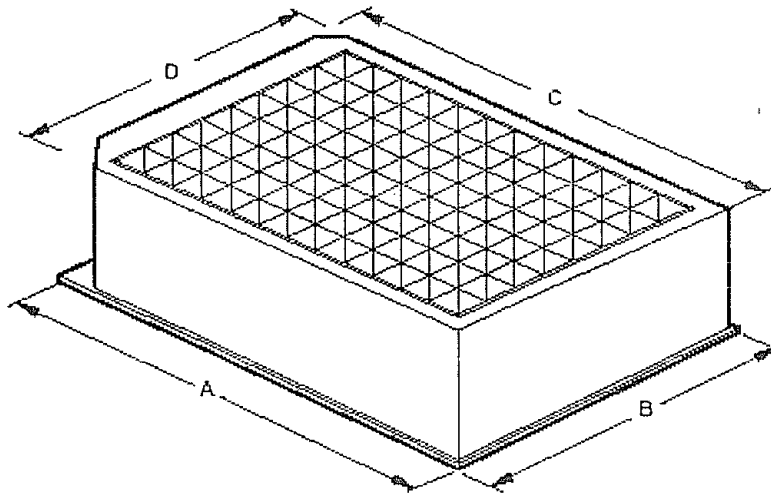


ERICA MARIA DE QUEIROZ

**SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO: DOIS NOVOS  
MÉTODOS DE TRIAGEM BASEADOS EM  
SELEÇÃO EM MEIO LÍQUIDO**



Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Geral

2005

ICB

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

ERICA MARIA DE QUEIROZ

**SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO: DOIS NOVOS  
MÉTODOS DE TRIAGEM BASEADOS EM  
SELEÇÃO EM MEIO LÍQUIDO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Dr. José Miguel Ortega

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Geral

2005

Apoio financeiro: CAPES

A Deus, pela oportunidade.

Aos meus pais e irmãos, pelo incentivo e paciência.

Ao Julio, pelo amor, companhia e pelo apoio moral e estatístico.

A Sasa, Ferdi e Mary, pela amizade.

# 1. AGRADECIMENTOS

Agradeço, em especial:

Ao Miguel, exemplo de profissional, pela orientação, aprendizado e amizade.

Agradeço também:

À Rosana, pelo apoio técnico incondicional.

Aos amigos do laboratório, pela agradável convivência.

Aos laboratórios dos professores Mônica Rodriguez Bucciarelli, Carlos Edmundo Salas Bravo, Sérgio Costa Oliveira, Ricardo Tostes Gazzinelli, Marcelo Porto Bemquerer, Cláudio Antonio Bonjardim, pelos equipamentos e/ou reagentes disponibilizados.

Às professoras Mônica Rodriguez Bucciarelli, Élide Mara Leite Rabelo e Vânia Ferreira Prado pela disponibilidade na análise de meu projeto de Mestrado.

Aos amigos do Curso de Pós-graduação em Genética, pela convivência.

À Marina, secretária do Curso de Pós-graduação em Genética, pela competência.

E a todos, que por esquecimento não foram citados, mas que torceram pela realização deste trabalho.

## 2. SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	i
SUMÁRIO .....	ii
LISTAS .....	v
Lista de Figuras .....	v
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	viii
RESUMO .....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
O sistema de duplo-híbrido .....	1
Vantagens do sistema de duplo-híbrido.....	6
Desvantagens do sistema de duplo-híbrido.....	7
Modificações da metodologia de duplo-híbrido.....	12
2. JUSTIFICATIVA.....	16
2b. OBJETIVO GERAL .....	17
2b1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1 MICRORGANISMOS .....	18
BACTÉRIAS.....	18
Meios de cultura para bactérias .....	18
Manutenção e estoque de bactérias .....	19
Antibiótico .....	19
LEVEDURAS .....	19
Meios de cultura para leveduras .....	20
Manutenção e estoque de leveduras .....	20
Complementos para meios de cultura de levedura: aminoácidos e bases nitrogenadas .....	21
3.2 PLASMÍDIOS .....	21
3.3 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE.....	22

3.4 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES .....	23
3.5 ELETROPORAÇÃO DE BACTÉRIAS .....	24
3.6 MINI-PREPARAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIO BACTERIANO ...	24
3.7 TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS UTILIZANDO ACETATO DE LÍTIO ..	25
3.8 MINI-PREPARAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIO DE LEVEDURA .	27
3.9 TESTE DE MARCAS .....	28
3.10 ENSAIO PARA ESTUDO DE ATIVAÇÃO DE GENE REPÓRTERE <i>HIS3</i> ....	28
3.11 ENSAIO PARA ESTUDO DE ATIVAÇÃO DE GENE REPÓRTER <i>LACZ</i> .....	29
3.12 ENSAIO DE MEDIDA DE DENSIDADE DO MEIO LÍQUIDO.....	30
Medida de densidade em Espectrofotômetro .....	30
Medida de densidade em leitor de placas de ELISA.....	30
3.13 ANÁLISE DE DADOS .....	31
3.14 SELEÇÃO DE DUPLO-HÍBRIDO EM PLACAS DE MEIO SÓLIDO.....	32
3.15 PROTOCOLO DE SELEÇÃO COM DILUIÇÕES.....	33
3.16 PROTOCOLO DE SELEÇÃO ROBOTIZÁVEL .....	35
3.17 PROTOCOLO DE COMPETIÇÃO EM CULTURA ÚNICA.....	36
3.18 TRIAGEM DE BIBLIOTECA COM SELEÇÃO EM CULTURA ÚNICA .....	36
4. RESULTADOS.....	38
4.0 Interação modelo para sistema de duplo-híbrido .....	38
4.1 Interação modelo em leveduras HF7c e Y190.....	38
4.1b Recuperação de clones positivos em meio líquido .....	41
4.2 Metodologia de seleção robotizável.....	48
4.3 Correspondência colônia-poço .....	56
4.4 Metodologia de seleção em cultura .....	58
4.4.1 Distinção entre competidores utilizando leveduras HF7c e Y190 .....	58
4.4.2 Crescimento em meio líquido em função de diferentes concentrações de inóculo de leveduras competidoras.....	62
4.4.3 Simulação de competição entre interações fortes e fracas.....	64
4.4.4 Biblioteca modelo para sistema de mono-híbrido .....	67
4.4.5 Triagem da biblioteca de mutantes de mTead1(1-134) .....	68
5. DISCUSSÃO.....	77

5.1 Viabilidade da seleção em meio líquido (segregação em poços de placas <i>deepwell</i> ) .....	77
5.2 Equivalência entre o número de colônias e poços crescidos.....	80
5.3 Comparação entre leveduras: Y190 é mais favorável .....	81
5.4 Efeito da presença de clones negativos .....	82
5.5 Rendimento de clones ativadores fortes.....	84
5.6 Viabilidade da seleção em cultura única: vantagens e desvantagens .....	85
5.7 Seleção de duplo-híbrido em larga escala.....	87
6. CONCLUSÕES.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90



### 3. LISTAS

#### Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Desenho esquemático de sistema de duplo-híbrido.....	5
<b>Figura 2:</b> Desenho esquemático da proteína mTead1.....	67
<b>Figura 3:</b> Desenho esquemático dos plasmídios utilizados neste trabalho.....	19
<b>Figura 4:</b> Testes para estabelecimento de protocolo de diluições de culturas líquidas.....	34
<b>Figura 5:</b> Comportamento de leveduras <i>S. cerevisiae</i> da linhagem HF7c com interação de duplo-híbrido após 24hs de crescimento e após diluições.....	40
<b>Figura 6:</b> Comportamento de leveduras <i>S. cerevisiae</i> da linhagem Y190 com interação de duplo-híbrido após 24hs de crescimento e após diluições.....	43
<b>Figura 7:</b> Estabelecimento do protocolo de diluições utilizando leveduras <i>S. cerevisiae</i> HF7c.....	44
<b>Figura 8:</b> Estabelecimento do protocolo de diluições utilizando leveduras <i>S. cerevisiae</i> Y190.....	46
<b>Figura 9:</b> Esquema do protocolo de transformação e seleção de duplo-híbrido robotizável baseadas na interação entre as proteínas p53 e <i>largeT</i> .....	53

<b>Figura 10:</b> Comparação entre seleção em placas e robotizável em leveduras <i>S. cerevisiae</i> HF7c.....	54
<b>Figura 11:</b> Comparação entre seleção em placas e robotizável em leveduras <i>S. cerevisiae</i> Y190.....	55
<b>Figura 12:</b> Proporção entre número de colônias e seu correspondente em poços na placa <i>deepwell</i> esperado por distribuição de Poisson.....	57
<b>Figura 13:</b> Comportamento de leveduras <i>S. cerevisiae</i> da linhagem HF7c com interação de duplo-híbrido.....	60
<b>Figura 14:</b> Comportamento de leveduras <i>S. cerevisiae</i> da linhagem Y190 com interação de duplo-híbrido.....	61
<b>Figura 15:</b> Ativação de gene repórter <i>HIS3</i> por duplo-híbrido de interação forte, negativa ou fraca e crescimento de leveduras <i>S. cerevisiae</i> Y190 em meio líquido..	63
<b>Figura 16:</b> Comparação de crescimento e de intensidade de ativação de gene repórter <i>LacZ</i> de clones Y190:mTead1(1-134)-UV selecionados em cultura única ou em placas.....	71
<b>Figura 17:</b> Análise de ativação de genes repórteres para clones Y190:mTead1(1-134)-UV selecionados em cultura única ou em placas.....	74
<b>Figura 18:</b> Proporção entre número de colônias e seu correspondente em 8 poços na placa <i>deepwell</i> segundo distribuição de Poisson.....	80

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Descrição dos genótipos, genes repórteres e marcadores genéticos das leveduras hospedeiras.....	20
<b>Tabela 2:</b> Complementos para meios de cultura de leveduras.....	21
<b>Tabela 3:</b> Descrição dos plasmídios utilizados neste trabalho.....	22
<b>Tabela 4:</b> Simulações de seleção com sistema de duplo-híbrido.....	38
<b>Tabela 5:</b> Número médio de colônias crescidas em seleção convencional em placas utilizando leveduras <i>S. cerevisiae</i> HF7c e diferentes quantidades de pPRESA.....	49
<b>Tabela 6:</b> Número médio de colônias crescidas em seleção convencional em placas utilizando leveduras <i>S. cerevisiae</i> Y190 e diferentes quantidades de pPRESA.....	49
<b>Tabela 7:</b> Ensaio de competição entre leveduras <i>S. cerevisiae</i> Y190 albergando duplo-híbrido de interação forte, negativa e fraca.....	66
<b>Tabela 8:</b> Número de clones isolados na seleção em cultura única e em placas nas quatro triagens da biblioteca de mutantes de mTead1(1-134).....	64

## Lista de Abreviaturas e Siglas

µg, micrograma ( $10^{-6}$  g)

$\mu\text{L}$ , microlitro ( $10^{-6}$  L)

$\mu\text{M}$ , micromolar ( $10^{-6}$  M)

$^{\circ}$ , graus Celsius

3AT, 3-aminotriazol

Amp, ampicilina

cDNA, DNA complementar ao mRNA

OD, densidade óptica

DNA, ácido desoxirribonucléico

DNTP, desoxirribonucleosídeos trifosfato

EDTA, Etileno diamino tetra-acetato de sódio

EtBr, brometo de etídio

g, gramas

Gal4DA, domínio de ativação transcricional da proteína Gal4

Gal4DL, domínio de ligação em DNA da proteína Gal4

His, aminoácido histidina

KCl, cloreto de potássio

*LacZ*, gene da beta-galactosidase

LB, meio Luria Bertani

Leu, aminoácido leucina

LiAc, Acetato de lítio

M, Molar

Mg, miligrama ( $10^{-3}$  g)

$\text{MgCl}_2$ , cloreto de magnésio

$\text{MgSO}_4$ , sulfato de magnésio

ML, mililitro ( $10^{-3}$  L)

mRNA, ácido ribonucléico mensageiro

NaCl, cloreto de sódio

NaI, iodeto de sódio

Ng, nanogramas ( $10^{-9}$  g)

ONPG, o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo

PCR, Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PEG, polietilenoglicol

PH, potencial de hidrogênio

RNA, ácido ribonucléico

Rnase, ribonuclease

Rpm, rotações por minuto

SD, meio de cultura mínimo para levedura

SD<sup>s</sup>, meio de cultura SD seletivo para a prototrofia conferida pelos marcadores genéticos contidos em plasmídios

SDL, seleção em meio SD líquido

SDS, seleção em meio SD sólido

SDS, Dodecil Sulfato de Sódio

SE, erro padrão

SOB, meio de cultura para bactéria

ss-DNA, DNA de espermatozoides de Salmão desnaturado

Tris, tris-(hidroximetil)-aminometano

Trp, aminoácido triptofano

URA, base nitrogenada uracila

UV, luz ultravioleta

V, Volts

W, Watts

X-gal, substrato cromogênico 5-bromo-cloro-3-idolil-beta-D-galactosídeo

YNB, Yeast Nitrogen Base

YPD, meio rico para cultivo de leveduras

X

## 4. RESUMO

O sistema de duplo-híbrido em leveduras tem sido rotineiramente empregado no estudo de interações proteína-proteína. Convencionalmente, a seleção de clones positivos é conduzida por recuperação de diplóides ou co-transformação e semeadura em placas. Entretanto, o elevado número de placas necessárias para a triagem completa de uma biblioteca torna o método de seleção trabalhoso e tedioso. Neste trabalho, foi desenvolvido um novo método de seleção de duplo-híbrido conduzido em meio líquido, com duas variações: (i) seleção robotizável; (ii) seleção em cultura única. Duas linhagens de levedura *S. cerevisiae* foram testadas, HF7c e Y190, sendo a segunda mais apropriada por permitir distinção entre duplo-híbrido de interação forte (Gal4DL-p53/Gal4DA-*largeT*) e controles de interação fraca ou negativa. A primeira variação foi realizada em placas *deepwell* de 96 poços e apresentou eficiência de recuperação de clones positivos semelhante à seleção convencional de placas, com a vantagem de reduzir em 96% o consumo de 3-aminotriazol e maior agilidade. A segunda variação, realizada em cultura única, foi efetivamente mais eficiente que a triagem em placas em selecionar clones com maior ativação do gene repórter, em modelos de mono ou duplo-híbrido. Para tanto, um protocolo de diluições de culturas líquidas foi desenvolvido e eficientemente depurou a cultura de leveduras não transformantes, que superestimariam os valores de medida de densidade em espectrofotômetro, utilizado na avaliação de ativação de gene repórter *HIS3*. Em conclusão, a possibilidade de automação da seleção robotizável permite que o estudo de interações entre proteínas possa ser conduzido em larga escala e a seleção em cultura única permite redução ainda mais intensa no trabalho de pesquisa das interações possivelmente mais relevantes.

## 5. ABSTRACT

The yeast two-hybrid system has been widely employed in the study of protein-protein interaction. Usually, selection of positive clones is conducted by either diploid recovery or co-transformation and seeding on plates. However, the large number of plates required for the complete screening of a library turns the selection procedure into a laborious and tedious one. Here, a novel method for two-hybrid selection in liquid cultures has been developed, under two variations: (i) robotic selection; (ii) single-culture selection. Two different *S. cerevisiae* strains have been tested: HF7c and Y190, the last one being more appropriated due to the ability to distinguish among strong interacting two-hybrid (Gal4BD-p53/Gal4AD-largeT) and negative/weak interacting controls. First variation has been carried out in 96-well "deepwell" plates and has shown equivalent efficiency on the recovery of positive clones as the usual selection on plates, adding the advantage of a 96% reduction on 3-aminotriazole usage and higher achievability. Second variation, conducted in single culture, was effectively more efficient than selection on plates on the selection of clones with higher activation of the reporter gene, for both one and two-hybrid models. Moreover, a liquid culture dilution protocol has been developed which efficiently depurated the culture out of non-transformed yeast cells, that would overestimate the values of density measurements under spectrophotometer, used to evaluate the *HIS3* reporter gene activation. Thus, automation feasibility of the robotic selection allows for a high-throughput study of protein interactions and the single-culture selection yields even more intense labor-reduction in the chasing of the putatively more relevant interactions.



# 1. INTRODUÇÃO

Muitos genes depositados em bancos genômicos e anotados podem ser classificados funcionalmente através de comparações de seqüência e pela identificação de motivos comuns. Este tipo de classificação fornece uma indicação inicial de possíveis funções exercidas pelas proteínas. No entanto, suas funções exatas não podem ser extraídas de dados genômicos.

A genômica funcional pode ser realizada por diversas técnicas, incluindo nocaute, análise de transcriptoma usando *microarrays*, proteômica e perfil metabólico. Algumas dessas tecnologias, apesar de poderosas, são caras, trabalhosas e algumas geram dados insuficientes (Immink e Angenent, 2002).

O mapeamento de interações proteína-proteína é uma ferramenta adicional na elucidação de funções protéicas, principalmente porque muitas proteínas funcionam em complexos e dependem de interações físicas para se tornarem ativas. É o caso dos fatores de transcrição que atuam através de domínios discretos que se associam a co-ativadores ou co-repressores.

O mapeamento de interações, além de possibilitar atribuir funções a muitas proteínas não caracterizadas funcionalmente, permite a identificação de novas proteínas.

## O sistema de duplo-híbrido

O sistema de duplo-híbrido, inicialmente desenvolvido por Fields e Song (1989), é uma das mais eficientes técnicas utilizadas para detectar interações proteína-proteína *in vivo*. Apesar do sistema

ter sido adaptado a diversos organismos (tais como, bactérias, leveduras, plantas e células de mamíferos), a seleção de duplo-híbrido tem sido freqüentemente conduzida em leveduras, principalmente pela simplicidade dos protocolos de transformação, pela disponibilidade de marcadores nutricionais e de genes repórteres (Fields e Sternglang, 1994; McAlister-Henn *et al.*, 1999).

O sistema de duplo-híbrido foi desenvolvido separando-se dois domínios (domínio de ligação em DNA e de ativação) necessários à atividade funcional de fatores de transcrição e clonando-os em fusão às proteínas sob estudo de interações. Desta forma, a proteína de interesse é clonada em fusão ao domínio de ligação em DNA (DL) originando a primeira proteína híbrida (híbrido 1 ou híbrido que contém a isca) que é usada na triagem de uma biblioteca (figura 1). A segunda proteína híbrida (híbrido 2, que contém a presa) faz parte de um grupo de proteínas geradas a partir de uma biblioteca contendo fragmentos de cDNA ou DNA genômico fusionados à região codificadora do domínio de ativação (DA) (Fields e Song, 1989; Fields e Sternglang, 1994; Uetz, 2001).

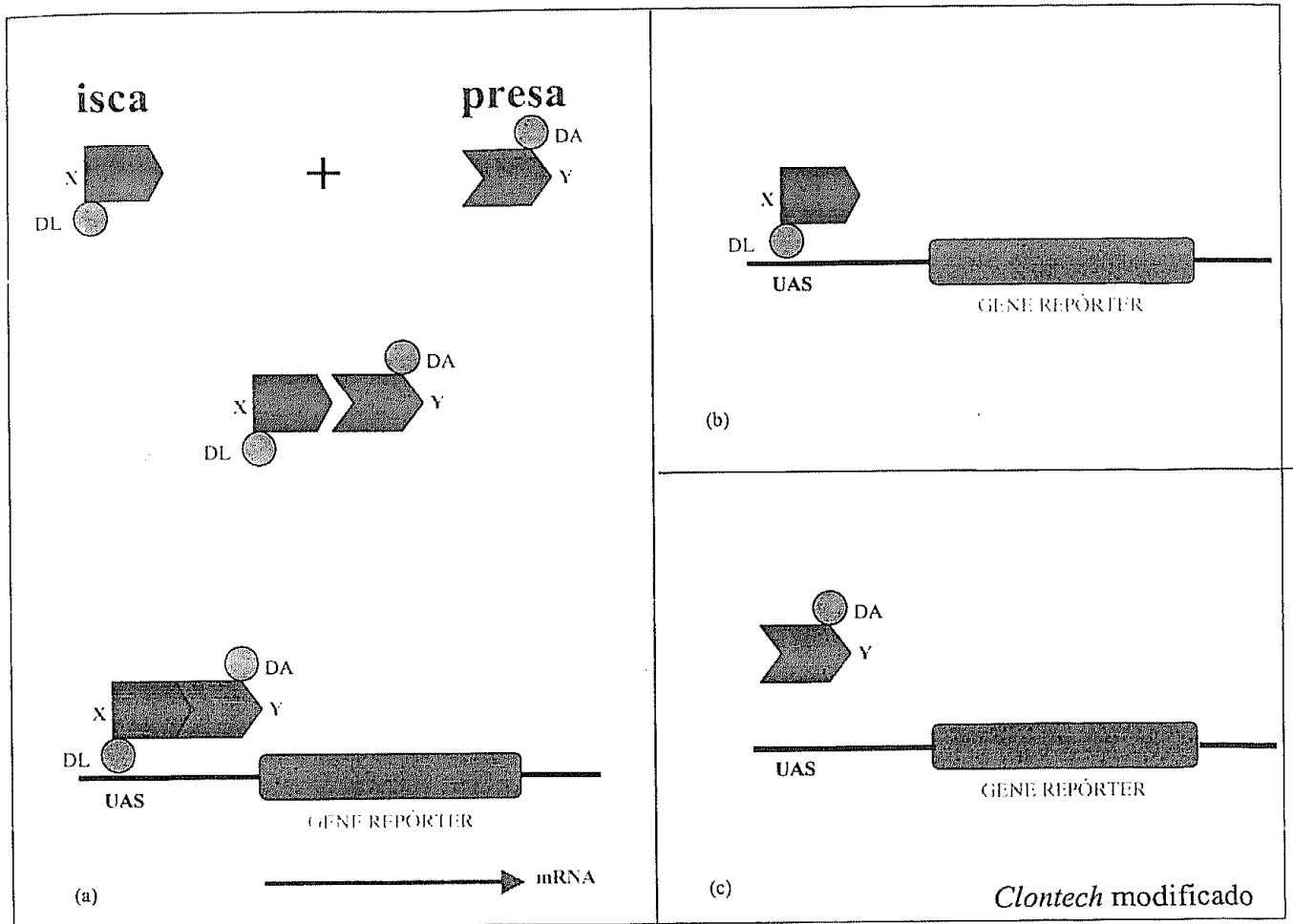
Quando ocorre interação física entre as duas proteínas (híbrido 1 e 2), a proteína híbrida resultante interliga os domínios DL e DA reconstituindo a atividade funcional do fator de transcrição do qual os domínios DL e DA se originaram como no sistema GAL4 de leveduras. Alternativamente, os domínios DL e DA podem ser provenientes de fatores de transcrição diferentes, assim como observado no sistema LexA, onde os domínios DL e DA se originam das proteínas bacterianas LexA e B42, respectivamente (Fields e Sternglang, 1994; Van Criekinge e Beyaert, 1999; Causier e Davies, 2002).

Independentemente da origem dos domínios DL e DA, a detecção de interação entre as proteínas híbridas é visualizada pela ativação de genes repórteres empregados neste sistema. Genes tais como *HIS3* (no caso do sistema GAL4) e *LEU2* (no caso do sistema LexA) são regularmente utilizados como genes repórteres em associação com *LacZ* proporcionando um ensaio de caracterização de clones positivos mais preciso (Fields e Sternklang, 1994; McAlister-Henn *et al.*, 1999; Causier e Davies, 2002). Entretanto, outros genes também têm sido empregados como repórter, por exemplo o gene *GFP* (codificante da proteína fluorescente verde) (Starling *et al.*, 2003).

O procedimento para a recuperação de clones de duplo-híbrido positivo é conduzido co-transformando-se as leveduras com os plasmídios portando os cDNA em estudo fusionados ao DL e DA (Chien *et al.*, 1991). Alguns autores optam por realizar transformações sequenciais, ou seja, a levedura é transformada primeiro com um plasmídio e depois com o outro. Procedimentos que dependem da recuperação de diplóides também tem sido conduzidos. Nesta situação, o diplóide é recuperado pelo cruzamento de leveduras de tipo de acasalamento diferentes ( $\alpha$  e  $\alpha$ ) portando cada plasmídio (codificador da isca ou da presa) (Uetz, 2001; Causier e Davies, 2002).

Entretanto, independente do processo de inserção dos plasmídios na levedura, a seleção genética tem sido convencionalmente realizada por semeadura em placas contendo meio sólido seletivo (Chien *et al.*, 1991; Uetz, 2001; Causier e Davies, 2002). Assim, os clones positivos podem ser recuperados da placa de meio sólido e seus plasmídios extraídos. A identificação do cDNA ou

DNA genômico pode ser conduzida pelo seqüenciamento do fragmento isolado. Dependendo do modelo estudado, a atual disponibilidade de região codificadora em bancos de dados facilita a identificação do produto do cDNA ou DNA genômico selecionado.



**Figura 1: Desenho esquemático de sistema de duplo-híbrido.** (a) A interação entre os híbridos 1 (contendo X ou isca) e 2 (contendo Y ou presa) é verificada pela ativação de gene repórter. (b) e (c) A presença de apenas um dos híbridos não é suficiente para ativar o gene repórter. (DL) Domínio de ligação em DNA. (DA) Domínio de ativação. (UAS) Sítios de ligação da proteína híbrida à montante do promotor.

## Vantagens do sistema de duplo-híbrido

Por ser conduzido *in vivo*, o sistema de duplo-híbrido tende a ser mais eficiente que outras metodologias conduzidas *in vitro*, principalmente porque muitas proteínas dependem de modificações pós-transcricionais para adquirirem sua conformação corretamente, o que não seria inviabilizado se conduzido *in vitro* (Van Criekinge e Beyaert, 1999; Causier e Davies, 2002). Entretanto, neste sistema, as interações entre proteínas ocorrem necessariamente no núcleo de leveduras, o que pode ser bem diferente da situação real. Apesar disso, o sistema de duplo-híbrido em leveduras ainda é mais adequado que os sistemas de estudo de interação *in vitro*.

