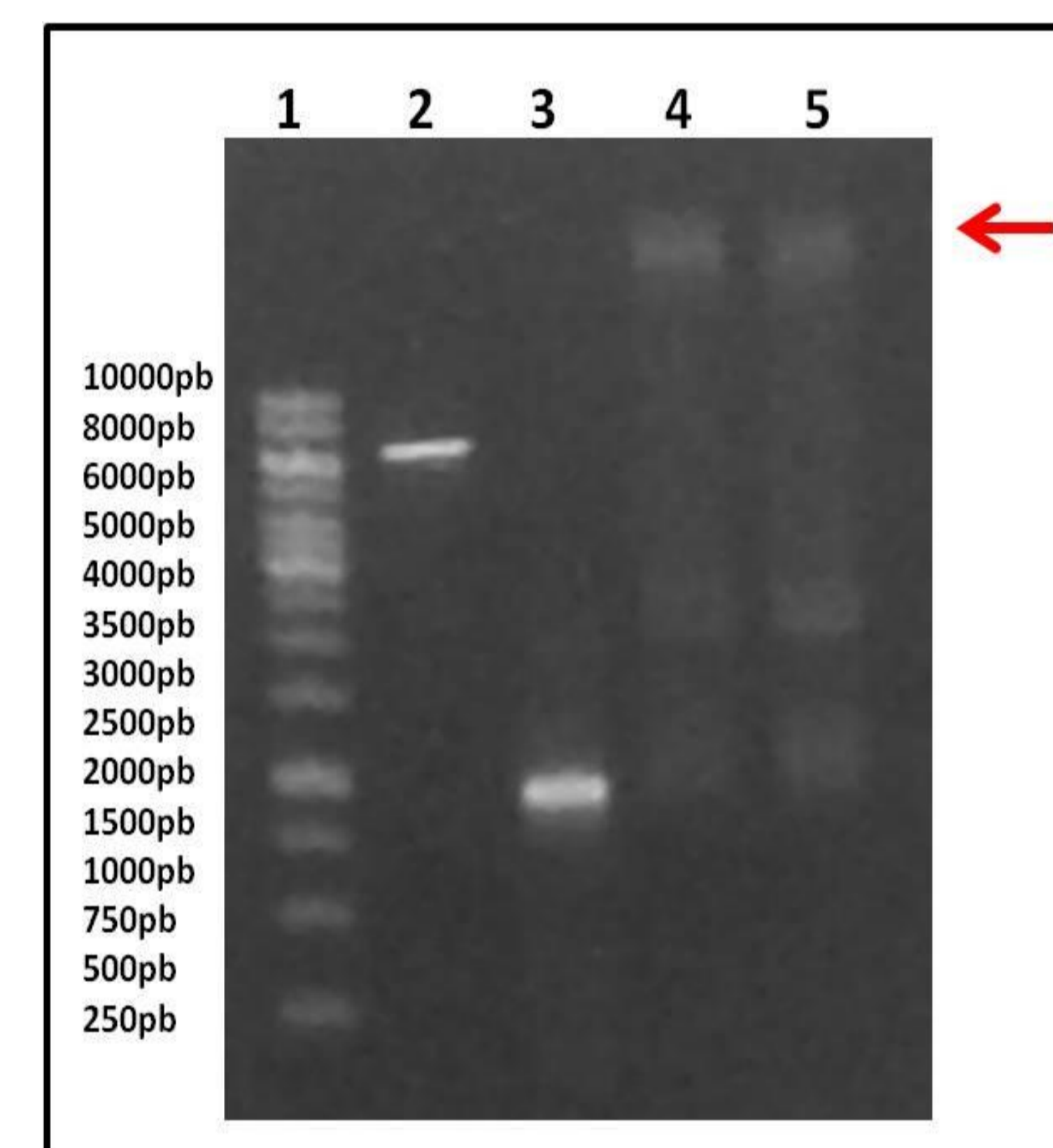
Transformação em bactérias competentes D5 $\alpha$

## Digestão: obtenção do fragmento 5' da isoforma $\alpha$



**Figura 1. Obtenção do fragmento 5' da isoforma maior (isoforma  $\alpha$ ) de camundongo.** Em A, indicado pela seta vermelha, o fragmento de correto tamanho molecular (aproximadamente 730 pb) a ser purificado do gel. Em B, fragmento 5' da isoforma maior (isoforma  $\alpha$ ) após a purificação do gel. Gel de agarose 1%.

## Ligação dos fragmentos ao vetor de expressão



**Figura 2. Reação de ligação para a obtenção do cDNA completo da isoforma maior (isoforma  $\alpha$ ) de camundongo.** Em 1, marcador de peso molecular *Gene Ruler* 1kb DNA Ladder. Em 2, vetor pCS2+ contendo o fragmento 3' do cDNA de Dact1 de camundongo digerido com as enzimas *XbaI* e *BsaBI*. Em 3, fragmento de PCR correspondente à região 5' da isoforma maior de camundongo digerido com as enzimas *XbaI* e *BsaBI*. Em 4 e 5, reação de ligação para a obtenção do cDNA completo da isoforma maior (isoforma  $\alpha$ ) de camundongo (proporção de vetor:inserto 1:3 e 1:5, respectivamente). A seta em vermelho indica que a ligação dos fragmentos ocorreu. Gel de agarose 1%.

## Conclusões

Foi possível demonstrar a eficácia da estratégia empregada para comprovação *in vivo* da existência dessas isoformas, bem como uma forma plausível de isolamento destas, apontando que novos esforços são cabíveis para o aperfeiçoamento das técnicas de transformação em células competentes a fim de obter-se o resultado final almejado.