

Rosana de Carvalho Cruz

**Genes Repórteres Alternativos para Sistemas de
Duplo-Híbrido em *Saccharomyces cerevisiae***



Belo Horizonte
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Genes Repórteres Alternativos para Sistemas de Duplo-Híbrido em *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mônica Bucciarelli
Rodriguez

**Belo Horizonte
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2006**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.
Apoio financeiro: CAPES

“O fim da ciência especulativa é a verdade. O fim da ciência prática é a ação.”

Aristóteles (384 AC-322 AC)

Dedico este trabalho a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para sua realização.

Agradecimentos

À minha orientadora, prof^a Mônica Bucciarelli Rodriguez, cuja orientação se estendeu além do mestrado com conselhos que vou carregar pela vida toda, pela oportunidade e paciência principalmente nessa reta final.

Aos professores Adlane, Andréa e Chartone pela convivência, carinho e preocupação.

Ao professor Miguel pelas sugestões sempre bem-vindas.

Aos meus colegas de mestrado e aos laboratórios do Departamento de Biologia Geral em especial ao Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (Prof. Evanguedes e Higgor), ao Laboratório de Genética Celular e Molecular (Anderson, Luís e Fernanda), ao Laboratório de Biologia Celular e Desenvolvimento (Prof. Miguel) cuja ajuda muito contribuiu para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do LGMM: Dudu, Gilka, Gleidson, Fred (que me ensinou muito), Dani, Michele, Kênia, Amanda, Dulce, Patrícia, Lília, Marcela, Flaviane, Geovane, Carla, Higgor (cuja ajuda foi fundamental na realização deste trabalho), Cláudia B., Claudia H. (nova amiga cujas saídas para o shopping e os conselhos me ajudaram muito), Wall, Rodrigo e Luciana. Vocês não sabem o quanto me ajudaram, o quanto me ensinaram com a convivência e o quanto tornaram os dias mais agradáveis. Desculpe se me esqueci de alguém, não é por menor importância e sim pela minha cabeça que a essa altura não está tão confiável.

À Paixão, Andréa Reis, Rosa e Rosana (Laboratório de Biologia Celular e Desenvolvimento) pela amizade e ajuda com os materiais de laboratório com a maior disposição sempre quando precisei.

À Ana Raquel, minha amiga e colega de laboratório, pela ajuda na realização deste trabalho, por sempre me ouvir e por participar das minhas agonias

sempre com paciência, carinho e uma palavra amiga que sempre me colocava para cima.

À Marina, secretária da pós, pela disposição em me ajudar sempre quando foi necessário.

À minha família, que mesmo distante e muitas vezes não entendendo meu trabalho, sempre me incentivaram e me apoiaram, especialmente a minha irmã Luciana, que soube dizer as palavras certas quando eu mais precisei.

À minha amiga Suzana, distante no convívio mas sempre presente no carinho e em meu coração.

Ao meu marido e grande amor Tel (morango) que me apoiou incondicionalmente em todas as etapas da minha vida não sendo diferente nesta, demonstrando sua paciência nos piores momentos, carinho e principalmente seu amor. Te amo!!!

À Deus, sempre presente na minha vida me fazendo ver sua infinita magnitude, me dando força, coragem e saúde para nunca desistir dos meus sonhos.

Sumário

Agradecimentos	5
Sumário	7
Lista de abreviaturas	10
Resumo	12
Abstract	13
1. Introdução	14
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo	15
1.2 O sistema de duplo-híbrido	15
1.3 Limitações do sistema de duplo-híbrido	17
1.4 O sistema de mono-híbrido	18
1.5 O sistema de triplo-híbrido	19
1.6 Estudo de interação de proteínas na membrana celular	21
1.7 O sistema de duplo-híbrido reverso	22
1.8 Genes repórteres	23
1.9 Genes repórteres alternativos	25
2 . Objetivos	28
3. Justificativa	30
4. Material e Métodos	32
4.1 Microrganismos	33
4.1.1 Bactéria.....	33
4.1.2 Leveduras	33
4.2 Estocagem e cultivo de microrganismos	33
4.2.1 Meios de cultura e estocagem de bactéria	33
4.2.2 Meios de cultura para levedura	34
4.2.2.1 Complemento para meio mínimo para levedura	35
4.3 Métodos	36
4.3.1 Contagem de células de levedura.....	36
4.3.2 Transformação de microrganismos	36
4.3.2.1 Bactérias	36
4.3.2.2 Leveduras	37

4.3.3	Teste de marcas	38
4.3.4	Extração de DNA	39
4.3.4.1	Midi preparação de plasmídio de bactéria por lise alcalina	39
4.3.4.2	Extração de DNA genômico de levedura	40
4.3.5	Reação em cadeia de polimerase (PCR)	41
4.3.5.1	PCR com DNA purificado	42
4.3.5.2	PCR de colônia	42
4.3.6	Eletroforese em gel de agarose	42
4.3.7	Purificação de DNA em gel de agarose utilizando lâ de vidro	43
4.3.8	Precipitação de DNA	43
4.3.9	Digestão de DNA com enzima de restrição	44
4.3.10	Ligação de fragmentos de DNA	44
4.3.11	Desfosforilação de vetor	44
4.3.12	Ensaio de metabolização de X-Gal	45
4.3.13	Revelação de atividade amilolítica com vapores de iodo	45
4.3.14	Teste de sobrevivência a L-canavanina	46
4.3.15	Teste de sobrevivência na ausência de adenina	46
4.3.16	Teste de sobrevivência em choque térmico	47
5.	Resultados	48
5.1	α -amylase: a new reporter gene for <i>Saccharomyces cerevisiae</i> two-hybrid system	49
5.2	Alternative reporter gene for yeast reverse two-hybrid system....	56
5.3	Effect of stress on <i>Saccharomyces cerevisiae</i> resistance to L-canavanine after activation of <i>CAN1⁺</i> reporter gene	65
5.4	Aumento da sensibilidade a L-canavanina por disrupção de <i>ScRHEB</i>	73
5.4.1	Construção do cassete de disrupção	73
5.4.2	Transformação de YJ0Zcan ^R com o cassete de disrupção e seleção dos transformantes	74

6. Discussão	78
6.1 O gene da α -amilase	79
6.2 O gene <i>CAN1⁺</i>	81
6.3 Estudo do efeito de estresse na sobrevivência após ativação do gene <i>CAN1⁺</i>	82
6.4 Construção do cassete de interrupção para o gene <i>ScRHEB</i>	84
7. Conclusão	86
8. Referências bibliográficas	88

Lista de abreviaturas

3-AT: 3 -amino-1,2,4-triazol

5FOA: 5-fluoro-orotic-acid

AD: activation domain

AD-Y: activation domain em fusão com proteína y de interesse (presa)

β -gal: enzima beta galactosidase

BD: binding domain

BD-X: binding domain em fusão com proteína x de interesse (isca)

CAN1: gene que codifica arginina permease

Can1p: enzima da arginina permease

cDNA - DNA complementar

C-Ub: porção carbox terminal da proteína ubiquitina

CYH2: gene que codifica proteína ribossômica L29

DNA: ácido desoxirribonucléico

EGFP: enhancer green fluorescent protein

g: grama

Gal4p: proteína

Gal4_{UAS} : Upstream activating sequence de Gal4

GFP: green fluorescent protein

HIS3: gene que codifica imidazolglicerol-fosfato desidratase

His3p: imidazolglicerol-fosfato desidratase

Kan^r: gene de resistência a geneticina

Lac-Z: gene que codifica a enzima β -galactosidase

L-can: L-canavanina

LT : large-T

μ g: micrograma

μ l: microlitro

ml: mililitro

MEL1: gene que codifica α -galactosidase em levedura

MF α : peptídeo sinal de fator α

mRNA: RNA mensageiro

ng:nanograma

N-Ub - porção amino terminal da proteína ubiquitina

ONPG: ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside

ORF: open reading frame

P53: gene supressor de tumor

pb: par (es) de base (s)

PCR: reação em cadeia da polimerase

PNP- α -Ga I: p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside

RNA: ácido ribonucléico

URA3: gene que codifica oroditina-5'

UV: ultravioleta

X-gal: 5-bromo-4cloro-3indolil- β -D-galactosídeo

Resumo

A chave para a compreensão de muitos processos biológicos inerentes a qualquer organismo reside no estudo da interação física entre proteínas. O sistema de duplo-híbrido de levedura permite o estudo dessas interações *in vivo*, o que fornece a vantagem do estudo das proteínas em sua conformação original. O sistema de duplo-híbrido reverso permite o estudo de mutantes que perderam a capacidade de interação, igualmente importante para a compreensão das interações protéicas. O uso de duplo-híbrido não seria possível sem a utilização de genes repórteres. Neste trabalho, foram analisados dois genes para serem usados como repórter em sistema de duplo-híbrido direto e reverso. O primeiro gene foi o da α -amilase pancreática de camundongo, que confere atividade amilolítica à levedura. É possível a detecção da atividade desse gene através da visualização de um halo de degradação de amido quando as leveduras são cultivadas em placas contendo esse substrato e expostas a vapores de iodo após o crescimento. O gene da α -amilase se mostrou suficientemente eficiente para uso em duplo-híbrido direto quando a interação entre as proteínas não é fraca. Outro gene estudado foi o gene *CAN1* de *Saccharomyces cerevisiae*. O produto deste gene é responsável pelo importe de arginina e também importa o análogo tóxico L-canavanina. O gene *CAN1* foi previamente analisado como repórter para duplo-híbrido reverso em nosso laboratório e uma significativa frequência de colônias resistentes foi detectada. A ocorrência desses resistentes foi examinada também sob privação de adenina e após choque térmico. Além disso, tentou-se a disrupção do gene *ScRHEB*, o que levaria a um aumento de sensibilidade à L-canavanina. A privação de adenina aumentou a frequência de sobrevivência em mais de 10% e pode ser usada quando uma elevada frequência de sobrevivência for interessante. O choque térmico de 37°C por 24 horas não produziu efeito considerável na sobrevivência em presença de L-canavanina mas reduziu consideravelmente a viabilidade celular. Embora a construção do cassete de disrupção para o gene *ScRHEB* tenha sido bem sucedida, não conseguimos selecionar transformante contendo o gene *ScRHEB* interrompido pelo cassete de disrupção.

Abstract

The study of protein-protein interactions is crucial for understanding many biological processes in all organisms. The two-hybrid system allows the study of these interactions *in vivo* and has the advantage of studying proteins in their original conformation. The reverse two-hybrid system allows the study of mutants which have lost protein-protein interactions, equally important for understanding biological processes. However, the use of the two-hybrid system depends on reporter genes. In this work, we have examined two genes to be used in conventional and reverse two-hybrid system. The first gene was the mouse pancreatic α -amylase gene which confers amylolytic activity to yeast. The activity of this gene can be detected by visualization of degradation haloes when yeast is cultivated in starch containing plates and exposed to iodine vapors after growth. The α -amylase gene showed to be sufficiently efficient for use in conventional two-hybrid system when the protein interaction is not weak. Another gene studied was the yeast *CAN1* gene. This gene is responsible for import of arginine and its toxic analog L-canavanine. The *CAN1* gene was previously tested for use in reverse two-hybrid system in our lab and a high frequency of L-canavanine resistant colonies was observed. The occurrence of these resistant clones was examined also under adenine starvation and after heat-shock. In addition, the disruption of the *ScRHEB* gene was attempted, because this would increase L-canavanine sensitivity. Adenine starvation increased the frequency of the resistant clones approximately 10-fold and can, thus, be used when a higher frequency of mutagenesis is desired. The heat shock at 37°C for 24 hours had no considerable effect on L-canavanine survival frequency but decreased cell viability. Although the construction of the disruption cassette was successful, we were not able to select transformant clones with the *ScRHEB* gene disrupted.

1. Introdução

1.1 *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo conhecido e utilizado pelo homem há muitos anos em diversas áreas, principalmente na indústria alimentícia. Nos últimos anos, essa levedura vem sendo bastante utilizada em pesquisas genéticas por se tratar de um organismo não patogênico e de fácil manipulação em laboratório, de rápido crescimento e por permitir que seqüências exógenas de DNA se integrem no seu genoma por meio de recombinação homóloga (Barr, 2003). Essa levedura apresenta estágios haplóide e diplóide bastante estáveis, o que facilita o isolamento de mutações recessivas em linhagens haplóides e estudos de complementação podem ser efetuados em linhagens diplóides (Sherman, 2001). O genoma inteiramente seqüenciado de *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996) permite uma comparação de seqüências de genes da mesma com as de organismos eucariotos superiores em busca de homólogos funcionais (função conservada), que permitam sua utilização em estudos de análise funcional. Como exemplo, comparando o genoma humano com o de *Saccharomyces cerevisiae*, verificou-se que aproximadamente 30% dos genes conhecidos como causadores de doenças humanas, apresentam homólogos funcionais com genes dessa levedura. Isso, associado com as várias técnicas disponíveis para estudos com essa levedura, faz dela um excelente modelo para várias linhas de pesquisa, inclusive pesquisa médica (Mager ; Winderickx, 2005).

1.2 O sistema de duplo-híbrido

Na fase pós genômica em que hoje se encontram muitas pesquisas, se torna cada vez mais indispensável a compreensão dos muitos processos biológicos inerentes a qualquer organismo, alguns como: regulação da transcrição, respostas às condições ambientais, transdução de sinal, (Causier; Davies, 2002). A chave para a compreensão de muitos desses processos biológicos reside no estudo da interação física entre proteínas.

O sistema de duplo-híbrido de levedura permite a detecção de interações entre proteínas *in vivo* e foi descrito primeiramente por Stanley

Fields ; Song (1989), fornecendo a vantagem do estudo das interações dessas proteínas em sua conformação original. Este sistema se baseia no conceito de que os fatores de transcrição, Gal4p por exemplo, podem ser fisicamente separados em dois domínios: um domínio chamado de ligação ao DNA (BD- “binding domain”) e um domínio de ativação de transcrição (AD- “activation domain”) (Keegan *et al.*, 1986). Estes domínios podem ser clonados separadamente em fusão com as proteínas de interesse, ou seja, aquelas cuja interação se deseja detectar. A construção ocorre de modo a formar dois híbridos: híbrido 1 (BD fusionada a uma das proteínas de interesse, “X”) também chamado de “isca” (BD-X) e híbrido 2 (AD fusionado a outra proteína de interesse – “Y”) também chamada de “presa” (AD-Y). A interação entre estas proteínas restaura o fator de transcrição, permitindo a transcrição de um gene reporter, que levará à visualização da interação.

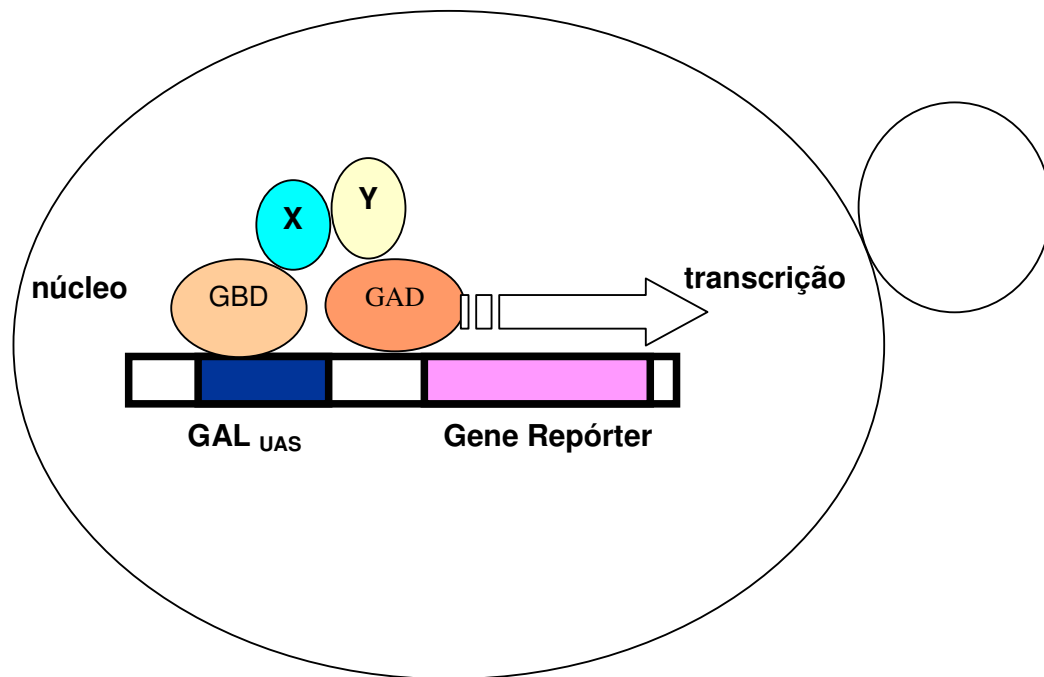


Figura1: Representação esquemática do sistema de duplo-híbrido. X e Y: proteínas híbridas; GBD: domínio de ligação de GAL; GAD: domínio de ativação da transcrição de GAL4; GAL_{UAS}: seqüência de ativação de GAL.

Como exemplo, este sistema já permitiu identificar mutações no gene p53, um supressor de tumor envolvido na regulação da proliferação celular, que afetam sua interação com o antígeno large T (Li; Fields, 1993). O sistema pode ser usado também em estudos de interação em larga escala de proteínas que interagem, por exemplo, com proteasoma 26S onde 55 interações foram isoladas do equivalente a 190.000 experimentos de duplo-híbrido (Cagney *et al.*, 2001). O estudo de interações em larga escala pode ser realizado com o objetivo de descobrir proteínas que interagem com uma proteína específica, como o exemplo citado anteriormente, ou como estudo de interações entre as proteínas totais do genoma de levedura, onde foram vistas 841 interações envolvendo 797 proteínas (Ito *et al.*, 2001). Como muitos domínios de interação das proteínas parecem ser conservados entre os organismos ao longo da evolução, análises computacionais juntamente com triagem genômica em larga escala permitem realizar predições de interação de proteínas entre organismos diferentes como *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* (Liu *et al.*, 2005). Ou ainda, estudar interações entre proteínas virais em levedura e inferir interações com o genoma humano (Uetz *et al.*, 2006). Ainda na premissa de que muitos genes que controlam processos e interações essenciais encontram-se conservados, o uso de duplo-híbrido juntamente com mutações de deleção em larga escala também permite o estudo de interações entre proteínas que são essenciais ao bom funcionamento celular em *Saccharomyces cerevisiae* (Tong *et al.*, 2004).