Além disso, o ensaio é muito simples, barato, não depende de conhecimento prévio sobre as possíveis interações para realizar a triagem e pode ser facilmente automatizado, permitindo a triagem em larga-escala ou do genoma inteiro (como nos vírus da hepatite C e da vaccínia e em levedura, segundo Uetz, 2001). Uetz (2001) revisou também diversos trabalhos de estudo de interação que desvendaram grupos de proteínas que se interagem em outras situações. Nestes estudos foi possível verificar a capacidade do sistema de duplo-híbrido em detectar interações entre membros de uma família de proteínas específica, tais como as proteínas envolvidas no ciclo celular de *Drosophila* (cinases dependentes de ciclinas, ciclinas e proteínas relacionadas), de um processo biológico específico, como no desenvolvimento da vulva de *C. elegans*, além do mapeamento de interações entre domínios protéicos.

Ao contrário de outras metodologias, as interações fracas e transientes, que normalmente passariam despercebidas, podem ser detectadas neste sistema, sendo vantajoso principalmente quando se estuda uma interação transiente como sinalizador-efetor (Van Criekinge e Beyaert, 1999; Causier e Davies, 2002). Entretanto, esta sensibilidade pode se constituir em desvantagem por gerar um elevado número de falso-positivos.

### **Desvantagens do sistema de duplo-híbrido**

Como qualquer outra metodologia, o sistema de duplo-híbrido apresenta limitações. A possibilidade de gerar falsos positivos é relativamente alta necessitando de análises adicionais para a identificação de clones com verdadeiras interações de duplo-híbrido. Segundo Zhu e colaboradores, a porcentagem de falsos-positivos pode chegar até a aproximadamente 50% das interações, o que é relativamente alta. Chien e colaboradores (1991) observaram uma porcentagem de falsos-positivos ainda mais elevada ao testar a capacidade de seleção de clones de biblioteca. Os testes de seleção foram conduzidos utilizando-se a interação Sir4-Sir4 como modelo. Na triagem, 15 clones positivos foram selecionados de um total de 220.000 transformantes, sendo que deles apenas 2 foram clones verdadeiramente positivos, o que corresponde a quase 87% de falsos-positivos.

Entretanto, alguns testes simples para identificação de falsos-positivos foram desenvolvidos com intuito de minimizar os efeitos sob os clones selecionados. Os testes consistem em repetir os arranjos da triagem e excluir as interações não reprodutíveis, confirmar se o domínio de ativação sozinho seria capaz de ativar os genes repórteres ou se o domínio em estudo é comum em

diversas proteínas (por exemplo, domínios de fosforilação). Confirmar as interações *in vitro* ou consultar os bancos de dados de falsos positivos disponíveis também são boas sugestões (Uetz, 2001; Causier e Davies, 2002; Vidalain *et al.*, 2004).

Outra desvantagem deste sistema é que algumas proteínas podem se tornar tóxicas quando expressas em leveduras. Este tipo de proteína dificulta ou até mesmo inviabiliza o crescimento da levedura e, conseqüentemente, sua seleção (Van Criekinge e Beyaert, 1999; Causier e Davies, 2002).

Como o sistema é baseado na ativação da transcrição de genes repórteres, o estudo de proteínas repressoras de transcrição – na posição de isca ou de presa – pode ser dificultado. Além disso, interações que dependem da conformação do N-terminal da proteína podem sofrer interferência, já que na grande maioria das construções o DL (e mesmo DA) reside à montante da região codificadora em estudo. Nestes casos, alternativamente a clonagem pode ser conduzida com sucesso utilizando a porção C-terminal (Causier e Davies, 2002).

Além disso, apesar do isolamento de alguns poucos clones positivos, a seleção convencional, realizada por semeadura em placas, depende de um número elevado de placas para a triagem adequada de uma biblioteca tornando a seleção muito trabalhosa. Causier e Davies (2002) sugerem um uso mínimo de 70 placas de 15cm de diâmetro para a semeadura de uma mistura de transformação inteira (sendo 300 $\mu$ L por placa) na triagem de biblioteca. Assim, o inóculo é semeado de forma menos densa. Este procedimento permite que a triagem seja conduzida mais



adequadamente e, além disso, reduz o aparecimento de falsos positivos.

Como as interações ocorrem no núcleo, muitas interações entre proteínas de membrana não podem ser detectadas (McAlister-Henn *et al.*, 1999; Phizicky *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2003). Para tanto, Broder e colaboradores (1998) propuseram modificações no sistema de duplo-híbrido de forma a possibilitar a detecção de interação entre este tipo de proteína. O sistema, denominado por sistema de recrutamento de Ras (SRR), baseia-se na dependência da proteína Ras de se ligar à membrana plasmática para se tornar ativa. Na ausência do domínio C-terminal, a proteína mutante (yRas) perde a capacidade de se localizar na membrana. A reconstituição funcional da proteína Ras somente é restaurada na presença do domínio de localização de membrana. Desta forma, os autores clonaram a proteína de interesse (isca) em fusão com a proteína yRas e a proteína que faz o par nesta interação (presa) ou a biblioteca de cDNA foram clonadas em fusão com o sinal de localização de membrana. Assim como no sistema de duplo-híbrido, a interação física entre as proteínas híbridas (isca e presa) restaura a atividade da proteína Ras possibilitando o crescimento da levedura em temperaturas restritivas.

Outras modificações no sistema de duplo-híbrido foram necessárias para torná-lo mais apropriado aos interesses em estudo. Por exemplo, a modificação que originou o sistema de duplo-híbrido reverso, onde a seleção genética é conduzida contra uma interação proteína-proteína específica. Neste sistema, a levedura resistente à droga empregada na seleção (cicloeximidina ou canavanina) apresenta o alelo de sensibilidade à droga sob o controle de um promotor conhecido. Na presença da proteína

ativadora selvagem ou da interação de duplo-híbrido, o gene de sensibilidade à droga é ativado transcricionalmente inviabilizando o crescimento da levedura em meio contendo a droga seletiva. Entretanto, este tipo de seleção é capaz de selecionar clones mutantes possibilitando o estudo de regiões críticas da interação (Leanna e Hannink, 1996).

O sistema baseado em ubiquitinação também foi desenvolvido a partir do sistema de duplo-híbrido. Neste sistema, Johnsson e Varshavsky (1994) clonaram as proteínas em questão em fusão a dois domínios distintos da proteína ubiquitina. Assim, a interação entre as proteínas híbridas restaura a atividade da proteína ubiquitina resultando na clivagem de uma proteína repórter.

Algumas modificações no sistema de duplo-híbrido foram necessárias devido às exigências de um certo tipo de isca em estudo. Estas modificações originaram dois tipos de sistemas distintos: mono e tri-híbrido. No primeiro sistema, a proteína em estudo (isca) é um ativador transcricional se ligando diretamente no DNA e, portanto, não seria esperada interação do tipo duplo-híbrido. Assim, a única proteína é clonada ao domínio de ligação em DNA (Alexander *et al.*, 2001). No segundo sistema, a interação entre duas proteínas é dependente de um terceiro membro que interliga as proteínas ou estabiliza a interação. Assim como no sistema de duplo-híbrido, uma proteína é clonada em fusão com o domínio de ligação em DNA, enquanto a outra é clonada ao domínio de ativação. Por sua vez, a terceira proteína é clonada ao sinal de localização nuclear (NLS) (Tirode *et al.*, 1997). Alternativamente, a interação pode ser entre proteína e RNA (Putz *et al.*, 1996). Em ambos sistemas, a atividade ativadora ou a

interação entre as proteínas é detectada pela ativação de genes repórteres.

Como mencionado anteriormente, o sistema de duplo-híbrido pode ser conduzido em bactérias e mamíferos. A grande vantagem do sistema em bactérias é a sua disponibilidade comercial, entretanto o estudo de interações entre proteínas que dependem de modificações pós-transcricionais é inadequado a este sistema. O sistema se baseia em uma repressão cooperativa que se caracteriza pela dependência de interação entre duas proteínas repressoras dimerizadas. A proteína de interesse (isca) é clonada em fusão ao repressor 434, enquanto a segunda proteína é clonada em fusão com o repressor  $\lambda$ . Somente quando os dois dímeros repressores formam um único complexo é que a repressão sobre o operador pode ser eficientemente conduzida, levando à repressão dos genes repórteres *cat* e *LacZ* (Hays *et al.*, 2000). Alternativamente, o sistema pode ser conduzido em células de mamíferos, apesar das dificuldades de cultivo celular e da exigência de genes repórteres mais elaborados. Por esse motivo, preferencialmente as triagens são conduzidas em leveduras e apenas a confirmação da interação é realizada em células de mamíferos. Neste sistema, a proteína de interesse (isca) é clonada em fusão ao domínio de ligação em DNA da proteína Gal4, enquanto a outra proteína é clonada em fusão ao domínio de ativação da proteína VP16 do vírus herpes simples. Um vetor adicional portando o gene repórter clorofenicol acetiltransferase (CAT) sob o controle também é introduzido nas células pela co-transfecção (Luo *et al.*, 1997). Novamente, o sistema de duplo-híbrido em leveduras parece mais adequado.

Van Criekinge e Beyaert (1999) revisaram outros tipos de metodologias originadas a partir do sistema de duplo-híbrido que podem ser prontamente consultados.

### **Modificações da metodologia de duplo-híbrido**

Além das modificações da metodologia de duplo-híbrido descritas anteriormente com a finalidade de melhorar a sensibilidade do sistema ou torná-lo mais adequado às análises. Outras modificações foram propostas visando, entretanto, facilitar os ensaios de ativação de genes repórteres conduzidos para a caracterização de clones isolados.

Recentemente, alguns trabalhos de interação proteína-proteína foram publicados relatando o surgimento de um novo ensaio de ativação do gene repórter *HIS3* em substituição ao ensaio de crescimento de clones em placas de meio sólido sem histidina suplementado ou não com 3-aminotriazol (3AT). O ensaio é conduzido avaliando-se a capacidade de clones em crescer em meio líquido sem histidina suplementado ou não com 3AT, seja em tubos ou em placas *deepwell*. Como a metodologia é recente, os trabalhos são inovadores principalmente quanto ao período de crescimento dos clones e quanto à quantidade de células no inóculo de partida.

No trabalho desenvolvido por Diaz-Camino e colaboradores (2003), os clones selecionados foram cultivados até fase estacionária em placas *deepwell* de 96 poços contendo meio SD<sup>s</sup> líquido com histidina. Posteriormente, a cultura foi diluída 1:1000 em novas placas *deepwell* em meio SD<sup>s</sup> sem histidina suplementado com 3AT 5-20mM. A análise de ativação do gene

repórter *HIS3* foi monitorada pela medida de densidade do meio líquido em espectrofotômetro com leitor de placa de ELISA ( $OD_{595nm}$ ) a cada 24 horas durante 5 dias. A avaliação do método adotada foi conduzida comparando-se o resultado de maior crescimento em meio líquido à ativação de gene repórter *LacZ* em ensaio líquido de  $\beta$ -galactosidase (ONPG). Conforme os autores, a sensibilidade do novo ensaio de ativação de *HIS3* foi igual ou superior ao *LacZ*. A possibilidade de automação foi um dos grandes atrativos deste novo ensaio.

O uso de placas *deepwell* para ensaio de crescimento de clones também foi conduzido por Chen e Zhao (2003). Neste trabalho, os clones isolados foram primeiramente inoculados em tubos (5ml) de meio SD<sup>s</sup> líquido sem histidina até atingir a fase logarítmica ( $D_{600}$  2 – 5 segundo os autores) e normalizados para  $OD_{600}=0,02$ . Somente após a normalização é que cada cultura diluída foi transferida para um poço da placa *deepweel* de 96 poços suplementado com 3AT 5mM. Neste trabalho, a densidade do meio líquido foi determinada após 50 horas de cultivo em espectrofotômetro com leitor de placa de ELISA. A isca utilizada pelos autores passava a ativar transcrição na presença do ligante 17- $\beta$ -estradiol demonstrando sensível aumento de crescimento quando o repórter *HIS3* era ativado. O ensaio foi utilizado para triagem de mutantes do receptor ER- $\alpha$  que não respondiam ao ligante, porém cada clone foi manualmente ensaiado em um poço isolado.

A análise de crescimento em meio líquido também foi proposta por Srivastava e Lal (2002) como um método efetivo na identificação de interações positivas em sistema de Tri-híbrido. Os clones foram inoculados em meio SD<sup>s</sup> líquido com histidina e re-

inoculados ( $OD_{600}=0,04$ ) em tubos (5ml) de meio SD<sup>s</sup> líquido sem histidina suplementado com 3AT 5mM. A densidade do meio foi mensurada em espectrofotômetro ( $OD_{600nm}$ ) após 24 e 48 horas de cultivo. Ao comparar aos resultados de análise de crescimento de clones em placas pela formação de supercolônias com o ensaio em meio líquido desenvolvido, foi possível verificar que a distinção de clones positivos foi mais efetiva com o crescimento em meio líquido, seja após 24 ou 48 horas de cultivo.

Em nosso laboratório, Gonçalves (2003) adaptou o ensaio de ativação de gene repórter *HIS3* em meio SD<sup>s</sup> líquido sem histidina, para detectar atividade repressora em domínios presentes em fatores de transcrição, através do sistema de mono-híbrido. O ensaio de crescimento foi conduzido em duas etapas. Primeiramente, transformante foi crescida em meio sem histidina durante 4 horas para o esgotamento da histidina armazenada em vacúolos da levedura. Posteriormente, o inóculo de leveduras normalizado para  $10^5$  células/mL foi crescido em meio sem histidina suplementado com 3AT durante 16 horas. A metodologia foi muito importante, porque permitiu a detecção de níveis de transcrição inferiores ao nível basal e se mostrou reprodutiva para os repressores testados.

Outro método desenvolvido, apesar de ter conduzido os ensaios de ativação convencionalmente em meio sólido, merece destaque por ter construído mapas de interação proteína-proteína em larga-escala de forma mais fácil. Para amostrar todas as possíveis combinações de interações entre proteínas híbridas no diplóide, foram realizados muitos arranjos de cruzamentos entre leveduras de diferentes tipos de acasalamento contendo a isca ou a presa em meio SD<sup>s</sup> sólido utilizando placas de 96 poços. Como relatado

pelos autores, a associação simultânea de genes repórteres *LEU2* e *LacZ* em meio sólido elevou a sensibilidade de detecção de interação de duplo-híbrido positiva (Zong *et al.*, 2003).

## 2. JUSTIFICATIVA

O gene repórter *HIS3* tem sido utilizado alternativamente em ensaios de crescimento em meio líquido sem histidina. Entretanto, esta utilização se restringe à medida da intensidade de ativação do gene repórter. A seleção de clones positivos tem sido convencionalmente conduzida por semeadura em meio sólido, o que demanda um número elevado de placas para a triagem de alguns poucos clones, tornando-o trabalhoso e tedioso.

Por essa razão, este trabalho objetivou desenvolver de forma inovadora uma metodologia onde tanto a seleção de clones positivos quanto os ensaios de ativação do gene repórter *HIS3* pudessem ser conduzidos acoplados exclusivamente em meio líquido. Assim, a metodologia proporcionaria rápida triagem de biblioteca, eliminando o elevado número de placas seletivas utilizadas em protocolos de seleção convencional.



## **2b. OBJETIVO GERAL**

Desenvolver uma metodologia de seleção de duplo-híbrido em leveduras conduzindo-se a triagem em meio líquido alternativa à sementeira em meio sólido.

### **2b.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Avaliar linhagens de leveduras favoráveis ao desenvolvimento da metodologia.
2. Desenvolver um procedimento de diluições e implementá-lo para o monitoramento de crescimento de clones positivos sem interferência da turbidez ( $OD_{600}$ ) produzida por leveduras não transformadas.
3. Desenvolver a metodologia de seleção robotizável objetivando a seleção de clones de intensidades de interação variadas.
4. Desenvolver a metodologia de seleção em cultura única privilegiando a seleção de clones de interações fortes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MICRORGANISMOS

##### BACTÉRIAS

A bactéria utilizada era *Escherichia coli* da linhagem MC1061 (Stratagene).

Genótipo da linhagem:

MC1061-F<sup>-</sup>, *araD139*,  $\Delta$ (*ara-leu*)7697, *galE15*, *galK16*,  $\Delta$ (*lac*)X74  
*rpsL*(Str<sup>r</sup>), *hsdR2*(*rK*<sup>-</sup>, *mK*<sup>+</sup>), *mcrA*, *mcrB1*

##### Meios de cultura para bactérias

###### Meio LB

Extrato de levedura 0,5% (BBL), NaCl 0,5% (VETEC), pH 7.

Em meio LB sólido, foi adicionado ágar a 1,5% (BD). Esterilizado em autoclave (soc. fabbe ltda.) a uma pressão de 120kgf/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos.

###### Meio 2xYT

Bactopeptona 1% (DIFCO), extrato de levedura 0,5% (BBL), NaCl 1% (VETEC), pH 7. Esterilizado em autoclave (soc. fabbe ltda.) a uma pressão de 120kgf/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos.

###### Meio SOB

Peptona 2% (INLAB), extrato de levedura 0,5% (BBL), NaCl 10mM (VETEC), KCl 2,5mM (SYNTH), MgCl<sub>2</sub> 10mM (Grupo Química), MgSO<sub>4</sub> 10mM (SYNTH). Esterilizado em autoclave (soc. fabbe ltda.) a uma pressão de 120kgf/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos.

### Meio SOC

Em 100ml de meio SOB, foi adicionado 2ml de solução de glicose 2M (VETEC) e 1ml de solução de MgCl<sub>2</sub> 2M (Grupo Química), ambos esterificados por filtração a vácuo.

### **Manutenção e estoque de bactérias**

As bactérias eram inoculadas em meio LB líquido suplementado com antibiótico e incubadas a 37°C durante 12-16 horas. O estoque era preparado adicionando-se 1ml desta cultura em 400µL de glicerol estéril, congelados a -20°C durante 24 horas e transferidos para *freezer* a -80°C.

### **Antibiótico**

Era utilizada uma concentração final de 100µg/ml de ampicilina (Eurofarma) em meio de cultura sólido ou líquido para a seleção de bactérias contendo os plasmídios (Tabela 3) com marcadores de resistência ao antibiótico.

### **LEVEDURAS**

As leveduras utilizadas neste trabalho eram *Saccharomyces cerevisiae*, linhagens HF7c e Y190 (Clontech). As especificações genóticas, genes repórteres e marcadores genéticos de ambas as leveduras estão especificados na tabela 1.

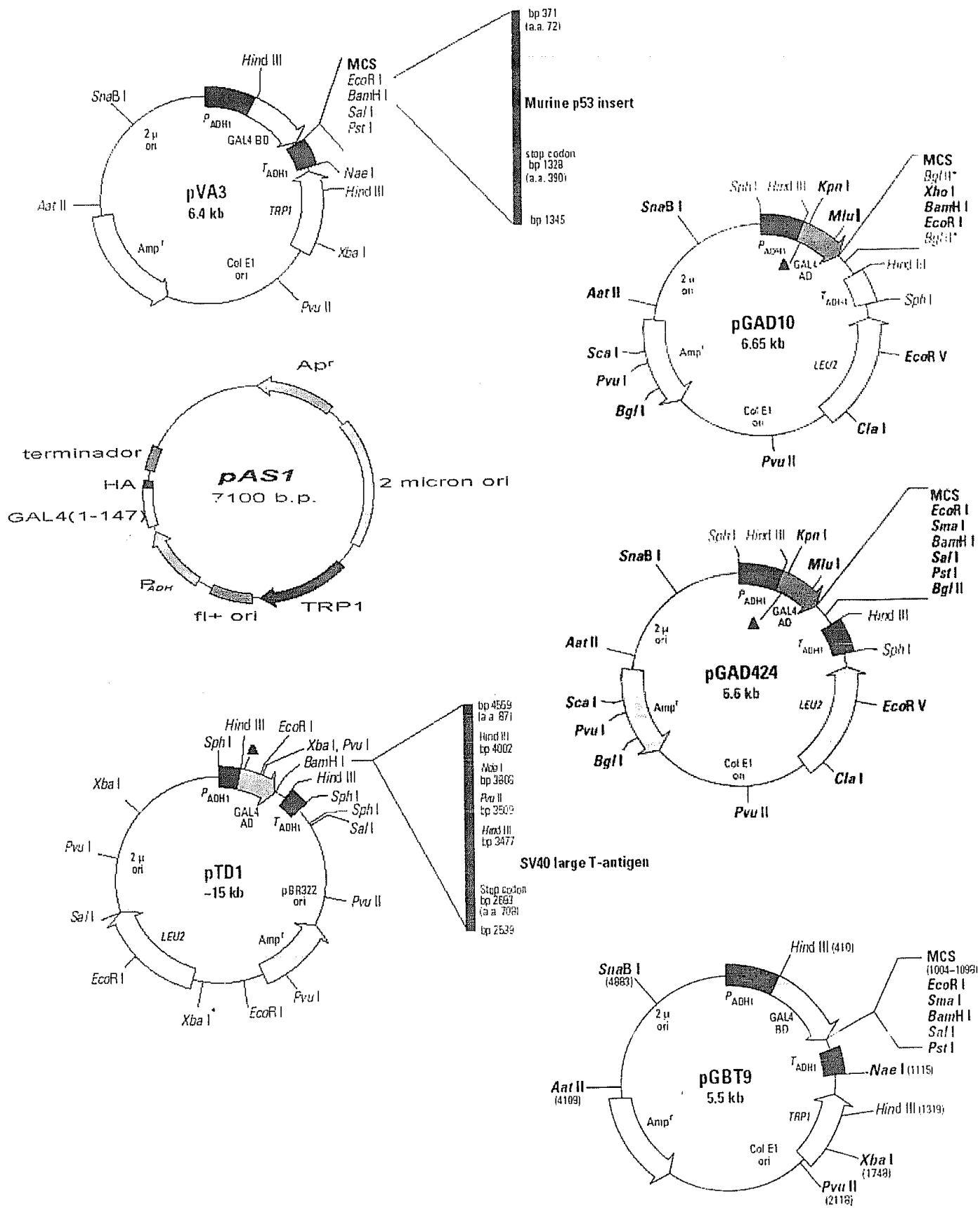


Figura 3: Desenho esquemático dos plasmídios utilizados neste trabalho. Detalhes da tabela 3.

**Tabela 1: Descrição dos genótipos, genes repórteres e marcadores genéticos das leveduras hospedeiras.**

Linagem	Genótipo	Genes repórteres	Marcadores genéticos
HF7c	<i>MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, LYS2::GAL1-HIS3, URA3::(gal417mers)<sub>3</sub>-CYC1-lacZ.</i>	HIS3	<i>trp1, leu2</i>
Y190	<i>MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1901, leu23, 112, gal4Δ, gal80Δcyh<sup>f2</sup>, LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-HIS3<sub>TATA</sub>-HIS3, URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</i>	HIS3, LacZ	<i>trp1, leu2, cyh<sup>f2</sup></i>

### Meios de cultura para leveduras

#### Meio SD

YNB (DIFCO) sem aminoácidos e sulfato de amônio 0,17%, dextrose 2% (VETEC), sulfato de amônio 0,5% (ISO FAR). Esterilizado em autoclave (soc. fabbe ltda.) a uma pressão de 120kgf/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos.

#### Meio YPD

Extrato de levedura 1% (BBC), peptona 2% (INLAB), dextrose 2% (VETEC). Esterilizado em autoclave (soc. fabbe ltda.) a uma pressão de 120kgf/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos.

Aos meios SD e YPD sólidos, era adicionado ágar a 1,5% (BD).

### Manutenção e estoque de leveduras

As leveduras crescidas em meio SD líquido sem aminoácidos e/ou bases nitrogenadas para auxotrofia eram estocadas em glicerol

como descrito anteriormente para bactérias. Leveduras utilizadas nos ensaios eram mantidas em meio de cultura sólido YPD (leveduras sem plasmídeo) ou SD<sup>s</sup> (SD *seletivo*, leveduras com plasmídeo) a 4°C. Periodicamente, as leveduras eram semeadas em um novo meio para serem mantidas viáveis.

### **Complementos para meios de cultura de levedura: aminoácidos e bases nitrogenadas**

As soluções estoque dos complementos (tabela 2) eram esterilizadas por filtração a vácuo e estocadas a 4°C, exceto uracila, estocada à temperatura ambiente.

**Tabela 2: Complementos para meios de cultura de leveduras.**

<b>Complemento</b>	<b>Concentração estoque</b>	<b>Concentração final</b>
L- triptofano (Sigma)	2mg/ml	20µg/ml
L- leucina (Sigma)	3mg/ml	30µg/ml
L- lisina (Sigma)	3mg/ml	30µg/ml
uracila (Sigma)	2mg/ml	20µg/ml
adenina (Sigma)	2mg/ml	20µg/ml
L- histidina (Sigma)	2mg/ml	30µg/ml

### **3.2 PLASMÍDIOS**

Os plasmídios utilizados neste trabalho estão descritos na tabela 3 e esquematizados na figura 3.

**Tabela 3: Descrição dos plasmídios utilizados neste trabalho.**

Plasmídio	Descrição	Tamanho	Referência
pAS1	Gal4DA (1-147) domínio de ligação em DNA, TRP1, amp <sup>r</sup>	7.1 Kb	Cedido por Stephen Elledge (Baylor College of Medicine, Houston)
pVA3	Gal4DL-p53 murina (72-390) em pGBT9, TRP1, amp <sup>r</sup>	6,4 Kb	Clontech
pTD1	Gal4DA-antígeno <i>LargeT</i> de SV40 (84-708) em pGAD3F, LEU2, amp <sup>r</sup>	15 Kb	Clontech
pGAD10	Gal4DA (768-881) domínio de ativação, LEU2, amp <sup>r</sup>	6,65 Kb	Clontech
pGAD424	Gal4DA (768-881) domínio de ativação, LEU2, amp <sup>r</sup>	6,6 Kb	Clontech
pGBT9	GAL4DL (1-147) domínio de ligação ao DNA, TRP1, amp <sup>r</sup>	5,4Kb	Clontech

Os plasmídios pGBT9 contendo construção mutante da proteína p53, Gal4DL-p53(72-390)D278G (Li e Fields, 1993), e os plasmídios pAS1 contendo Gal4DL-mTead1(1-134) eram utilizados em ensaios de duplo-híbrido e mono-híbrido, respectivamente.

