T
2912

Alessandra Lopes Starling

CONSTRUÇÃO DE GENES REPÓRTERES ALTERNATIVOS PARA SISTEMAS DE DUPLO-HÍBRIDO EM LEVEDURA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIBLIOTECA

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

Orientadora: Drª Mônica B. Rodriguez

Co-Orientador: Dr. J. Miguel Ortega

U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
229160411
NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

Belo Horizonte
Departamento de Biologia Geral
Instituto de Ciências Biológicas
2000

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Dissertação defendida e aprovada, em 28 de fevereiro de 2000, pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Profª Mônica Bucciarelli Rodriguez

Profª Elisabete José Vicente

Profª Adlane Vilas Boas Ferreira

AGRADECIMENTOS

Ao longo de nossas vidas encontramos pessoas que, de uma maneira surpreendente, estão sempre nos ajudando, nos apoiando e nos encorajando a seguir em frente. Aqui estão citadas algumas destas pessoas que de algum modo me ajudaram a chegar até aqui e que gostaria de agradecer de coração.

À professora Mônica Bucciarelli Rodriguez responsável, em grande parte, pelo meu desenvolvimento científico, intelectual e pessoal, além de ser uma orientadora atenciosa e altamente competente;

Ao professor J. Miguel Ortega que, além de nos ter cedido um precioso espaço em seu laboratório para realização deste trabalho, sempre se mostrou interessado, atencioso e disposto a ajudar, dando valiosas sugestões durante todos estes anos;

Às professoras Cleusa Graça da Fonseca e Maria Bernadete Lorato, grandes responsáveis pelo crescimento da nossa pós-graduação em Genética;

Aos membros do colegiado da pós-graduação por me acolherem com atenção e respeito como representante dos alunos e por tornar esta pós-graduação um motivo de orgulho para o Departamento de Biologia Geral;

Às professoras Ana Clara Schenberg e Elizabete Vicente, ICB, USP, por nos ter enviado alguns dos plasmídios mais importantes, além de estarem sempre dispostas a nos ajudar através de sugestões e compartilhando resultados importantes;

Ao professor Evaldo Nascimento, do Departamento de Parasitologia, por nos permitir utilizar o eletroporador, inúmeras vezes;

Ao professor Kenneth John Gollob, do Departamento de Bioquímica e Imunologia, por ter dispensado seu precioso tempo para nos ajudar com os experimentos que envolveram a utilização do FACScan;

Ao Dr. Stanley Fields, da Universidade de Washington, por nos ter enviado, sem qualquer restrição, alguns clones mutantes de p53;

Ao Dr Gietz, Universidade de Manitoba, por nos ter enviado os plasmídios do "Set of nine";

À professora Conceição Ribeiro de Machado, do Departamento de Morfologia, pela utilização do microscópio de fluorescência;

Ao pessoal do laboratório de Genética Bioquímica, que sempre nos ajudou com os seqüenciamentos e as fotos;

Ao pessoal do laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos, em especial às professoras Adlane Vilas Boas e Andréa Amaral, ao querido professor Edmar Chartone, pela convivência no laboratório e à Melissa, pelas valiosas correções na revisão da tese;

À professora Maria de Fátima Leite, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, que, além de nos ter cedido a L-canavanina, é uma pessoa muito querida em nosso laboratório;

À querida professora Maria Dolores P. Acedo, a Dô, por todos estes anos de ensinamentos não só importantes para a minha profissão, mas também para a minha vida pessoal. Seus conselhos, seu carinho e seu caráter a tornaram minha grande amiga;

Aos meus colegas de pós-graduação: Anderson, Daniela, Fábio, Isabel, Márcia, Maria Dulce, Michelini, pela convivência durante estes dois anos de muito estudo e também de momentos agradáveis;

À Marina, secretária da pós-graduação em Genética, pela boa vontade e valiosa colaboração no decorrer desses anos;

Aos meus colegas de bancada: Breno, Fernanda, Flávia Cristina, Frederico, Luciana, Renata, Shamse, Vanessa e Ygor, pela amizade e por dividir o espaço, a experiência e alguns dados importantes para realização deste trabalho;

À Rosana, nossa técnica de laboratório que não é bombril, mas tem mil e uma utilidades, além de ser minha amiga cruzeirense;