1.3 Limitações do sistema de duplo-híbrido

Apesar do sistema de duplo-híbrido ser amplamente utilizado, vários tipos de falso-positivos têm sido descritos. Duas categorias principais de falso positivo podem ser definidas: o chamado falso-positivo biológico, onde a interação entre as proteínas ocorre na levedura mas não ocorre *in vivo* no organismo em estudo; e o falso-positivo técnico, onde ocorre a ativação do gene repórter sem que ocorra a interação dos híbridos (Vidalain *et al.*, 2004). Ocorre também uma categoria chamada de falso-negativo, onde as interações entre as proteínas não conseguem ser reproduzidas porque parecem ser sensíveis a variações na construção do sistema de duplo-híbrido (Ito *et al.*,

2002). Algumas precauções se tornam necessárias para minimizar o aparecimento de falso-positivos, dentre os quais podemos destacar o uso de mais de um gene repórter. Quando se usa duplo-híbrido em larga escala, outras situações devem ser levadas em consideração, pois, muitas vezes, a própria estratégia usada para a triagem pode levar ao aparecimento de falso-positivos ou falso-negativos. Por exemplo: muitas estratégias usadas em pesquisas de interações em larga-escala envolvem amplificação da ORF desejada por PCR, o que pode gerar mutações que afetam a interação. Diferentes mecanismos de seleção de interação podem afetar a análise das interações, além dos plasmídios utilizados para as construções que podem afetar o “folding” da proteína afetando a interação (Ito *et al.*, 2001). Logo quando ocorre uma interação, é necessário confirmá-la seja, por exemplo, com a ativação de mais de um gene repórter ou com ensaios de interação *in vitro* como imunoprecipitação e purificação bioquímica permitindo a identificação das proteínas associadas na interação através de espectrometria de massa (Fields, 2005).

1.4 O sistema de mono-híbrido

A regulação dos diferentes processos biológicos não se limita a interações entre proteínas. Por isso, os sistemas de duplo-híbrido sofreram modificações visando uma melhor compreensão dos diversos tipos de regulação presentes em sistemas biológicos.

O sistema de mono-híbrido permite estudar proteínas que se ligam a uma seqüência específica do DNA. Neste sistema, o híbrido BD-X é substituído por uma seqüência de DNA contendo uma seqüência alvo para a proteína regulatória em estudo e esta, sozinha, não é capaz de ativar a transcrição do gene repórter. O híbrido AD é fusionado com a proteína que está sob investigação e, se a mesma interage com a seqüência de DNA previamente clonada, ocorre a ativação do gene repórter permitindo a detecção da interação.

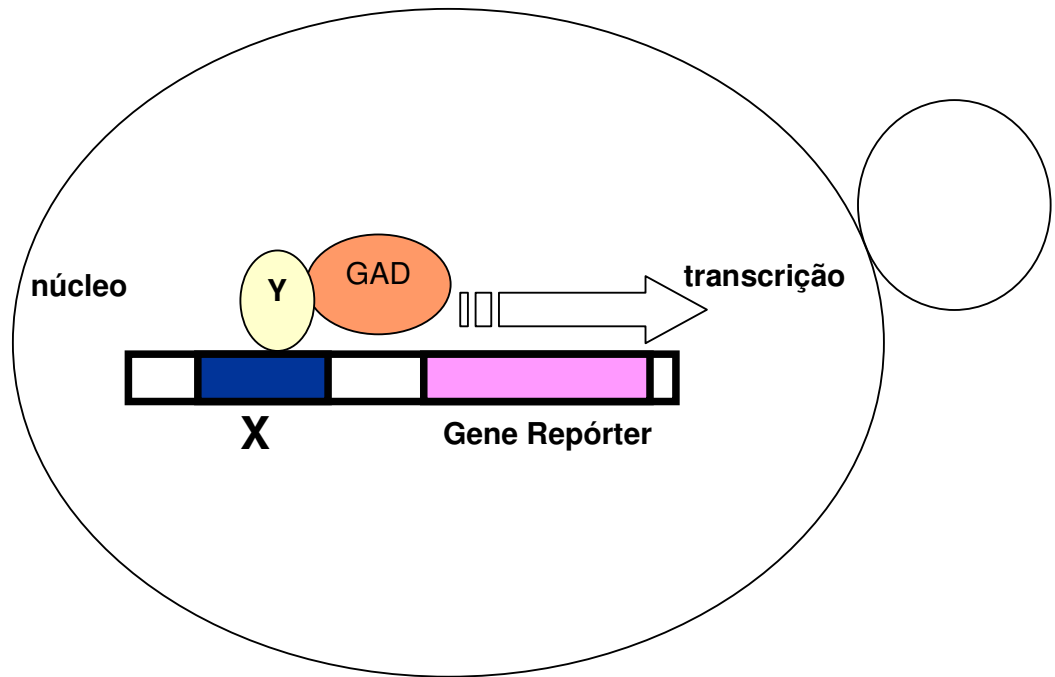


Figura 2: Representação esquemática do modelo de mono-híbrido. X: seqüência alvo para a proteína regulatória em estudo; Y: proteína em estudo; GAD: domínio de ativação da transcrição de GAL4.

O modelo de sistema de mono-híbrido foi considerado adequado para estudos do efeito epigenético da metilação do DNA mediado por interação com fatores trans-ativadores (Feng, 2004) e identificação de fatores de transcrição que se ligam ao DNA em sistema de mono-híbrido em bactéria (Meng *et al.*, 2005).

1.5 O sistema de triplo-híbrido

O sistema de triplo-híbrido é utilizado para detectar interações entre proteína e RNA, importantes para a compreensão de muitos processos biológicos, tais como, processamento de RNA, tradução e estabilidade de mRNA (Putz *et al.*, 1996). Este sistema é composto por BD em fusão com uma proteína de ligação ao RNA (BD- "X") e AD em fusão com uma outra proteína de ligação ao RNA (AD- "Y"). O sistema é completado por um terceiro híbrido, uma molécula de RNA que contém um sítio de ligação para a proteína

“X” e um sítio “Z” para ligação da proteína “Y” ao RNA de interesse. A interação de “Z” ao sítio “Y” restaura o fator de transcrição ativando, assim, a transcrição do gene repórter.

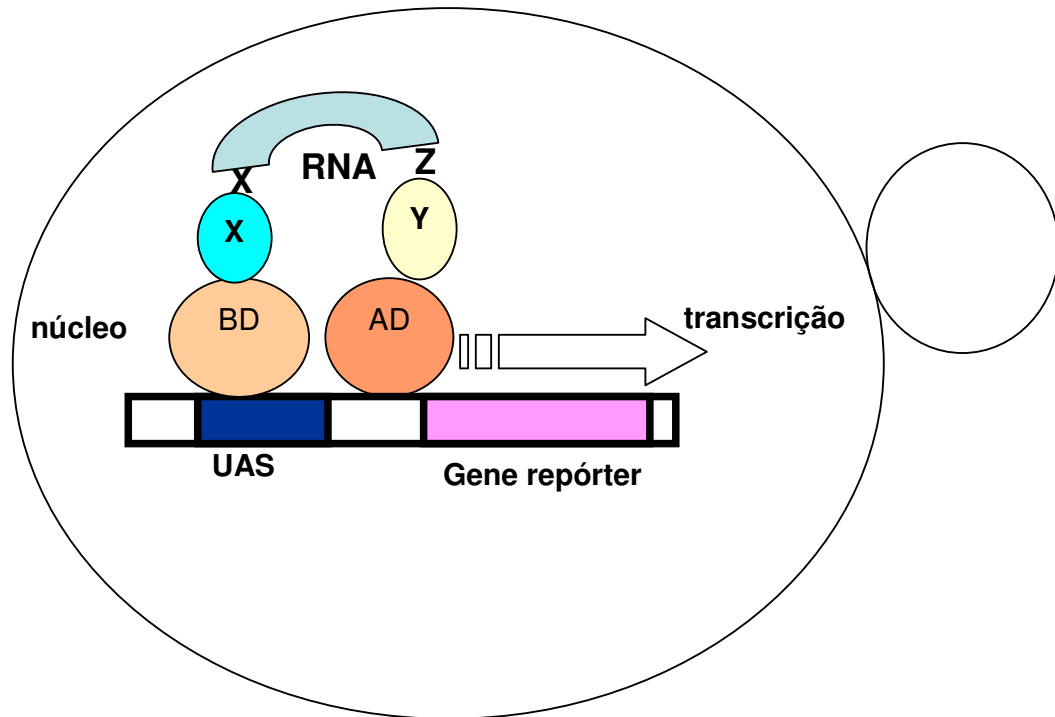


Figura 3: Representação esquemática do modelo de triplo-híbrido. UAS: seqüência de ativação da transcrição; BD: domínio de ligação ao DNA; X: proteína de ligação ao RNA; AD: domínio de ativação; Y: proteína de ligação ao RNA; Z: sítio de ligação ao RNA de interesse.

Esse sistema tem sido usado para dissecar interações RNA-proteína, testar interações previamente conhecidas, definir, por deleção, o domínio mínimo de ligação (Jaeger *et al.*, 2004), descobrir proteínas-alvo para drogas através de estudos de interação entre ligante e receptor (Felipe *et al.*, 2004), triagem de bibliotecas de cDNA-AD para detecção de proteínas que interagem com seis amostras específicas de RNA de *C. elegans* (Hook *et al.*, 2005) e estudo de interação entre organismos diferentes através da interação de RNAs de levedura com a proteína hek2p de levedura e hnRNP K de

mamíferos, mostrando que essas proteínas podem ser homólogos funcionais envolvidos na regulação da transcrição (Paziewska *et al.*, 2005).

1.6 Estudo de interação de proteínas na membrana celular

No sistema de duplo-híbrido convencional, a interação entre as proteínas ocorre no núcleo da célula, não sendo usado com sucesso em estudos de interação de proteínas localizadas na membrana celular. Um sistema desenvolvido para estudos de interações ocorridas na membrana, conhecido como sistema CytoTrap (www.stratagene.com), explora vias de sinalização da proteína Ras e uma linhagem de levedura mutante denominada *cdc25*, sensível à temperatura. A interação dos híbridos ocorre na membrana da célula. Em decorrência dessa interação, uma cascata de sinais é ativada permitindo o crescimento da linhagem de levedura *cdc25* em condições de temperatura restritiva. Outro sistema também utilizado para estudos de interações que ocorrem na membrana, é o sistema baseado em clivagem de ubiquitina. Neste sistema, genes que codificam as proteínas (X e Y), cuja interação se deseja estudar, são clonados em fusão com N-terminal e C-terminal da proteína ubiquitina respectivamente. Essas fusões são clonadas separadamente em plasmídeos. O plasmídeo que contém o C-terminal da proteína ubiquitina codifica o fator de transcrição Lexa-VP16. A interação entre X e Y restaura a ubiquitina, que é então clivada por uma protease celular, liberando o fator de transcrição que ativa a transcrição de um gene repórter. Esse sistema foi usado para estudo em larga escala de interação de proteínas de membrana em *Saccharomyces cerevisiae* (Fields, 2005).

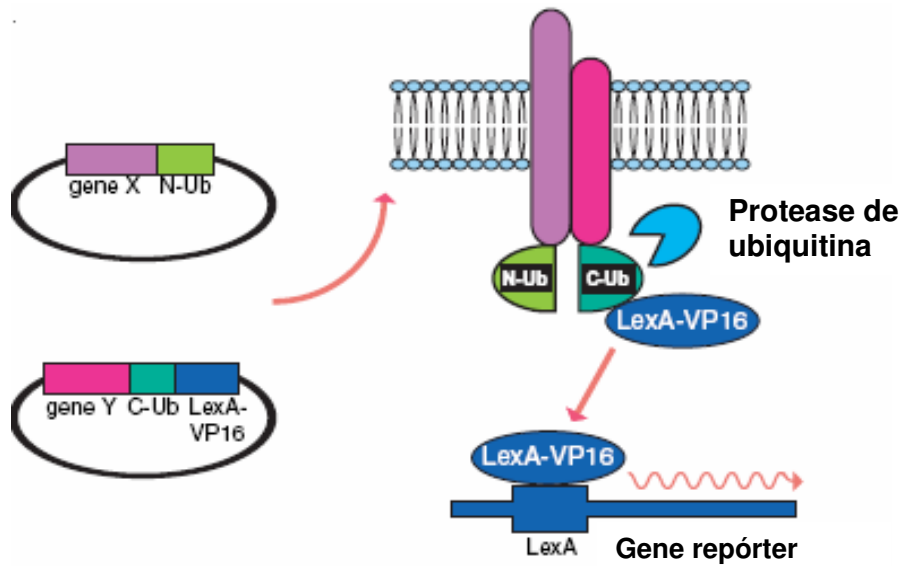


Figura 4: Representação esquemática de um modelo para estudo de interação entre proteínas de membrana. LexA-VP16: fator de transcrição; C-Ub: porção C-terminal da proteína ubiquitina; N-Ub: porção N-terminal da proteína ubiquitina; LexA: sítio de ligação ao DNA do fator de transcrição LexA-VP16. (Fonte; Fields, 2005).

1.7 O sistema de duplo-híbrido reverso

O estudo de mutações que resultam na perda da capacidade de interação entre proteínas é igualmente necessário e importante para a compreensão dessas interações. Neste contexto, o sistema de duplo-híbrido reverso favorece esse tipo de estudo, pois, a seleção nesse sistema é dirigida contra a interação dos híbridos. Isso acontece porque a ativação do gene repórter usado nesse sistema resulta na transcrição de um produto que geralmente é tóxico para a levedura, resultando em células não viáveis em condições restritivas (Vidal, 1997). Somente serão detectadas células de leveduras viáveis se não houver interação entre os híbridos. Logo, a não interação dos híbridos confere, ao organismo, vantagem seletiva. Como modelo de seleção genética, este sistema permite a seleção de eventos raros, pois, dentre muitas, poucas colônias podem ser detectadas. Este sistema também pode ser usado para identificar eventos que afetam uma função em particular, usando o método seletivo apropriado, como, por exemplo, realizar uma triagem de drogas, cuja interação é beneficiada por seleção negativa

(Vidal ; Endoh, 1999). Pode-se, também, fazer análises comparativas entre mutantes que perderam sua capacidade de interação selecionada por este sistema, com sua contraparte selvagem selecionada no sistema de duplo-híbrido direto (Vidal ; Legrain, 1999).

1.8 Genes repórteres

O estudo de interações entre proteínas através do sistema de duplo-híbrido não seria possível sem a utilização de um gene repórter.

No primeiro sistema de duplo-híbrido descrito (Fields; Song, 1989), o gene *Lac-Z*, que codifica a enzima β -galactosidase, foi usado como repórter e, até hoje, continua sendo bastante utilizado para detectar interações entre proteínas. A atividade desse gene como repórter pode ser visualizada pela degradação de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactosídeo). Neste ensaio, interações entre proteínas são selecionadas em colônias que adquirem coloração azul, decorrente da quebra do X-gal pela enzima β -galactosidase. Esta coloração pode variar do claro ao escuro, dependendo da intensidade da interação (Breedon; Nasmith, 1985). A atividade do gene repórter *Lac-Z* também pode ser quantificada medindo os níveis de produção da enzima β -galactosidase através de ensaio de ONPG, um substrato, que quando quebrado por essa enzima, promove a alteração da coloração da reação para amarelo. O gene *MEL1* de levedura codifica uma α -galactosidase, que é secretada para o espaço periplasmático naturalmente pela levedura. Este gene também é regulado por Gal4p e foi testado para uso como gene repórter em 1997 (Aho *et al.*, 1997). A atividade desse gene como repórter pode ser medida usando PNP- α -Gal como substrato com um protocolo parecido ao usado no ensaio de ONPG. Hoje, é utilizado como repórter no estudo de interação entre antagonistas (Chen *et al.*, 2004), ou para complementar o estudo de interação entre proteínas com a ativação de mais de um gene repórter para ajudar da eliminação de falso-positivos (Ito *et al.*, 2001).

Atualmente, uma variedade de genes repórteres está sendo usada em sistemas de duplo-híbrido (Causier; Davies, 2002), visando melhorar a confiabilidade desse sistema, sendo alguns deles descritos abaixo.

O gene *HIS3* é bastante utilizado como repórter em sistema de duplo híbrido, e codifica a enzima His3p (imidazolglicerol-fosfato desidratase). A expressão desse gene confere capacidade de crescimento em meio não contendo histidina, a linhagens de levedura auxotróficas para histidina. Essa enzima possui um inibidor competitivo denominado 3-AT (3-amino-1,2,4-triazol). Células de leveduras contendo maior quantidade de His3p são capazes de sobreviver quando altas concentrações de 3-AT são adicionadas no meio de cultura. Logo, a intensidade da interação dos híbridos reflete-se na expressão dos níveis de His3p e, conseqüentemente, na sobrevivência das leveduras em elevadas concentrações de 3-AT.

Outro gene bastante utilizado é o gene *URA3*, e possui a vantagem de permitir tanto a seleção positiva quanto a negativa. Para a seleção positiva, o gene codifica uma enzima chamada orotidina-5' fosfato descarboxilase, necessária para a via de biossíntese de uracila, permitindo o crescimento de linhagens auxotróficas em meio sem uracila (Sherman, 2001). Além disso, este gene é bastante usado em sistemas de duplo-híbrido reverso para seleção negativa, submetendo a levedura ao crescimento em meio contendo 5FOA (5-fluoro-orotic-acid). O produto do gene *URA3* realiza a conversão do composto 5FOA em um composto tóxico chamado 5-fluorouracil. Se a interação dos híbridos ocorrer, a transcrição do gene repórter *URA3* resultará na morte da célula na presença de 5FOA (Causier; David, 2002). Ainda no sistema de duplo-híbrido reverso, pode ser usado o gene *CYH2* como repórter, onde a interação dos híbridos confere, à levedura, um fenótipo de sensibilidade à cicloheximida (Leanna; Hannink, 1996).

Para todos os genes mencionados acima usados como repórteres, são necessários ensaios utilizando reagentes para confirmar a interação entre as proteínas. Os reagentes são dispensáveis quando se usa o gene que codifica a proteína verde fluorescente (GFP), extraído de *Aequorea victoria*. Essa proteína é intrinsecamente fluorescente, emitindo luz verde no comprimento de onda $\lambda_{\max} = 510\text{nm}$ com uma amplitude até 540nm quando excitada com luz UV. Modificações *in vitro* foram realizadas nessa proteína

transformando-a em EGFP (fluorescência 35 vezes mais intensa), para melhorar seu uso como repórter (Koloteva, 1998), além de permitir a localização subcelular de proteínas quando estas são construídas em fusão com GFP (Chattopadhyay; Pearce, 2002). Adequações têm sido feitas para seu uso em sistema de mono-híbrido (Barz; Pyerin, 2002), duplo-híbrido reverso (Endoh *et al.*, 2000) e para uso em duplo-híbrido direto (Starling *et al.*, 2003).

1.9 Genes repórteres alternativos

O gene *CAN1* presente na levedura *Saccharomyces cerevisiae* codifica uma aminoácido-permease (Can1p), responsável pelo importe de arginina. Também transporta, com pouca afinidade, lisina, histidina e ornitina, sendo, então, mais específico para arginina. No entanto, esta permease também transporta o análogo tóxico da arginina, L-canavanina (L-can). Este gene foi um dos primeiros genes isolados por complementação e sua caracterização molecular já se encontra estudada desde 1985 (Hoffmann, 1985). O gene *CAN1* é bastante utilizado em estudos de mutagênese provocada por sistema de reparo onde é analisada a frequência de mutação neste *locus*, principalmente em estudos de mutações no DNA da mitocôndria que afetam a taxa de mutação no genoma nuclear (Dzierzbiki *et al.*, 2004). O gene *CAN1* foi testado para uso como repórter no sistema de duplo-híbrido reverso em nosso laboratório (Starling, 2000) e uma significativa frequência de resistentes foi detectada. Essa mutagênese, de can^r para can^s , foi observada em clones expressando os híbridos, cuja interação é conhecida, e perderam a sua capacidade de interagir ou onde a interação desses híbridos ainda ocorria, mesmo que de maneira fraca. A frequência do aparecimento de mutações neste sistema deve ser a mais baixa possível para que não mascare mutações dirigidas e não altere demasiadamente a confiabilidade no sistema.