### 3.3 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

Amostras de DNA plasmidiano eram visualizadas e quantificadas em géis de agarose 0,8% (p/v). Após completa dissolução da agarose no tampão TAE 1x, era adicionado brometo de etídio (concentração final 0,5µg/ml, Life technologies). O gel era

polimerizado em cuba de eletroforese (EC-Apparatus corporation) a temperatura ambiente.

Solução TAE: Tris-base 0,04M (Sigma), EDTA 0,001M (Synth) pH 8, ácido acético glacial (REAGEN).

#### **4.4 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES**

Uma colônia da bactéria MC1061 era inoculada em 100ml de meio 2xYT e incubada a 37°C sob agitação durante 16 horas em incubadora refrigerada (TE-421, Tecnal). 10ml desta cultura eram inoculados em 1L de 2xYT e incubados a 37°C até atingir absorvância entre 0.2 - 0.25 (OD<sub>600</sub>). Após atingir a absorvância desejada, a cultura era incubada em gelo durante 1 hora. A cultura era centrifugada durante 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C em rotor GSA (centrífuga Sorvall). O sobrenadante era descartado e o sedimento ressuspendido em 50ml de glicerol 10% (diluído em água) esterilizado e gelado. As células eram centrifugadas durante 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante era descartado e o sedimento ressuspendido em 100ml de glicerol 10% esterilizado e gelado. As células eram centrifugadas durante 15 minutos a 10.000 rpm a 4°C e o sedimento ressuspendido em 50ml de glicerol 10% gelado e esterilizado. As células eram centrifugadas durante 25 minutos a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante era desprezado e o sedimento ressuspendido em 1ml de glicerol 10% esterilizado e gelado. Uma alíquota de 25µL era diluída em 10ml de glicerol 10% e a absorvância mensurada (OD<sub>600</sub>). A suspensão era diluída em glicerol 10% esterilizado até a amostra diluída



atingir  $OD_{600} = 0,15$ . A suspensão era dividida em alíquotas de  $40\mu\text{L}$  e estocada a  $-90^{\circ}\text{C}$ .

### **5.5 ELETROPORAÇÃO DE BACTÉRIAS**

Células eletrocompetentes MC1061 eram descongeladas em gelo durante 15 minutos. O DNA ou mistura de ligação ( $100\text{pg}$  a  $1\text{ng}$  ou alíquota 1:10 da mistura de ligação) era adicionado às células e incubado em gelo durante 5 minutos. As células contendo o DNA eram transferidas para cubetas de eletroporação resfriadas e submetidas a choque elétrico de  $2,5\text{V}$ , resistência  $200\Omega$ , capacitância de  $25\mu\text{FD}$  (Eletroporador BIORAD). As bactérias eram incubadas em meio SOC a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora e semeadas em meio LB sólido suplementado com antibiótico (ampicilina  $100\mu\text{g/ml}$ ).

### **3.6 MINI-PREPARAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIO BACTERIANO**

Cada colônia de bactéria era inoculada em  $5\text{ml}$  de meio LB líquido contendo antibiótico (ampicilina  $100\mu\text{g/ml}$ ) e incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 12-16 horas sob agitação. A cultura era transferida para tubos de microcentrífuga e centrifugada durante 5 minutos. O sobrenadante era desprezado e as células depositadas eram ressuspensas em  $100\mu\text{L}$  de GTE gelado. O volume de  $200\mu\text{L}$  de solução de lise era adicionado aos tubos e incubados em gelo durante 10 minutos. O volume de  $150\mu\text{L}$  de solução de acetato de potássio (KOAc) eram adicionados aos tubos, invertidos por 5 vezes e centrifugados durante 10 minutos. O volume de  $400\mu\text{L}$  do sobrenadante era transferido para novos tubos e adicionado  $400\mu\text{L}$  de álcool isopropanol. Os tubos eram invertidos

delicadamente, centrifugados em microcentrífuga durante 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O volume de 1ml de etanol 80% gelado era adicionado, os tubos invertidos delicadamente e centrifugados durante 10 minutos. Os tubos eram invertidos delicadamente, incubados em freezer durante 20 minutos e centrifugados durante 10 minutos. O DNA era ressuspensionado em 25 $\mu$ L de solução TE-RNase e incubado a 37°C durante 20 minutos. A solução era armazenada a 4°C e o DNA quantificado em gel de agarose 0,8%.

#### GTE

Glicose 50mM

EDTA 10mM (Synth)

Tris-HCl 25Mm, pH 8 (Sigma)

#### Solução de lise para bactéria

NaOH (Synth) 0,2N (Sigma)

SDS 10% (Sigma)

#### KOAc

Acetato de potássio (5M) 60ml

Ácido acético glacial (Aldrich) 11,5ml

Água Mili Q estéril 28,5ml

#### TE- RNase

Tris-HCl 10mM, pH=7.4

EDTA 1mM, pH=8.0

RNase pancreática livre de DNase (20 $\mu$ g/ml).

### **3.7 TRANSFORMAÇÃO DE LEVEDURAS UTILIZANDO ACETATO DE LÍTIO**

Cada colônia de levedura sem plasmídeo era inoculada em 5ml de meio YPD e incubada a 30°C sob agitação (incubadora refrigerada TE-422, Tecnal) durante 12-16 horas. O volume de 100µL de cada cultura era inoculado em 10ml de YPD e incubados a 30°C sob agitação durante 12-16 horas. As células eram contadas em câmara de Neubauer utilizando o microscópio óptico (aumento de 400x) e incubadas a 30°C sob agitação de 180 rpm em meio YPD a uma densidade de  $0,5 \times 10^7$  células/ml. O crescimento era acompanhado até atingir a densidade de  $1,6 - 2 \times 10^7$  células/ml. O volume de células correspondente a  $10^8$  células/ml era centrifugado durante 10 minutos a 3000g e o sobrenadante desprezado. As células depositadas eram ressuspensas em 1ml de água Mili-Q estéril, centrifugado durante 15 segundos e o sobrenadante desprezado. As células eram ressuspensas em 400µL de LiAc 0,1M, centrifugadas durante 15 segundos e o sobrenadante desprezado. As células eram novamente ressuspensas em 400µL de LiAc 0,1M, centrifugadas durante 15 segundos e o sobrenadante desprezado. Sobre as células depositadas eram adicionados, nesta ordem, as soluções: 240µL de PEG 4000 50% (p/v) autoclavado, 36µL de LiAc 1M, 25µL de ss-DNA 2mg/ml fervido durante 5 minutos e resfriado em banho de gelo e 50µL de solução contendo 1µg de cada plasmídeo. Os tubos eram vigorosamente agitados até completa dissolução do sedimento durante 1 minuto e incubados a 30°C durante 30 minutos sem agitação. Os tubos eram submetidos a choque térmico à 42°C durante 30 minutos sem agitação. As células depositadas eram recuperadas por centrifugação em microcentrífuga durante 15 segundos, o sobrenadante desprezado e as células ressuspensas em 500µL de água Mili-Q estéril. Aliquotas de 50 e 100µL eram semeadas em placas seletivas.

Para sistema de duplo-híbrido, todas as transformações eram realizadas através de co-transformação (1 $\mu$ g de cada plasmídio).

LiAc Acetato de lítio 1M dissolvido em água MiliQ (0,1-1M)- (Sigma #L-6883) e esterilizado por filtração.

PEG Polietilenoglicol 3350 dissolvido em água MiliQ (50% p/v)- (Sigma #P-3640) e esterilizado por autoclavação.

ss-DNA DNA de esperma de salmão (2 mg/ml) dissolvido em solução Tris-HCl 10mM pH8 e EDTA 0,5M esterilizada em ambiente frio (câmara fria) - (Sigma D-1626).

### **3.8 MINI-PREPARAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIO DE LEVEDURA**

Culturas de leveduras eram crescidas em 5ml de meio seletivo a 30°C sob agitação (incubadora refrigerada TE-422, Tecnal) durante 12-16 horas. O volume de 1ml desta cultura era centrifugado e o sobrenadante descartado. As células depositadas eram ressuspensas no meio residual. O volume de 400 $\mu$ L de solução de lise era adicionado e homogeneizado em agitador. O volume de 400 $\mu$ L da solução fenol:clorofórmio:álcool isopropílico (25:24:1) e 0,3g de pérolas de vidro (Sigma, 425-600 *microns*, G-8772) lavadas com ácido eram adicionados e a cultura homogeneizada em agitador durante 2 minutos. A cultura era centrifugada durante 5 minutos. A fase aquosa era retirada e seu volume medido. O volume de 0,25V de solução 10M de acetato de amônio, 1 $\mu$ L de glicogênio e 2V de etanol absoluto gelado era adicionado. O material era homogeneizado e incubado a -20°C durante 10 minutos. O sedimento era lavado com etanol 80% e

ressuspendido em 25 $\mu$ L de água miliQ estéril. O DNA era armazenado a 4°C.

#### Solução de lise para levedura

Triton 100x (Sigma)

SDS 10% (Sigma)

NaCl 100mM (MERK)

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

EDTA 0,5mM (Synth)

Água MiliQ estéril

### **3.9 TESTE DE MARCAS**

Cada colônia selecionada em placa era crescida em placas contendo meio SD sólido, sendo cada placa carente de um complemento (aminoácido ou base nitrogenada) específico. A levedura não cresce nos meios carentes de aminoácidos/bases nitrogenadas aos quais ela é auxotrófica. As placas eram incubadas durante 2-3 dias em estufa (Hotpack) a 30°C.

### **3.10 ENSAIO PARA ESTUDO DA ATIVAÇÃO DE GENE REPÓRTER *HIS3***

Culturas de leveduras eram crescidas em tubos *Falcon* (tubo BD *Falcon*™, BD Biosciences) contendo 3ml de meio SD<sup>s</sup> líquido suplementado com 3AT 0 a 5mM a 30°C sob agitação (incubadora refrigerada TE-422, Tecnal) durante 12-16 horas. As culturas eram diluídas conforme o protocolo F de diluições de culturas líquidas (item 3.15 a seguir) e a ativação do gene repórter *HIS3* quantificada pela medida da densidade do meio líquido em espectrofotômetro (item 3.12 a seguir). Alternativamente, 10<sup>5</sup>

leveduras/mL (ou diluições para  $OD_{600}=0,014$ , o que corresponde aproximadamente a esta concentração) eram incubadas em meio  $SD^s$  durante 24 horas, monitorando-se o crescimento por medida de  $OD_{600nm}$ .

### 3.11 ENSAIO PARA ESTUDO DA ATIVAÇÃO DE GENE REPÓRTER *LacZ*

Leveduras crescidas em placas  $SD^s$  eram semeadas em filtro de nitrocelulose tipo HA (poro de  $0,45\mu m$  de diâmetro, Millipore Corporation) acondicionado sobre meio  $SD^s$  sólido. As placas contendo o filtro eram incubadas em estufa (Hotpack) a  $30^\circ C$  durante 1-3 dias, conforme o vigor do inóculo, até atingir crescimento desejado. O filtro era submetido a tratamento com nitrogênio líquido (3x), descongelado e depositado sobre papel de filtro embebido com solução contendo *Z-buffer* e X-Gal 2% (5-bromo-4-cloro-3 indolil  $\beta$ -d-galactopiranosídeo, Sigma) e incubado a  $30^\circ$  durante 24 horas. Colônias capazes de ativarem o gene repórter *LacZ* adquirem coloração azul devido a metabolização do substrato X-Gal pela  $\beta$ -galactosidase, produto do gene repórter.

Alternativamente, era gerada sobre o filtro já acondicionado em placa uma supercolônia depositando-se  $10\mu L$  de cultura líquida.

#### Soluções:

- Z- *buffer* -  $Na_2HPO_4$  60mM (Synth)
- $Na_2H_2PO_4$  40mM (Synth)
- KCl 10mM (Synth)
- $MgSO_4$  1mM (Synth)
- SDS 0,025% (p/v)
- $\beta$ -mercaptoetanol 0,27mL (v/v)

pH 7

X-Gal – 2% (p/v) em N,N dimetilformamida (DMF, Aldrich) ou Dimetil Sulfoxido (DMSO) e utilizado na concentração final de 20mg/ml.

### **3.12 ENSAIO DE MEDIDA DE DENSIDADE DO MEIO LÍQUIDO**

#### **Medida de densidade em Espectrofotômetro**

Culturas de leveduras crescidas eram transferidas para cubetas apropriadas e submetidas à medida de densidade do meio em aparelho espectrofotômetro (UV-VIS SPECTROPHOTOMETER, Shimadzu UV mini 1240) usando comprimento de onda de 600nm ( $OD_{600}$ ). Antes de medir a densidade das amostras, o aparelho era estabilizado durante 5 minutos. A leitura era padronizada pela medida da densidade do meio SD líquido ("branco"). Valores iguais ou próximos de 0 eram considerados sem crescimento, valores próximos de 1 como crescimento ótimo e valores próximos a 0,5 como crescimento intermediário, quando comparado ao "branco". Em alguns experimentos, era utilizada a porcentagem de crescimento (utilizando os valores de  $OD_{600}$ ) em relação a controle incubado com histidina.

#### **Medida de densidade em leitor de placas de ELISA**

Culturas líquidas crescidas eram transferidas para placa de ELISA (microplacas BD *Falcon*™ de 96 poços, BD Biosciences) e submetidas à medida de densidade em aparelho espectrofotômetro com leitor de placa de ELISA (Spectra Max Plus, Molecular Devices) com comprimento de onda de 600nm ( $OD_{600}$ ) e programa Soft Max Pro 2.1.1. Antes de medir a densidade das amostras, o aparelho era estabilizado durante 5 minutos. A leitura era

padronizada pela medida da densidade do meio SD líquido ("branco"). Valores superiores a 0,5 eram considerados como crescimento (devido à diferente sensibilidade e distância percorrida pelo feixe) e, entre 0,5 e 0, sem crescimento quando comparado ao "branco".

### 3.13 ANÁLISE DE DADOS

Para comparar a eficiência de seleção robotizável em relação à seleção convencional em placas, era feita uma conversão do número de colônias crescidas em 22 setores virtuais da placa para o número de poços equivalentes utilizando a distribuição de Poisson (Soares e Siqueira, 2002). A média do número de colônias/setor era calculada (considerando-se 22 setores por placa) e aplicada à fórmula da distribuição para calcular a probabilidade da classe zero -  $P(0)$ , que corresponde à proporção de poços sem crescimento. O complemento deste valor,  $1-P(0)$ , representa a fração esperada de poços com crescimento. O número de poços com crescimento era sempre ajustado para o número inteiro superior.

Era feita uma análise de co-variância de dois fatores (*two-way ANCOVA*) para testar se a estimativa de poços com crescimento calculada a partir da seleção em placas era estatisticamente diferente do número de poços com crescimento observado. A quantidade de presa era a covariável e cada experimento era considerado um evento aleatório (Zar, 1996).

Para testar o efeito do tipo de meio (líquido ou sólido) no crescimento de clones selecionados da biblioteca de mutantes de mTead1(1-134) utilizando a levedura *S. cerevisiae* Y190, era



utilizada uma Análise de variância de dois fatores (*two-way ANOVA*), considerando a triagem como efeito aleatório. Era também utilizado um teste *a posteriori* de Tukey para testar a diferença entre pares de triagens (clones selecionados em cultura única - clones selecionados em placa). Os dados de porcentagem de crescimento em relação ao controle eram transformados utilizando o arcosseno da raiz quadrada. Este recurso é recomendado para transformar distribuições binomiais, características de porcentagens, em distribuições normais, necessárias para a execução deste tipo de teste (Zar, 1996).

Para testar o efeito do tipo de meio (líquido ou sólido) na porcentagem de clones azuis no teste de X-gal selecionados da biblioteca de mutantes de mTead191-134) utilizando a levedura *S. cerevisiae* Y190, era utilizado um teste T de *student* pareado (pares dentro de cada triagem). Novamente os dados de porcentagem eram transformados utilizando o arcosseno da raiz quadrada (Zar, 1996).

### **3.14 SELEÇÃO DE DUPLO-HÍBRIDO EM PLACAS DE MEIO SÓLIDO**

Após a transformação (item 3.7), o volume de 400 $\mu$ L da mistura de transformação era semeado em placas de meio SD<sup>s</sup> sólido de 15cm de diâmetro sem histidina suplementado com 3AT 35mM. As placas eram incubadas em estufa (Hotpack) a 30°C durante 4-8 dias. As colônias recuperadas pela ordem de crescimento na placa seletiva eram testadas em teste de marcas (item 3.9). O monitoramento da transformação era conduzido semeando-se 100 $\mu$ L da mistura de transformação em placas de meio SD<sup>s</sup> sólido com histidina.

### 3.15 PROTOCOLO DE SELEÇÃO COM DILUIÇÕES

Após transformação (item 3.7), o volume de 100 $\mu$ L (20%) da mistura de transformação eram inoculados em tubo *Falcon* (tubo BD *Falcon*™, BD Biosciences) contendo 2,5ml de meio SD<sup>s</sup> (seletivo para a co-transformação) líquido com histidina ou sem histidina suplementado com 3AT 0; 0,1 e 0,5mM, para as leveduras *S. cerevisiae* HF7c. Para *S. cerevisiae* Y190, eram utilizados 3AT 0; 1 e 2,5mM. As culturas eram incubadas a 30°C sob agitação (incubadora refrigerada TE-422, Tecnal).

A cultura era diluída (Protocolos A-F abaixo e esquematizados na figura 4) e submetida a ensaio de medida de densidade do meio líquido em espectrofotômetro (item 3.12).

**Protocolo A:** diluições 1:100 em 24, 48, 72 e 96 horas e medida de densidade da cultura em 120 horas.

**Protocolo B:** diluições 1:100 em 48, 72 e 96 horas e medida de densidade da cultura em 120 horas.

**Protocolo C:** diluições 1:100 em 72 e 96 horas e medida de densidade da cultura em 120 horas.

**Protocolo D:** diluição 1:10 em 24 horas, diluições 1:100 em 48, 72 e 96 horas e medida de densidade da cultura em 120 horas.

testes	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
A	Transformação	1:100	1:100	1:100	1:100	OD
B			1:100	1:100	1:100	OD
C				1:100	1:100	OD
D		1:10	1:100	1:100	1:100	OD
E			1:10	1:100	1:100	OD
F				1:10	1:100	OD

**Figura 4: Testes para estabelecimento de protocolo de diluições de culturas líquidas.** Esquema de testes de diluições aplicados às culturas SD<sup>s</sup> líquidas. Diluições foram realizadas nas horas indicadas subseqüentes à transformação (0h) e a detecção de crescimento realizada pela medida de densidade da cultura líquida em espectrofotômetro (OD<sub>600nm</sub>). Teste A (diluições 1:100 indicadas e absorvância medida em 120 horas), teste B (diluições 1:100 indicadas e absorvância mensurada em 120 horas), teste C (diluições 1:100 indicadas e absorvância em 120 horas), teste D (diluição 1:10 em 24 horas seguido por diluições 1:100 indicadas e absorvância mensurada em 120 horas), teste E (diluição 1:10 em 48 horas seguido por diluições 1:100 indicadas e absorvância mensurada em 120 horas), teste F (diluição 1:10 em 72 horas, diluição 1:100 em 96 horas, absorvância mensurada em 120 horas).

**Protocolo E:** diluição 1:10 em 48 horas, diluições 1:100 em 72 e 96 horas e medida de densidade da cultura em 120 horas.

**Protocolo F:** diluição 1:10 em 72 horas, diluição 1:100 em 96 horas e medida de densidade da cultura em 120 horas.

### 3.16 PROTOCOLO DE SELEÇÃO ROBOTIZÁVEL

Após transformação (item 3.7), o volume de 400 $\mu$ L da mistura de transformação eram inoculados em 10ml de meio SD<sup>s</sup> líquido sem histidina suplementado com 3AT 2,5mM. A cultura era distribuída em 24 poços da placa *deepwell* (placa de polietileno *Deep-Well* de 96 poços, BD Biosciences), sendo cada poço com volume de 400 $\mu$ L. À primeira coluna da placa *deepwell*, era adicionada histidina (a partir de estoque 100x concentrado).

A placa *deepwell* era coberta com papel *contact* transparente (Plastific), perfurado com agulha hipodérmica esterilizada e incubada em estufa (Hotpack) a 30°C durante 72 horas.

A cultura era diluída conforme protocolo F especificado em Material e Métodos - item 3.15 - utilizando micropipeta multicanal.

A medida de densidade das culturas era conduzida em espectrofotômetro com leitor de placas de ELISA conforme Material e Métodos – item 3.12.

O volume de 10 $\mu$ L de cada cultura era pingado em placa de meio SD<sup>s</sup> sólido com histidina e incubado em estufa (Hotpack) a 30°C durante 72 horas. A supercolônia gerada era submetida a ensaio de ativação de gene repórter *LacZ* (item 3.11).

### 3.17 PROTOCOLO DE COMPETIÇÃO EM CULTURA ÚNICA

Nos ensaios de competição, quantidades pré-determinadas de leveduras competidoras eram inoculadas em tubos *Falcon* (tubo BD *Falcon*™, BD Biosciences) em 3ml de meio SD<sup>s</sup> líquido, incubadas a 30°C sob agitação (incubadora refrigerada TE-422, Tecnal) e diluídas conforme protocolo F - item 3.15, medindo-se a densidade de crescimento em espectrofotômetro como em 3.12. Supercolônias eram derivadas diretamente do meio líquido para ensaio de *LacZ* ou colônias eram obtidas por semeadura em meio SD<sup>s</sup> para ensaio de clones individuais da ativação de genes repórteres *HIS3* (item 3.10) e *LacZ* (item 3.11).

### 3.18 TRIAGEM DE BIBLIOTECA COM SELEÇÃO EM CULTURA ÚNICA

Após transformação, 4ml de mistura de transformação (reunindo-se várias misturas de transformação – item 3.7) eram inoculados em 100ml de meio SD<sup>s</sup> líquido sem histidina suplementado com 3AT 5mM. A cultura era incubada a 30°C sob agitação (incubadora refrigerada TE-422, Tecnal) durante 72 horas e diluída conforme protocolo F - item 3.15. Colônias (20-45) eram recuperadas semeando-se o volume correspondente a 10<sup>3</sup> células/ml em placa de meio SD<sup>s</sup> sólido sem histidina suplementado com, respectivamente, 3AT 5 e 35mM para leveduras *S. cerevisiae* HF7c e Y190. As placas de meio sólido eram incubadas em estufa (Hotpack) a 30°C durante 48 horas. As colônias isoladas eram testadas quanto as marcas de auxotrofia (item 8.9) e ensaiadas para estudo de ativação de gene repórter *LacZ* (item 3.11) ou crescidas em meio SD<sup>s</sup> líquido por 48 horas e ensaiadas para

estudo de ativação de gene repórter *HIS3* (item 3.10, SD<sup>s</sup> com histidina ou sem histidina e 3AT 5mM).

## 4. RESULTADOS

### 4.0 Interação modelo para sistema de duplo-híbrido

As simulações de interação forte do presente trabalho foram baseadas na interação entre duas proteínas bem conhecidas: *largeT* do vírus SV40 e p53 (Li e Fields, 1993; Iwabuchi *et al.*, 1993).

A proteína supressora de tumor p53 desempenha uma importante função na tumorigênese e seu gene é um dos mais freqüentemente mutados em cânceres humano (Iwabuchi *et al.*, 1993).

Verifica-se que a interação física entre a proteína p53 (resíduos 72-390) e o antígeno *largeT* (resíduos 84-708) proporciona elevada atividade transcricional no duplo transformante (Iwabuchi *et al.*, 1993).

No entanto, o enfraquecimento desta atividade transcricional foi observado em mutantes de p53. Dos mutantes mapeados por Li e Fields (1993), quase todos apresentaram pelo menos uma mutação em domínios conservados. O mutante 54.2 de p53 (mutação pontual D278G) merece destaque por ter sido usado nas simulações de interação fraca juntamente com o antígeno *largeT*.

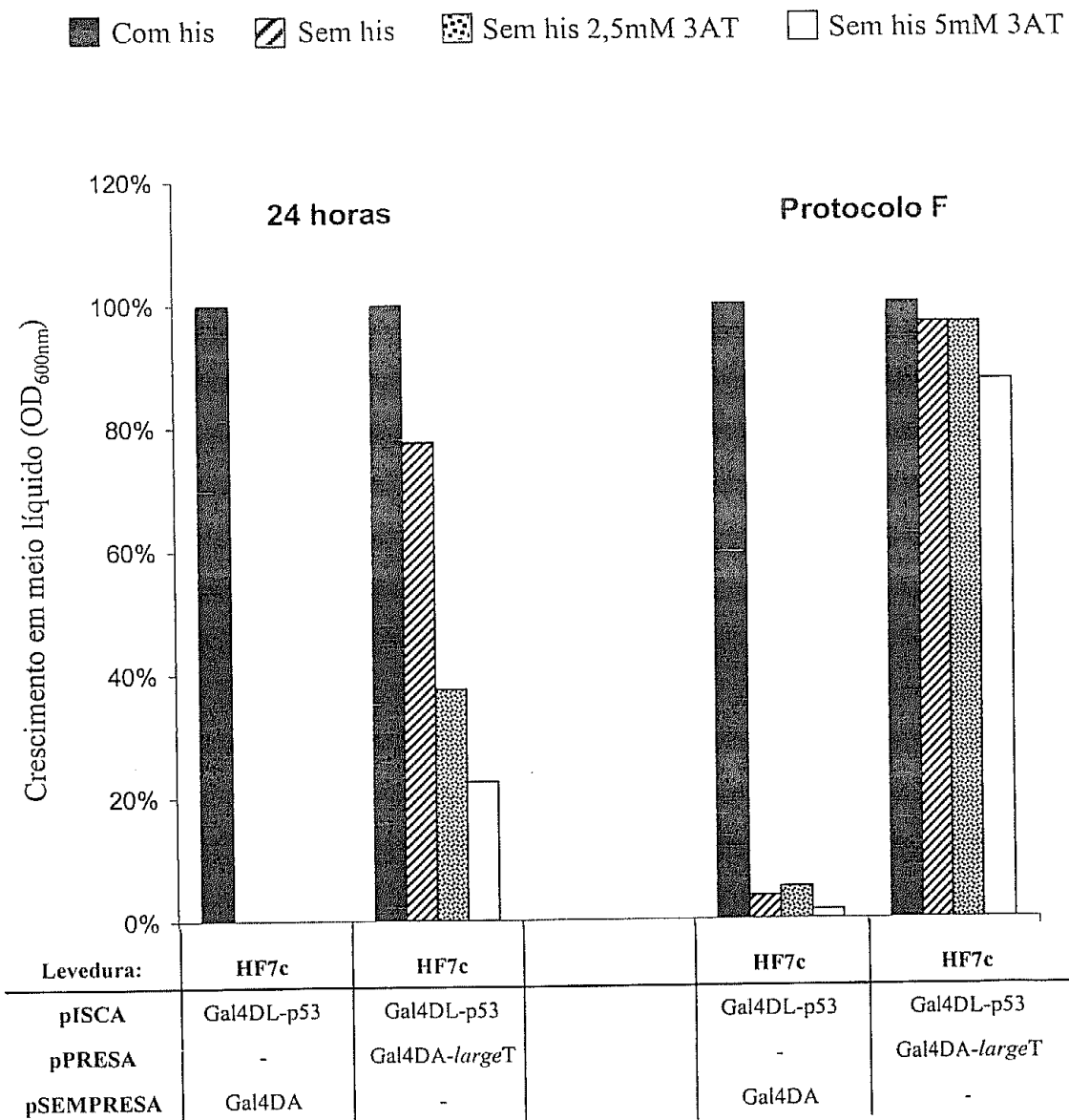
### 4.1 Interação modelo em leveduras HF7c e Y190

Visando o desenvolvimento da metodologia de seleção em meio líquido, a interação modelo entre as proteínas p53 e *largeT* foi utilizada como clone positivo.

Inicialmente, foram realizados ensaios de ativação do gene repórter *HIS3* por crescimento em meio líquido (24 horas ou após diluições – protocolo F cuja recuperação de clones positivos foi obtida eficientemente dentre os protocolos testados neste trabalho e descritos detalhadamente mais adiante) em duas linhagens de leveduras *S. cerevisiae* (HF7c e Y190) albergando os plasmídios da interação modelo para verificar se as leveduras poderiam ser utilizadas nas simulações eficientemente. Os ensaios também foram conduzidos para o controle negativo (expressando Gal4DL-p53 + Gal4DA).

Em ensaios de crescimento em meio SD<sup>s</sup> líquido para a levedura *S. cerevisiae* HF7c (figura 5), ambos procedimentos (24 horas e após diluições) distinguiram as leveduras transformadas com pISCA e pPRESA (expressando Gal4DL-p53 + Gal4DA-*largeT*) daquelas transformadas com pISCA e pSEMPRESA (expressando Gal4DL-p53 e Gal4DA). O ensaio após diluições facilitou a distinção entre a situação de ativação forte do gene repórter e a ativação basal, já que mesmo na presença de 3AT 5mM foi obtido crescimento similar, próximo de 100%, ao controle incubado com histidina.





**Figura 5: Comportamento de leveduras *S. cerevisiae* da linhagem HF7c com interação de duplo-híbrido após 24hs de crescimento e após diluições.** As leveduras de controle negativo (HF7c:Gal4DL-p53 + Gal4DA) ou de duplo-híbrido de interação forte (HF7c:Gal4DL-p53 + Gal4DA-largeT) foram inoculadas em meio SD<sup>s</sup> líquido com histidina ou sem histidina suplementado com 3AT 0; 2,5 e 5mM como indicado. O crescimento em meio líquido foi avaliado pela medida de densidade do meio líquido em espectrofotômetro (OD<sub>600nm</sub>) após 24 horas de cultivo e segundo protocolo F descrito em Materiais e Métodos - item 3.15.

A figura 6 mostra que é também possível, utilizando a linhagem *S. cerevisiae* Y190, distinguir entre interação forte (Gal4DL-p53 + Gal4DA-*LargeT*) e o controle negativo (Gal4DL-p53 + Gal4DA) em meio SD<sup>s</sup> líquido sem histidina suplementado com 3-aminotriazol (3AT) após 24 horas de crescimento e após diluições. A capacidade de crescimento de leveduras do controle negativo, em meio líquido sem histidina, e o pequeno crescimento observado em 3AT 2,5mM, devem-se ao elevado nível basal do repórter nesta linhagem, assim como observado em meio SD<sup>s</sup> sólido (não mostrado). Concentrações de 3AT 5mM foram suficientes para minimizar este crescimento em procedimentos de 24 horas de cultivo e de diluições, não sendo necessárias concentrações da droga tão elevadas (35mM) como em meio SD<sup>s</sup> sólido.

#### **4.1b Recuperação de clones positivos em meio líquido**

Para desenvolver o método de seleção em meio líquido, foi necessário investigar se era possível a recuperação de clones positivos em cultura líquida, sem que ocorresse crescimento de controle negativo (sem ativação do repórter *HIS3*). Para determinar o intervalo de tempo mais adequado para recuperação de clones positivos, seis protocolos de diluições foram delineados para conduzir o ensaio, utilizando novamente a interação modelo (p53 e *largeT*).

Os protocolos (figura 4) consistiram em diluições (1:10 e 1:100) de culturas de leveduras co-transformadas, durante o intervalo de 120 horas, finalizando-se pela análise de ativação de gene repórter *HIS3* por medida de densidade do meio SD<sup>s</sup> líquido em espectrofotômetro. A diferença principal entre os protocolos consiste na amplitude (1:10 ou 1:100) e momento (após 24, 48 ou

72 horas de cultivo) da primeira diluição (Material e Métodos – item 3.15).

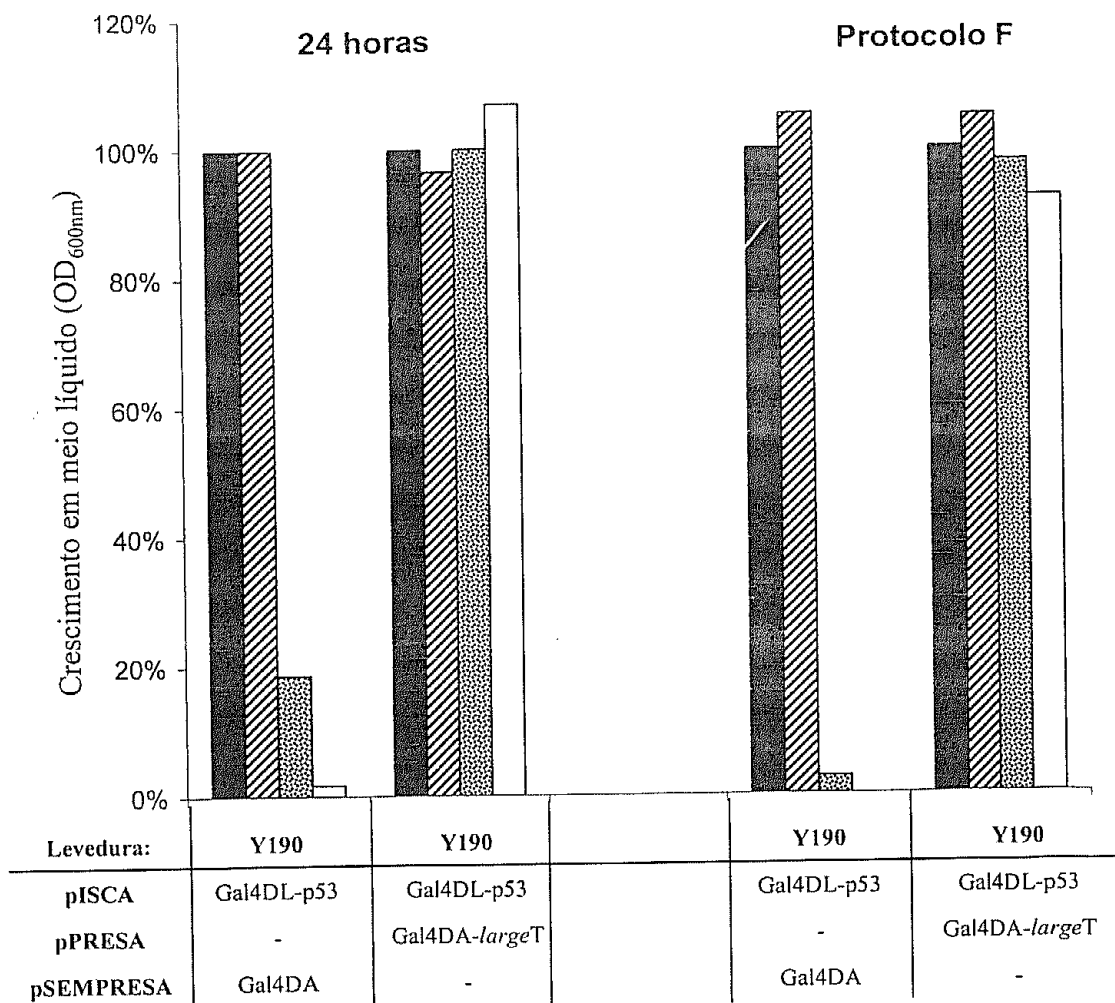
O ensaio dos seis protocolos foi conduzido por co-transformação de leveduras *S. cerevisiae* HF7c e Y190 com 1 $\mu$ g de pISCA (expressão de Gal4DL-p53), 1 $\mu$ g de pSEMPRESA (expressão de Gal4DA) e 0; 0,1; 1; 10 ou 100ng de pPRESA (expressão de Gal4DA-*largeT*), como esquematizado na tabela 4. Assim, seria simulada a triagem de clones positivos (pISCA + pPRESA), em concentrações crescentes, em meio a clones de controle negativo (pISCA + pSEMPRESA).

**Tabela 4: Simulações de seleção com sistema de duplo-híbrido.** (+) presença da construção, (-) ausência da construção. pISCA (Gal4DL-p53), pSEMPRESA (Gal4DA), pPRESA (Gal4DA-*largeT*).

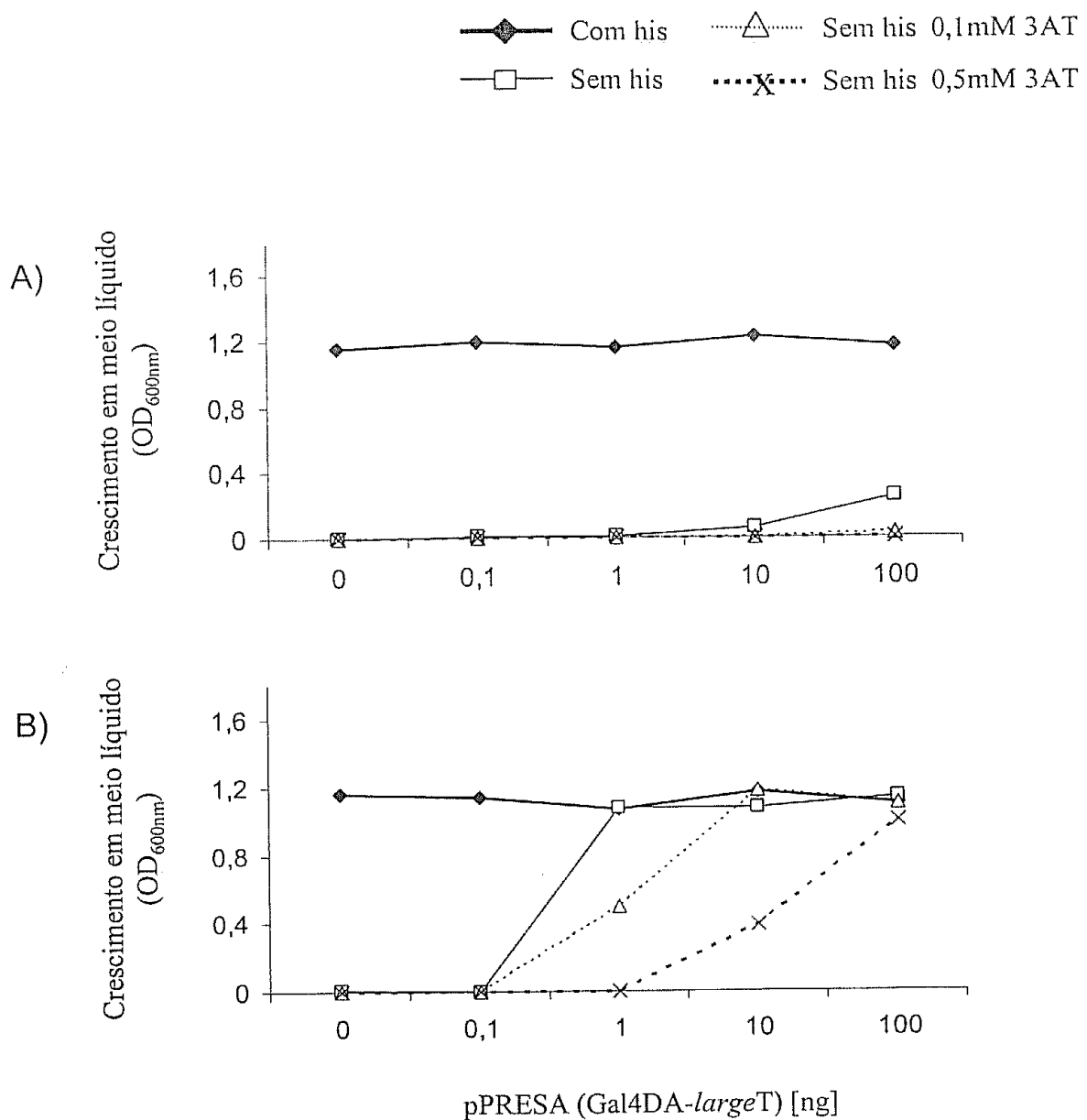
Transformações	pISCA (1 $\mu$ g)	pSEMPRESA (1 $\mu$ g)	pPRESA
1	+	+	-
2	+	+	+ (0,1 ng)
3	+	+	+ (1 ng)
4	+	+	+ (10 ng)
5	+	+	+ (100 ng)

Como mostrado na figura 7A, não foi observado crescimento significativo (valores de OD acima 0,5) ao final das incubações, com o protocolo A, para a levedura *S. cerevisiae* HF7c, nem mesmo utilizando-se 100ng de pPRESA em meio sem histidina na ausência de 3AT. O crescimento na presença de histidina foi sempre obtido, indicando que a transformação dupla foi eficiente.

Com his  
  Sem his  
  Sem his 2,5mM 3AT  
  Sem his 5mM 3AT

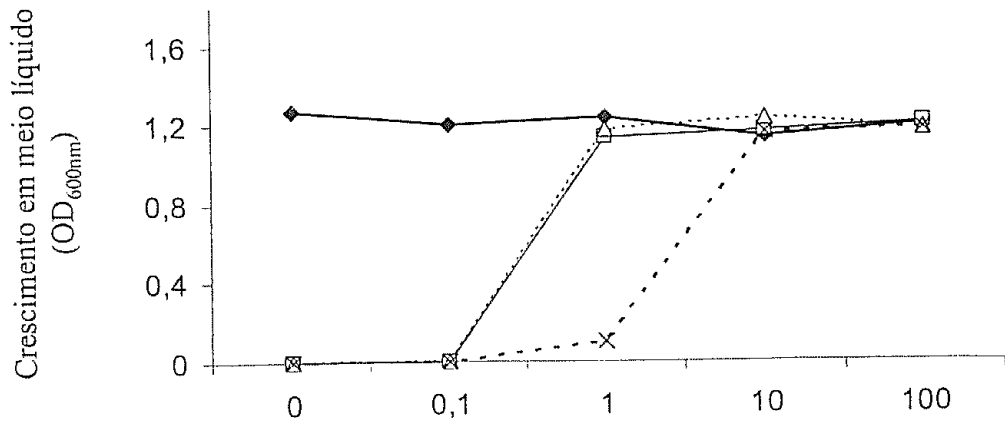


**Figura 6: Comportamento de leveduras *S. cerevisiae* da linhagem Y190 com interação de duplo-híbrido após 24hs de crescimento e após diluições.** As leveduras de controle negativo (Y190:Gal4DL-p53 + Gal4DA) ou de duplo-híbrido de interação forte (Y190:Gal4DL-p53 + Gal4DA-largeT) foram inoculadas em meio SD<sup>s</sup> líquido com histidina ou sem histidina suplementado com 3AT 0; 2,5 e 5mM. O crescimento em meio líquido foi avaliado pela medida de densidade do meio líquido em espectrofotômetro (OD<sub>600nm</sub>) após 24 horas de cultivo e segundo protocolo F descrito em Materiais e Métodos - item 3.15.

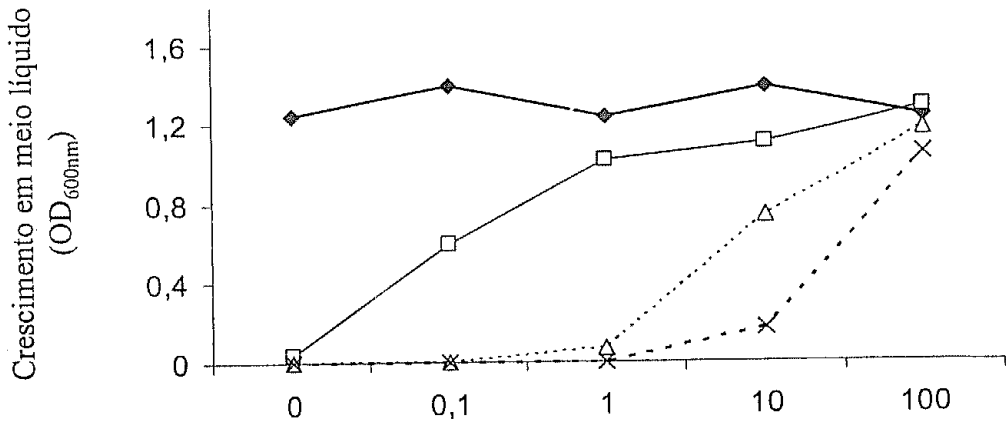


**Figura 7: Estabelecimento do protocolo de diluições utilizando leveduras *S. cerevisiae* HF7c.** A mistura de transformação contendo 1 $\mu$ g de pISCA (Gal4DL-p53), 1 $\mu$ g de pSEMPRESA (Gal4DA) e as quantidades indicadas de pPRESA foi inoculada em meio SD<sup>S</sup> líquido com histidina ou sem histidina suplementado com 3AT 0; 0,1 e 0,5mM, conforme indicado, e submetidas aos procedimentos de diluições como descrito em Materiais e Métodos, item 3.15 e esquematizados na figura 4 . A) Teste A (diluições 1:100 indicadas e absorbância mensurada em 120 horas). B) Teste B (diluições 1:100 indicadas e absorbância mensurada em 120 horas). C) Teste C (diluições 1:100 indicadas e absorbância em 120 horas). D) Teste D (diluição 1:10 em 24 horas seguido por diluições 1:100 indicadas e absorbância mensurada em 120 horas). E) Teste E (diluição 1:10 em 48 horas seguido por diluições 1:100 indicadas e absorbância mensurada em 120 horas). F) Teste F (diluição 1:10 em 72 horas, diluição 1:100 em 96 horas, absorbância mensurada em 120 horas).

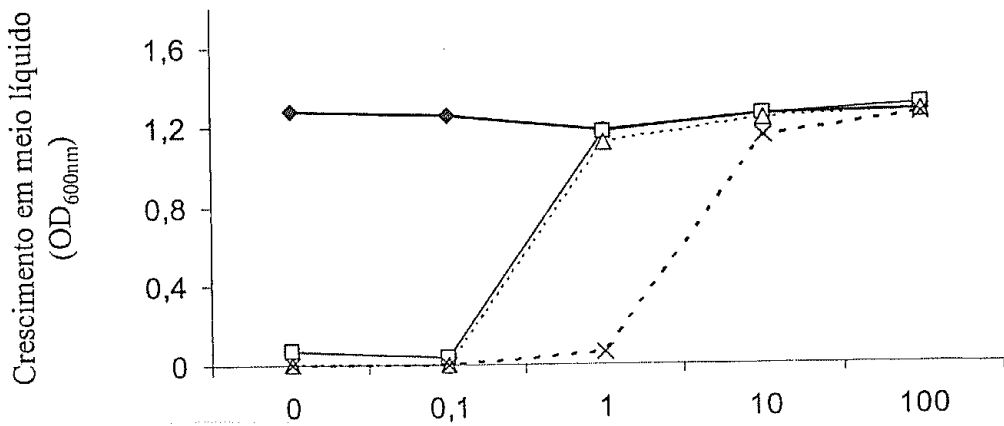
C)



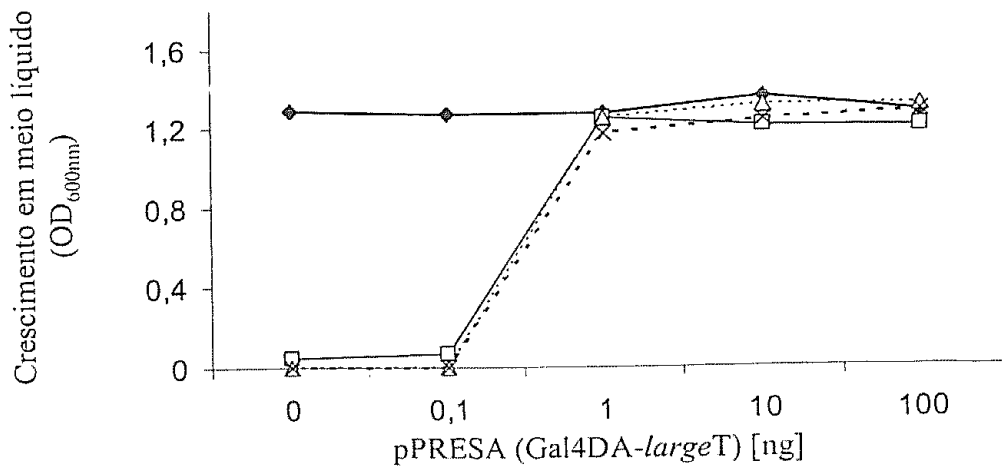
D)



E)



F)



Quando a primeira diluição (1:100) foi feita 48 horas após a transformação (protocolo B, figura 7B), houve eficiente recuperação de clone(s) positivo(s) utilizando-se apenas 1ng de pPRESA em meio sem histidina. Todavia, quando o experimento foi conduzido na presença de 3AT, só houve recuperação eficiente utilizando-se maiores quantidades de pPRESA.

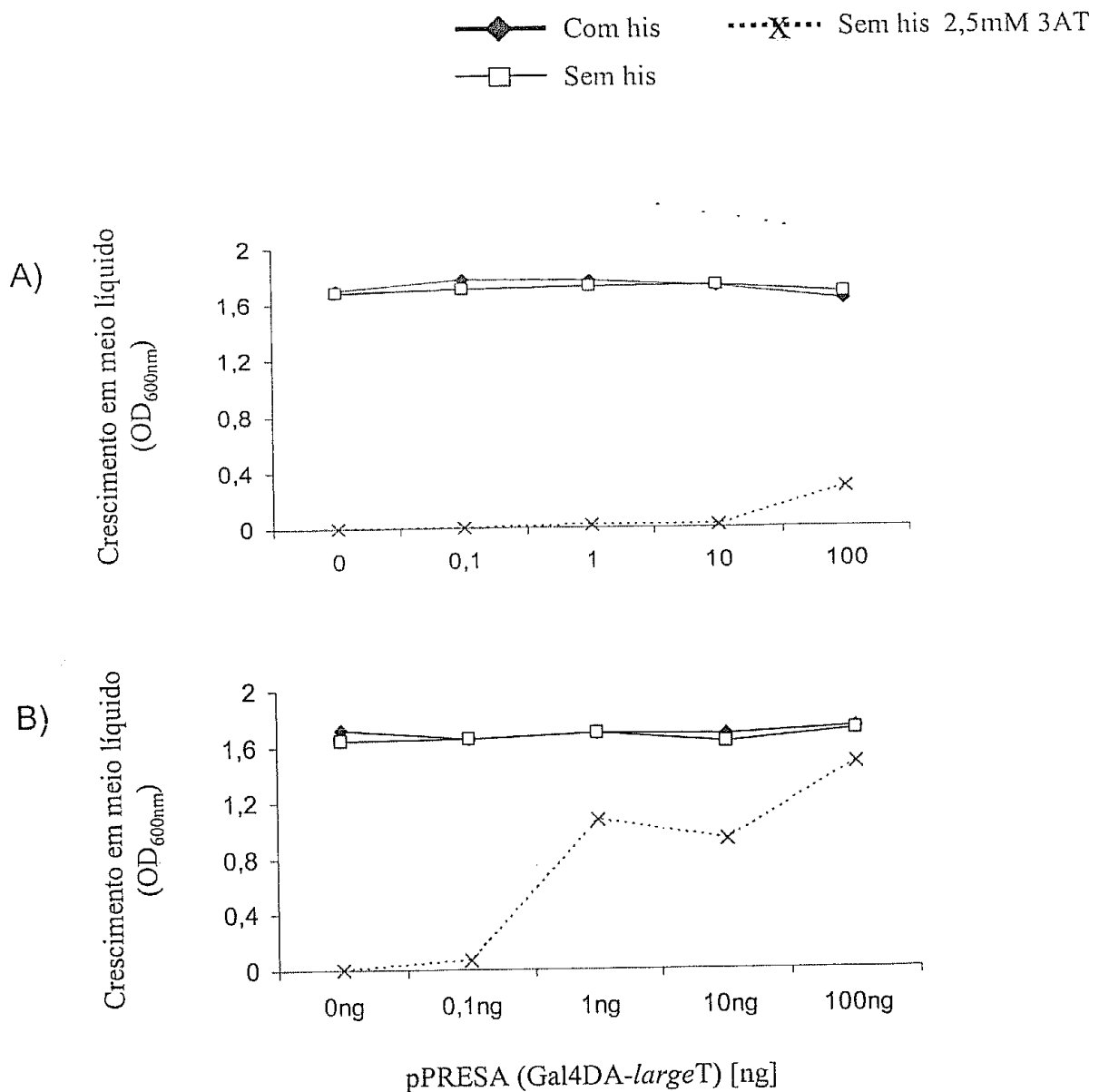
O resultado obtido foi um pouco mais eficiente no protocolo C (figura 7C), onde foi permitido o crescimento do clone positivo por 72 horas antes da primeira diluição de 1:100.

A recuperação de clones foi relativamente mais eficiente quando a primeira diluição aplicada foi de 1:10 (compare as figuras 7A, 7B e 7C com, respectivamente, 7D, 7E e 7F).