Foi demonstrado que algumas proteínas influenciam na função de Can1p e poderiam ser utilizadas em conjunto com o gene *CAN1* para aumentar a sensibilidade da levedura à L-canavanina.

A proteína Rheb, descrita em mamíferos, é um membro da superfamília da proteína Ras e desempenha um importante papel no

metabolismo. Ela regula o crescimento e o ciclo celular e está envolvida com uma série de desordens associadas com retardo mental em seres humanos, sendo a regulação do importe de arginina e lisina, a primeira função fisiológica dessa proteína (revisado em Aspúria; Tamanoi, 2004). Foi encontrado um homólogo da proteína Rheb humana em *Saccharomyces cerevisiae*, denominado ScRheb (Urano *et al.*, 2000). Estudos onde deleções neste gene foram efetuadas, sugerem uma regulação no importe, com grande especificidade, de arginina e conseqüentemente do seu análogo de L-canavanina. Linhagens contendo deleção em *ScRHEB* mostraram uma hipersensibilidade à L-canavanina devido à perda da regulação apropriada do importe de arginina através de Can1p (Urano *et al.*, 2000). Outra proteína que interfere no importe de arginina é Btn2p. Essa proteína interage com a proteína Rsg1p (interação demonstrada por duplo-híbrido em Chattopadhyay; Pearce, 2002) e Rsg1p é um regulador negativo do importe de arginina por Can1p. Linhagens carregando deleções no gene que codifica Rsg1p ou tanto em Btn2p e Rsg1p, exibiram uma elevada taxa no importe de arginina e conseqüentemente, do seu análogo L-canavanina.

Um outro gene analisado anteriormente em nosso laboratório para ser usado como repórter foi o gene da glicoamilase de *Aspergillus awamori*. A expressão desse gene produz um halo de degradação em placas contendo amido quando as mesmas são expostas a vapores de iodo, sendo um método de rápida visualização e de baixo custo. No entanto, este gene não se mostrou apropriado para uso no sistema de duplo híbrido, pois sua atividade não foi suficiente para produzir fenótipo detectável quando este foi construído sob controle de um promotor indutível (Starling *et al.*, 2003). No entanto, este gene pode ser considerado um bom repórter para triagem de promotores fortes (Scorpioni *et al.*, 1993).

A α -amilase pancreática de camundongo, também confere atividade amilolítica as leveduras, possuindo a vantagem de efetuar múltiplos ataques em diferentes pontos da molécula, como maltose e maltotriose, que são facilmente incorporados pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O gene da α -amilase pancreática se encontra clonado para expressão em levedura desde 1986, em fusão com a seqüência codificadora do peptídeo sinal de fator α

(MF α) promovendo sua secreção (Astolfi Filho *et al.*, 1986). Essa fusão permite que a α -amilase seja secretada para o meio extracelular, o que facilita a análise da interação quando esta for usada como gene repórter em sistema de duplo-híbrido.

Hoje, os sistemas de duplo-híbrido contam com uma variedade de genes repórteres que facilitam a análise de interações entre proteínas estudadas neste sistema. No entanto, se torna cada vez mais interessante a procura por genes repórteres alternativos que possam contribuir para uma melhor confiabilidade no sistema e para uma maior redução nos custos.

2. Objetivos

Esta dissertação teve por objetivo desenvolver genes repórteres alternativos para serem utilizados no sistema de duplo-híbrido direto e duplo-híbrido reverso.

Para duplo-híbrido direto, foi considerado o gene da α -amilase pancreática de camundongo, que foi testado para uso em sistema de duplo-híbrido sob controle de promotores indutíveis.

Em sistema de duplo-híbrido reverso foi considerado o gene *CAN1*, testado anteriormente em nosso laboratório. O objetivo foi a redução da frequência de clones resistentes a L-canavanina sem que houvesse mutagênese prévia. Para tanto, buscou-se aumentar a atividade tóxica de L-canavanina sem a necessidade de uso de altas concentrações do análogo.

3. Justificativa

O estudo de interações entre proteínas é de suma importância para a compreensão de uma variedade de processos celulares presentes em todos os organismos como regulação da transcrição gênica, transdução de sinal entre outros. Estudos de mutações que afetam interações protéicas também se tornam igualmente importantes para direcionamento de pesquisas.

Na era pós genômica, o sistema de duplo-híbrido se torna uma ferramenta muito útil para estudo dessas interações podendo ser facilmente adaptado para o seu uso em diversas áreas da biologia molecular e indústria farmacêutica.

No entanto, as metodologias para detecção de interações entre proteínas utilizando os genes repórteres convencionais dos sistemas de duplo-híbrido muitas vezes se tornam dispendiosas. Por isso, ocorre uma necessidade da busca por genes repórteres alternativos que visem diminuir esses custos, fazendo com que este sistema possa ser utilizado em larga escala. Concomitantemente, ocorre a necessidade de se estabelecer protocolos auxiliares que ajudem a eliminar o aparecimento de falso-positivos tornando o sistema mais confiável no estudo dessas interações.

Para o sistema de duplo híbrido reverso utilizando o gene *CAN1* como repórter, a redução significativa de resistentes permitirá o uso seguro e controlado desse sistema para seleção de mutantes específicos que não interagem.

4. Material e Métodos

4.1 Microrganismos:

4.1.1 Bactéria:

MC1061: *F-ara* Δ 139 *D(ara-leu)*7696 *galE*15 *galk*16 Δ (lac)*X*74 *rps* (*Str* ^r),
*hsdR*2 (*r_k-m_k*⁺) *mcrAmcrB*1.

4.1.2 Leveduras:

IH1784: (*MAT* α *trip*1 *leu*2 *ura*3 *his*4 *can*1)

YJ0Zcan^R: *MAT* α *gal*4 Δ *gal*80 Δ *ura*3-52 *leu*2-3 112 *ade*-1 *his*3 *MEL*-1 *GAL*1
– *LacZ can*^r

4.2 Estocagem e cultivo de microrganismos

4.2.1 Meios de cultura e estocagem de bactéria (Sambrook *et al*, 1989)

Os meios de cultura descritos a seguir foram esterilizados em autoclave (120kgf /cm²) por 15 minutos antes de serem utilizados.

- LB :
triptona 1%
Extrato de levedura 0,5%
NaCl 1%
Para meio LB sólido foi acrescentado ágar a 1,5%.
- SOB:
bactotriptonas 2%
Extrato de levedura 0,5%
NaCl 10mM

KCl 2,5mM
MgCl₂ 10mM
MgSO₄ 10Mm

- SOC:
10ml de meio SOB
100µl de glicose 2M
100µl de Mg²⁺ 2M (MgSO₄ 1M + MgCl₂ 1M)

- 2XYT:
bactopeptona 1%
extrato de levedura 0,5%
NaCl 1%
pH 7,0

Para uso de placa seletiva contendo ampicilina, a mesma foi adicionada para uma concentração de 100µg/ml.

A estocagem de bactérias foi feita à temperatura de -90°C para manter os estoques viáveis por longos períodos. A estocagem foi feita adicionando-se 400µl de glicerol esterilizado em 1ml de cultura, mantido -20°C por 24 horas, e transferida para estocagem definitiva a -90°C. Para manter o estoque por pouco tempo, a placa de cultura foi colocada a -4°C e renovada periodicamente.

4.2.2 Meios de cultura para levedura (Guthrie; Fink, 1991)

Todos os meios de cultura utilizados para leveduras foram esterilizados sob as mesmas condições descritas para bactérias.

- YPD: extrato de levedura 1%

peptona 2%

dextrose 2%

- SD: YNB sem aminoácido e sulfato de amônio 0,17%
dextrose 2%
sulfato de amônio 0,5%

Para meios sólidos, foi adicionado ágar a 2%

A estocagem de leveduras foi feita nas mesmas condições descritas para bactérias.

4.2.2.1 Complemento para meio mínimo (SD) para levedura:

Complemento	meio (ml)	quantidade (µl)	concentração final
Triptofano (2mg/ml)	25	250	30µg/ml
Leucina (3mg/ml)	25	250	20µg/ml
Lisina (3mg/ml)	25	250	30µg/ml
Uracila (2mg/ml)	25	250	20µg/ml
Adenina (2mg/ml)	25	250	20µg/ml
Histidina (2mg/ml)	25	250	30µg/ml

4.3 Métodos:

4.3.1 Contagem de células de levedura

Para proceder à contagem de células foi utilizada a câmara de Neubauer. Uma alíquota de 10µl foi pingada sobre a câmara, prensada por uma lamínula e levada ao microscópio ótico onde ocorre a contagem. A câmara de Neubauer é formada por um quadrado central dividido em 25 quadrados, e cada um deles é subdividido em 16 quadrados. Devem-se contar os 16 quadrados das quatro extremidades do quadrado central. Foi feita a média das contagens e multiplicado por 25 (número total de quadrados). O volume contido na câmara de Neubauer equivale a uma diluição de 10^{-4} células/ml.

4.3.2 Transformação de microrganismos:

4.3.2.1 Bactérias

- Preparação de bactérias eletrocompetentes (Sambrook *et al*, 1989 com modificações do Dr. Marcelo Bento Soares)

Uma colônia da bactéria desejada foi inoculada em 20ml de meio 2 x YT e colocada a 37°C sob agitação por 16 horas. Após esse tempo, 5ml dessa cultura foram usados para inocular 500ml de meio 2 x YT e a cultura foi colocada para crescer a 37°C sob agitação até atingir uma OD₆₀₀ de 0,2 a 0,25. Tão logo a OD foi atingida, resfriou-se a cultura no gelo por pelo menos 30min. A cultura então, foi centrifugada em tubos Sorval (10.000 rpm, -4°C) por 10min. O sobrenadante foi descartado e cada sedimento foi ressuscitado com 8ml de glicerol 10% a 4°C. Essa suspensão foi novamente centrifugada por 15min. nas mesmas condições citadas. O sobrenadante foi descartado e as células de cada tubo foram ressuscitadas em 35ml de glicerol 10% nas condições descritas acima e a suspensão foi novamente centrifugada por 15min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuscitadas com

15ml de glicerol 10% (igual anterior) e centrifugada por mais 20min. (condições já citadas). As células foram ressuspensas em 1ml de glicerol e uma alíquota de 25µl foi diluída em 10ml de glicerol. A OD₆₀₀ foi novamente medida e uma densidade de 0,15 foi alcançada. Tão logo, isso ocorreu, as células foram aliqüotadas num volume de 40µl e estocadas a -90°C.

- Transformação de bactérias por eletroporação (Sambrook *et al*, 1989)

As bactérias estocadas a -90°C foram descongeladas por 15 minutos no gelo. O DNA ou a mistura de uma ligação foi adicionado em uma concentração de 1 a 5ng para plasmídios pequenos ou 1µl da mistura de ligação e permaneceram incubados por mais 5min. Após esse tempo, as células foram transferidas para cubetas de eletroporação e submetidas a um choque elétrico de 1800V (para cubetas de 1mm) ou 2500V (para cubetas de 2mm). Cada suspensão bacteriana foi incubada em 1ml de meio SOC por 1 hora e em seguida, semeadas em placas contendo meio LB e o antibiótico apropriado.

4.3.2.2 Leveduras

- Transformação de leveduras - receita para 12 transformações - (Gietz *et al.*, 1995)

Uma colônia da levedura de interesse foi usada para inocular 5ml de meio YPD que foi colocado a 30°C sob agitação por 24 horas. Após esse tempo, 20µl dessa cultura foi usada para inocular 10ml de meio YPD e este inóculo foi incubado sob agitação a 30°C por mais 24 horas. A seguir, as células foram contadas e um inóculo de células a uma densidade de $0,5 \times 10^7$ células/ml em 75ml de YPD foi realizado. O crescimento dessa cultura foi acompanhado até que a mesma atingiu uma densidade de 1,6 a $2,0 \times 10^7$ células/ml. Um volume equivalente a 1×10^8 células foi centrifugado por 5min. em tubo Sorval a 7000rpm. O

sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 400µl de LiAc 0,1M e centrifugadas por 30seg. Esse procedimento foi repetido 2 vezes. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado sobre cada sedimento, nessa ordem: 240µl de PEG 50% (p/v), 36µl LiAc 1M, 25µl de solução de ss-DNA (DNA de esperma de salmão) 2mg/ml (fervido por 5min. e resfriado em banho de gelo), 50µl da solução contendo o plasmídeo a ser transformado (1µg em 50µl). A mistura foi homogeneizada e incubada a 30°C sem agitação por 30min. Em seguida foi dado um choque térmico de 42°C sem agitação por mais 30min. A mistura foi centrifugada por 30seg. e o sedimento ressuspendido em 500µl de H₂O mili-Q e semeado em placas seletivas apropriadas. As placas foram colocadas a 30°C e o crescimento de colônias transformantes foi aguardado por um período de 3 a 5 dias.

Soluções necessárias:

LiAc dissolvido em H₂O mili-Q esterilizada em uma concentração de 0,1 e 1M;

PEG 3350 dissolvido em H₂O mili-Q estéril a 50% (p/v);

ss-DNA (DNA de esperma de salmão) dissolvido em H₂O mili-Q estéril (2mg/ml)

4.3.3 Teste de marcas (Guthrie; Fink, 1991)

É um teste realizado com o propósito de verificar a possibilidade da seleção de contaminantes em uma transformação de leveduras. A mesma colônia foi semeada em placas seletivas contendo soluções complementares de auxotrofia diferentes com o auxílio de um grid numerado. Para descartar a possibilidade de contaminação, a colônia deve crescer somente na placa onde sua auxotrofia for complementada.

4.3.4 Extração de DNA

4.3.4.1 Midi preparação de plasmídio de bactéria por lise alcalina (equivale a 5 mini-preparações) (Sambrook *et al.*, 1989 com modificações)

Foi usada 1 colônia da bactéria desejada para inocular 15ml de meio LB e este inóculo colocado a 37°C sob agitação por 24 horas. A cultura foi centrifugada em tubo Falcon por 10min. (10000rpm). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido em 500µl de GTE. Em seguida, foi adicionado 1ml de solução de lise (que dever ser feita na hora) e essa suspensão foi incubada no gelo por 5min. Em seguida, foram adicionados 750µl de KOAc e o tubo foi invertido 5 vezes e centrifugado novamente sob as condições já mencionadas. O sobrenadante foi transferido para tubos de microcentrífuga em um volume de 750µl por tubo. A cada tubo, foi adicionado 750µl de fenol:clorofórmio (1:1) e este foi vortexado e centrifugado por 1min. A fase superior foi retirada e transferida para outro tubo de microcentrífuga e adicionado 700µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), vortexado e centrifugado por mais 1min. Novamente, a fase superior foi retirada, transferida para outro tubo de microcentrífuga e adicionados 650µl de isopropanol a 4°C, vortexado e este foi incubado a -20°C por 15min. Após ter decorrido esse tempo, a suspensão foi centrifugada por 15min. e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com 1ml de etanol 80% e centrifugado por 5min. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento foi ressuspendido em 20µl de solução de TE RNase. Em seguida, a amostra foi deixada a 37°C sem agitação por 20min. e estocada a -20°C.

Soluções necessárias:

GTE: (preparo de 100ml)

0,9g de glicose (dextrose)

2ml de EDTA 0,5M

2,5ml de Tris-Cl 1M (pH 8,0)
H₂O mili-Q para completar o volume

Solução de lise: (preparo de 5ml)

200µl de NaOH 5N
500µl de SDS 10%
H₂O mili-Q para completar o volume

KOAc: (preparo de 100ml)

60ml de acetato de potássio 5M
11,5ml de ácido acético glacial
28,5ml de H₂O mili-Q estéril

TE RNase:

Tris-Cl 10mM (pH 7,4)
EDTA 1mM (pH 8)
RNase pancreática livre de DNase para uma concentração final de 20µg/ml.

4.3.4.2 Extração de DNA genômico de levedura (Harju *et al.*,2004)

Esse protocolo pode ser utilizado tanto para experimentos com Southern blot quanto para PCR.

Uma colônia da levedura desejada foi usada para inocular 2ml de meio YPD e este inóculo foi incubado a 30°C por aproximadamente 20 horas. Depois de decorrido esse tempo, um volume de 1,5ml dessa cultura foi centrifugado por 5 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 200µl de tampão de lise e o tubo foi imerso em nitrogênio líquido por 2 minutos seguido de imersão em banho-maria a 95°C por 1 minuto. Esse procedimento foi realizado duas vezes e o tubo foi vortexado vigorosamente por 30 segundos. Em seguida, foi adicionado ao sedimento 200µl de clorofórmio e este foi vortexado por 2 minutos e

centrifugado por 3 minutos. A fase aquosa foi transferida para um outro tubo contendo 400µl de etanol absoluto gelado, vortexada e deixada a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, o tubo foi centrifugado por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado em 500µl de etanol 70%. O tubo foi centrifugado por 5 minutos, o sobrenadante foi removido e o sedimento foi deixado secar a temperatura ambiente. O sedimento foi ressuscitado em 25 a 50µl de TE, se cultura vier de cultura líquida, ou em 10µl, se a cultura vier diretamente de placa.

Soluções Utilizadas:

Tampão de lise

Triton X-100 2%
SDS 1%
NaCl 100mM
Tris-HCl 10mM (pH 8,0)
EDTA 1mM (pH 8.0)

TE:

Tris 10mM (pH 8,0)
EDTA 1mM (pH 8,0)

4.3.5 Reação em cadeia de polimerase (PCR) (Sambrook *et al*, 1989)

Esta reação é o processo de amplificação de um fragmento de DNA usado como molde. Para um DNA purificado (plasmídeo), utiliza-se 20 a 30ng deste na reação. Quando o DNA não está purificado (o plasmídeo está na bactéria), pode ser realizado um PCR de colônia.

4.3.5.1 PCR com DNA purificado (plasmídio)

Para as reações foram utilizadas alíquotas de 25µl para cada amplificação contendo um tampão (50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH9, 0,1% de Triton X100 e 0,15mM de MgCl₂) de PCR a 10%, 0,2mM de cada nucleotídeo trifosfatado, 0,04U/µl de Taq polimerase, 0,8 a 1µM de cada iniciador e 30ng do molde do DNA a ser amplificado. A solução foi acondicionada em termociclador e o resultado foi analisado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio.