Como a recuperação foi maximizada no protocolo F, este protocolo foi escolhido para utilização com a levedura *S. cerevisiae* HF7c. Nesta última condição, foi possível a recuperação eficiente de clones de interação positiva a partir de 1ng de pPRESA em todas as concentrações de 3AT.

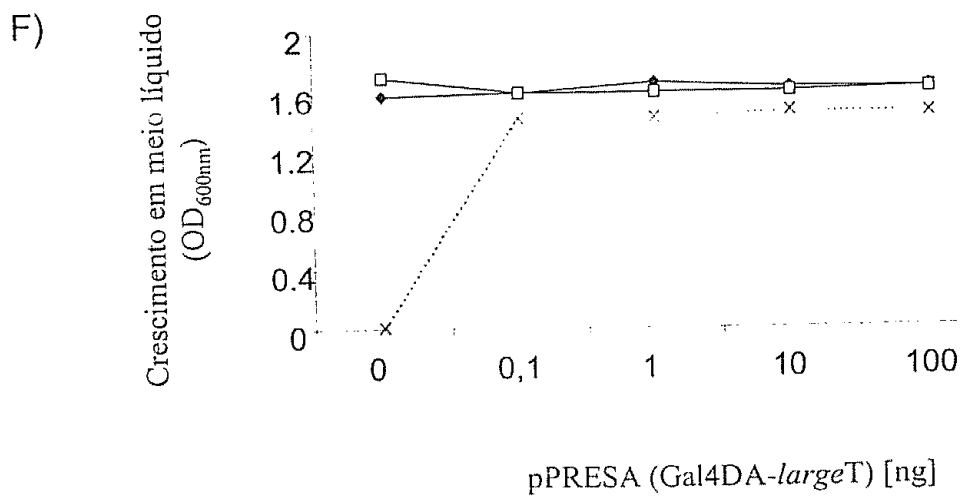
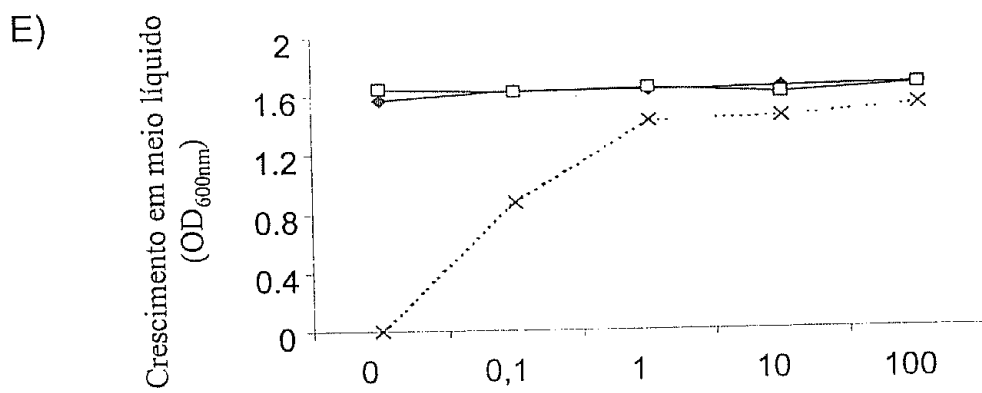
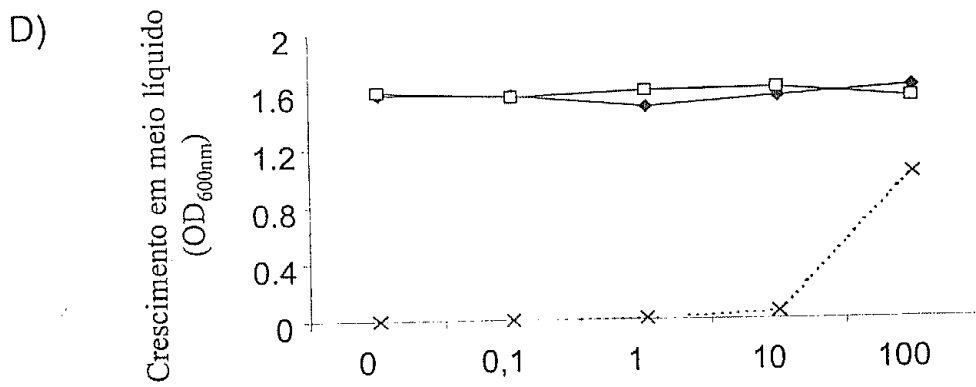
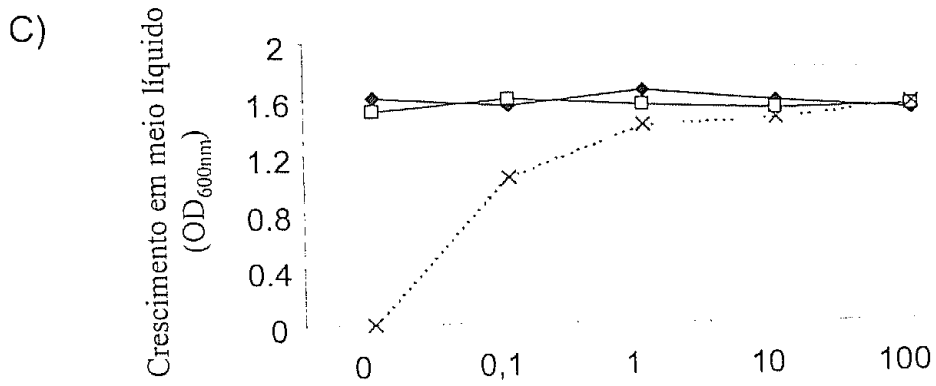
Para a levedura *S. cerevisiae* Y190, os resultados dos protocolos A - F (figura 8) foram bastante similares ao observado para a levedura *S. cerevisiae* HF7c (figura 7).

Como a linhagem Y190 apresenta transcrição basal do gene repórter mais elevada, houve crescimento das culturas em meio sem histidina (figura 8, símbolos vazados) mesmo na ausência de pPRESA (0ng). A adição de 3AT 2,5mM foi suficiente para abolir este crescimento, de forma reprodutiva (figura 8A-8F), sem impedir a recuperação eficiente de clones positivos.



**Figura 8: Estabelecimento do protocolo de diluições utilizando leveduras *S. cerevisiae* Y190.** A mistura de transformação contendo 1 $\mu$ g de pISCA (Gal4DL-p53), 1 $\mu$ g de pSEMPRESA (Gal4DA) e as quantidades indicadas de pPRESA foi inoculada em meio SD<sup>s</sup> líquido com histidina ou sem histidina suplementado com 3AT 0 e 2,5mM, conforme indicado, e submetidas aos procedimentos de diluições como descrito em Materiais e Métodos, item 3.15 e esquematizados na figura 4 . A) Teste A (diluições 1:100 indicadas e absorbância mensurada em 120 horas). B) Teste B (diluições 1:100 indicadas e absorbância mensurada em 120 horas). C) Teste C (diluições 1:100 indicadas e absorbância em 120 horas). D) Teste D (diluição 1:10 em 24 horas seguido por diluições 1:100 indicadas e absorbância mensurada em 120 horas). E) Teste E (diluição 1:10 em 48 horas seguido por diluições 1:100 indicadas e absorbância mensurada em 120 horas). F) Teste F (diluição 1:10 em 72 horas, diluição 1:100 em 96 horas, absorbância mensurada em 120 horas).





Novamente, o protocolo F foi o mais eficiente. Nesta última condição, foi possível a recuperação eficiente de clones de interação positiva a partir de 0,1ng de pPRESA.

Para comparar os resultados da simulação de interação em meio líquido obtidos com o protocolo de diluições, a simulação para ambas leveduras também foi conduzida por semeadura da mistura de transformação em placas de meio SD<sup>s</sup> sólido (Material e Métodos – item 3.14).

Como mostrado na tabela 5, a eficiência de transformação foi similar em todas as cinco transformações independentes (placas com histidina) utilizando leveduras *S. cerevisiae* HF7c. O número médio de colônias obtido na presença de 3AT 5mM foi relativamente proporcional à quantidade de pPRESA utilizada. Obteve-se cerca de 1 colônia por placa com a transformação que utilizou 1ng de pPRESA, ao mesmo tempo em que houve crescimento em meio líquido ao final do protocolo F (figura 7F). Resultado similar foi obtido na ausência de 3AT em meio sem histina (tabela 5 e figura 7F).

O uso de 3AT é, portanto, desnecessário em ambos métodos de seleção, placas e meio líquido, uma vez que a repressão exercida pela proteína p53 e o baixo nível de transcrição basal da linhagem *S. cerevisiae* HF7c são suficientes para impedir o crescimento de clones de controle negativo.

Utilizando leveduras *S. cerevisiae* Y190 (tabela 6), com 0,1ng de pPRESA não foi possível recuperar clones pelo método convencional de seleção em meio SD<sup>s</sup> sólido sem histidina suplementado com 35mM 3AT. A recuperação de clones em placas

só se tornou possível utilizando-se 10ng de pPRESA. A incapacidade de seleção de clones em concentrações inferiores a 10ng não é justificada por excessiva concentração de 3AT (35mM), uma vez que esta concentração foi determinada como mínima para inibição do elevado nível de transcrição basal da linhagem *S. cerevisiae* Y190 (dados de semeadura em placas de meio SD<sup>s</sup> sólido sem histidina suplementado com 3AT 35mM não mostrados).

É importante ressaltar que em todos os protocolos de diluições (figuras 7 e 8) e placas (tabelas 5 e 6) de ambas linhagens de leveduras *S. cerevisiae*, HF7c e Y190, nenhum crescimento de clones foi observado utilizando-se 0ng de pPRESA e concentrações apropriadas de 3AT, indicando especificidade da seleção ou ausência de crescimento de clones epigenéticos prototróficos para histidina.

Os resultados demonstram que o protocolo de diluições F foi bastante adequado à recuperação eficiente de clones em meio líquido, em ambas linhagens de leveduras *S. cerevisiae* (HF7c e Y190). Enquanto, em leveduras *S. cerevisiae* HF7c este protocolo apresentou sensibilidade semelhante à observada na seleção convencional em placas, em leveduras *S. cerevisiae* Y190 a sensibilidade foi um pouco melhor.

#### **4.2 Metodologia de seleção robotizável**

Uma metodologia de seleção robotizável (Material e Métodos – item 3.16) foi desenvolvida neste trabalho utilizando novamente a interação de duplo-híbrido modelo (p53 e *largeT*) na presença de controle negativo.

**Tabela 5: Número médio de colônias crescidas em seleção convencional em placas utilizando leveduras *S. cerevisiae* HF7c e diferentes quantidades de pPRESA.**

Meio de cultura SD <sup>s</sup> sólido	Concentração de pPRESA (Gal4DA-largeT) [ng]				
	0	0,1	1	10	100
Com histidina	141	124,5	156	189	126,8
Sem histidina	0	0,5	0,8	44,5	119,3
Sem histidina 3AT 5mM	0	0	0,8	19,5	85

<sup>a</sup> Foi semeado o volume de 50 $\mu$ L da mistura de transformação. <sup>b, c</sup> Foi semeado o volume de 100 $\mu$ L da mistura de transformação.

**Tabela 6: Número médio de colônias crescidas em seleção convencional em placas utilizando leveduras *S. cerevisiae* Y190 e diferentes quantidades de pPRESA.**

Meio de cultura SD <sup>s</sup> sólido	Concentração de pPRESA (Gal4DA-largeT) [ng]				
	0	0,1	1	10	100
Com histidina <sup>a</sup>	4344	4368	3456	3600	3584
Sem histidina <sup>b</sup>	3072	3144	2952	3456	4584
Sem histidina 3AT 35mM <sup>c</sup>	0	0	0	2	20

<sup>a</sup> Foi semeado o volume de 50 $\mu$ L da mistura de transformação. <sup>b, c</sup> Foi semeado o volume de 100 $\mu$ L da mistura de transformação.

A metodologia foi conduzida distribuindo-se o volume equivalente de uma mistura de transformação que normalmente seria semeado em uma placa de meio sólido de 15cm de diâmetro, em 22 poços da placa *deepwell* de 96 poços. Assim, uma placa *deepwell* de 96 poços é capaz de acomodar o equivalente a 4 placas grandes de meio sólido. A segregação dos transformantes entre os poços permitiria, portanto, que se recuperassem clones de intensidades de interação variadas.

Diferentemente do procedimento anterior, onde cinco transformações independentes foram realizadas para simular o aparecimento de clones positivos em frequências crescentes, para padronizar esta seleção duas co-transformações foram realizadas em leveduras *S. cerevisiae* HF7c e Y190: transformação 1 e transformação 2.

Ambas transformações foram preparadas utilizando 1 $\mu$ g de pISCA (Gal4DL-p53) e 1 $\mu$ g de pSEMPRESA (Gal4DA). Apenas à transformação 2 foram adicionados 100ng de pPRESA (Gal4DA-*largeT*). Quatro tubos contendo 10,9ml de meio SD<sup>s</sup> líquido sem histidina foram preparados para a adição de 436 $\mu$ l da transformação 1 e volumes correspondentes a 0, 1, 5 e 10ng de pPRESA (Gal4DA-*largeT*), tomados da transformação 2 (figura 9), no intuito de se obter melhor controle no incremento do aparecimento de clones positivos.

As figuras 10 e 11 mostram os resultados de simulação de obtenção de clones positivos para, respectivamente, as leveduras *S. cerevisiae* HF7c e Y190, sob seleção robotizável. Em ambas leveduras, o número médio obtido de poços da placa *deepwell* com crescimento ( $OD_{600} > 0,5$ ) nas quantidades de 1, 5 e 10ng de

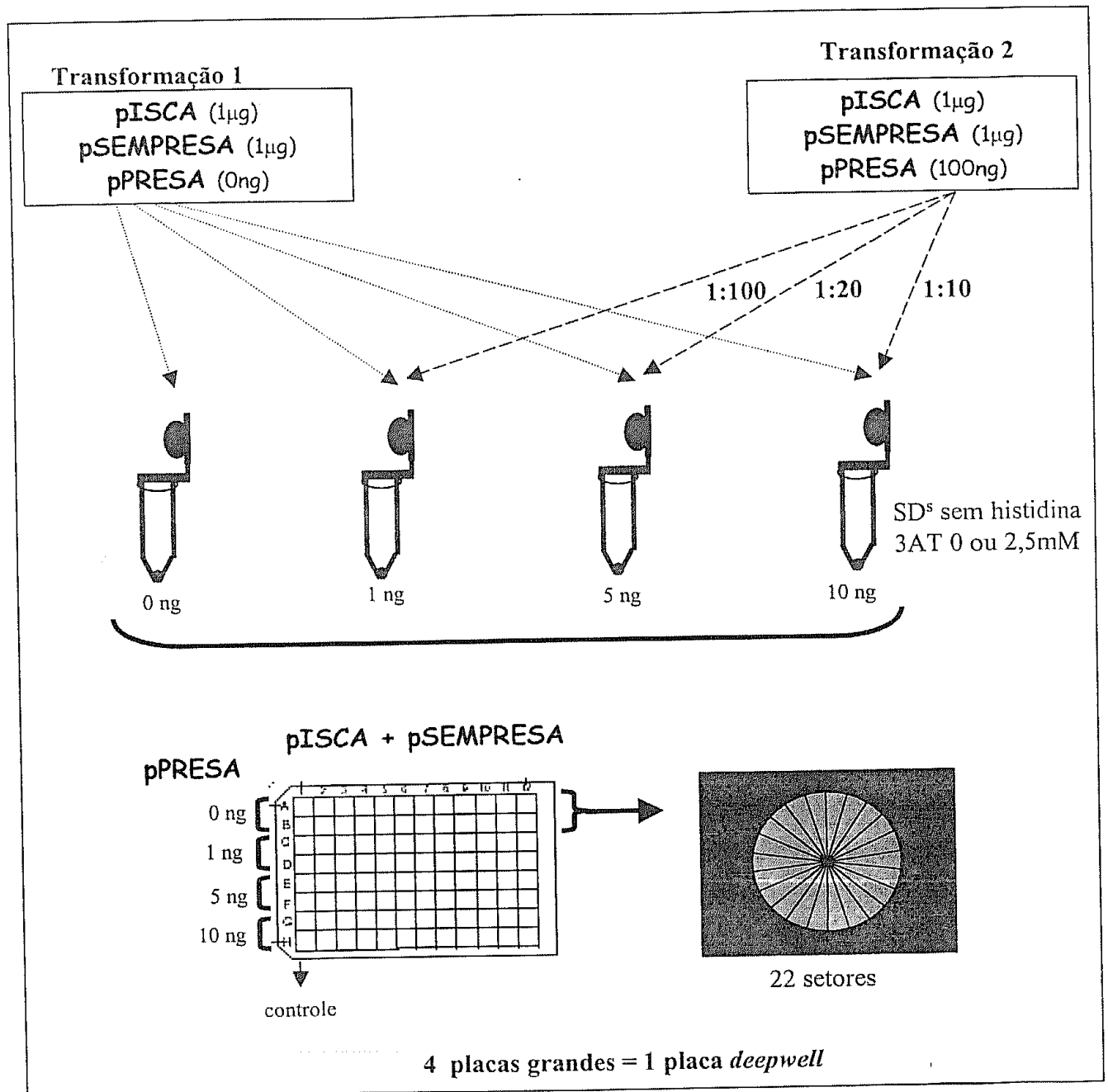
pPRESA (Gal4DA-*largeT*) foi crescente (barras vazadas). Como desejado, em nenhum poço houve crescimento na ausência de pPRESA (0ng).

O número médio de colônias mostrado nas figuras 10A e 11A foi obtido por semeadura da mistura de transformação em meio sólido como na seleção em placas convencional (Material e Métodos – item 3.14).

A comparação da eficiência de seleção robotizável em relação à seleção convencional em placas foi possível após converter os resultados da segunda seleção (número de colônias crescidas em placas) no correspondente em poços crescidos. A conversão foi realizada considerando uma distribuição de Poisson. A média de colônias/setor foi calculada (considerando-se 22 setores por placa) e foi aplicada à fórmula da distribuição para calcular a probabilidade da classe zero -  $P(0)$ , poços sem crescimento. O complemento deste valor,  $1-P(0)$ , representou a fração esperada de poços com crescimento (barras cheias das figuras 10B e 11B).

Como aparente, não foi observada diferença significativa entre o número de poços com crescimento estimado (utilizando os dados da seleção em placas) com o obtido na seleção robotizável (ANCOVA:  $F=1,4$  e  $p=0,449$ ) em levedura *S. cerevisiae* HF7c.

Os resultados para a levedura *S. cerevisiae* Y190, mostrados na figura 11, foram similares aos obtidos para HF7c (figura 10), utilizando-se 3AT 2,5mM na seleção em meio líquido e 35mM em placas, concentração convencional em seleção com esta linhagem.

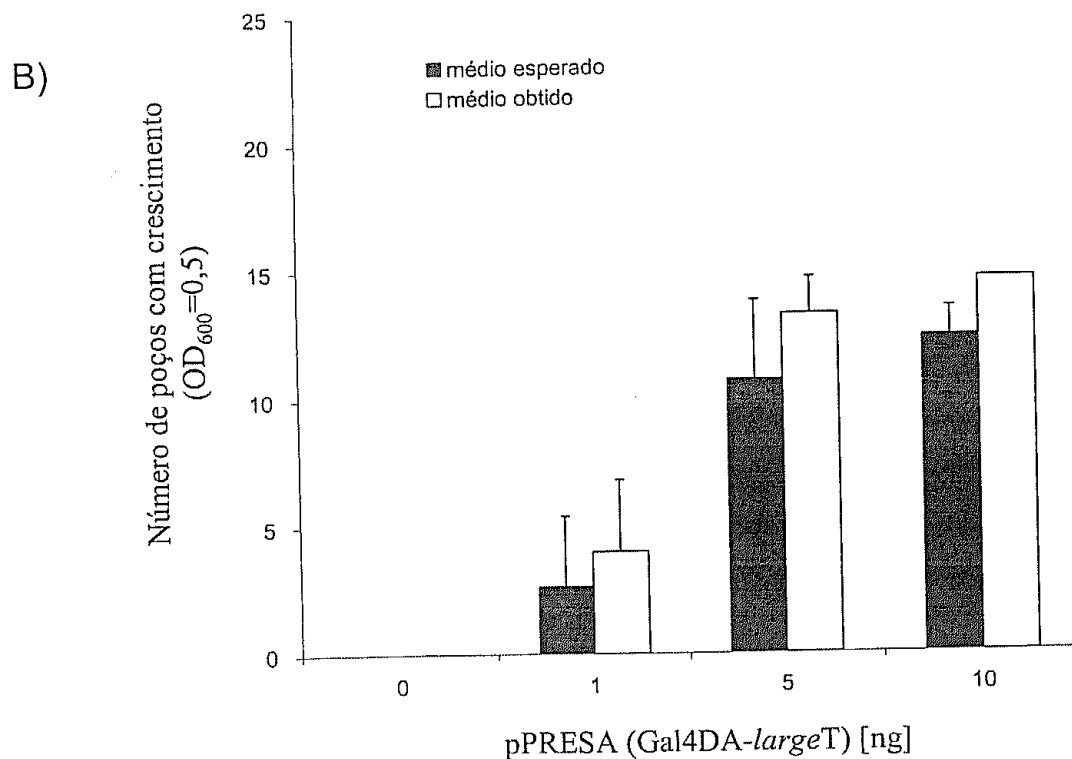


**Figura 9:** Esquema do protocolo de transformação e seleção de duplo-híbrido robotizável baseadas na interação entre as proteínas p53 e largeT. De duas transformações, cada uma contendo 1 µg de pISCA (Gal4DL-p53), 1 µg de pSEMPRESA (Gal4DA) e 0 ou 100ng de pPRESA (Gal4DA-largeT), foram tomadas alíquotas correspondentes a 0; 1; 5 e 10ng de pPRESA em tubos de cultura SD<sup>s</sup> líquida sem histidina suplementado com 3AT 0 ou 2,5mM e distribuídos em 96 poços de placa *deepwell* (400µL por poço). O crescimento foi avaliado pela medida de densidade do meio líquido em espectrofotômetro com leitor de placa de ELISA (OD<sub>600nm</sub>) segundo protocolo de diluições F (Material e Métodos, item 3.15).

A)

pISCA	pSEMPRESA	pPRESA	Colônias <sup>a</sup>	Média <sup>b</sup> ( $\mu$ )	P(0) <sup>c</sup>	Poços <sup>d</sup>
1 $\mu$ g	1 $\mu$ g	0ng	0	0	0	0
1 $\mu$ g	1 $\mu$ g	1ng	4,5	0,20	0,81	2,6
1 $\mu$ g	1 $\mu$ g	5ng	30,5	1,39	0,25	10,7
1 $\mu$ g	1 $\mu$ g	10ng	42	1,91	0,15	12,4

<sup>a</sup> = n° médio de colônias em duplicatas. <sup>b</sup> = n° de colônias por 22 setores da placa. <sup>c</sup> = probabilidade da classe 0 da Distribuição de Poisson. <sup>d</sup> = n° esperado de poços com crescimento.

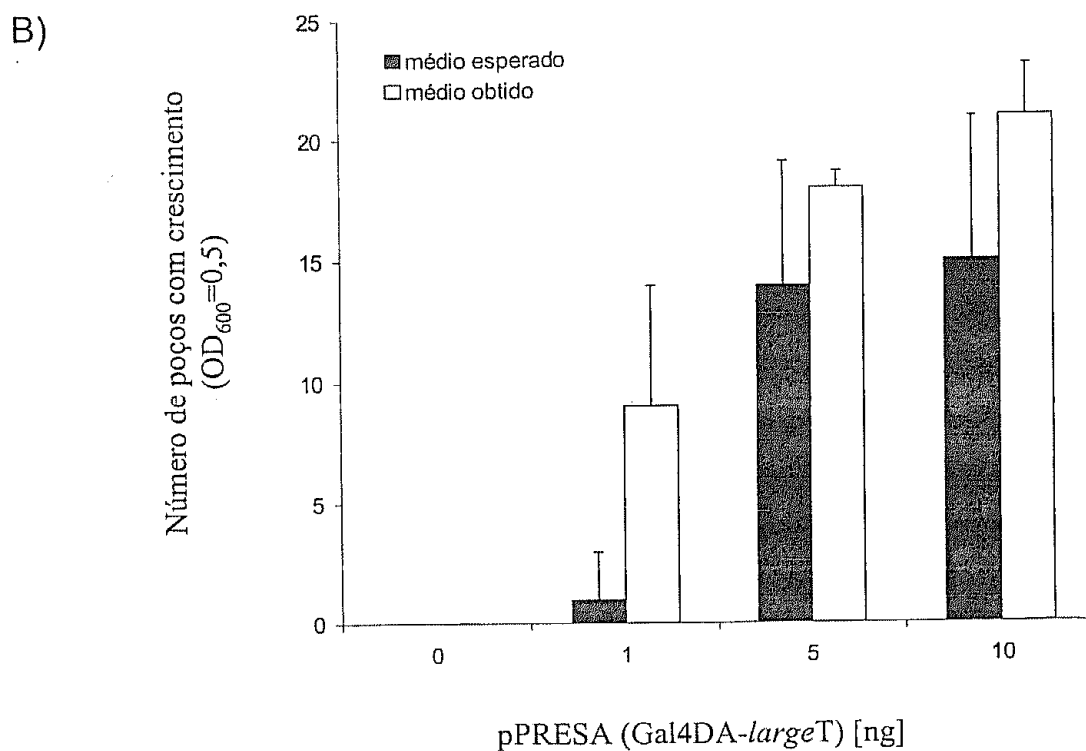


**Figura 10: Comparação entre seleção em placas e robotizável em leveduras *S. cerevisiae* HF7c.** Leveduras *S. cerevisiae* HF7c foram transformadas com pISCA (Gal4DL-p53), pSEMPRESA (Gal4DA) e quantidades crescentes de pPRESA (Gal4DA-largeT) como indicado em A. Cada transformação foi diluída em meio SD<sup>s</sup> líquido sem histidina e distribuída em 22 poços da placa *deepwell*. O crescimento foi avaliado pela medida de densidade do meio líquido em espectrofotômetro com leitor de placa de ELISA após diluições (protocolo F) e o número de poços com crescimento foi registrado (B, barras vazadas). Quantidade equivalente foi semeada em placa de meio sólido SD<sup>s</sup> sem histidina na presença de 3AT 5mM e o número médio de colônias por placa foi registrado e utilizado para estimar o número de poços crescidos esperado (A e barras cheias em B) segundo distribuição de Poisson. Média de dois experimentos.



	pISCA	pSEMPRESA	pPRESA	Colônias <sup>a</sup>	Média <sup>b</sup> ( $\mu$ )	P(0) <sup>c</sup>	Poços <sup>d</sup>
A)	1 $\mu$ g	1 $\mu$ g	0ng	0	0	0	0
	1 $\mu$ g	1 $\mu$ g	1ng	1,5	0,07	0,93	1,49
	1 $\mu$ g	1 $\mu$ g	5ng	26,5	1,2	0,3	14,4
	1 $\mu$ g	1 $\mu$ g	10ng	30,5	1,39	0,25	15,49

<sup>a</sup> = n° médio de colônias em duplicatas. <sup>b</sup> = n° de colônias por 22 setores da placa. <sup>c</sup> = probabilidade da classe 0 da Distribuição de Poisson. <sup>d</sup> = n° esperado de poços com crescimento.