4.3.5.2 PCR de colônia

As colônias a serem utilizadas foram retiradas da placa seletiva com o auxílio de ponteiros de micropipetas esterilizadas e estas foram encostadas em placa seletiva apropriada e, em seguida, usadas como molde para a PCR através de refluxos com a micropipeta na solução da reação. A placa foi incubada na temperatura apropriada e a solução de PCR foi levada ao termociclador. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio.

O programa usado para todas as amplificações realizadas neste trabalho foi 4 minutos a 95°C para desnaturação inicial seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C para desnaturação, 45 segundos para anelamento dos iniciadores, 2 minutos a 72°C para extensão e uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

4.3.6 Eletroforese de DNA em gel de agarose (Sambrook *et al*, 1989)

A agarose 0,8% (p/v) foi acrescida de TAE1X e aquecida até sua dissolução. Em seguida, após a solução esfriar, foi adicionado brometo de etídio para a concentração final de 0,5µg/ml. Esperou-se até o gel polimerizar, à temperatura ambiente, aplicou-se a amostra de DNA nas canaletas do gel e realizou-se a corrida a uma voltagem de 1 a 5 V/cm²

na cuba de eletroforese mergulhada em TAE na mesma concentração feita para o gel.

Solução Utilizada:

TAE 1X: Tris-acetato 0,04M
0,001M de EDTA

4.3.7 Purificação de DNA em gel de agarose utilizando lã de vidro

Uma pequena quantidade de lã de vidro autoclavada (o suficiente para tampar o fundo) foi colocada no fundo furado de um eppendorf. A banda do gel que se deseja purificar foi retirada do gel de agarose utilizando-se luz UV em onda longa para visualizar o gel. A banda cortada foi colocada no eppendorf com lã de vidro e este, por sua vez, foi colocado dentro de um outro eppendorf sem tampa e centrifugado por aproximadamente 15 segundos na velocidade de 8000 rpm. O líquido contendo a solução de DNA foi recuperado do fundo do tubo. Quando este volume excede 20µl, deve-se proceder ao protocolo de precipitação de DNA descrito no próximo item.

4.3.8 Precipitação de DNA utilizando acetato de amônia (Sambrook *et al*, 1989)

O volume da solução contendo o DNA foi completado com H₂O mili-Q estéril até o volume de 100µl. Em seguida, adicionou-se 25µl acetato de amônio a uma concentração final de 2,5M. A solução foi vortexada e acrescentado à mesma, etanol absoluto 2x o volume (250µl) e deixado a 20°C por 20min. Depois de decorrido esse tempo, a solução foi centrifugada por 15min. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado com etanol 80% na quantidade de 1/2x o volume do eppendorf utilizado. Em seguida, foi centrifugado por 5min., o sobrenadante removido e o sedimento ressuspendido no volume desejado com H₂O mili-Q estéril e armazenado a -20°C.

4.3.9 Digestão de DNA com enzima de restrição (Sambrook *et al*, 1989)

O primeiro passo foi estipular o volume final da reação. Foi colocada a quantidade do DNA que se queria digerir em um tubo eppendorf contendo a enzima apropriada na concentração de 5U/ μ g de DNA juntamente com o tampão dessa enzima na concentração de 10% do volume final da reação. O volume da solução foi completado com H₂O mili-Q estéril. A concentração final do DNA deve ser verificada pois não deve exceder 0,2 μ g/ μ l da solução. A digestão foi colocada a 37°C ou na temperatura apropriada para cada enzima sem agitação por 3 horas ou deixada overnight.

4.3.10 Ligação de fragmentos de DNA (Sambrook *et al*, 1989)

A solução para ligação de fragmentos de DNA foi preparada da seguinte maneira: usou-se 100ng do vetor digerido com as enzimas de restrição apropriadas e o inserto (3x a quantidade do vetor em equivalente molar) acrescido de 2 μ l do tampão específico de ligase (Gibco 5X) e 1 μ l da enzima T4 DNA ligase (Gibco, 5U/ μ l). Esta solução foi colocada no termociclador a 22°C durante 16 horas para a ocorrência da ligação. Em seguida, o tubo foi guardado a -20°C. Deve-se ter o cuidado para que o volume final da reação não ultrapasse 10 μ l.

4.3.11 Desfosforilação de vetor (Sambrook *et al*, 1989)

Este protocolo é necessário quando se deseja evitar que o vetor se religue. Após realizar o protocolo de precipitação do DNA, calculou-se o volume final da solução e acrescentou-se tampão para fosfatase a 10% desse volume acrescido de fosfatase na concentração de 5U/ μ l e completado o restante do volume com H₂O mili-Q estéril. A solução foi colocada a 37°C sem agitação por 30min.. Em seguida, colocou-se EDTA (pH 8) na concentração final de 5mM para inativar a fosfatase e a

solução foi incubada a 65°C por 1 hora. A solução foi armazenada a -20°C.

4.3.12 Ensaio de metabolização de X-Gal

Colônias representativas da levedura a ser analisada foram semeadas em placa seletiva contendo sobre ela, filtro de nitrocelulose (geralmente com poros de 0,45µm). Após o crescimento das colônias sobre o filtro, esse foi retirado da placa e mergulhado em nitrogênio líquido para que as colônias congelassem. Em seguida, o filtro congelado foi embebido em uma solução contendo 2% de X-Gal e tampão Z, e deixado na estufa a 37°C de 1 a 3 horas. As colônias que produziram a enzima β-galactosidase, expressaram a cor azul devido a metabolização do substrato X-Gal.

Soluções utilizadas:

Tampão Z:

60mM de Na₂HPO₄

40mM de NaH₂PO₄

10mM de KCl

1mM de MgSO₄

0,025% de SDS (p/v)

β-mercaptoetanol na concentração final de 50mM.

X-Gal:

Dissolver o X-Gal em N,N-dimetilformamida na concentração final de 20mg/ml.

4.3.13 Revelação de atividade amilolítica com vapores de iodo.

Uma colônia representativa de cada transformação foi inoculada em meio seletivo apropriado e incubada a 30°C por 48 horas.

Aproximadamente 10^3 células provenientes dessa cultura foram pingadas em placa de YPD contendo 0,1; 0,3 ou 0,5% (p/v) de amido, e essas foram incubadas a 30°C por 48 horas. Em seguida, foram adicionados cristais de iodo na tampa da placa e essa foi fechada por aproximadamente 3 minutos para que os cristais de iodo evaporassem. Os vapores de iodo coram o amido presente no meio de cultura tornando possível a visualização de um halo de degradação de amido nas colônias que expressaram o gene da α -amilase.

4.3.14 Teste de sobrevivência à L-canavanina

Uma colônia representativa da levedura a ser analisada foi inoculada em meio seletivo apropriado e incubada a 30°C sem agitação por 72 horas. Após o crescimento, 250 μ l de células provenientes da cultura foram inoculados em 5ml de meio seletivo apropriado e novamente incubadas a 30°C sem agitação por 24 horas. Após esse tempo, as células dessa cultura foram contadas em câmara de Neubauer e o equivalente a 1800 células foi semeado em placas seletivas contendo L-canavanina nas concentrações indicadas. As placas foram deixadas a 30°C sem agitação por 10 dias. As colônias sobreviventes foram contadas em intervalos de 3 dias.

4.3.15 Teste de sobrevivência na ausência de adenina

Uma colônia representativa para o experimento foi inoculada em meio seletivo apropriado e incubada a 30°C sem agitação por 72 horas. Um volume de 250 μ l dessa cultura foi inoculado em 5ml de meio seletivo apropriado que foi incubado novamente a 30°C por 24 horas para renovação da cultura. Depois de decorrido esse tempo, as células foram contadas em câmara de Neubauer e um volume correspondente a 10^5 células/ml foi usado para inocular o meio seletivo apropriado sem adenina. Esse inóculo foi incubado durante 16 horas. Após esse tempo,

as células presentes nessa cultura foram novamente contadas em câmara de Neubauer e aproximadamente 10^3 células foram semeadas em placas seletivas apropriadas contendo adenina e/ou L-canavanina na concentração de $10\mu\text{g/ml}$. As placas foram deixadas a 30°C sem agitação por 10 dias. As colônias sobreviventes foram contadas em intervalos de 3 dias.

4.3.16 Teste de sobrevivência em choque térmico

A colônia desejada para o experimento foi inoculada em meio seletivo apropriado e incubada a 30°C sem agitação por 72 horas. Um volume de $250\mu\text{l}$ dessa cultura foi inoculado em 5ml de meio seletivo apropriado e incubado novamente a 30°C por 24 horas para renovação de cultura. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer e um volume de aproximadamente 10^4 células foram semeados em placas seletivas apropriadas contendo ou não L-canavanina. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas ou por 30 minutos para o choque térmico e em seguida, incubadas a 30°C por 10 dias. As colônias sobreviventes foram contadas em intervalos de 10 dias.

5. Resultados

5.1 α -amylase: a new reporter gene for the *Saccharomyces cerevisiae* two-hybrid system

Cruz R.C., Bucciarelli-Rodriguez M.*

Depto. de Biologia Geral, Inst. de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP.31270-091, Brazil

* Corresponding author: Tel.:55(31) 3499-2602, Fax: 55 (31)3499-2567 e-mail: monicabr@icb.ufmg.br

Keywords: reporter gene, α -amylase, yeast, two-hybrid system

Abstract

Reporter genes are essential for the yeast two-hybrid system. In this paper, we show that the mouse pancreatic α -amylase gene can be successfully used as a reporter gene for strong protein-protein interactions in the yeast two-hybrid system.

Introduction

The study of interactions between proteins is important because it helps to understand many biological processes such as transcription regulation, environmental response and signal transduction. The two-hybrid system is a very useful tool to study protein-protein interactions because it allows *in vivo* detection of interactions. This system was firstly described in 1989 (Fields; Song, 1989). In this system, two hybrid proteins are produced: one of them has the GAL4 DNA binding domain (GBD) in fusion with a protein of interest, and the other one has the GAL4 activation domain (GAD) in fusion with another protein under study or a DNA library. Activation of the reporter gene reflects the occurrence of interaction between the two hybrid proteins.

However, technical and biological false-positives in the two-hybrid system have been described (Vidalain *et al.*, 2004). The use of additional reporter genes for two-hybrid analysis may contribute to overcome some of these false-positive results. Because of that, yeast strains used for two-hybrid experiments usually have two reporter genes: one used in the screening

process and another one for checking the interaction. The main goal of this work was to find alternative reporter genes that demand inexpensive and easy protocols to be used in the two-hybrid system. This paper shows the use in the yeast two-hybrid system of the mouse pancreatic α -amylase gene. The mouse pancreatic α -amylase had already proved to have amylolytic activity in *Saccharomyces cerevisiae* when the corresponding cDNA was cloned in fusion with yeast α -factor signal peptide coding sequence (Astolfi Filho *et al.*, 1986).

Material and Methods

Strains and plasmids: The *Saccharomyces cerevisiae* strain YJ0Zcan^R (*MATa gal4 Δ gal80 Δ ura3-52 leu2-3 112 ade-1 his3 MEL-1 GAL1 – LacZ can^R*) was used as a host for two-hybrid. The yeast strain IH1784 (*α trp1 leu2 ura3 his4 can1*) was used as a control of expression of the α -amylase gene. The *E. coli* strain MC1061 (Raleigh *et al.*, 1989) was used in cloning and plasmid manipulations. The plasmids pYES2 (Invitrogen Life Technologies), pTD1, pVA3 and pCL-1 (CLONTECH); pBDA-2, pADA-2, pADA-3 (da Silva, 2005) were used in two-hybrid experiments. The plasmid pESA (Astolfi Filho *et al.*, 1986) and pGEM-T (Promega) were used for the α -amylase cloning experiments.

Reporter plasmid construction, media and yeast cultures: The strategy for the reporter gene construction is described in the results section. Bacteria growth conditions and its manipulation are described in Sambrook *et al.* (1989). Yeast cultivation and manipulation are described in Guthrie & Fink (1991).

PCR Amplification: The following primers were used for α -amylase gene amplification: 5' CGCGGATCCATGAGATTTTCCTTCAATTTTT 3', and 5' GCGTGTCGACTTCTTACAATTTTGAGACAGC 3', which inserts a BamHI site on the 5' end of the gene and a Sal I restriction site on the 3' end. DNA was amplified using 30 cycles of 1 minute and at 95°C for denaturing, 45 seconds for annealing at 55°C and 2 minutes for extension at 72°C, and 10

minutes of final extension at 72°C. The PCR reaction was done with 10% buffer ID (Phonutria –MG, Brazil), 0.2mM dNTP's, 1.0µM primers, 1U Taq polymerase αF (Phonutria –MG, Brazil) and 30ng of template.

α-amylase activity assay: The phenotype of the reporter gene was detected after cultivating yeast transformants on solid YPD (1% bacto-yeast extract, 2% bacto-peptone, 2% dextrose, 2% bacto-agar) containing 0,1 - 0,5% starch at 30°C for 48 hours. Iodine crystals were put on the dish lids and the plates were incubated for 3 minutes to allow starch staining which reveals the degradation haloes.

Results and Discussion

α-amylase reporter plasmid construction:

The cloning strategy for the α-amylase gene is shown in figure 1. The α-amylase gene in fusion with the yeast MFα peptide-signal sequence was amplified using the pESA plasmid as a template. The PCR product was cloned into the pGEM-T vector. The resulting plasmid was digested with *BamHI* and *XhoI* restriction enzymes. The α-amylase fragment was cloned into pYES2 and the resulting plasmid was named pYESamy. Cloning steps were confirmed by colony PCR.

Two-hybrid assay:

The evaluation of the mouse pancreatic α-amylase as a reporter gene was performed using YJ0Zcan^R, a yeast strain suitable for Gal4p based two-hybrid assays. Initially, yeast cells were transformed with pYESamy only (negative control), with pYESamy and pCL-1 (a positive control plasmid that encodes wild-type Gal-4 protein), and with pYESamy, pVA3 (encoding the murine p53 in fusion with GAL4-BD) and with pTD -1 (encodes SV40 large-T in fusion with GAL4-AD). It is well known that p53 and SV40 Large T interact (Tan *et al.*, 1986). We have also tested the reporter phenotype when the two

hybrid proteins do not interact (*Neurospora crassa* mat A-3 and p53, da Silva, 2005, encoded by pADA-3 and pVA3, respectively) or show weak interaction [*Neurospora crassa* mat A-2 and *Neurospora crassa* mat A-3, encoded by pBDA-2 and pADA-3 respectively (da Silva, 2005)] in the yeast two-hybrid system. Figure 2 shows, by conspicuous production of haloes on starch, that mouse pancreatic α -amylase is expressed after transcriptional activation by Gal4p (full length protein) or when the two hybrid proteins display strong interaction, as happens with p53 and Large T. However, weak protein interactions produce negative results on starch plates, comparable to the negative controls. Results presented in figure 2 also show that the visualization of the reporter phenotype is easier on the lowest starch concentration (0.1%). The amylolytic activity was not detected when minimal medium (YNB w/o aminoacids, Difco Lab.) was used, even with the original yeast clone harboring pESA (data not shown). Therefore, the α -amylase reporter gene cloned in an episomal vector can be used as secondary reporter gene in two-hybrid assay, when one searches for strong interactions. Its use would help to detect false-positive clones at low cost and reduced bench work. Integration of the reporter cassette was not done, but the negative results obtained when weak interaction was tested suggest that several copies of the reporter gene would be necessary to produce a conspicuous phenotype.

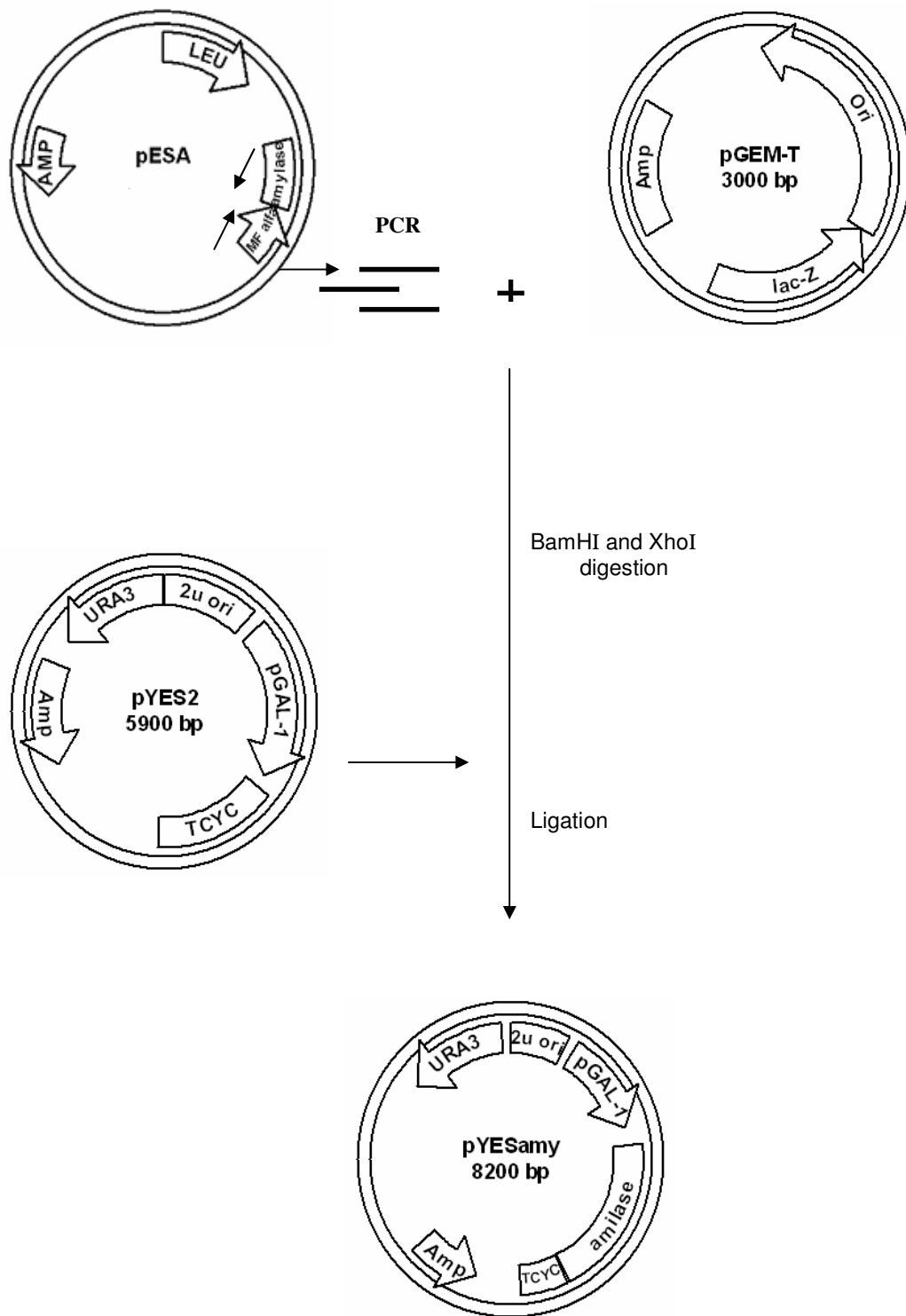


Figure 1: Representation of cloning strategies for α -amylase under GAL-1 promoter in pYES2 vector.