**Figura 11: Comparação entre seleção em placas e robotizável em leveduras *S. cerevisiae* Y190.** Leveduras *S. cerevisiae* Y190 foram transformadas com pISCA (Gal4DL-p53), pSEMPRESA (Gal4DA) e quantidades crescentes de pPRESA (Gal4DA-largeT) como indicado em A. Cada transformação foi diluída em meio SD<sup>s</sup> líquido sem histidina e distribuída em 22 poços da placa *deepwell*. O crescimento foi avaliado pela medida de densidade do meio líquido em espectrofotômetro com leitor de placa de ELISA após diluições (protocolo F) e o número de poços com crescimento foi registrado (B, barras vazadas). Quantidade equivalente foi semeada em placa de meio sólido SD<sup>s</sup> sem histidina na presença de 3AT 35mM e o número médio de colônias por placa foi registrado e utilizado para estimar o número de poços crescidos esperado (A e barras cheias em B) segundo distribuição de Poisson. Média de dois experimentos.

Apesar da eficiência de obtenção de poços crescidos ter sido, em alguns experimentos, maior que a de colônias, esta diferença não foi significativa (ANCOVA:  $F=1,1$  e  $p=0,486$ ).

Portanto, em leveduras *S. cerevisiae* HF7c e Y190, os resultados de seleção robotizável utilizando 22 poços foram equivalentes a seleção convencional de placas, demonstrando correspondência entre colônia e poço com crescimento.

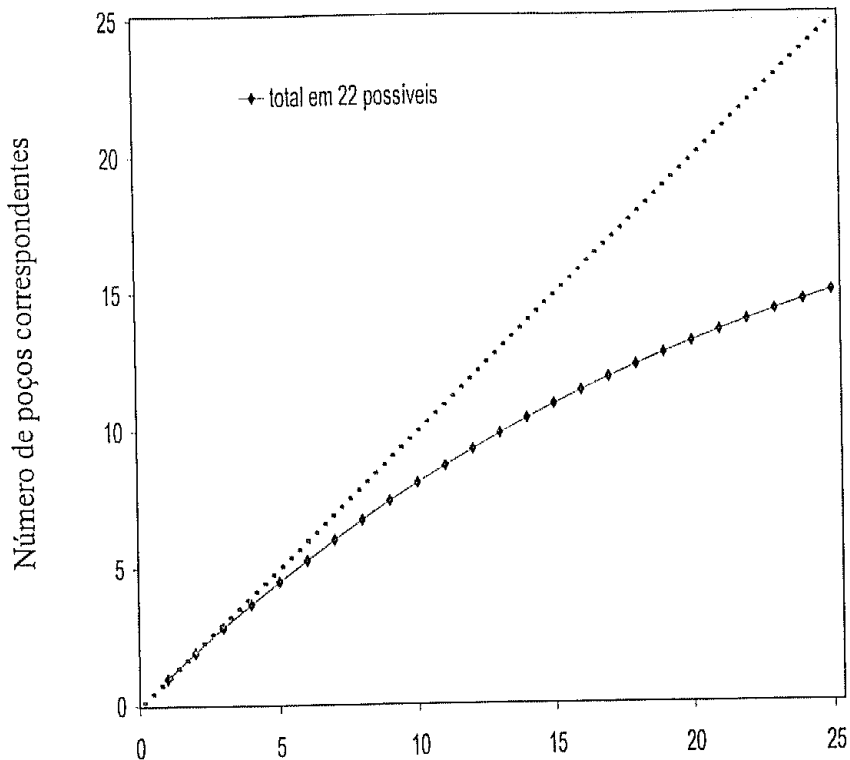
#### **4.3 Correspondência colônia-poço**

Uma modelagem do sistema foi conduzida segundo a distribuição de Poisson, considerando-se 22 e 96 poços da placa *deepwell* para estimar o número máximo de colônias em placas que manteria a correspondência colônia-poço em ensaios de seleção robotizável e placas (figura 12).

A modelagem do sistema sugeriu que a seleção robotizável apresenta certa limitação. A relação de uma colônia para um poço com crescimento perdeu a linearidade quanto mais freqüentes foram os clones positivos (colônias).

A equivalência acima de 5 colônias por placa foi perdida considerando-se o equivalente a uma placa distribuído em 22 poços (figura 12A), pois foi obtido um menor número de poços com crescimento. Quando considerou-se o equivalente a uma placa distribuído em 96 poços (figura 12B), a equivalência foi perdida apenas acima de 20 colônias por placa.

A)



B)

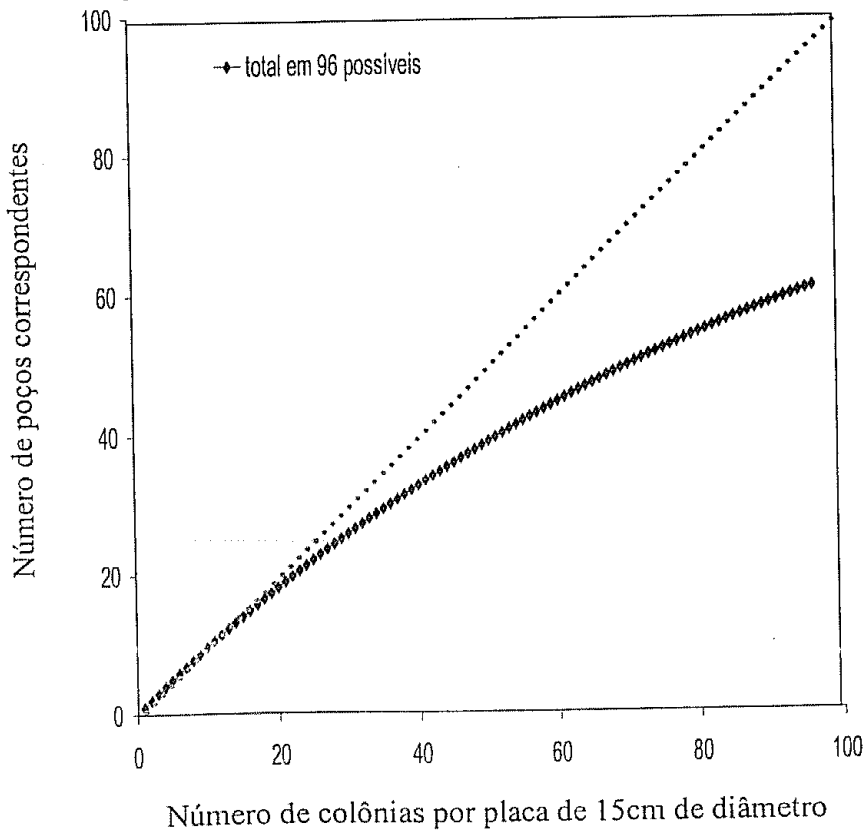


Figura 12: Proporção entre número de colônias e seu correspondente em poços na placa *deepwell* esperado por distribuição de Poisson. A) Simulação utilizando 22 poços de placa *deepwell* como o equivalente a uma placa. B) Idem, para 96 poços. Distribuição linear está representada por uma linha pontilhada.

Assim, a recuperação linear de clones positivos requer um número apropriado de poços a cada nível de frequência de clones positivos. Se os clones positivos apresentarem baixa frequência, ou seja, quando a recuperação de clones positivos em placas de 15cm de diâmetro for um evento raro, o uso de menor número de poços na placa *deepwell* é adequado. No entanto, quando as interações são muito frequentes, ou seja, acima de cinco clones positivos por placa de 15cm de diâmetro, é necessário o uso de maior número de poços na placa *deepwell*.

Nossos resultados indicam que a seleção robotizável pode ser aplicada com sucesso quando se deseja detectar clones de intensidades de interação variadas (fracas a fortes). É importante ressaltar que a "unidade formadora de colônias" em placas de meio sólido correspondeu à "unidade geradora de crescimento" em poços de placa *deepwell*, o que era esperado, mas nunca antes demonstrado.

#### **4.4 Metodologia de seleção em cultura única**

##### **4.4.1 Distinção entre competidores utilizando leveduras HF7c ou Y190**

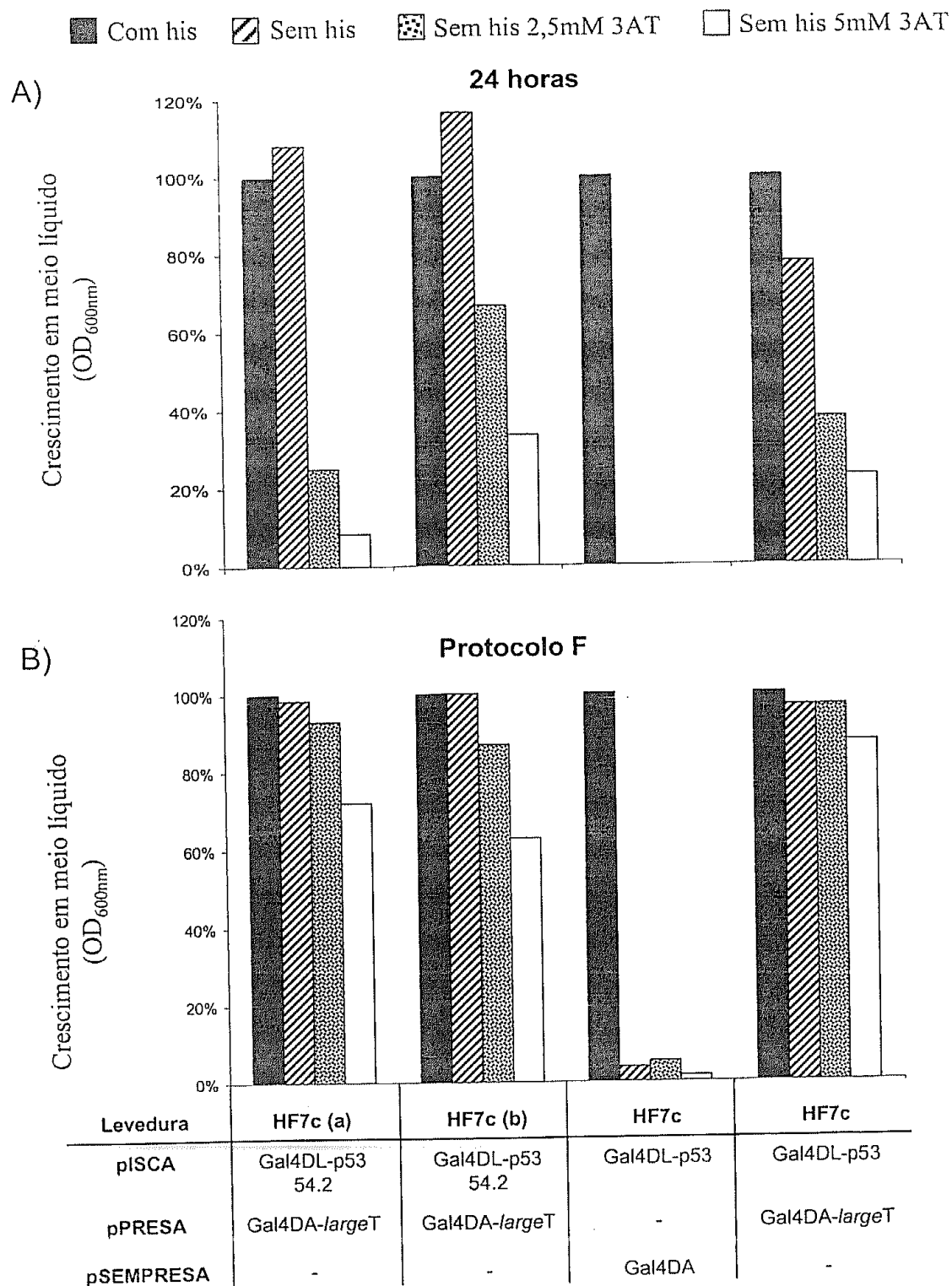
Para conduzir os ensaios de competição entre leveduras de interação de duplo-híbrido forte *versus* fraca, foi necessário verificar se, em linhagens de leveduras *S. cerevisiae* HF7c e Y190, esta distinção entre os competidores seria possível.

Para tanto, as leveduras competidoras albergando duplo-híbrido de interação forte (Gal4DL-p53 + Gal4DA-*LargeT*) ou fraca (Gal4DL-p53 54.2 + Gal4DA-*largeT*) foram ensaiadas isoladamente

quanto à ativação do gene repórter *HIS3*, por crescimento em meio líquido (24 horas ou após diluições – Material e Métodos, item 3.15, protocolo F). Os ensaios também foram conduzidos para o controle negativo (expressando Gal4DL-p53 + Gal4DA).

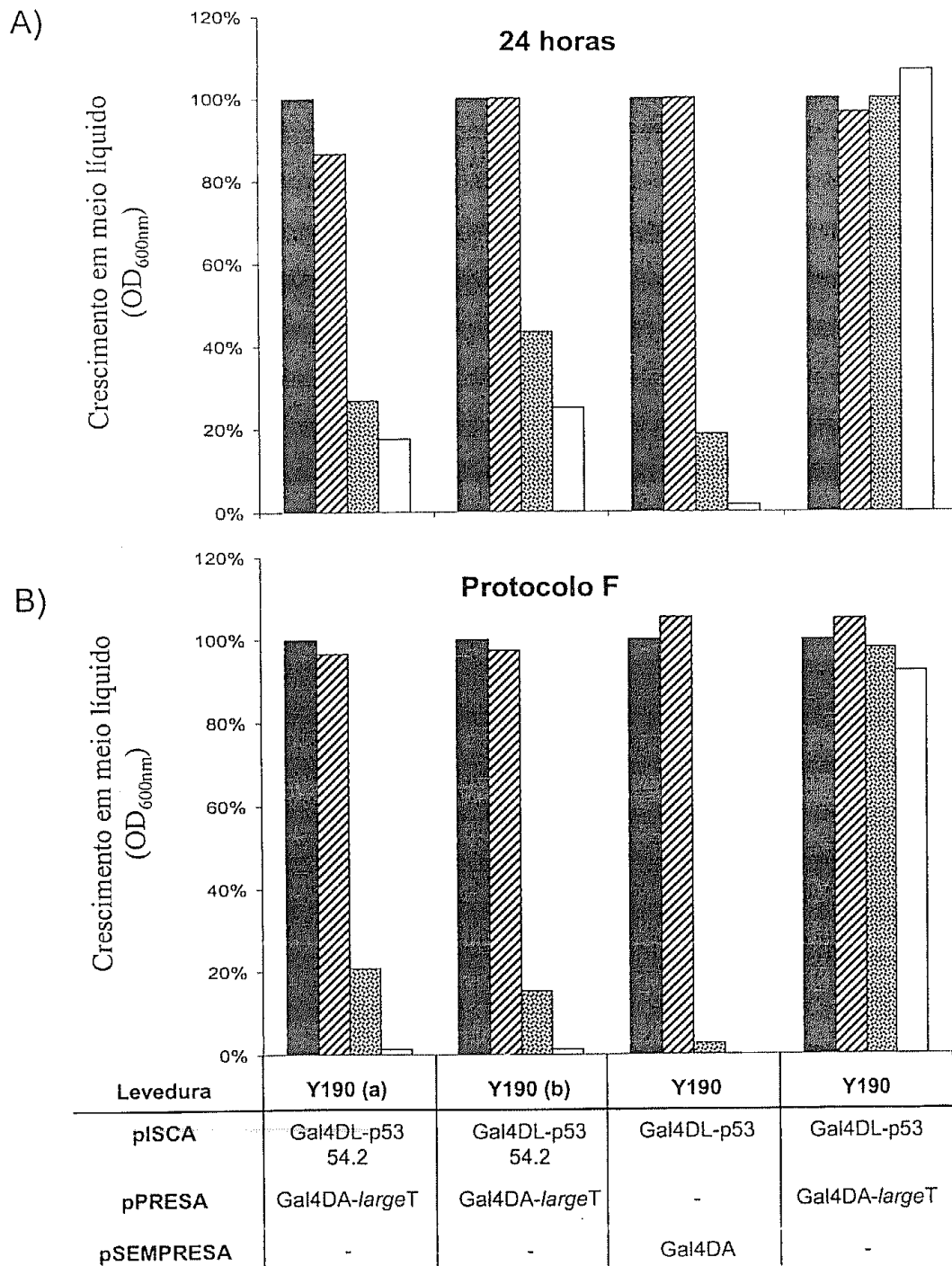
Os dados apresentados na figura 13 mostram que, em levedura *S. cerevisiae* HF7c, não foi possível a distinção entre a ativação do gene repórter *HIS3* produzida pela interação forte (Gal4DL-p53 + Gal4DA-*LargeT*) daquela produzida por interação fraca (Gal4DL-p53 54.2 + Gal4DA-*largeT*), seja após 24 horas de crescimento ou após diluições (protocolo F). Mesmo utilizando a concentração de 3AT 10mM, não foi possível a eficiente distinção entre interação forte e fraca (dados não mostrados).

Por sua vez, em levedura *S. cerevisiae* Y190 foi possível a distinção entre as leveduras portando duplo-híbrido de interação forte e fraca, como mostrado na figura 14. As leveduras portando o duplo-híbrido de interação forte foram suficientemente capazes de crescer após 24 horas de cultivo ou após diluições, mesmo na presença de 5mM do inibidor (figura 14, barras vazadas). As leveduras com a interação fraca mostraram crescimento reduzido, porém significativo quando comparado ao controle negativo, em meio suplementado com 3AT 2,5mM, após diluições (protocolo F) e, portanto, esta concentração foi considerada adequada para análises subseqüentes de competição.



**Figura 13: Comportamento de leveduras *S. cerevisiae* da linhagem HF7c com interação de duplo-híbrido.** Leveduras contendo duplo-híbrido de interação fraca (HF7c:Gal4DL-p53 54.2 + Gal4DA-largeT), controle negativo (HF7c:Gal4DL-p53 + Gal4DA) e duplo-híbrido de interação forte (HF7c:Gal4DL-p53 + Gal4DA-largeT) foram inoculadas em meio SD<sup>s</sup> líquido com histidina ou sem histidina suplementado com 3AT 0; 2,5 e 5mM como indicado. O crescimento em meio líquido foi avaliado pela medida de densidade do meio líquido em espectrofotômetro (OD<sub>600nm</sub>) após 24 horas de cultivo (A) e após diluições segundo protocolo F (B). (a) e (b) clones independentes de leveduras contendo duplo-híbrido de interação fraca.

Com his  
  Sem his  
  Sem his 2,5mM 3AT  
  Sem his 5mM 3AT



**Figura 14: Comportamento de leveduras *S. cerevisiae* da linhagem Y190 com interação de duplo-híbrido.** Leveduras contendo duplo-híbrido de interação fraca (Y190:Gal4DL-p53 54.2 + Gal4DA-largeT), controle negativo (Y190:Gal4DL-p53 + Gal4DA) e duplo-híbrido de interação forte (Y190:Gal4DL-p53 + Gal4DA-largeT) foram inoculadas em meio SD<sup>s</sup> líquido com histidina ou sem histidina suplementado com 3AT 0; 2,5 e 5mM como indicado. O crescimento em meio líquido foi avaliado pela medida de densidade do meio líquido em espectrofotômetro (OD<sub>600nm</sub>) após 24 horas de cultivo (A) e após diluições segundo protocolo F (B). (a) e (b) clones independentes de leveduras contendo duplo-híbrido de interação fraca.

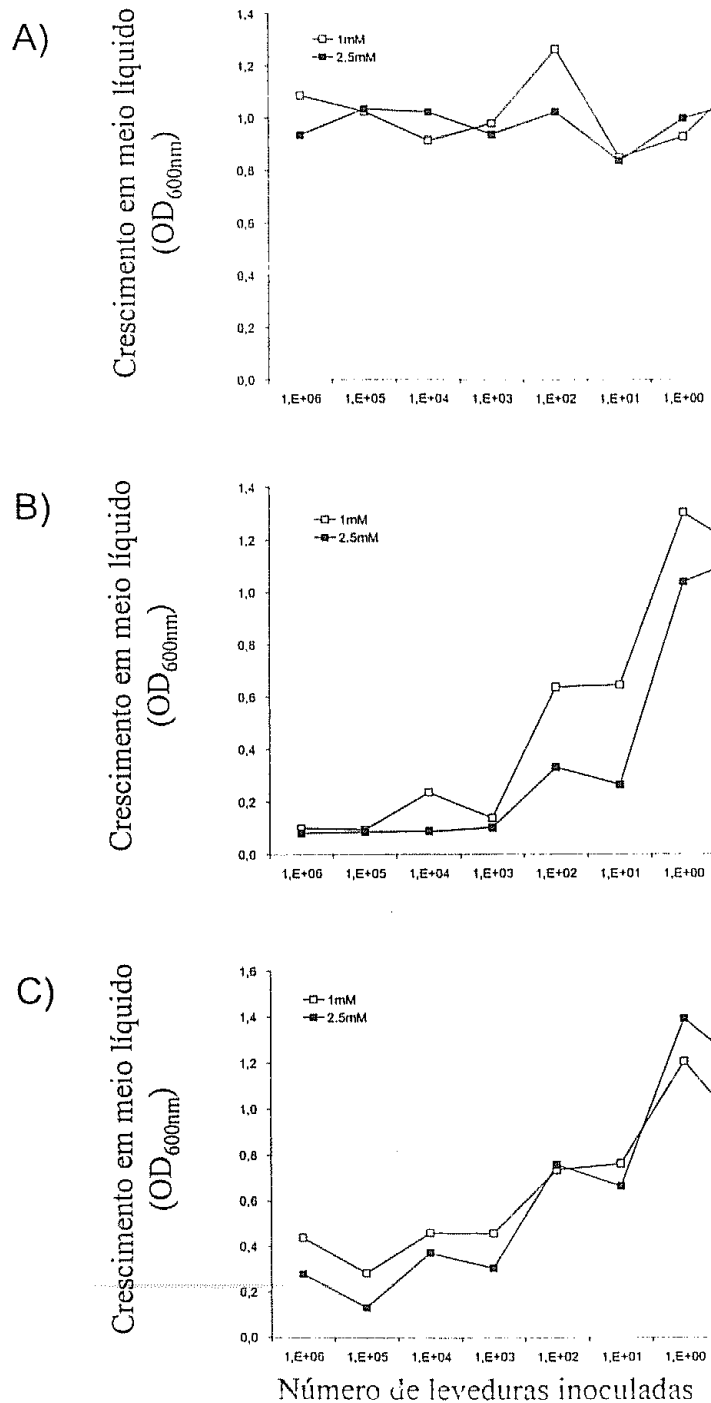
#### 4.4.2 Crescimento em meio líquido em função de diferentes concentrações de inóculo de leveduras competidoras

A análise do ensaio de competição necessita que se conheça a capacidade de crescimento em meio líquido dos diferentes competidores em função do número de leveduras inoculadas. Por exemplo, seria possível o registro de crescimento quando um número elevado de leveduras albergando duplo-híbrido de fraca interação fosse inoculado.

O comportamento de leveduras competidoras foi ensaiado em leveduras *S. cerevisiae* Y190 inoculando-se  $10^6$  células do competidor em 1 poço de placa *deepwell* em meio SD<sup>s</sup> líquido sem histidina suplementado com 3AT 1 ou 2,5mM. Com auxílio de micropipeta multicanal, a cultura foi diluída de forma seriada a 6 poços vizinhos. O mesmo procedimento foi feito com a coluna de 7 poços vizinha, trabalhando-se assim em duplicatas. Com este procedimento, foi possível gerar inóculos de  $10^6$  a  $10^0$  células por poço, nominalmente (figura 15). As culturas foram incubadas e diluídas conforme o protocolo F - Material e Métodos, item 3.15 (a densidade de crescimento foi avaliada com espectrofotômetro com leitor de placa de ELISA).

Como mostrado na figura 15A, ocorreu crescimento em 3AT 1 e 2,5mM (figura 15, símbolos vazados e cheios, respectivamente) para a interação forte (Gal4DL-p53 + Gal4DA-*largeT*), independentemente da concentração do inóculo.





**Figura 15: Ativação de gene repórter *HIS3* por duplo-híbrido de interação forte, negativa ou fraca e crescimento de leveduras *S. cerevisiae* Y190 em meio líquido.** Leveduras albergando duplo-híbrido de interação forte (A) (Y190:Gal4DL-p53 + Gal4DA-*largeT*), controle negativo (B) (Y190:Gal4DL-p53 + Gal4DA) ou duplo-híbrido de interação fraca (C) (Y190:Gal4DL-p53 54.2 + Gal4DA-*largeT*) foram inoculadas em poços de placa *deepwell* (número de leveduras por poço indicado) em meio SD<sup>S</sup> líquido sem histidina suplementado com 3AT 1 e 2,5mM (símbolos vazados e cheios, respectivamente). O crescimento foi avaliado segundo protocolo F (figura 4) com medida de densidade do meio líquido em espectrofotômetro com leitor de placa de ELISA (OD<sub>600nm</sub>).

Para o controle negativo (figura 15B), não foi verificado crescimento quando o inóculo foi superior a  $10^3$  leveduras. Entretanto, inóculos diluídos resultaram no crescimento após diluições mesmo da levedura de controle negativo (figura 15B).