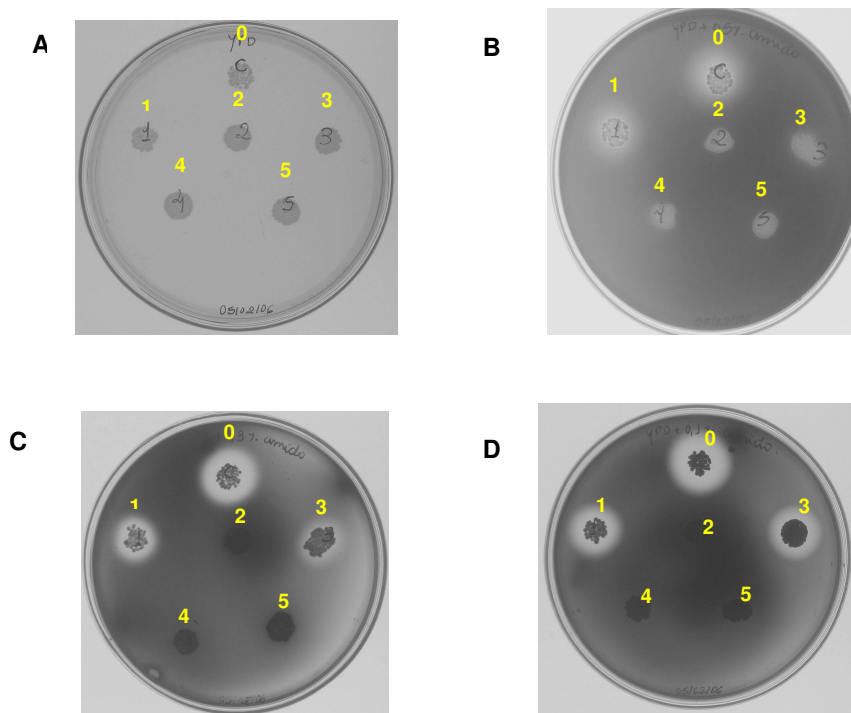


Figure 2: α -amylase activity assay. 10^3 cells of clones from each transformation were spotted on YPD plates containing starch and submitted to α -amylase activity assay. A: control plate with YPD medium. B: YPD with 0.5% starch. C: YPD with 0.3% starch. D: YPD with 0.1% starch. 0: positive control (IH1784 yeast strain transformed with pESA). 1: YJ0Zcan^R yeast strain transformed with pYESamy and pCL1. 2: negative control (YJ0Zcan^R yeast strain transformed with pYESamy). 3: YJ0Zcan^R yeast strain transformed with pYESamy, pVA3 and pTD1. 4: YJ0Zcan^R yeast strain transformed with pYESamy, pVA3 and pADA3. 5: YJ0Zcan^R yeast strain transformed with pYESamy, pBDA2 and pADA3.

Acknowledgments

The authors wish to thank Capes for a graduate scholarship to Rosana C. Cruz, to Ana Clara Schenberg and Elisabete José Vicente (ICB, USP) for providing pESA plasmid and Carla C. da Silva (ICB, UFMG) for providing pBDA2 and pADA3 plasmids.

References

- Astolfi Filho, S. et al.** (1986). Stable yeast transformants that secrete functional α -amylase encoded by cloned mouse pancreatic cDNA. *Bio/technology* 4: 311-315.
- Da Silva, C.C.** (2005). Estudo da atividade transcricional e interação das proteínas mat A-2 e mat A-3 de *Neurospora crassa* usando o sistema de duplo-híbrido. Dissertação, Mestrado em Genética, U.F.M.G.
- Fields, S.; Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-6.
- Guthrie, C.; Fink, G.R.** (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology* 194: 905p.
- Raleigh, E.A.; Lech, I.C.; Brent, R.** (1989). In current protocols in molecular biology eds. Asubel, F.M., et al. Publishing Associates and Wiley Interscience; New York, Unist 1-4.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press* 2: 2100p.
- Tan, T.H.; Wallis, J.; Levine, A.J.** (1986). Identification of the p53 protein domain involved in formation of the simian virus 40 large T-antigen –p53 protein complex. *Journal of Virology* 59:574-583.
- Vidalain, P. et al.** (2004). Increasing specificity in high-throughput yeast two-hybrid experiments. *Methods* 32: 363-370.

5.2 An alternative reporter gene for yeast reverse two-hybrid system

Starling, L.A.¹, J.M. Ortega², Cruz, R.C.¹, Bucciarelli-Rodriguez, M.^{1*}

¹Dep. de Biologia Geral, Inst. de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP.31270-091, Brazil

²Dep. de Bioquímica e Imunologia, Inst. de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP.31270-091, Brazil

* Corresponding author: Tel.: 55(31) 3499-2602, Fax: 55(31) 3499-22567 e-mail: monicabr@icb.ufmg.br

Keywords: L-canavanine, yeast, reverse two-hybrid system

Abstract

The study of interactions between proteins is very important for understanding various cellular processes. Protein-protein interaction can be analyzed by introducing mutations that avoid the interaction. The yeast reverse two-hybrid system is used to screen mutants that have lost specific protein-protein interactions. Reporter genes are essential for the usefulness of this system. Here we examined the *Saccharomyces cerevisiae* *CAN1* gene as an alternative reporter gene for the yeast reverse two-hybrid system.

1. Introduction:

Interactions between proteins are involved in all cellular processes. They are important for the control of cell cycle, metabolism, signal transduction and other processes (Alberts; Miake, 1992). Therefore, dissection of such protein-protein interactions plays an important role in the understanding of these processes.

The two-hybrid system was firstly described in 1989 (Fields; Song, 1989) and is frequently used for identifying protein-protein interactions because it allows *in vivo* study, a condition in which proteins have their original conformation. In this system, transcription activation of a reporter gene reflects the occurrence of interaction between the two hybrid proteins.

In the reverse two-hybrid system (a variation of the original two-hybrid system), the reporter protein is deleterious to the host cell. Therefore, reporter activation due to interaction between proteins results in cell death (Vidal, 1997). As a consequence, the dissociation of the interaction between two proteins provides a selective growth advantage, facilitating the study of structure-function relationships (Vidal *et al.*, 1996).

The *URA3* gene has been used as a reporter gene in the reverse two-hybrid system because its activity is lethal in the presence of 5-fluoro-orotic acid - 5FOA (Causier; David, 2002). Another gene used for this purpose is *CYH2*, which expression confers cycloheximide sensitivity (Leanna & Hannink, 1996).

In this work, we have examined the usefulness *Saccharomyces cerevisiae* *CAN1* gene as a reporter gene for the reverse two-hybrid system. This gene encodes a permease responsible for arginine import which also imports the toxic arginin analog L-canavanine, thus conferring L-canavanine sensitivity to the wild-type phenotype (Asami *et al.*, 2002).

2. Material and Methods

Strains and plasmids: The *Saccharomyces cerevisiae* strain YJ0Z (*MATa gal4Δ gal80Δ ura3-52 leu2-3 112 ade-1 his3 MEL-1 GAL1 – LacZ*) was used as the two-hybrid host strain. The *E. coli* strain MC1061 (Raleigh *et al.*, 1989) was used for cloning and plasmid amplification. Plasmids pYES2 (Invitrogen Life Technologies), pTD1, pVA3 and pCL-1 (CLONTECH) were used in the two-hybrid experiments. Plasmid TCL1 was used for the *CAN1* cloning experiments. The pET-28-a vector (NOVAGEN) was used in cloning experiments.

Reporter plasmid construction, media and yeast cultivation:
The strategy for the reporter cassette construction is described in the results section. Bacteria growth conditions and manipulation are described in Sambrook *et al.* (1989). Yeast culture and manipulation are described in Guthrie & Fink (1991).

Reverse two-hybrid assay using the *CAN1* gene as the reporter gene: Cells from a representative colony were cultivated in selective medium at 30°C for 72 hours. Selective medium was inoculated with 250 µl from this culture and incubated at 30°C for 24 hours. 1800 cells from this culture were plated on selective media with or without L-canavanine and incubated at 30°C for 3 days.

X-Gal assay: Cells from a representative colony were plated on a nitrocellulose filter covering a selective medium plate and incubated at 30°C for 3 days. After that, the nitrocellulose filter with the colonies was frozen in liquid nitrogen. This nitrocellulose filter was soaked in Z-buffer (60mM Na²HPO⁴, 40mM NaH²PO⁴, 10mM KCL, 1mM MgSO⁴, 0,025% SDS p/v, 50mM β-mercaptoethanol) and 2% X-Gal solution and incubated at 37°C for 2 hours. X-Gal degradation confers blue color to the colony and when there is no degradation, the colony remains white.

3. Results and Discussion

Isolation of a spontaneous L-canavanine resistant mutant of the YJ0Zcan^R strain sensitive to L-canavanine

The *CAN1* gene is a natural *Sacharomyces cerevisiae* gene and codes for arginine permease. Besides arginine, the Can1 permease is able to import L-canavanine, a toxic analogue of arginine. Therefore, the wild-type allele determines a dominant phenotype of L-canavanine susceptibility. Since the haploid two-hybrid host yeast strain used here, YJ0Z, has the *CAN1* allele, the first step for using this gene as a reporter in reverse two-hybrid system was to isolate L-canavanine resistant mutants of this strain. For this purpose, 2.3×10^7 cells were plated onto a 10 µg/ml canavanine YPD plate and incubated for 48h. Fifty three large colonies were obtained, in a mutation frequency of 2.3×10^{-6} . Some of these clones were analyzed and presented 100% survival to 80 µg/ml L-canavanine. Furthermore, these clones had the wild-type phenotype

restored upon transformation with TCL1, a plasmid which carries the *CAN1* gene under control of its own promoter, which is constitutive.

Construction of the *CAN1* reporter gene plasmid

YJ0Z is a strain suitable for two-hybrid assays based on Gal4p. For this reason, Invitrogen's yeast episomal plasmid pYES2, carrying a GAL-1 promoter followed by a multiple cloning site, was chosen as the cloning vector. Figure 1 shows the construction strategy of the pYESCAN1 plasmid. The TCL1 plasmid was digested with *BamHI* and *NcoI* restriction enzymes to release the *CAN1* gene. The *CAN1* gene was cloned into the pET-28-a vector previously digested with *BamHI* and *NcoI* enzymes. This plasmid was digested with *BamHI* and *XbaI* restriction enzymes to release the *CAN1* gene. This fragment was cloned into the pYES2 vector previously digested with *BamHI* and *XbaI* enzymes to produce plasmid pYESCAN1. The resulting plasmid carries the *CAN1* gene under control of a GAL1 inducible promoter. All steps of *CAN1* cloning were confirmed by digestion with restriction enzymes and followed in gel electrophoresis analysis (data not shown).

Evaluation of *CAN1* as reporter gene for reverse two-hybrid

Initially, the YJ0Zcan^R strain was simultaneously transformed with pYESCAN1 and pCL1 (which encodes the full length Gal4p) to verify whether Gal4p activation of the reporter gene would restore the original susceptibility to L-canavanine. Some transformant clones were spotted onto plates with or without L-canavanine, at 5 or 80µg/ml. Those clones showed high L-canavanine sensitivity (figure 2) indicating a good possibility of using *CAN1* as a reporter gene.

To simulate a reverse two-hybrid assay we have used two well-known interacting proteins: murine p53 and SV40 Large T antigen (LT). It would be expected that interaction between those proteins would result in L-canavanine susceptibility of the host resistant strain harboring the reporter

gene. YJ0Zcan^R was simultaneously transformed with pYESCAN1 (encoding the reporter gene), pVA3 (encoding the hybrid Gal4 binding domain (GBD) in fusion with residues 72 to 390 of murine p53) and pTD1 (encoding the hybrid Gal4 activation domain (GAD) in fusion with LT antigen). Approximately 1800 cells from randomly chosen transformants were plated on selective medium with L-canavanine, at concentrations varying from 5 to 200 µg/ml and they were not expected to present any growth on these conditions. Surprisingly, resistant colonies emerged in high frequency, showing distinctive patterns of size: small and large colonies (figure 3). Although the frequency of large colonies remained constant despite increasing on L-canavanine concentration in this experiment, some times it decreased slightly upon increasing L-canavanine concentration. On the other hand, the frequency of small colonies decreased significantly with the increase in L-canavanine concentration. To understand the role of the two-hybrid interaction on these phenotypes we have then checked the phenotype of the other reporter gene present in this yeast strain, *LacZ*. Figure 4 shows the results of testing β-galactosidase activity (encoded by the *LacZ* gene), using X-gal as substrate, of YJ0Zcan^R cells harboring simultaneously pYESCAN1, pVA3 and pTD1 that were not selected on L-canavanine plates (control), and cells from small and large colonies isolated on 100 µg/ml L-canavanine plates. Large colonies seem to have at least one of the hybrid proteins mutated, because they show results consistent with lack of interaction when both reporter genes are tested: canavanine resistant cells that are white on a X-gal assay. Large colonies isolated in lower canavanine concentrations (10 to 40 µg/ml) had the same behavior (data not shown). Cells from small colonies seems to be less resistant to L-canavanine and showed some activity of the *lacZ* reporter gene, suggesting that interaction still occurs, although with a lower intensity. Understanding this process demands further characterization of the isolated resistant cells and their plasmids.

Despite of the high frequency of surviving colonies at low L-canavanine concentrations, the *CAN1* gene can be used as a reporter for screening lack of interaction from a library with some restrictions. The *CAN1* reporter gene only can be used in haploid yeast strains and *ARG*⁺ yeast

strains. High canavanine concentration may be need. The *CAN1* reporter gene could be useful when the assay is performed to test interacting previously mutated proteins. Yeast transformants harboring pYESCAN1, pTD1 and a plasmid coding for GBD fusion with characterized mutants of p53 (Fields; Li, 1993) showed 100% of L-canavanine resistance (data not shown). It is possible, however, that changes in the screening protocol or additional mutations on the host cells to enhance its sensitivity to L-canavanine could improve the use of the *CAN1* gene as reporter in reverse two-hybrid system.

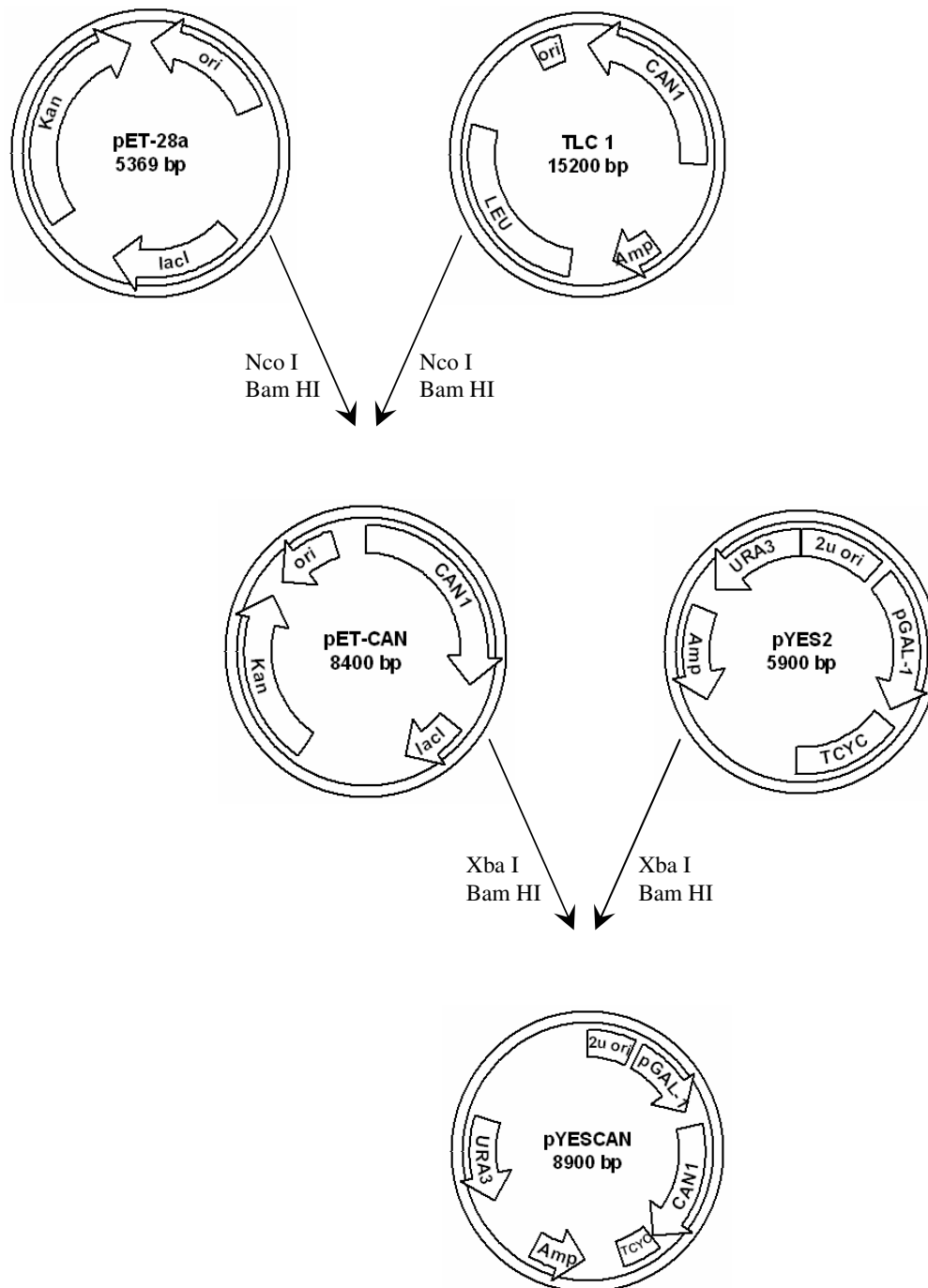


Figure 1: Construction of *CAN1* reporter plasmid by cloning it under the control of the GAL-1 promoter.