Quando a interação era fraca (figura 15C), também foi observado diminuição de crescimento quando o inóculo continha acima de  $10^3$  células, todavia o crescimento obtido foi distinto do controle do controle negativo.

Portanto, é requerido em ensaios de competição que as quantidades de leveduras competidoras albergando duplo-híbrido de controle negativo ou fraca sejam superiores a  $10^3$  células por inóculo.

#### **4.4.3 Simulação de competição entre interações fortes e fracas**

Após identificar o comportamento em função do tamanho do inóculo de leveduras competidoras e o número ideal das mesmas para realização do experimento, o ensaio de competição foi conduzido (Material e Métodos – item 3.17). A interação forte foi simulada com p53 e *largeT*, enquanto na interação fraca a proteína p53 foi substituída pelo mutante p53 54.2 (D278G, Li e Fields, 1993).

No ensaio, um inóculo de  $10$  e  $10^2$  leveduras contendo duplo-híbrido de interação forte (Gal4DL-p53 + Gal4DA-*LargeT*) foi adicionado, respectivamente, a tubos de cultura nos experimentos 1-3 e 7-9, tabela 7. O volume correspondente a  $10^6$  leveduras do controle negativo (Gal4DL-p53 + Gal4DA) foi adicionado aos experimentos 1-6 da tabela 7. Aos experimentos [2 e 4]; [3, 5, 8 e

10]; [9 e 11], foram adicionadas, respectivamente,  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  leveduras contendo interação de duplo-híbrido fraca (Gal4DL-p53 54.2 + Gal4DA-*largeT*) (tabela 7).

Os resultados de competição mostram que, quando o inóculo continha leveduras portando a interação forte (experimentos 1-3 e 7-9, tabela 7), independentemente da presença de leveduras de interação fraca (experimentos 2-3 e 8-9, tabela 7) ou controle negativo (experimentos 1 e 7, tabela 7), houve crescimento e as leveduras resultantes foram preponderantemente positivas no teste de X-gal (Material e Métodos – item 3.17).

Nos demais casos, não houve crescimento acima de  $OD_{600}=0,5$ , nem as colônias ou supercolônias recuperadas destas culturas com pouco crescimento apresentaram cor azul na revelação.

Os dados mostram, portanto, que é possível recuperar com eficiência clones de interação forte na presença de grandes quantidades de clones, sejam de controle negativo ou de interação fraca, o que está de acordo com os experimentos onde as diluições foram executadas a partir da mistura de transformação (figuras 8F e 11).

Tabela 7: Ensaio de competição entre leveduras *S. cerevisiae* Y190 albergando duplo-híbrido de interação forte ou fraca e controle negativo.

Experimento	3AT (mM)	Número de células inoculadas para cada interação			<i>HIS3</i>	<i>LacZ</i>	
		forte	negativa	fraca	Crescimento (OD <sub>600</sub> > 0,5)	Super-colônia	Colônias isoladas (azuis)
1	1	100	10 <sup>6</sup>	-	1,37	azul	-
2	1	100	10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	1,36	azul	-
3	1	100	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	1,01	azul	-
4	1	-	10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup>	0,19	branca	-
5	1	-	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	0,19	branca	-
6	1	-	10 <sup>6</sup>	-	0,13	branca	-
7	2,5	10	-	-	1,68	-	20/20
8	2,5	10	-	10 <sup>5</sup>	1,71	-	19/20
9	2,5	10	-	10 <sup>6</sup>	1,13	-	17/20
10	2,5	-	-	10 <sup>5</sup>	0,28	-	0/20
11	2,5	-	-	10 <sup>6</sup>	0,14	-	0/20

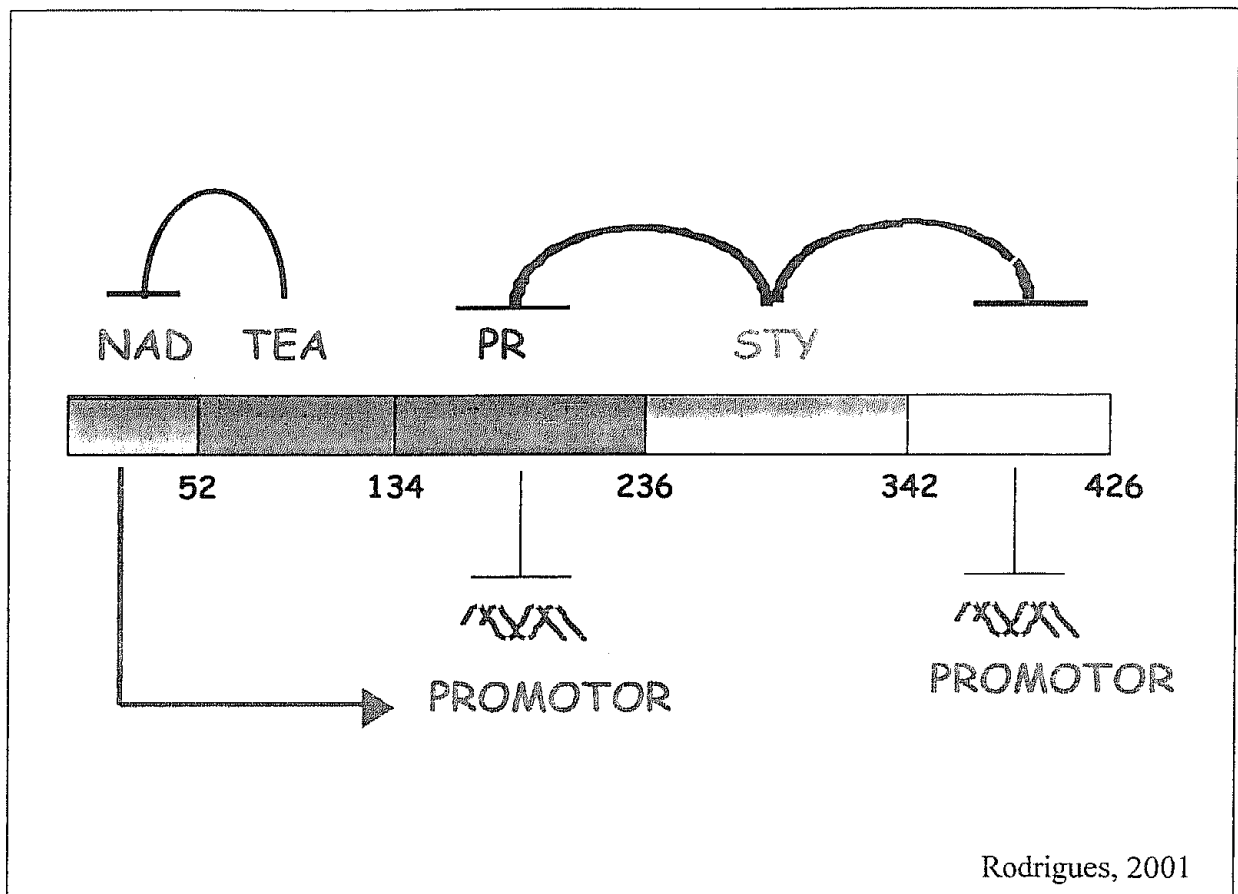
#### 4.4.4 Biblioteca modelo para sistema de mono-híbrido

Muitos trabalhos sugerem que a especificidade das proteínas Tead (*TEA domain proteins*) em ativar e reprimir diferentes genes se deve a interações com outras proteínas, tais como Max, TONDU, PARP, membros da família p160, YAP65, SRF e MEF2 (Gupta *et al.*, 1997; Vaudin *et al.*, 1999; Butler e Ordahl, 1999; Belandia e Parker, 2000; Vassilev *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2002). Esta peculiaridade permite que membros desta família possam ser empregados em estudo de interações.

Em mamíferos, existem quatro parálogas de proteínas Tead (Tead1, Tead2, Tead3 e Tead4) que atuam durante a embriogênese pré-implantacional de mamíferos e no desenvolvimento cardíaco e muscular (Kaneko *et al.*, 1997; Kaneko e DePamphilis, 1998; Jacquemin *et al.*, 1998).

A proteína mTead1 (Tead1 de camundongo), utilizada como modelo para testes de seleção neste trabalho, apresenta cinco domínios: domínio N-terminal, domínio TEA, domínio PR, domínio STY e domínio ZF (Jacquemin *et al.*, 1996).

Estudos realizados por Rodrigues (2001), usando o sistema de mono-híbrido em leveduras, identificou a atividade funcional de todos os domínios de mTead1 (figura 2). O domínio N-terminal (NAD) de mTead1 atua como ativador transcricional e é *cis*-reprimido pelo domínio TEA. O domínio TEA, domínio de ligação a DNA, atua como *cis*-modulador de NAD. Assim, na presença do domínio TEA, o domínio N-terminal perde sua capacidade ativadora quando ensaiado neste sistema. O domínio rico em prolina (PR) atua como repressor transcricional, assim como o



**Figura 2: Desenho esquemático da proteína mTead1.** Domínio N-terminal ativador (NAD), domínio de ligação em DNA *cis*-repressor de N-terminal (TEA), domínio repressor rico em prolinas (PR), domínio rico em serina, treonina e tirosina modulador dos domínios repressores (STY) e domínio repressor C-terminal de ligação a zinco (ZF).

domínio com potencial de ligação a zinco (ZF). O domínio rico em serina, treonina e tirosina (STY) atua como modulador dos domínios repressores PR e ZF.

Aproveitando a capacidade de TEA suprimir a ativação produzida por NAD, foi possível utilizar como modelo de estudo uma biblioteca de mutantes de mTead1(1-134) para sistema de mono-híbrido contendo clones raros que perdem a referida modulação e passam a ativar transcrição.

A biblioteca, construída no Laboratório de Biodados, Biologia Celular e Desenvolvimento – UFMG (Queiroz e colaboradores, não publicado), foi construída por 8 minutos de irradiação com luz ultravioleta (UV 254nm) promovendo cerca de 1 a 2 mutações aleatórias na construção (NAD+TEA). Esta biblioteca contendo 100mil clones a partir de 200µg foi usada para simular interações variadas, dada a presença, ao lado da maioria de clones selvagens, de mutantes em escala de ativadores fracos a fortes ativadores, em um contínuo gradiente.

#### **4.4.5 Triagem da biblioteca de mutantes de mTead1(1-134)**

A seleção em cultura única foi desenvolvida visando o enriquecimento de clones ativadores mais potentes em meio SD<sup>s</sup> líquido.

A disponibilidade de uma biblioteca de mutantes de mTead1(1-134) para sistema de mono-híbrido possibilitou a realização de testes da metodologia de seleção em cultura única (Material e Métodos – item 3.18), uma vez que clones com diferentes níveis de ativação podem ser obtidos.

A capacidade de enriquecimento de clones de interação forte por seleção em cultura única em meio líquido foi conduzida com quatro triagens da biblioteca. Clones foram selecionados paralelamente em cultura única (Material e Métodos – item 3.18) ou em placas de meio sólido (Material e Métodos – item 3.14).

A tabela 8 mostra os resultados das quatro triagens, onde 145 clones foram isolados na seleção em cultura única e 140 clones isolados na seleção em placas.

Em ensaio de ativação de gene repórter *HIS3*, a maior parte dos clones isolados nas três primeiras triagens pela seleção em cultura única foi capaz de crescer acima de 80% em relação ao controle (meio com histidina), como mostrado na figura 16A. No total, 73% dos clones testados foram capazes de crescer acima de 80% (figura 16A).

**Tabela 8: Número de clones isolados na seleção em cultura única e em placas nas quatro triagens da biblioteca de mutantes de mTead1(1-134).**

Triagens	Tipo de seleção	
	cultura única	Placas
1	45	40
2	20	20
3	40	40
4	40	40
<b>Total</b>	<b>145</b>	<b>140</b>



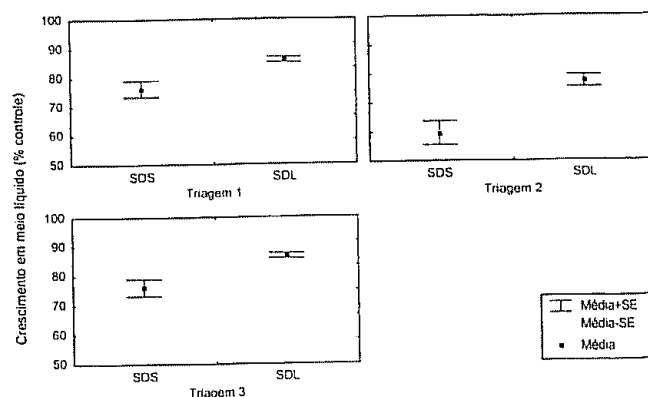
Entretanto, dos clones isolados na seleção em placas, poucos foram capazes de crescer acima de 80% em relação ao controle (figura 16A). No total, apenas 38% dos clones testados foram capazes de crescer acima de 80% (figura 16A).

Embora o efeito desejado não fosse o aumento da capacidade média de crescimento, outrossim o aumento da freqüência de ativadores fortes, isto ocorreu e foi significativamente maior que o obtido para clones selecionados em placas (figura 16B) (ANOVA:  $F=41,4$  e  $p=0,023$ ), refletindo indiretamente o enriquecimento de clones mais forte ativadores na seleção em cultura única (ver figura 17 adiante para dados brutos). O erro padrão mostrado na figura sugere que amostragens independentes resultem em médias próximas e reprodutivas.

A)

Triagens	Seleção em cultura única	Seleção em placas
1	21/28 (75%)	7/20 (35%)
2	6/19 (32%)	3/18 (17%)
3	36/39 (92%)	18/35 (51%)
<b>Total</b>	<b>63/86 (73%)</b>	<b>28/73 (38%)</b>

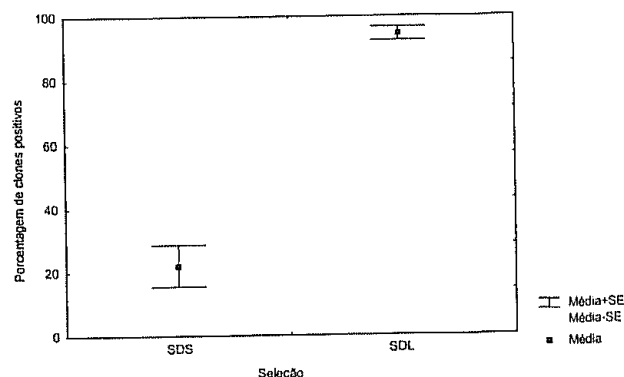
B)



C)

Triagens	Seleção em cultura única	Seleção em placas
1	45/45 (100%)	6/40 (15%)
2	19/20 (95%)	8/20 (40%)
3	36/40 (90%)	4/40 (10%)
4	37/40 (93%)	9/40 (23%)
<b>Total</b>	<b>137/145 (94%)</b>	<b>27/140 (19%)</b>

D)



**Figura 16: Comparação de crescimento e de intensidade de ativação de gene repórter *LacZ* de clones Y190:mTead1(1-134)-UV selecionados em cultura única ou em placas.** Os 159 clones analisados quanto a capacidade de ativação do gene repórter *HIS3* foram obtidos em três triagens independentes da biblioteca de mutantes de mTead1(1-134), sendo 86 clones isolados pela seleção em cultura única e os 73 restantes isolados pela seleção em placas convencional. A) Número de clones com crescimento superior a 80% do controle (com histidina) nas três triagens realizadas. B) Proporção média de crescimento em relação ao controle de clones selecionados em placas (SDS) e em cultura única (SDL) em três diferentes triagens. Os 285 clones analisados quanto a capacidade de ativação do gene repórter *LacZ* foram obtidos em quatro triagens independentes da biblioteca de mutantes de mTead1(1-134), sendo 145 clones isolados pela seleção em cultura única e os 140 restantes isolados pela seleção em placas convencional. C) Número de clones azuis nas quatro triagens realizadas. D) Porcentagem média de clones positivos no teste de X-gal de clones selecionados em placas (SDS) e em cultura única (SDL). Erro padrão (SE).

Os clones isolados nos dois tipos de seleção foram analisados quanto à intensidade de ativação do gene repórter *LacZ*.

Em ensaio de ativação de gene repórter *LacZ*, quase todos os clones analisados apresentaram ativação de *LacZ* quando a seleção foi conduzida em cultura única (figura 16C), gerando 94% de clones forte ativadores em contraposição a apenas 19% com a seleção convencional (figura 16C). A diferença na proporção de clones positivos no teste X-gal isolados pelos dois métodos de seleção foi confirmada pelo teste T de *Student* ( $T=8,2$  e  $p=0,004$ ) (figura 16D).

A figura 17A mostra o resultado bruto de ensaio de ativação de gene repórter *HIS3* de uma das triagens com seleção em placas. Em média, a partir do vigésimo quinto clone selecionado começa a ser mais freqüente o aparecimento de clones que crescem abaixo de 60% do controle nesse tipo de ensaio. No entanto, na seleção em cultura única, existiu uma tendência de os clones analisados serem sempre fortes ativadores (figura 17B e dados não mostrados). Como o isolamento de clones obedeceu à ordem de surgimento de clones na placa, elevando-se o número de clones isolados pela seleção em placas, a chance de isolamento de clones com crescimento superior a 80% diminuiu. Aqueles que desenvolveram conspícua coloração azul estão denotados com "\*" sobre as barras na figura 17. Apesar do resultado da seleção em placas ser satisfatório, pois não é freqüente isolar ativadores fortes em uma seleção convencional de mono ou duplo-híbrido, a seleção em cultura única elevou muito esta freqüência.

Como observado para o teste de crescimento em meio líquido, elevando-se o número de clones isolados com a seleção em placas, a chance de isolamento de clones capazes de ativarem o gene repórter *LacZ* diminuiu (figura 17C e dados não mostrados). No entanto, esta redução foi muito mais severa que a observada na capacidade de crescimento em meio líquido (figura 17A). O mesmo não acontece na seleção em cultura única, sendo a grande maioria dos clones forte ativadores (figuras 17B e 17D).

Nossos dados não descartam a possibilidade de que esteja havendo redundância na seleção de múltiplas cópias de um único mutante, quando a seleção é realizada em cultura única. Por isso, este tipo de seleção é recomendado quando se busca a interação mais relevante em um sistema de duplo-híbrido, ou o mutante com maior capacidade de ativação de transcrição, no caso da análise desta biblioteca. A caracterização das mutações dos clones isolados será conduzida pelo seqüenciamento da região codificante de *mTead1(1-134)* em um projeto distinto, possibilitando um melhor entendimento do mecanismo de regulação em *cis*.

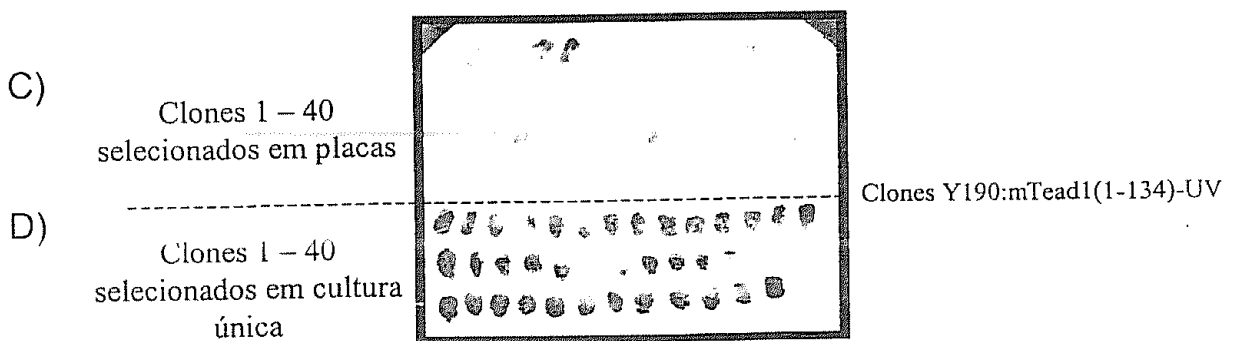
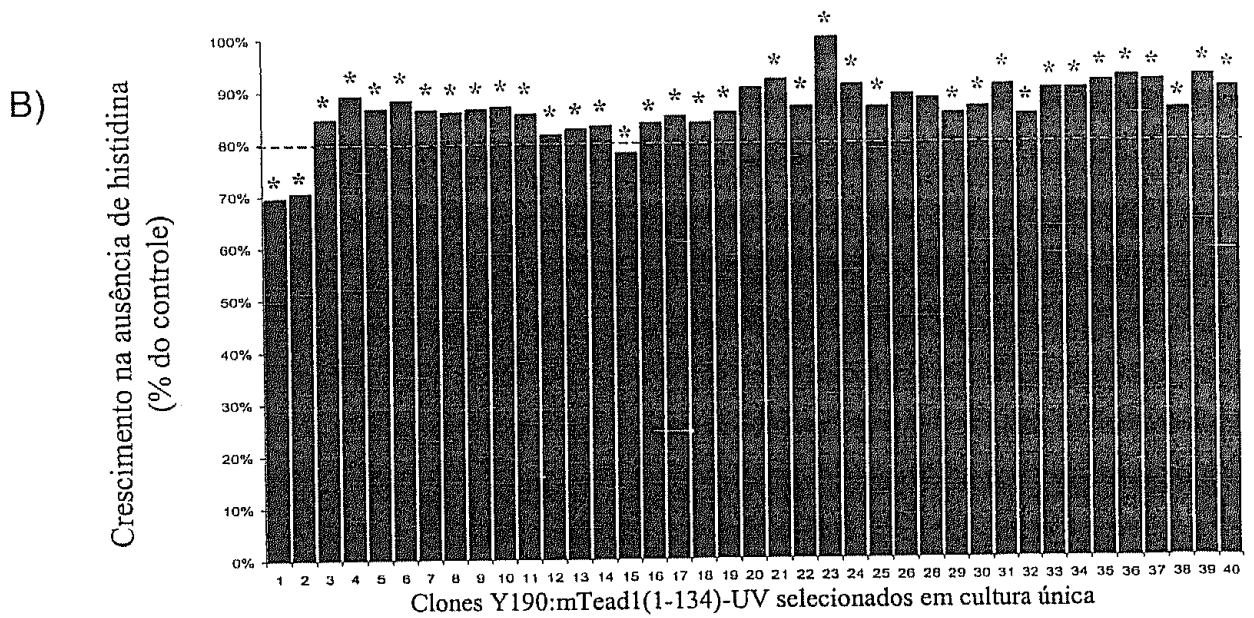
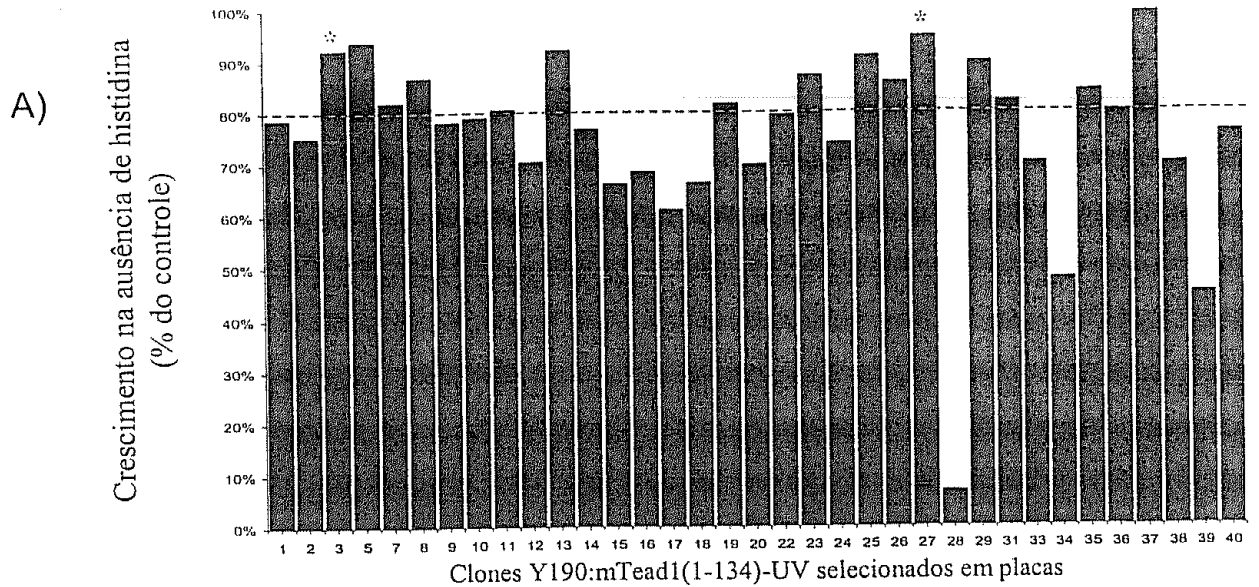


Figura 17: Análise de ativação de genes repórteres para clones Y190:mTead1(1-134)-UV selecionados em placas e em cultura única. Os clones foram obtidos na triagem da biblioteca de mutantes de mTead1(1-134) e isolados pela seleção em placas convencional, pela ordem de aparecimento ou pela seleção em cultura única. Crescimento de clones selecionados em placas (A) ou em cultura única (B) em meio SD<sup>s</sup> líquido sem histidina suplementado com 3AT 5mM após 24 horas. Teste de metabolização de substrato X-gal de clones selecionados em placas (C) ou em cultura única (D). (\*) Clones que desenvolveram cor azul no teste de metabolização do sustrato X-gal.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Viabilidade da seleção em meio líquido (segregação em poços de placas *deepwell*)

A seleção robotizável se mostrou equivalente à seleção em placas convencional em ambas leveduras testadas (HF7c e Y190). Entretanto, a substituição de muitas placas de meio sólido por algumas placas *deepwell*, a economia de 3AT e de tempo foram algumas vantagens adquiridas no novo método de seleção.

Por exemplo, para a triagem de uma biblioteca de 1 milhão de clones, considerando-se uma eficiência de transformação de  $10^4$  células/ $\mu\text{g}$  e  $1\mu\text{g}$  de pISCA/biblioteca por ensaio, seriam necessárias 25 placas *deepwell*, ou cinco experimentos independentes de 5 placas *deepwell*, e um consumo de apenas 3,6ml do estoque 2M de 3AT (4% do volume usado em placas).

Além disso, o protocolo aqui desenvolvido implica em um intervalo de tempo definido e reduzido (seleção e ensaio de ativação em 5 dias) em comparação à seleção em placas (seleção em 3-7 dias e ensaio de ativação em 3 dias). Assim, todos os clones podem ser eficientemente comparados entre si quanto à capacidade de ativação de gene repórter *HIS3* no quinto dia da seleção. Este método tornará muito mais ágil e menos exaustivo se robotizado.

O intervalo de tempo definido também é uma vantagem sobre os ensaios recentemente desenvolvidos de ativação de *HIS3* em meio líquido. Nestes trabalhos, grandes variações são observadas quanto ao momento da análise da atividade ativadora dos clones. Por exemplo, Diaz-Camino e colaboradores (2003) sugerem que

sejam conduzidas análises de ativação de *HIS3* a cada 24 horas durante 5 dias e a comparação dos clones utilizando a maior ativação obtida durante este período. Entretanto, o trabalho não leva em consideração as variações que provavelmente ocorrem de um dia a outro. Chen e Zhao (2003) sugerem que as análises de ativação sejam conduzidas após 50 horas de cultivo, enquanto Srivastava e Lal (2002) sugerem que sejam após 24 ou 48 horas. Por sua vez, Gonçalves (2003) analisa a atividade dos clones após 16 horas de cultivo. A variação no momento da análise de clones expressivamente prejudica a comparação dos clones quanto à intensidade de ativação entre diferentes trabalhos. Assim, um determinado clone pode ser classificado diferentemente dependendo da referência utilizada.

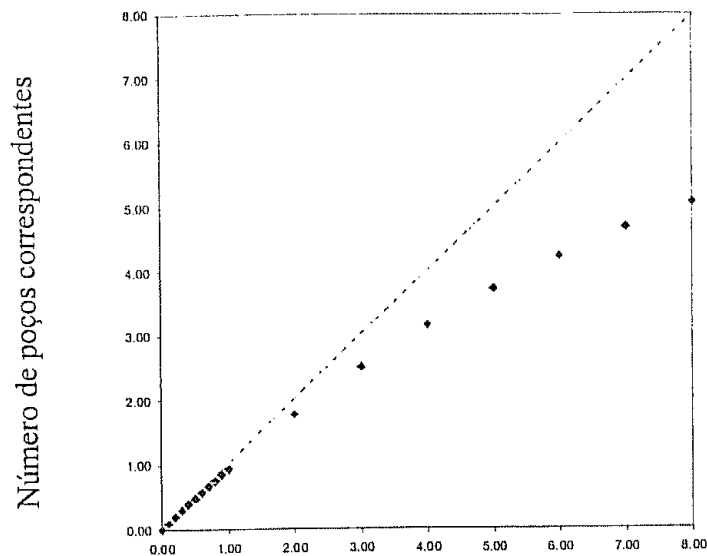
Outra variação que dificulta a comparação dos clones é a quantidade de células utilizada nos inóculos de partida em ensaios líquidos de ativação de gene repórter *HIS3*. No trabalho de Diaz-Camino e colaboradores (2003), os inóculos utilizados dependem que os clones atinjam primeiramente a fase estacionária para a subsequente diluição 1:1000. Entretanto, este tipo de quantificação de células notavelmente não é a mais precisa. Por outro lado, os inóculos utilizados em Chen e Zhao (2003), Srivastava e Lal (2002) e Gonçalves (2003) não sofreram grandes variações ( $OD_{600}=0,02$ ;  $OD_{600}=0,04$  e  $10^5$  células/mL - equivalente a  $OD_{600}=0,014$ ; respectivamente).

Se a triagem da biblioteca mencionada fosse conduzida pela seleção em placas convencional, seria necessário o equivalente a 100 placas, ou cinco experimentos independentes de 20 placas, e um consumo de 87,5ml do estoque 2M da droga 3-aminotriazol (3AT).

Outras facilidades da seleção robotizável tornam este método mais atrativo que a seleção em placas convencional. Por exemplo, como o crescimento de clones positivos é um evento raro, o número esperado de clones selecionáveis em triagens de bibliotecas é cerca de 0,1 a 1 clone positivo por placa. Nestas condições, o crescimento de clones positivos estaria sendo superestimado em 22 poços da placa *deepwell*, onde a correspondência colônia-poço ocorre quando até cinco colônias crescem por placa de meio sólido (figura 12A). Assim, cada placa de meio sólido poderia ser substituída por 8 poços da placa *deepwell*, onde uma melhor correspondência colônia-poço seria obtida (figura 18). Portanto, apesar de não ter sido testado, a triagem da biblioteca poderia ser conduzida em menor número de placas *deepwell* (8 placas *deepwell*, ao invés de 25, equivalendo a 100 placas de meio sólido).

Outra facilidade é que, como a mistura de transformação é inoculada diretamente na cultura líquida e distribuída sobre as placas *deepwell*, não é necessário recuperar os clones das placas de meio sólido e inocular cada um deles em meio líquido como foi conduzido por Diaz-Camino e colaboradores (2003). O mesmo procedimento foi adotado por Zong e colaboradores (2003), entretanto as placas *deepwell* continham meio sólido. Alternativamente, Chen e Zhao (2003), Srivastava e Lal (2002) e Gonçalves (2003) inocularam cada um dos clones recuperados da placa de meio sólido em tubos contendo meio líquido. Além disso, a seleção robotizável, assim como a seleção em cultura única, não depende de cruzamento de leveduras e de subsequente recuperação do diplóide, uma vez que as leveduras foram co-transformadas.





Número de colônias por placa de 15cm de diâmetro

**Figura 18: Proporção entre número de colônias e seu correspondente em 8 poços na placa *deepwell* segundo Distribuição de Poisson. Distribuição linear (linha pontilhada).**

## 5.2 Equivalência entre número de colônias e poços crescidos

Em experimentos conduzidos com quantidades crescentes de pPRESA (figuras 10 e 11), foi possível observar correspondência entre colônia e poço em ambas as linhagens de leveduras *S. cerevisiae* testadas (HF7c e Y190). Em alguns casos, utilizando leveduras *S. cerevisiae* Y190 obteve-se melhor crescimento de clones positivos em meio líquido que em sólido, apesar deste crescimento não ter sido significativo (figura 8 - tabela 6 e figura 11).

Possivelmente, esta diferença de crescimento se deve ao fato da sobrevivência desta levedura nas concentrações de 3AT empregadas em meio sólido não chegar a 100% (sobrevivência de

78% e 50% em 3AT 35mM e 50mM, respectivamente). Assim, um clone positivo teria maiores chances de ser recuperado em meio líquido, onde as concentrações são mais baixas.

A diferença de sobrevivência nos diferentes meios pode estar relacionada à difusão da droga 3AT empregada para compensar a elevada transcrição basal da levedura *S. cerevisiae* Y190. Possivelmente, a difusão do 3AT seja dificultada quando em meio sólido, por isso a necessidade de concentrações elevadas neste meio.

Em meio líquido, concentrações bem menores de 3AT (2,5mM) são suficientes para inibir o produto da transcrição basal nesta levedura, reduzindo o consumo de droga (3AT). Outra explicação para a diferença de sobrevivência observada em meio líquido e sólido poderia estar relacionada a uma maior interação metabólica quando em meio sólido que em líquido.

Em placa, a concentração de histidina local, proveniente de leveduras mortas, seria suficiente para promover crescimento de leveduras de controle negativo. Enquanto em meio líquido, a interação metabólica seria dificultada pela diluição da histidina no meio, evitando a concentração em pontos específicos.

### **5.3 Comparação entre leveduras: Y190 é mais favorável**

Para o estudo de competição entre ativadores fortes e fracos em meio líquido, ambas linhagens de leveduras *S. cerevisiae* (HF7c e Y190) foram testadas.

A levedura *S. cerevisiae* HF7c não permitiu distinguir a ativação do gene repórter produzida pela interação forte (isca-p53 e presa-*largeT*) daquela produzida pela interação fraca (isca-mutante 54.2 de p53 e presa-*largeT*) (figura 13). Portanto, esta linhagem não pôde ser empregada em análises de competição. Elevando-se a concentração de 3AT poderia ser possível distinguir entre os ativadores, entretanto, 3AT 10mM não foi suficiente (dados não mostrados). Como um dos motivos de se usar o meio líquido é a redução do consumo de 3AT, esta linhagem foi então considerada inadequada.

Por outro lado, a levedura *S. cerevisiae* Y190 possibilitou a distinção entre a ativação forte e fraca de forma adequada (figura 14). Semelhante resultado foi obtido em placas de meio sólido, onde as sobrevivências de leveduras *S. cerevisiae* Y190 que carregam duplo-híbrido de interação forte, fraca e negativa foram de 78%, 2% e <0,1%, respectivamente (dados não mostrados).

Os critérios adotados neste trabalho para a equivalência colônia-poço podem ser prontamente adotados na avaliação de outras linhagens de leveduras apropriadas para seleção de duplo-híbrido.

#### **5.4 Efeito da presença de clones negativos**

Quando clones negativos apresentam fenótipo *HIS+*, diferente do esperado, supõe-se que estejam sob efeito epigenético. A capacidade de ativação do repórter sendo muito baixa corresponde a uma chance muito baixa de abertura da estrutura da cromatina na região promotora, mas em casos raros esta abertura, caso se estabeleça, pode ser herdada epigeneticamente.

Resultados do nosso laboratório (Rodrigues, 2001) sugeriram que clones raros *HIS+* surgiam em leveduras onde o promotor do gene repórter estava sob efeito repressor de transcrição, mas nem o plasmídeo codificador do repressor nem a levedura que o albergava estavam mutados.

Embora não demonstrado, é possível que o crescimento em meio sem histidina na presença de 3AT de clones de controle negativo quando diluídos se deva a epigenética.

Acima de  $10^3$  células por ensaio, o fenótipo esperado se manteve, provavelmente pela competição gerada pelo elevado número de células no meio líquido. O mesmo ocorre com clones de interação fraca (figura 15C).

Estes resultados estão de acordo com os obtidos em experimentos de transformação de duplo-híbrido, onde cerca de  $3,0-4,0 \times 10^3$  células transformantes (tabela 7, primeira linha) haviam restaurado prototrofia para leucina e triptofano, requerendo apenas a ativação do gene repórter *HIS3* para crescer em meio sem histidina. Mesmo assim, nenhum clone do controle negativo foi capaz de crescer na ausência de pPRESA (tabela 7, última linha, primeira coluna).

Outra evidência deste comportamento foi observada nos ensaios de competição entre ativadores fortes e fracos (tabela 6). Neste ensaio,  $10^5-10^6$  ativadores negativos ou fracos não obtiveram crescimento em meio líquido (tabela 7, experimentos 4- 6, 10-11), assim como observado nas figuras 15B e 15C ensaiando-se essas mesmas quantidades de leveduras.

No entanto, a presença de pequenas quantidades de ativadores fortes ( $10$  ou  $10^2$  ativadores) foi suficiente para garantir o crescimento em meio líquido (tabela 7, experimentos 1-3, 7-9), assim como observado na figura 15A.

Não foi investigado se em quantidades inferiores a 10 ativadores fortes estes resultados se manteriam. No entanto, nossos dados demonstram claramente a necessidade de conduzir experimentos de transformação ou competição utilizando número de células igual ou superior a  $10^3$  para que não ocorra a interferência de clones supostamente epigenéticos.

### **5.5 Rendimento de clones ativadores fortes**

Na triagem da biblioteca de mutantes de mTead1(1-134), a classificação dos clones isolados pela seleção em placa ou pela seleção em cultura única foi conduzida considerando crescimento de 80% do controle com histidina (linha tracejada nas figuras 17A e 17B).

Convencionalmente, as colônias são recuperadas pela ordem de crescimento na placa, entretanto, outros critérios podem ser adotados.

Na figura 17A, dos 35 clones selecionados em placas e crescidos em meio líquido, apenas 2 foram azuis no teste de metabolização do substrato X-gal (proporções semelhantes foram obtidas nas outras triagens). Os clones azuis fazem parte do grupo de clones com crescimento igual ou superior a 80% do controle (20 clones,

figura 17A). Portanto, os mesmos seriam recuperados se fosse adotado o crescimento de 80% do controle como um novo critério de escolha de clones para caracterização.

Este critério melhoraria sensivelmente o rendimento (2/20 versus 2/35) na análise de clones em comparação ao critério anterior, principalmente se conduzido em placas *deepwell*, onde um maior número de clones podem ser avaliados quanto ao crescimento. As análises de crescimento em meio líquido que foram aplicadas nas figuras 10, 11 e 15 utilizaram esse tipo de procedimento. A robotização desta análise, acoplada a um leitor de placa de ELISA, pode ser facilmente conduzida.

#### **5.6 Viabilidade da seleção em cultura única: vantagens e desvantagens**

A seleção em cultura única realizada nas três triagens da biblioteca de mutantes de mTead1(1-134) mostra claramente um enriquecimento de ativadores fortes no meio líquido (figuras 16 e 17B).

Adotando o critério de análise de clones com crescimento maior ou igual a 80% do controle com histidina, praticamente todos os clones seriam recuperados.

Em ensaio de metabolização de substrato X-gal, a frequência de clones azuis foi quase 100% (figuras 16C, 16D e 17C, 17D). No entanto, o enriquecimento de clones forte ativadores gerado por este método de seleção pode ser devido à presença de réplicas de um único clone ou poucos clones distintos.

Portanto, a distinção entre os clones deve ser conduzida por métodos adicionais, seja pela análise do produto da PCR, digestão com endonuclease ou experimentos de hibridação (*macroarray*).

Ao triar uma biblioteca de cDNA de embrião de camundongo, Schaaf e colaboradores (2004), utilizando a proteína oncogênica TRP-MET como isca, selecionou 290 colônias por semeadura em placas de meio sólido a partir de  $9.10^6$  transformantes. Destas, 86 colônias foram positivas no ensaio de ativação de gene repórter *LacZ*, sendo 31 e 55 clones classificados, respectivamente, como fraco e forte ativadores. Por sua vez, Lee e colaboradores (2004) selecionaram 25 clones em placas de meio sólido a partir de  $2.10^6$  transformantes ao triar uma biblioteca de cDNA de cérebro humano utilizando a proteína supressora de tumor Merlin como isca. Em ensaio de ativação de *LacZ*, todos os 25 clones foram classificados como forte ativadores.

Se ambas triagens tivessem sido conduzidas pela seleção em cultura única, provavelmente os 55 clones de Schaaf e colaboradores (2004) e os 25 clones selecionados por Lee e colaboradores (2004) teriam sido facilmente selecionados. Entretanto, os 31 clones fraco ativadores isolados no primeiro trabalho poderiam não ter sido selecionados. Contudo, como mencionado anteriormente, a seleção em cultura única é recomendada quando se deseja selecionar preferencialmente clones mais forte ativadores. Quando se objetiva selecionar clones de intensidade de ativação variada, a seleção robotizável pode ser prontamente aplicada.

## 5.7 Seleção de duplo-híbrido em larga escala

A análise de ativação de gene repórter *HIS3* foi anteriormente conduzida por crescimento de clones em meio líquido (Srivastava e Lal, 2002; Chen e Zhao, 2003; Diaz-Camino *et al.*, 2003). Entretanto, a seleção de clones positivos por recuperação de diplóides ou co-transformação e semeadura em placas se manteve inalterada. A seleção de clones positivos conduzida diretamente em meio líquido foi uma inovação proposta neste trabalho e necessitou do estabelecimento de um protocolo de diluições efetivo para a eliminação de leveduras não transformadas.

A associação dos métodos de seleção (robotizável e cultura única) à análise de clones em cultura líquida aqui mostradas possibilita a imediata implementação da seleção automatizada em estações robóticas e, conseqüentemente, a análise de interações de duplo-híbrido em larga escala. O procedimento de seleção em cultura única aparece como uma importante alternativa prontamente aplicável quando o interesse é direcionado às interações mais fortes e provavelmente mais relevantes.

Uma metodologia alternativa foi proposta utilizando-se a proteína verde fluorescente como gene repórter em sistema de duplo-híbrido e executando-se a seleção em larga escala em aparelhos de citometria de fluxo (FACS) acoplado a um *cell sorter*. Entretanto, esta metodologia ainda se encontra em desenvolvimento ao contrário da metodologia desenvolvida neste trabalho (Starling *et al.*, 2003).



## 6. CONCLUSÕES

O protocolo de diluições das culturas líquidas desenvolvido (teste F) pode ser aplicado eficientemente para a eliminação de leveduras não transformantes em ambas as linhagens de leveduras *S. cerevisiae* (HF7c e Y190) analisadas sem perder a correspondência colônia-poço.

O método de seleção robotizável desenvolvido apresenta equivalência à seleção convencional de placas quanto à recuperação de clones positivos em ambas as leveduras *S. cerevisiae* (HF7c e Y190). Entretanto, a redução de 96% no consumo de 3-aminotriazol (3AT) e a maior agilidade na seleção, principalmente se conduzida em estações robóticas, torna a seleção robotizável mais atrativa.

A escolha do número de poços da placa *deepwell* deve levar em consideração a frequência esperada de recuperação de clones positivos por placa em sistemas de mono e duplo-híbrido. Quanto menos frequentes (0,1-1 clone positivo por placa), menos poços são recomendados (8-20 poços).

A levedura *S. cerevisiae* HF7c não distinguiu a ativação de clones ativadores de interação de duplo-híbrido forte e fraca por crescimento em meio líquido, mesmo na presença de 3AT 10mM. Portanto, não pôde ser usada em ensaios de competição.

A levedura *S. cerevisiae* Y190 é favorável aos ensaios de competição pela distinção entre clones ativadores de interação de duplo-híbrido forte e fraca por crescimento em meio líquido.

Os experimentos de seleção e competição desenvolvidos em meio líquido devem ser preferencialmente conduzidos com o número de células igual ou superior a  $10^3$  para a não interferência de possíveis clones epigenéticos.

Ao invés do isolamento de clones pela ordem de surgimento da colônia na placa, um novo critério, pelo isolamento de clones com crescimento igual ou superior a 80% do controle com histidina, pode ser adotado mais eficientemente. Este critério pode ser amplamente conduzido em estações robóticas acoplado a leitores de placa de ELISA.

O método de seleção em cultura única desenvolvido é efetivamente mais eficiente que a seleção convencional em placas quando se deseja selecionar clones ativadores mais fortes, seja em sistemas de mono ou duplo-híbrido. No entanto, a distinção entre os clones isolados necessita de métodos de análise adicionais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, M. K., Bourns, B. D. and Zakian, V. A. 2001. One-hybrid systems for detecting protein-DNA interactions. *Methods Molecular Biology* 177: 241-259.
- Belandia, B. and M.G. Parker. 2000. Functional interaction between the p160 coactivator proteins and the transcriptional enhancer factor family of transcription factors. *J Biol Chem* 275: 30801-30805.
- Broder, Y. C., Katz, S. and Aronheim, A. 1998. The Ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions. *Current Biology* 8:1121-1124.
- Butler, A.J.a.O., C. P. 1999. Poly(ADP-ribose)polymerase binds with transcription enhancer factor 1 to MCAT1 elements to regulate muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol*. 19(1): 296-306.
- Causier, B. and B. Davies. 2002. Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Mol Biol* 50: 855-870.
- Chen, Z.a.Z., H. 2003. A highly efficient and sensitive screening method for trans-activation activity of estrogen receptors. *Gene* 306: 127-134.
- Chien, C.T., P.L. Bartel, R. Sternglanz, and S. Fields. 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 9578-9582.
- Diaz-Camino, C., E.P. Risseeuw, E. Liu, and W.L. Crosby. 2003. A high-throughput system for two-hybrid screening based on growth curve analysis in microtiter plates. *Anal Biochem* 316: 171-174.
- Fields, S.S., O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246.
- Fields, S. and R. Sternglanz. 1994. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet* 10: 286-292.
- Gonçalves, V. F. 2003. *Metodologia para caracterização de mutantes de um domínio repressor de transcrição*. Tese apresentada para obtenção do título de Mestre ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, Belo Horizonte.
- Gupta, M.P., C.S. Amin, M. Gupta, N. Hay, and R. Zak. 1997. Transcription enhancer factor 1 interacts with a basic helix-loop-helix zipper protein, Max, for positive regulation of cardiac alpha-myosin heavy-chain gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 17: 3924-3936.

- Hays, L. B., Chen, Y. S. and Hu, J. C. 2000. Two-hybrid system for characterization of protein-protein interactions in *E. coli*. *Biotechniques* 29(2):288-290.
- Immink, R.G. and G.C. Angenent. 2002. Transcription factors do it together: the hows and whys of studying protein-protein interactions. *Trends Plant Sci* 7: 531-534.
- Iwabuchi K, L.B., Bartel P, Fields S. 1993. Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8: 1693-1696.
- Jacquemin, P., J.J. Hwang, J.A. Martial, P. Dolle, and I. Davidson. 1996. A novel family of developmentally regulated mammalian transcription factors containing the TEA/ATTS DNA binding domain. *J Biol Chem* 271: 21775-21785.
- Jacquemin, P., V. Sapin, E. Alsat, D. Evain-Brion, P. Dolle, and I. Davidson. 1998. Differential expression of the TEF family of transcription factors in the murine placenta and during differentiation of primary human trophoblasts in vitro. *Dev Dyn* 212: 423-436.
- Johnsson, N. and Varshavsky, A. 1994. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10340-10344.
- Kaneko, K.J., E.B. Cullinan, K.E. Latham, and M.L. DePamphilis. 1997. Transcription factor mTEAD-2 is selectively expressed at the beginning of zygotic gene expression in the mouse. *Development* 124: 1963-1973.
- Kaneko, K.J. and M.L. DePamphilis. 1998. Regulation of gene expression at the beginning of mammalian development and the TEAD family of transcription factors. *Dev Genet* 22: 43-55.
- Leanna, C. A. and Hannink, M. 1996. The reverse two-hybrid system: a genetic scheme for selection against specific protein/protein interactions. *Nucleic Acids Research* 24(17):3341-3347.
- Lee, I. K, Kim, K., Kim, H., Lee, J. Y., Ryu, C. H., Chun, H. J., Lee, K., Lim, Y., Kim, Y. H., Huh, P., Lee, K., Han, S., Jun, T. and Rha, H. K. 2004. MAP, a protein interacting with a tumor suppressor, merlin, through the run domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325:774-783.
- Li, B.a.F., 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.
- Luo, Y., Batalao, A., Zhou, H. and Zhu, L. 1997. Mammalian two-hybrid system: a complementary approach to the yeast two-hybrid system. *Biotechniques* 22(2):350-352.

- Maeda, T., M.P. Gupta, and A.F. Stewart. 2002. TEF-1 and MEF2 transcription factors interact to regulate muscle-specific promoters. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 791-797.
- McAlister-Henn, L., N. Gibson, and E. Panisko. 1999. Applications of the yeast two-hybrid system. *Methods* 19: 330-337.
- Phizicky, E., P.I. Bastiaens, H. Zhu, M. Snyder, and S. Fields. 2003. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 422: 208-215.
- Putz, U., Skehel, P. and Kuhl, D. 1996. A tri-hybrid system for the analysis and detection of RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 24: 4838-4840.
- Rodrigues, L. B. 2001. *Mapeamento de domínios funcionais do fator de transcrição mTead1 em levedura*. Tese apresentada para obtenção do título de Mestre ao Departamento de Biologia Geral, UFMG, Belo Horizonte.
- Schaaf, C. P, Benzing, J., Schmitt, T., Erz, D. H. R., Tewes, M., Bartram, C. R. and Janssen, J. W. G. 2004. Novel interaction partners of the TPR-MET tyrosine kinase. *The FASEB Journal*. Express article 10.1096/fj.04-1558fjc.
- Schwartz-Mittelmann, A., T. Neufeld, D. Biran, and J. Rishpon. 2003. Electrochemical detection of protein-protein interactions using a yeast two hybrid: 17-beta-estradiol as a model. *Anal Biochem* 317: 34-39.
- Soares, J.F. and A.L. Siqueira. 2002. *Introdução a Estatística Médica*. 300pp. 2 st edn. Cooperativa Editora e de Cultura Médica.
- Srivastava, R. and S.K. Lal. 2002. A liquid synchronized-growth culture assay for the identification of true positive and negative yeast three-hybrid transformants. *Letf Appl Microbiol* 34: 300-303.
- Starling, A. L., Ortega, J. M., Gollob, K. J., Vicente, E. J., Andrade-Nóbrega, G. M. and Rodriguez, M. B. 2003. Evaluation of alternative reporter genes for the yeast two-hybrid system. *Genetics and Molecular Research* 2 (1): 124-135.
- Tirode, F., Malaguti, C. Romero, F. Attar, R. Camonis, J. and Egly, J. M. 1997. A conditionally expressed third partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three-hybrid system. *J. Biol. Chem.* 272: 22995-22999.
- Uetz, P. 2001. Two-hybrid arrays. *Curr Opin Chem Biol* 6: 57-62.
- Van Criekinge, W. and R. Beyaert. 1999. Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol Proced Online* 2: 1-38.

- Vassilev, A., K.J. Kaneko, H. Shu, Y. Zhao, and M.L. DePamphilis. 2001. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev* 15: 1229-1241.
- Vaudin, P., R. Delanoue, I. Davidson, J. Silber, and A. Zider. 1999. TONDU (TDU), a novel human protein related to the product of vestigial (vg) gene of *Drosophila melanogaster* interacts with vertebrate TEF factors and substitutes for Vg function in wing formation. *Development* 126: 4807-4816.
- Vidal, M., Brachmann, R. K., Fattaey, A., Harlow, E. and Boeke, J. D. 1996. Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10315-10320.
- Vidalain, P.O., M. Boxem, H. Ge, S. Li, and M. Vidal. 2004. Increasing specificity in high-throughput yeast two-hybrid experiments. *Methods* 32: 363-370.
- Zar, J.H. 1996. *Biostatistical Analysis*. 662pp. 3 st edn. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffee.
- Zhong, J., H. Zhang, C.A. Stanyon, G. Tromp, and R.L. Finley, Jr. 2003. A strategy for constructing large protein interaction maps using the yeast two-hybrid system: regulated expression arrays and two-phase mating. *Genome Res* 13: 2691-2699.
- Zhu, H., M. Bilgin, and M. Snyder. 2003. *Proteomics*. *Annu Rev Biochem* 72: 783-812.

# 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](#)