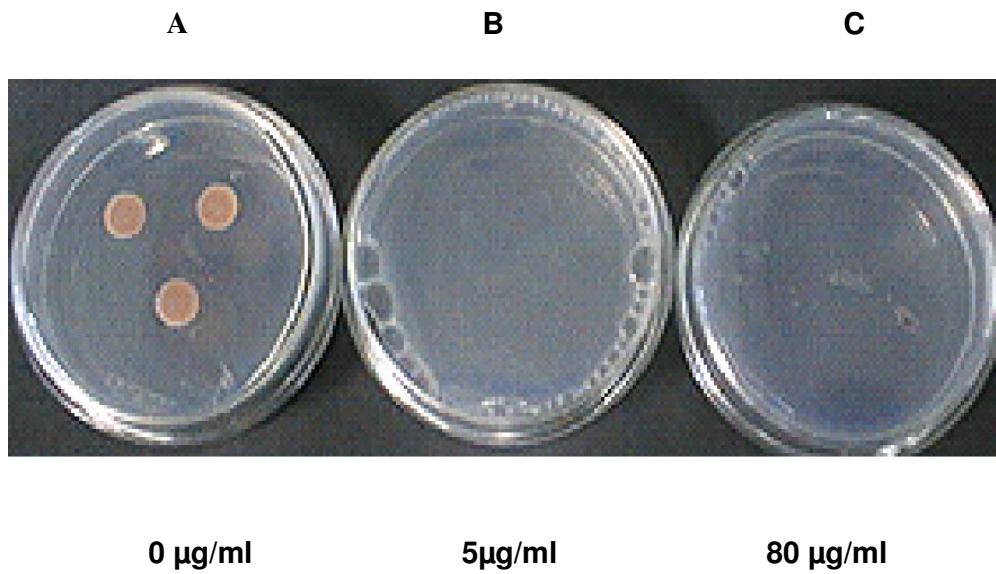


Figure 2: Induction of YJ0Zcan^R susceptibility to L-canavanine by expressing Gal4p. A: YJ0Zcan^R yeast strain transformed with pCL1 and pYESCAN1 spotted on selective medium without L-canavanine. B and C: YJ0Zcan^R yeast strain transformed with pCL1 and pYESCAN1 spotted on selective medium with 5µg/ml (B) and 80µg/ml L-canavanine (C).

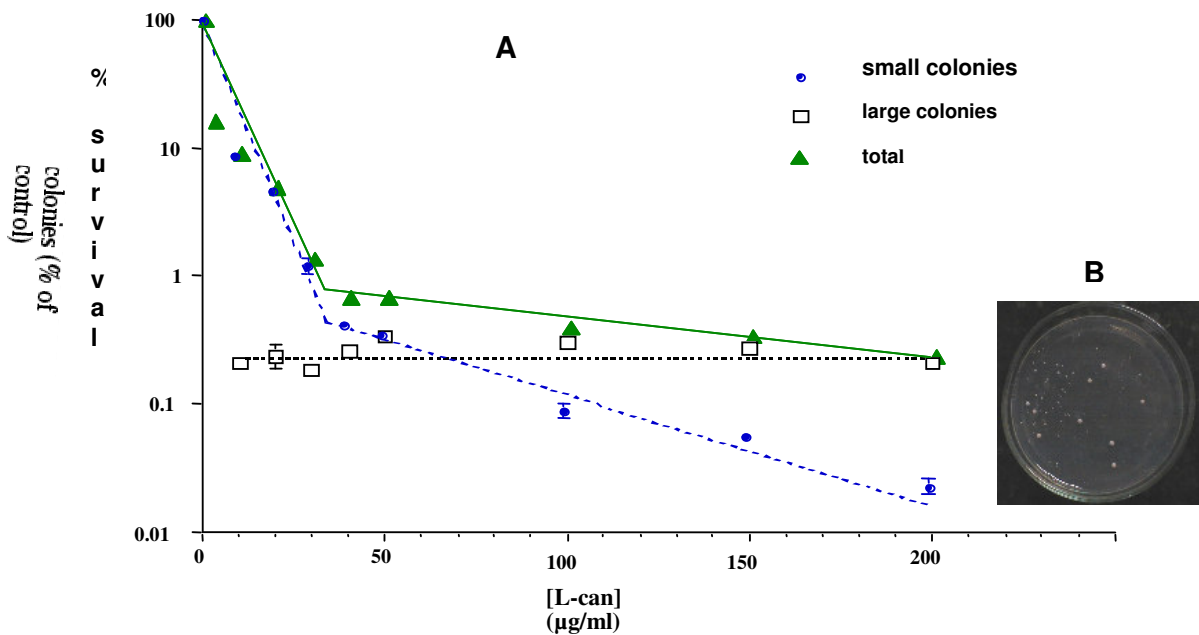


Figure 3: A: Frequency of yeast clones surviving to L-canavanine. YJ0Zcan^R harboring pYESCAN1, pVA3 and pTD1 were plated on selective media without and with different concentrations of L-canavanine. B: Small and large yeast colonies present on selective media with 10µg/ml L-canavanine.

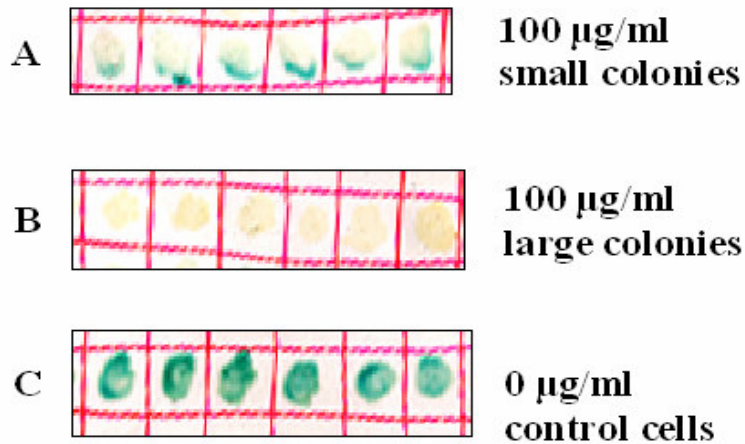


Figure 4: Activation of the *LacZ* reporter gene in L-canavanine resistant cells. YJ0Zcan^R yeast strain transformed with pYESCAN1, pVA3 and pTD1 (panel C) and colonies isolated from selective media with 100µg/ml L-canavanine A: small colonies and B: large colonies.

Acknowledgments

The authors wish to thank Capes for a graduate scholarship to Alessandra L. Starling and Rosana C. Cruz and to Ana Clara Schenberg and Elisabete José Vicente (ICB, USP) for providing TCL1 plasmid.

References

- Alberts, B.; Miake, R.** (1992). Unscrambling the puzzle biological machines: the importance of the details. *Cell* 68:415-420.
- Asami, Y. et al.** (2002). Effect of the DNA topoisomerase II inhibitor VP-16 on illegitimate recombination in yeast chromosomes. *Gene* 291:251-257.
- Causier, B.; Davies, B.** (2002). Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Molecular Biology* 50: 855-870.
- Fields, S.; Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-6.

- Guthrie, C.; Fink, G.R.** (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology 194*: 905p.
- Leanna, C.A.; Hannink, M.** (1996). The reverse two-hybrid system: a genetic scheme for selection against specific protein/protein interactions. *Nucleic Acids Res 24*:3341-3347.
- Li, B.; Fields, S.** (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *Research Communications 7*: 957-963.
- Raleigh, E.A.; Lech, I.C.; Brent, R.** (1989). In current protocols in molecular biology eds. Asubel F.M. *et al.*, Publishing Associates and Wiley Interscience; New York, Unit. 1-4.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press 2*: 2100p.
- Vidal, M.** (1997). In Bartel e Fields (eds), The yeast two-hybrid systems. *Oxford University Press, NY*, 109-147.
- Vidal, M. et al.** (1996). Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions (see comments). *Proc. Natl. Sci. U S A 93*:10315-1320.

5.3 Effects on *Saccharomyces cerevisiae* resistance to L-canavanine after activation of the *CAN1* reporter gene in the two-hybrid system

Cruz, R.C.¹Ortega², J.M., Bucciarelli-Rodriguez, M.^{1*}

¹Dep. de Biologia Geral, Inst. de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP.31270-091, Brazil

²Dep. de Bioquímica e Imunologia, Inst. de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Av. Antônio Carlos, 6627, CEP.31270-091, Brazil

* Corresponding author: Tel.: 55(31) 3499-2602, Fax: 55(31) 3499-22567 e-mail: monicabr@icb.ufmg.br

Keywords: L-canavanine, yeast, reverse two-hybrid system, stress

Abstract

The reverse two-hybrid system allows the study of mutants having lost protein-protein interactions and is a valuable tool to help to understand the mechanisms of *in vivo* interactions between proteins. In a previous work, we described the use of the *CAN1* gene as a reporter gene for reverse two-hybrid system, that spontaneously produced high frequency of L-canavanine resistant clones. In this work, we show that heat shock did not affect the resistance frequency, while a pre-treatment of adenine starvation increased the number of resistant colonies.

Introduction

The two-hybrid system, first described in 1989 (Fields; Song, 1989), allows to study *in vivo* protein-protein interactions. In this system, activation of the reporter gene reflects the occurrence of interaction between the two hybrid proteins. The study of mutants which have lost interaction ability is equally important for a better understanding of these interactions. The reverse two-hybrid system is a variation of the conventional two-hybrid system and it is an important tool for selecting

these mutants, because the selection is driven against the hybrid proteins interaction (Vidal, 1997).

The use of reporter genes is essential in reverse as well as in the conventional two-hybrid system. The *CAN1 Saccharomyces cerevisiae* gene, which encodes a permease responsible for the import of L-arginine and its toxic analog L-canavanine. This gene was isolated by complementation tests and its molecular characterization was published in 1985 (Hoffmann, 1985). The *CAN1 Saccharomyces cerevisiae* gene was previously tested as a reporter gene for reverse two-hybrid system in our lab (Starling, 2000). YJ0Zcan^R, a L-canavanine resistant two-hybrid host strain was simultaneously transformed with pYESCAN1, which encodes the reporter gene *CAN1* under GAL1 promoter control, with pVA3 (encoding the hybrid Gal4 binding domain –GBD - in fusion with residues 72 to 390 of murine p53) and with pTD1 (encoding the hybrid Gal4 activation domain –GAD in fusion with SV40 LargeT antigen). The interaction between these two hybrid proteins activates transcription of the reporter gene, causing susceptibility to L-canavanine. However, this experiment resulted in a high frequency of canavanine resistant clones, showing distinctive size patterns: small and large colonies. The large colonies were unable to show any activation of another two-hybrid reporter gene, *LacZ* (Starling, 2000), present in the *Saccharomyces cerevisiae* chromosome host strain, while the small colonies showed weak reporter activation.

The present work examines if two stress conditions, adenine starvation and heat shock, can modify the frequency of L-canavanine resistant clones after the use of *CAN1* as a reporter gene in the reverse two-hybrid system.

Material and Methods

Strains and plasmids: The *Saccharomyces cerevisiae* strain YJ0Zcan^R (*MATa gal4Δ gal80Δ ura3-52 leu2-3 112 ade-1 his3 MEL-1 GAL1 – LacZ can^R*) was used as the two-hybrid host strain. The *E.coli* strain MC1061 (Raleigh *et al*, 1989) was used in plasmid manipulations.

The plasmids pYESCAN1 (Starling, 2000), pTD1 and pVA3 (CLONTECH) were used in two-hybrid experiments.

Media and cultures: Bacteria growth conditions and manipulation are described in Sambrook *et al.* (1989). Yeast culture and manipulation are described in Guthrie; Fink (1991).

Adenine starvation pre-treatment: Cells from a representative colony from transformation with pYESCAN1, pVA3 and pTD1 were cultivated in selective medium at 30°C for 24 hours in shaker. 10^5 cells/ml from this culture were inoculated in selective media with or without adenine and incubated in shaker at 30°C for 16 hours. Afterwards, 10^3 cells from this culture were plated on selective media with adenine and with or without 10µg/ml L-canavanine. The plates were incubated at 30°C for 10 days.

Heat shock: Cells from a representative colony from transformation with pYESCAN1, pVA3 and pTD1 were cultivated in selective media at 30°C for 72 hours. After wards, 10^4 cells from this culture were plated on selective media with or without 10µg/ml L-canavanine and incubated at 37°C by 24 hours or 30 minutes for heat shock and after that, incubated at 30°C for 10 days.

X-Gal assay: Cells from a representative colony were plated on a nitrocellulose filter covering a selective medium plate and incubated at 30°C for 3 days. The nitrocellulose filter with the colonies was frozen in liquid nitrogen. This nitrocellulose filter was soaked in Z-buffer (60mM Na_2HPO_4 , 40mM NaH_2PO_4 , 10mM KCL, 1mM MgSO_4 , 0.025% SDS p/v, 50mM β -mercaptoethanol) and 2% X-Gal solution and incubated at 37°C for 2 hours. X-Gal degradation confers blue color to the colony and when there is no degradation the colony remains white.

Results and Discussion

Adenine starvation pre-treatment

Adenine deprivation was used to promote starvation because YJ0Zcan^R is unable to produce adenine (it carries an *ade2* mutation) and the starvation could lead to increasing L-canavanine uptake, or reducing its use in protein synthesis. The YJ0Zcan^R yeast strain transformed with pYESCAN, pVA3 and pTD1 were cultivated in selective medium without adenine and its growth was monitored by 24 hours. After 16 hours of adenine starvation, cells have completely stopped growth (data not shown). 10⁵ cells of YJ0Zcan^R simultaneously transformed with pYESCAN1, pVA3 and pTD1 were incubated in selective media without adenine for 16 hours and plated on non-starvation (20µg/ml adenine) selective medium for the plasmid markers with or without 10µg/ml L-canavanine.

The adenine starvation pre-treatment promoted approximately 10-fold increase on the frequency of yeast colonies in plates with L-canavanine (figure 1). In both situations, with and without any pre-treatment, there were two kind of colonies: small (more frequent) and large ones (less frequent), similarly to what was described before for reverse two-hybrid assay using *CAN1* as a reporter gene (Starling, 2000). This emergence in high frequency of resistant colonies with different sizes only happens when the three components of the reverse two-hybrid assay are present: reporter gene *CAN1* and the two interacting hybrid proteins. When at least one of the components is missing, there is 100% cell survival in L-canavanine and they are all large colonies (data not shown). This indicates that there is no efficient alternative mechanism to L-canavanine uptake (the same conclusion was published in Urano *et al.*, 2000).

We have examined the activity of the *lacZ* reporter gene, also carried by YJ0Zcan^R yeast strain, to analyze if the activity of the β-galactosidase enzyme showed alteration on the two-hybrid interactions after adenine starvation. Cells submitted only to adenine starvation retain the blue color on an X-Gal assay, indicating transcription activation of the reporter

gene by protein-protein interaction. However, when a quantitative assay (ONPG degradation) was done, it was clear that adenine starvation reduced the activity of β -galactosidase (data not shown). After L-canavanine selection, independently of an adenine starvation pre-treatment or not, we observed that the small colonies were blue and the large colonies were white (data not shown). These results indicate that there is a higher frequency of L-canavanine resistant colonies (small ones) that were able to survive in the presence of L-canavanine, but were not able to form large colonies, and still retain the interaction between the two-hybrid proteins.

However, more studies can be necessary for a better understand this processes because it is not clear why or how the adenine starvation pre-treatment increases the emergence of L-canavanine resistant colonies when reverse two-hybrid assay is performed using *CAN1* as reporter gene. In fact, it is not clear what triggers this kind of behavior even in the absence of the pre-treatment.

Heat shock effect

Since starvation induced L-canavanine resistant clones, we wanted to test whether other types of stress would also modify the frequency of emergence of L-canavanine resistant colonies. We have chosen heat shock because several of its effects on cells are well known, such as the effects on transcription of housekeeping genes (Zanton; Pugh, 2004), and especially increasing expression of genes involved in protein synthesis, when compared with other stress mechanisms (Pillai, 2003). Heat shock with different temperatures has been used in studies of transcription regulation of specific heat shock genes (Karreman; Lindsey, 2005) and to analyze the effect of a proline analog in gene expression (Trotter, 2002).

We asked if heat shock could affect L-canavanine sensitivity in our yeast strain. 10^4 cells of the yeast strain transformed with pYESCAN1, pVA3 and pTD1 were plated on selective media and incubated at 30°C or 37°C for 30 minutes or for 24 hours and, after that, at 30°C for 72 hours.

In our experiments, heat shock at 37°C for 30 minutes (figure 2), after plating YJ0Zcan^R cells bearing the three components of the reverse two-hybrid assay on 10µg/ml L-canavanine, did not modify significantly the frequency of resistant colonies. Similar results were observed when we used heat shock for 24 hours (data not shown). However, the viability of the control plated without L-canavanine remained constant after 30 minutes of heat shock but decreased 50% after heat shock for 24 hours (data not shown). Therefore, it seems that the processes involved in the high frequency of L-canavanine resistant colonies are not influenced by heat shock induced processes.

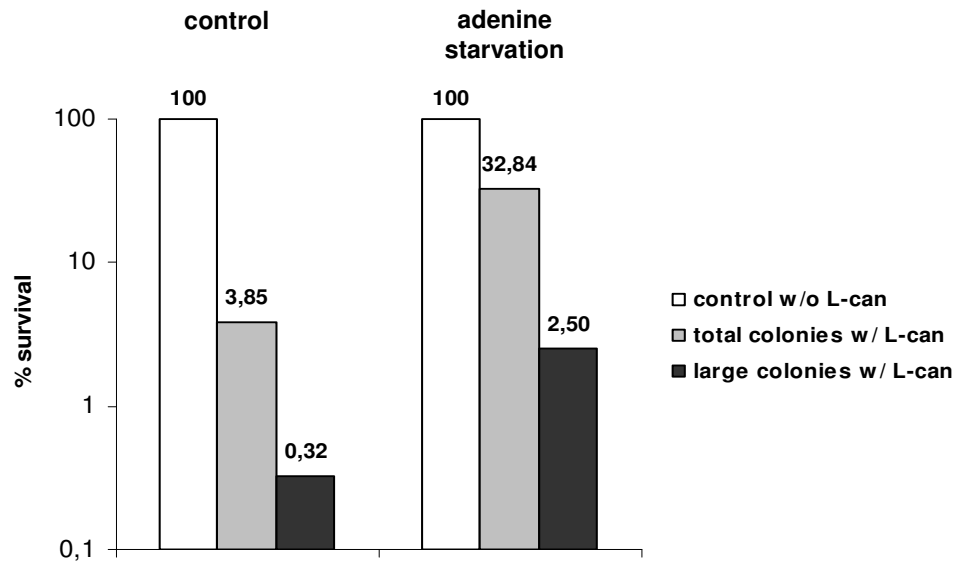


Figure 1: Frequency of L-canavanine resistant clones after adenine starvation. YJ0Zcan^R yeast strain transformed with pYESCAN1, pVA3 and pTD1 with or without adenine starvation were plated on media with or without 10µg/ml L-canavanine. The graph shows percent values. The values are the average of two experiments.

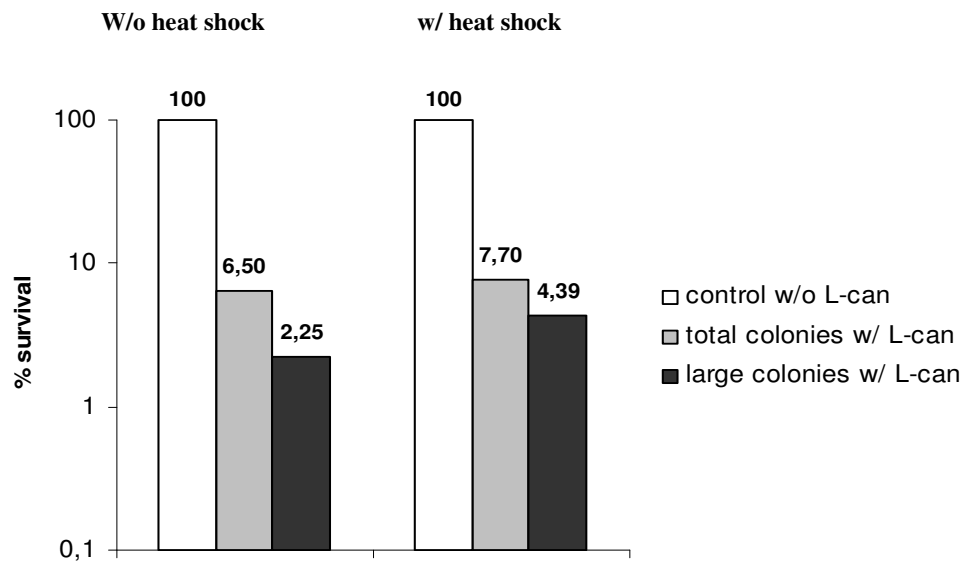


Figure 2: Frequency of L-canavanine resistant clones after heat shock. YJ0Zcan^R yeast strain transformed with pYESCAN1, pVA3 and pTD1 with or without 37°C heat shock for 30 minutes were plated on media with or without 10µg/ml L-canavanine. The graph shows perceptual values. The values are the average between two experiments.

Acknowledgments:

The authors wish to thank Capes for a graduate scholarship to Rosana C. Cruz.

References:

Fields, S.; Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-6.

Guthrie, C.; Fink, G.R. (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology* 194: 905p.

Hoffmann, W. (1985). Molecular characterization of the *CAN1* locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 11831-11837.

Karreman, R.J.; Lindsey, G.G. (2005). A rapid method to determinate the stress status of *Saccharomyces cerevisiae* by monitoring the expression of a Hsp12: green fluorescent protein (GFP) construct under the control of the Hsp12 promoter. *Journal of Biomolecular Screening* 10: 253-259.

Pillai, B. et al. (2003). Whole genome expression profiles of yeast RNA polymerase II core subunit, Rpb4, in stress and nonstress conditions. *The Journal of Biological Chemistry* 31: 3339-3346.

Raleigh, E.A.; Lech, I.C.; Brent, R. (1989). In current protocols in molecular biology eds. Asubel F.M. *et al.*, Publishing Associates and Wiley Interscience; New York, Unit. 1-4.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press* 2: 2100p.

- Starling, A.L.** (2000). Construção de Genes Repórteres Alternativos para Sistemas de Duplo-Híbrido em Levedura. Dissertação, Mestrado em Genética, U.F.M.G.
- Trotter, E.W. et al.** (2002). Misfolded proteins are competent to mediate a subset of the responses to heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 44817-44825.
- Urano, J. et al.** (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* Rheb G-protein is involved in regulating canavanine resistance and arginine uptake. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 276: 11198-11206.
- Vidal, M.** (1997). In Bartel e Fields (eds), The yeast two-hybrid systems. *Oxford University Press, NY*, 109-147.
- Zanton, S.J.; Pugh B.F.** (2004). Changes in genomewide occupancy of core transcriptional regulators during heat stress. *PNAS* 101: 16843-16848.

5.4 Aumento da sensibilidade à L-canavanina por interrupção de *ScRHEB*

Conforme mencionado na introdução, o gene *RHEB* codifica uma proteína que exerce importante função no metabolismo celular além de ser responsável pela regulação do importe de arginina (Aspuria & Tamanoi, 2004). O homólogo deste gene em levedura, *ScRHEB*, codifica uma proteína (ScRheb) que exerce influência na regulação do importe de arginina através de uma possível interação direta ou indireta sobre a proteína Can1p. Linhagens de leveduras que apresentam deleção em *ScRHEB*, exibem um fenótipo de maior sensibilidade à L-canavanina (Urano *et al.*, 2000).

Com o objetivo de tornar a linhagem YJ0Zcan^R mais sensível à L-canavanina e melhorar o desempenho de *CAN1* como repórter para sistema de duplo-híbrido reverso, foi realizada a construção de um cassete que contém o gene *ScRHEB* interrompido pelo gene *Kan^r*, que confere resistência a geneticina.

5.4.1 Construção do cassete de interrupção

A figura 5 mostra a representação da construção do cassete de interrupção. O plasmídeo pUC4k foi digerido com *PstI* liberando um fragmento de aproximadamente 1240pb que contém o gene *Kan^r*. O plasmídeo pWHA, que apresenta somente um sítio de restrição para *PstI* dentro do gene *ScRHEB*, também foi digerido com essa enzima. O fragmento contendo o gene *Kan^r* foi ligado ao plasmídeo pWHA e a confirmação da ligação foi feita através de digestão com a enzima *PstI* e visualização da banda correspondente ao gene *Kan^r* em gel de agarose. Em seguida, o vetor pWHAKan^r foi submetido à digestão com as enzimas de restrição *BamHI* e *SacI* para liberar um fragmento de aproximadamente 1900pb contendo o gene *ScRHEB* interrompido pelo gene *Kan^r* visualizado, após eletroforese, em gel de agarose (dados não mostrados).

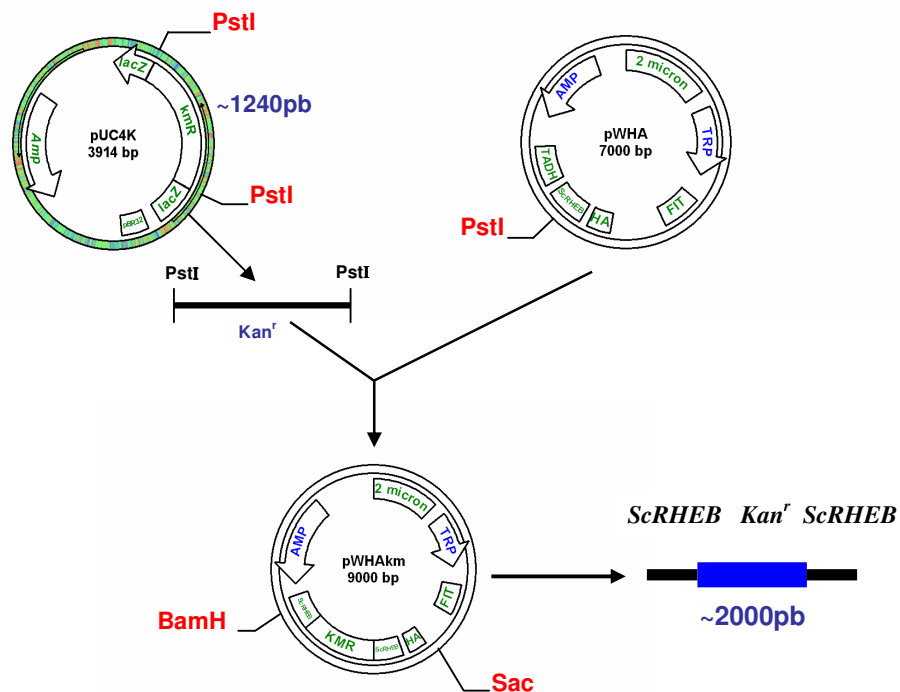


Figura 5: Representação esquemática da construção do cassete de interrupção *ScRHEB-Kan^r ScRHEB*.

5.4.2 Transformação de YJ0Zcan^R com o cassete de interrupção e seleção dos transformantes

Aproximadamente 1 µg de solução de DNA contendo a construção do cassete de interrupção foi usada para transformar a linhagem de levedura YJ0Zcan^R e a seleção de transformantes foi feita em placas contendo 200 µg/ml de genética.

Conforme descrito na Introdução, é uma característica intrínseca da levedura permitir que seqüência exógena de DNA se integre em seu genoma por meio de recombinação homóloga (Barr, 2003). No entanto, a eficiência desse tipo de transformação é menor que a de uma transformação com plasmídios epissômicos ou centroméricos, fazendo com que cresçam poucos transformantes em relação a uma transformação controle com plasmídio (figura 6). Foram realizadas 19 transformações com 1 µg de DNA sendo obtido um total de 58 transformantes. O DNA genômico desses transformantes foi extraído e usado como molde para uma reação de PCR com iniciadores

desenhados para o gene *ScRHEB* de levedura. O produto da reação de PCR foi visualizado em gel de agarose 1%. Uma amplificação de aproximadamente 550pb corresponde somente ao gene *ScRHEB* e uma amplificação de aproximadamente 1900pb corresponderia ao gene *ScRHEB* interrompido por *Kan^r*, isso indicaria a integração do cassete de interrupção ao genoma da levedura através de recombinação homóloga. Desses 58 transformantes, nenhum continha o cassete de interrupção, pois foi visualizada apenas uma banda de aproximadamente 550pb em gel de agarose (alguns deles mostrados na figura 7).

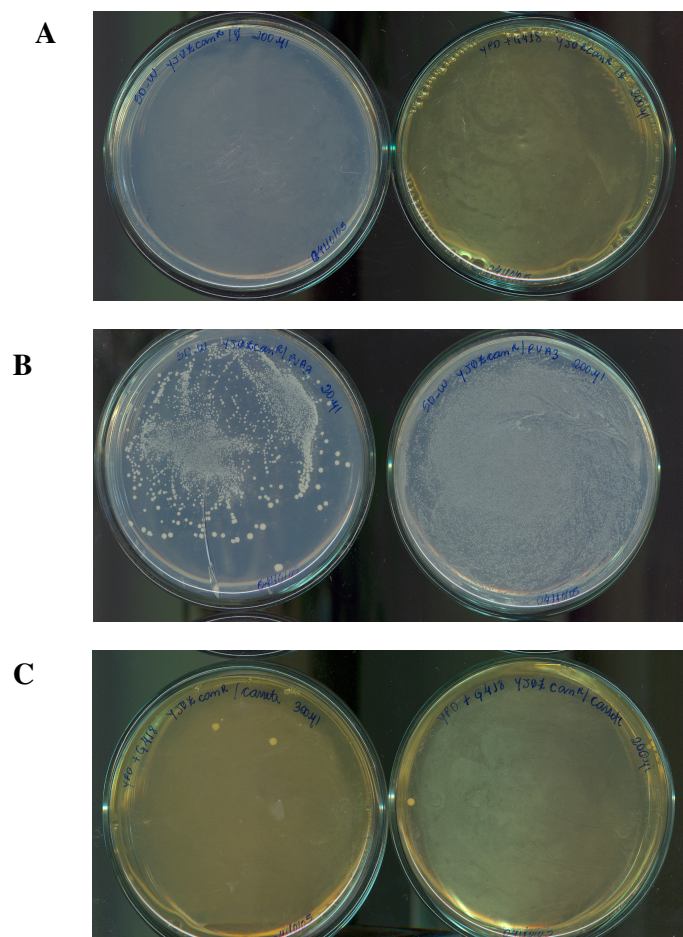


Figura 6: Transformação de YJZcan^R com o cassete de interrupção. A: controle negativo de transformação onde à linhagem YJ0Zcan^R foi adicionado água em vez de DNA e semeada em placas de SD-TRP e YPD contendo 200µg/ml de geneticina; B: controle positivo de transformação, onde a linhagem YJ0Zcan^R foi transformada com 1µg plasmídeo pVA3 e semeada em placas de SD-TRP; C: transformação de YJ0Zcan^R com 1µg do cassete de interrupção e semeada em placas YPD contendo geneticina na concentração de 200µg/ml.

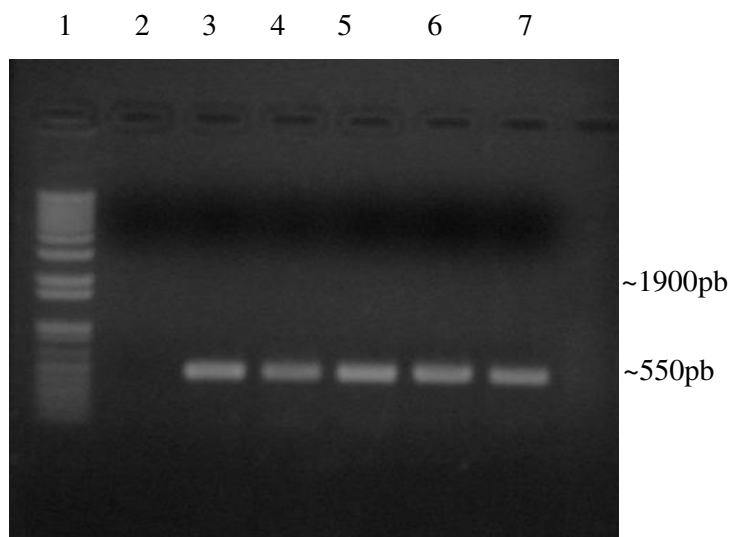


Figura 7: Gel de agarose mostrando produto de PCR para o gene *ScRHEB*. Canaleta 1: DNA padrão 1kb plus (Gibco); canaleta 2: reação de PCR sem o molde; canaleta 3: DNA de levedura não transformada; canaletas 4 a 7: leveduras transformantes com o cassete de interrupção.

A concentração de geneticina usada nesse experimento para seleção dos transformantes já havia sido utilizada antes com sucesso (Güldener *et al.*, 1996). Para tentar evitar a seleção de mutantes em nossas transformações, aumentamos a concentração de geneticina para 300µg/ml, sem obtenção de colônia alguma.

Uma outra abordagem experimentada foi um aumento na concentração de DNA (cassete) usado na transformação de levedura. Em uma transformação convencional, é usada 1µg de DNA de plasmídeo para cada transformação. Mesmo sendo 1µg de cassete de interrupção, uma quantidade bem maior, em equivalência molar, que o DNA de plasmídeo, a concentração deste foi aumentada para 10µg, oriunda de produto de PCR, e foram selecionados 200 transformantes de 4 transformações realizadas. Todos eles foram submetidos a PCR e observou-se apenas amplificação de banda de 550pb, indicando que em nenhum a interrupção tenha sido bem sucedida.

A utilização de cassetes de interrupção para estudos em *Saccharomyces cerevisiae* é bastante comum. Essa estratégia pode ser usada para construção de cassetes de interrupção em levedura, para serem utilizados em outros organismos, explorando a pequena região de homologia necessária para que

haja recombinação homóloga em levedura (Zaragoza, 2003). Uma outra aplicação seria o uso em pesquisa em linhagens industriais, produzindo variações otimizadas de acordo com a necessidade industrial (Walker *et al.*, 2005).

Em nossos experimentos, foi analisado um total de 258 transformantes e não foi possível a obtenção de uma linhagem contendo *ScRHEB* interrompido pelo gene de resistência à geneticina. Logo, todos os clones selecionados eram na verdade mutantes para resistência à geneticina impedindo assim, a continuidade dos experimentos. Novas tentativas devem ser realizadas, como por exemplo aumentar ainda mais a concentração de cassete a ser utilizado na transformação e/ou o número de transformações.

6. Discussão

Neste trabalho, foram estudados dois genes para possível uso em sistemas de duplo-híbrido direto e reverso de levedura: o da α -amilase pancreática de camundongo e o gene *CAN1* da própria *Saccharomyces cerevisiae*. Foi realizado também um estudo dos efeitos de duas condições de estresse sobre o percentual de sobrevivência a L-canavanina previamente observada durante a ativação do gene *CAN1*. Além disso, realizamos uma tentativa de disrupção do gene *ScrHEB* através da construção de um cassete de disrupção.

6.1 O gene da α -amilase

A pesquisa por genes que possam ser usados como repórteres alternativos em sistema de duplo-híbrido fez com que chegássemos aos genes que codificam enzimas amilolíticas. A atividade dessas enzimas, como por exemplo glicoamilase ou α -amilase, pode ser facilmente detectada através da visualização de um halo de degradação de amido através do cultivo de linhagens em placas contendo amido, expostas a vapores de iodo. Este protocolo é simples, rápido e demanda um baixo custo. Estas qualidades fizeram dessas amilases boas candidatas para uso como genes repórteres em sistema de duplo-híbrido de levedura.

Primeiramente foi analisado o gene da glicoamilase de *Aspergillus awamori* como gene repórter para uso em sistema de duplo-híbrido direto. No entanto, este gene não se mostrou viável para uso neste sistema quando foi colocado sob controle de promotores indutíveis (Starling *et al.*, 2003).

A α -amilase possui uma vantagem sobre a glicoamilase: esta enzima realiza múltiplos ataques catalíticos na molécula de amido, hidrolizando várias partes da molécula (Kuriki; Imanaka, 1999). Desta forma, neste trabalho resolvemos estudar o gene da α -amilase pancreática de camundongo como repórter para sistema de duplo-híbrido direto. Devido a um problema na construção da α -amilase sob controle de promotor PGK, não foi possível analisar a expressão desse gene sob controle de promotor constitutivo e conseqüentemente analisar a expressão desse gene nas linhagens de levedura

Y190 e HF7c, também usadas em ensaios de duplo-híbrido. Então decidimos analisar diretamente o comportamento deste gene sob controle de promotores indutíveis através da clonagem no vetor pYES2 usado na linhagem YJ0Zcan^R.

O gene da α -amilase se mostrou suficientemente eficiente para uso como gene repórter em sistema de duplo-híbrido podendo auxiliar no estudo de interações entre proteínas. O halo de degradação de amido observado no ensaio de triagem de duplo-híbrido (YJ0Zcan^R transformada com pYESamy, pVA3 e pTD1) foi pequeno em relação ao controle (IH1784 transformada com pESA), mas suficientemente visível nas placas contendo 0,1% de amido. Nós analisamos também a sensibilidade deste gene para uso em duplo-híbrido foi testada através da transformação da linhagem de levedura YJ0Zcan^R com proteínas que interagem fracamente ou que não interagem previamente estudadas em duplo-híbrido (da Silva, 2005). Nossos resultados mostraram que o gene da α -amilase não é sensível o suficiente para triagem de proteínas que interagem fracamente. Porém, esse gene repórter pode ser usado em triagem de proteínas que interagem fortemente.

Os ensaios de triagem de duplo-híbrido foram realizados cultivando os transformantes em meio YPD. Em ensaios de produção de α -amilase em transformantes cultivados em meio mínimo, não foi observada a presença do halo de degradação de amido nem mesmo na transformação controle (IH1784 transformada com pESA). Assim, a triagem de transformantes deve ser realizada em meio seletivo e o ensaio de α -amilase em meio YPD com o auxílio da técnica de carimbo. Essa técnica é necessária para a realização desse ensaio de qualquer maneira, uma vez que as colônias de transformantes usadas no ensaio de α -amilase morrem devido à exposição aos vapores de iodo e o transformante desejado deve ser recuperado de outra placa.

O plasmídeo usado para esta construção, pYES, é epissômico. Isso significa que o número de cópias presentes em cada célula não pode ser controlado. Logo, a quantidade da enzima produzida por célula é variável. Embora para alguns casos a utilização de plasmídeo epissômico não interfira no resultado da expressão gênica (Starling, 2000), seria interessante promover a análise da expressão desse gene quando esse se encontra em apenas uma

cópia, como por exemplo, integrado ao cromossomo da levedura como o gene *LacZ*. Embora esse experimento possa ser realizado, é possível que o gene da α -amilase presente em cópia única dentro da célula, não produza fenótipo detectável uma vez que nossos resultados mostraram um halo de degradação de amido pequeno (em relação ao controle) quando a linhagem YJ0Zcan^R transformada com pYESamy, pVA3 e pTD1 foi cultivada em placa contendo 0,1% de amido e exposta a vapor de iodo.

6.2 O gene *CAN1*

O gene *CAN1* de *Saccharomyces cerevisiae* foi previamente estudado em nosso laboratório para uso como repórter em sistema de duplo-híbrido reverso (Starling, 2000). Esse sistema é igualmente importante para o estudo de interações entre proteínas porque permite o estudo de mutantes que perderam a capacidade de interação pois a seleção é dirigida contra a seleção dos híbridos.

Para uso do gene *CAN1* como repórter, a levedura usada para esse fim, deve ser um mutante resistente a canavanina. Uma linhagem YJ0can^R foi selecionada em placa com L-canavanina para esse fim. As linhagens Y190, HF7c e CG1945 também foram testadas quanto à sensibilidade a L-canavanina mas a linhagem YJ0Z foi escolhida por não produzir uracila, marca de seleção do plasmídio pYES2, usado na construção de *CAN1* sob controle de promotor indutível.

O gene *CAN1* se mostrou viável para uso como repórter para o sistema de duplo-híbrido reverso quando analisado sob controle de promotor constitutivo devolvendo sensibilidade a L-canavanina a linhagem YJ0Zcan^R. Quando o gene *CAN1* foi colocado sob controle de um promotor indutível e submetida a ensaio de duplo-híbrido reverso através da transformação de YJ0Zcan^R com pYEScan, pVA3 e pTD1, uma significativa frequência de mutagênese foi detectada. Foram observados dois tipos diferentes de sobreviventes: colônias pequenas e colônias grandes. Através de um ensaio de X-Gal para esses clones mutantes detectou-se diferenças entre essas colônias. As colônias pequenas ficaram azuis, porém em com tonalidades diferentes do controle, indicando que a interação entre p53 e Large-T ainda ocorria, embora

fracamente. As colônias grandes ficaram brancas, indicando total perda da interação. Os clones mutantes demonstraram ser resistentes mesmo quando altas concentrações de L-canavanina foram usadas (100µg/ml).

O gene *CAN1* pode ser usado em ensaios de duplo-híbrido reverso desde que a concentração de L-canavanina usada para seleção seja elevada. Mesmo assim, devem ser usados protocolos adicionais de eliminação de falso-positivo como por exemplo, a ativação de mais de um gene repórter para duplo-híbrido reverso como *URA3* ou *CYH2*. Porém, muitas vezes a utilização de protocolos adicionais pode não ser viável por consumir tempo e reagentes. Assim, seria interessante o desenvolvimento de protocolos simplificados que possam ser usados em conjunto com o gene repórter *CAN1* no intuito de diminuir a mutagênese e tornar esse sistema mais confiável para estudos em duplo-híbrido reverso.

6.3 Estudo do efeito de estresse na sobrevivência após ativação do gene *CAN1*

A mutagênese ocorre espontaneamente tanto em linhagens haplóides quanto linhagens diplóides de *Saccharomyces cerevisiae* e o gene *CAN1* é bastante usado em estudos de mutagênese através da análise da frequência de reversão de resistência para sensibilidade (Ohnishi *et al.*,2004). Nós estudamos o efeito de duas condições de estresse na mutagênese previamente observada no gene *CAN1* após sua ativação. Duas condições foram escolhidas: privação de adenina e choque térmico.

Para a realização do ensaio de privação de adenina, foi necessário primeiramente estabelecer o período de tempo no qual a linhagem YJ0Zcan^R consome todo seu estoque de adenina. Para isso, foi feito um acompanhamento através da contagem de um volume fixo de leveduras (transformadas com pYEScan, pVA3 e pTD1) a partir de 10 horas de incubação em meio seletivo sem adenina por um período total de 24 horas. Observamos que com 10 horas de incubação, a linhagem já havia consumido o estoque endógeno de adenina, permanecendo o número de células presentes na cultura estável até as 24 horas de incubação (dados não mostrados). No entanto, escolhemos 16 horas de privação de adenina para a realização dos

experimentos porque esse tempo pode ser considerado um “over night” e facilitaria o desenvolvimento dos experimentos.

Ao observarmos em microscópio óptico as leveduras provenientes do cultivo de 16 horas sem adenina, foi possível notar algumas diferenças morfológicas. Leveduras que sofreram privação de adenina exibiram um fenótipo de poucos brotos além de um aumento significativo no seu tamanho, quando comparadas com o controle (leveduras que não sofreram privação de adenina). Embora diferenças na morfologia ou no metabolismo de leveduras quando estas se encontram sob algum tipo de estresse tenham sido relatadas (Eisler *et al.*, 2005 e Onodera; Ohsumi, 2005), não foi encontrado na literatura nada que explique as diferenças observadas em nossos experimentos de privação de adenina. Acreditamos ser esse, um fenótipo normal apresentado sempre que leveduras sofrem algum tipo de estresse pois esse fenótipo se repetiu em todos os experimentos de estresse por ausência de adenina.

A privação de adenina como condição de estresse foi escolhida porque a linhagem de levedura em questão é auxotrófica para essa base nitrogenada esperava-se um aumento no importe de L-canavanina devido a um aumento generalizado do importe de nutrientes, uma vez que a divisão celular seria temporariamente interrompida pela privação de adenina. Entretanto, os resultados demonstraram o contrário. A privação de adenina por 16 horas aumentou significativamente a sobrevivência à L-canavanina. Também foi realizado um ensaio de X-Gal em um número representativo de colônias isoladas do experimento de privação de adenina (dados não mostrados). Foi observado o aparecimento de colônias pequenas azuis para o ensaio de X-Gal e colônias grandes brancas para o teste de X-Gal, sugerindo diferenças nos clones resistentes à L-canavanina, como já discutido no item anterior. Portanto, privação de adenina não foi capaz de diminuir a sobrevivência visualizada após a ativação do gene *CAN1*, porém, esse ensaio pode ser realizado quando uma elevada frequência de sobrevivência é interessante.

Outro mecanismo de estresse estudado foi o choque térmico. Na literatura, já é conhecido que o choque térmico afeta diretamente a expressão de vários genes e várias vias metabólicas, influenciando diretamente no

metabolismo celular e nos mecanismos de respostas a condições de estresse (Zanton; Pugh, 2004; Karreman; Lindsey, 2005; Seppä *et al.*, 2005).

Primeiramente, as células foram submetidas ao choque térmico de 37°C por 24 horas. Observamos que 24 horas de incubação serviram apenas para reduzir a frequência de clones viáveis na placa seletiva. Nós especulamos se 24 horas não seria tempo demais para incubação a 37°C podendo esse tempo ser uma condição de estresse muito elevada e uma perda da viabilidade em quase 50% (dados não mostrados) poderia estar impedindo uma interpretação mais sensível dos resultados. Foi então realizada uma pesquisa bibliográfica na busca por melhores condições de incubação para experimentos de choque térmico que possam afetar a expressão gênica. Decidimos diminuir o tempo de incubação para 30 minutos, concomitantemente com um aumento na concentração de L-canavanina para 40µg/ml. No entanto, o que foi observado se refletiu apenas na viabilidade celular, que foi mantida como no controle, não havendo novamente interferência na sobrevivência dos clones à L-canavanina (dados não mostrados). Contudo, outras temperaturas não muito extremas podem ser testadas bem como outros intervalos de tempo para melhorar o estudo dos efeitos desse mecanismo de estresse.

6.4 Construção do cassete de disrupção para o gene *ScRHEB*

A disrupção gênica é um mecanismo largamente utilizado para o estudo de função de um gene. O uso do cassete de disrupção para interromper a função de um determinado gene é um artifício muito facilitado em *Saccharomyces cerevisiae* devido à sua capacidade de recombinação homóloga. Construímos um cassete de disrupção para interromper o gene *ScRHEB* da linhagem YJ0Zcan^R usada em nossos experimentos de duplo-híbrido reverso, o que deveria aumentar a sensibilidade linhagem à L-canavanina. Embora a construção do cassete tenha sido bem sucedida, não foi possível a seleção de transformantes contendo o fenótipo desejado. A seleção foi feita em placas contendo 200µg/ml de geneticina, condição em que crescem apenas mutantes de resistência para essa droga. Quando aumentamos a concentração de geneticina para 300µg/ml, também não obtivemos nenhum

transformante e também nenhum mutante de resistência. É possível que essa concentração seja alta demais até para crescimento de mutantes. Quando aumentamos a quantidade de DNA do cassete usado em cada transformação para 10µg, obtivemos ainda mais mutantes, embora a análise de PCR para todas as amostras mostrasse que nenhum dos clones selecionados em placa contendo geneticina continham o cassete de interrupção. Novas tentativas devem ser realizadas aumentando a concentração do cassete e o número de transformações para tentar obter transformante contendo o gene *ScRHEB* interrompido.

7. Conclusão

Com base nos resultados apresentados ao longo deste trabalho, é possível concluir que:

- ✓ O gene da α -amilase pancreática de camundongo se mostrou suficientemente sensível para uso como repórter em duplo-híbrido direto, desde que não seja usado para pesquisar interações fracas;
- ✓ O gene *CAN1* de *Saccharomyces cereviaie* pode ser usado como repórter em sistema de duplo-híbrido reverso desde que seja usado para verificar falta de interação de proteínas previamente mutadas ou seja usada uma concentração de pelo menos 200 $\mu\text{g/ml}$ de L-canavanina para triagem;
- ✓ A partir dos resultados de privação de adenina como condição de estresse, foi possível verificar um aumento na frequência de clones resistentes à L-canavanina quando se usa o gene *CAN1* como repórter em aproximadamente 10 vezes o aparecimento desses;
- ✓ Com base nos resultados de choque térmico como condição de estresse, foi possível concluir que as condições testadas não aumentaram a frequência de clones resistentes à L-canavanina no uso do gene *CAN1* como repórter.

8. Referências Bibliográficas

- Aho, S. et al.** (1997). A novel reporter gene MEL1 for the yeast two-hybrid system. *Analytical Biochemistry* 253: 270-272.
- Asami, Y. et al.** (2002). Effect of the DNA topoisomerase II inhibitor Vp-16 on illegitimate recombination in yeast chromosomes. *Gene* 291:251-27.
- Aspuria, P.J.; Tamanoi, F.** (2004). The Rheb family of GTP-binding proteins. *Cellular Signalling* 16: 1105-1112.
- Astolfi Filho, S. et al.** (1986). Stable yeast transformants that secrete functional α -amylase encoded by cloned mouse pancreatic cDNA. *Bio/technology* 4: 311-315.
- Barr; Maureen M.** (2003). Super models. *Physiol Genomics* 13: 15-24.
- Barz, T.; Ackermann, K.; Pyerin, W.** (2002). A positive control for the green fluorescent protein-based one-hybrid system. *Analytical Biochemistry* 304: 117-121.
- Breedon, L.; Nasmith, K.** (1985). Regulation of the gene. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol.* 50: 643-650.
- Cagney, G.; Uetz, P.; Fields, S.** (2001). Two-hybrid analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* 26S proteasome. *Physiol Genomics* 7: 27-34.
- Causier, B.; Davies, B.** (2002). Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Molecular Biology* 50: 855-870.
- Chattopadhyay, S.; Pearce, D.A.** (2002). Interaction with Btn2p is required for localization of Rsg1p:Btn2p-mediated changes in arginine uptake in *Saccharoyces cerevisiae*. *Eukariotic Cell* 4, 1: 606-612.

- Chen, Q. et al.** (2004). A yeast two-hybrid technology-based system for the discovery of PPAR γ agonist and antagonist. *Analytical Biochemistry* 335: 253-259.
- Da Silva, C.C.** (2005). Estudo da atividade transcricional e interação das proteínas mat A-2 e mat A-3 de *Neurospora crassa* usando o sistema de duplo-híbrido. Dissertação, Mestrado em Genética, U.F.M.G.
- Dzierzbicki, P. et al.** (2003). Repair of oxidative damage in mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the MSH1-dependent pathway. *DNA Repair* 3: 403-411.
- Eisler, H.; Fröhlich, K.; Heidenreich, E.** (2004). Starvation for an essential amino acid induces apoptosis and oxidative stress in yeast. *Experimental Cell Research* 300:345-353.
- Endoh, H.; Walhout, A.J.M.; Vidal, M.** (2000). A green fluorescent protein-based reverse two-hybrid system: Application to the characterization of large numbers of potential protein-protein interactions. *Methods in Enzymology* 328: 74-88.
- Felipe, K.S. et al.** (2004). Correlation between ligand-receptor affinity and transcription readout in a yeast three-hybrid system. *Biochemistry* 43: 10353-10363.
- Feng, S. et al.** (2004). A yeast one-hybrid system to detect methylation-dependent DNA-protein interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313: 922-925.
- Fields, S.; Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-6.
- Fields, S.** (2005). High-throughput two-hybrid analysis. *FEBS journal* 272: 5391-5399.

- Gietz, R.D. et al.** (1997). Identification of proteins that interact with a protein of interest: applications of the yeast two-hybrid system. *Molecular & Cellular Biochemistry* 172: 67-79.
- Goffeau, A. et al.** (1996). Life with 6000 genes. *Science* 274: 546-552.
- Guldener, U. et al.** (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research* 13, 24: 2519-2524.
- Guthrie, C.; Fink, G.R.** (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymology* 194: 905p.
- Harju, S.; Fedosyuk, H.; Peterson, K.R.** (2004). Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC Biotechnology* 4: 1-6.
- Hoffmann, W.** (1985). Molecular characterization of the *CAN1* locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 21, 260: 11831-11837.
- Hook, B. et al.** (2005). RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: Affinity, sensitivity, and enhanced library screening. *RNA* 11, 2: 227-233.
- Ito, T. et al.** (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Genetics* 98, 8: 4569-4574.
- Ito, T. et al.** (2002). Roles for the two-hybrid system in exploration of the yeast protein interactome. *Molecular & Cellular Proteomics* 1: 561-566.
- Jaeger, S.; Eriane, G.; Martin F.** (2004). Results and prospects of the yeast three-hybrid system. *FEBS Letters* 556: 7-12.

- Karreman, R.J.; Lindsey, G.G.** (2005). A rapid method to determinate the stress status of *Saccharomyces cerevisiae* by monitoring the expression of a Hsp12: green fluorescent protein (GFP) construct under the control of the Hsp12 promoter. *Journal of Biomolecular Screening* 10: 253-259.
- Keegan, L.; Gill, G.; Ptashne, M.** (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231: 699-704.
- Koloteva, N.; Hughes, J.M.X.; McCarthy, J.E.G.** (1998). Reporter genes and their use in studying yeast gene expression. *Methods in Microbiology* 26: 139-159.
- Kuriki, T.; Imanaka, T.** (1999). The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87: 557-565.
- Leanna, C.A.; Hannink, M.** (1996). The reverse two-hybrid system: a genetic scheme for selection against specific protein/protein interactions. *Nucleic Acid Res* 24: 3341-7.
- Li, B.; Fields, S.** (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *Faseb J.* 7: 957-963.
- Liu, Y.; Liu, N.; Zhao, H.** (2005). Inferring protein-protein interactions through high-throughput interaction data from diverse organisms. *Bioinformatics* 21, 15: 3279-3285.
- Mager, W. H.; Winderickx, J.** (2005). Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends in Pharmacological Sciences* 26, 5: 255-273.

- Meng, X.; Brodsky, M. H.; Wolfe, S. A.** (2005). A bacterial one-hybrid system for determining the DNA-binding specificity of transcription factors. *Nature* 23, 8: 988-994.
- Ohnishi, G. et al.** (2004). Spontaneous mutagenesis in haploid and diploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325: 928-933.
- Onodera, J.; Ohsumi, Y.** (2005). Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *The Journal of Biological Chemistry* 36:31582-31586.
- Paziewska, A. et al.** (2005). The binding activity of yeast RNAs to yeast hek2p and mammalian hnRNP K proteins, determined using the three-hybrid system. *Cellular & Molecular Biology* 10: 227-235.
- Putz, U.; Skehel, P.; Khul, D.** (1996). *Nucleic Acids Research* 24: 4838-4840.
- Raleigh, E.A.; Lech, I.C.; Brent, R.** In current protocols in molecular biology eds. Asubel F.M. et al., Publishing Associates and Wiley Interscience; New York, Unit. 1-4, (1989).
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press* 2: 2100p.
- Scorpioni, R.C. et al.** (1993) A new promoter probe vector for *Saccharomyces cerevisiae* using fungal glucoamylase cDNA as the reporter gene. *Yeast* 9: 599-605.
- Seppä, L.; Hänninen, A.L.; Makarow, M.** (2004). Upregulation of the Hsp104 chaperone at physiological temperature during recovery from thermal insult. *Molecular Microbiology* 52: 217-225.

- Sherman, F.** (2001) An Introduction to the Genetics and Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. www.urmc.rochester.edu/smd/biochem/yeast.
- Starling, A.L.** (2000). Construção de Genes Repórteres Alternativos para Sistemas de Duplo-Híbrido em Levedura. Dissertação, Mestrado em Genética, U.F.M.G.
- Starling, A.L. et al.** (2003). Evaluation of alternative reporter genes for the yeast two-hybrid system. *Genetics and Molecular Research 2*: 124-135.
- Tan, T.H.; Wallis, J.; Levine, A.J.** (1986). Identification of the p53 protein domain involved in formation of the simian virus 40 large T-antigen –p53 protein complex. *Journal of Virology 59*:574-583.
- Tong, A. et al.** (2004). Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science, 303*: 808-813.
- Uetz, P. et al.** (2006). Herpesviral protein networks and their interaction with the human proteome. *Science, 311*: 239-242.
- Urano, J. et al.** (2000). The *Saccharomyces cerevisiae* Rheb G-protein is involved in regulating canavanine resistance and arginine uptake. *The Journal of Biological Chemistry 15, 276*: 11198-11206.
- Vidal, M.** (1997). In Bartel e Fields (eds), The yeast two-hybrid systems. *Oxford University Press, NY*, 109-147.
- Vidal, M.; Endoh, H.** (1999). Prospects for drug screening using the reverse two-hybrid system. *Tibtech 17*: 374-381.
- Vidal, M.; Legrain, P.** (1999). Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems. *Nucleic Acid Research 4, 27*: 919-929.

Vidalain, P. et al. (2004). Increasing specificity in high-throughput yeast two-hybrid experiments. *Methods* 32: 363-370.

Walker, M. et al. (2005). PCR-based gene disruption and recombinatory marker excision to produce modified industrial *Saccharomyces cerevisiae* without added sequences. *Journal of Microbiological Methods* 02252: 01-12.

www.stratagene.com The CytoTrap two-hybrid system.

Zanton, S.J.; Pugh B.F. (2004). Changes in genomewide occupancy of core transcriptional regulators during heat stress. *PNAS* 48: 16843-16848.

Zaragoza, Oscar (2003). Generation of disruption cassettes in vivo using a PCR product and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Microbiological Methods* 52: 141-145.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)