Às minhas amigas Fernanda Coelho e Maria Cristina pelos papos descontraídos nos corredores do ICB e pela convivência durante todos estes anos;

Aos meus irmãos Fabiana e Gustavo, por serem parte da minha família e por me aturarem desde que eles nasceram;

À minha tia Edna e tio Flávio pelo exemplo de dedicação e amor por tudo que fazem, além do exemplo de tudo o que eles são;

À minha tia Fatinha, uma pessoa extrordinária, uma bióloga muito mais que competente, uma tia do coração;

À CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro;

Ao meu pai Alonso, por ser a RAZÃO na minha vida;
À minha mãe Elizabeth, por ser a EMOÇÃO na minha vida;
Ao Paulo Henrique, por tudo que foi e por tudo que é em minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO I
ABSTRACT II
LISTAS DE FIGURAS E TABELAS III
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS VI
1 – INTRODUÇÃO 1
1.1 Interações protéicas 1
1.1.1Relevância das interações proteína-proteína 1
1.1.2 Métodos de detecção de interação protéica 2
1.2 Leveduras como ferramentas biotecnológicas 6
1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* 7
1.2.2 Vetores de levedura 7
1.3. Regulação da transcrição em levedura 9
1.3.1 Os elementos promotores 9
1.3.2 Fatores de transcrição basal 10
1.3.3 Ativadores transcricionais 14
1.3.4 Fatores transcricionais intermediários (co-fatores) 16
1.3.5 Repressão transcricional 16
1.4 Sistemas de duplo-híbrido em levedura 18
1.4.1 Sistema Duplo-híbrido 18
1.4.2 Duplo-híbrido reverso 19
1.4.3 Mono-híbrido 21
1.4.4 Tri-híbrido 24
1.4.5 Limitações do sistema de duplo-híbrido 24
1.4.6 Métodos para identificação de falso-positivos 27
1.4.7 Genes repórteres 28
1.4.7.1 Sensibilidade do sistema proporcionada pela sensibilidade dos genes repórteres 28
1.4.7.2 Genes repórteres utilizados no sistema de duplo-híbrido 28
1.4.7.3 Genes repórteres alternativos 29
2-JUSTIFICATIVA 34
3- MATERIAL E MÉTODOS 35
3.1. Microrganismos 35
3.1.1 Bactérias 35
3.1.2 Levedura 35
3.2 Meios de cultura 36
3.2.1 Meios de cultura para bactéria 36
3.2.2 Meios de cultura para levedura 37
3.3 Soluções de antibióticos, aminoácidos e bases nitrogenadas 38
3.4 Métodos 38
3.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 38
3.4.1.1 PCR utilizando DNA purificado 39
3.4.1.2 PCR *de colônia* 39
3.4.1.3 Iniciadores (*primers*) utilizados nas *PCR* 39
3.4.1.4 Programas utilizados nas *PCR* 40
3.4.2 Sequenciamento de DNA 41
3.4.2.1 Reação de sequenciamento 41
3.4.2.2 Iniciadores (*primers*) utilizados nos sequenciamentos 41
3.4.2.3 Programas para o sequenciamento 42
3.4.3 Eletroforese de DNA 42
3.4.3.1 Eletroforese de DNA em gel de agarose 42

3.4.3.2 Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida....42
3.4.3.3 Coloração de gel de poliacrilamida por prata....43
3.4.4 Precipitação de DNA....43
3.4.5 Purificação de DNA em gel de agarose....44
3.4.6 Digestão de DNA com enzima de restrição....44
3.4.7 Ligação de fragmentos....44
3.4.8 Preenchimento das pontas com Klenow polimerase I....44
3.4.9 Fosforilação, anelamento e formação de dímeros de ^{GAL}UAS....45
3.4.10 Desfosforilação de vetores....45
3.4.11 Transformação de bactérias....45
3.4.11.1 Preparação de bactérias eletrocompetentes....47
3.4.11.2 Eletroporação de bactérias....47
3.4.12 Extração de DNA plasmidiano....47
3.4.12.1 Mini-preparação de plasmídio bacteriano (miniprep de bactéria)....47
3.4.12.2 Maxi preparação de plasmídio bacteriano (*Plasmid maxi protocol- QIAGEM*)....48
3.4.13 Hibridação *de colônia*....49
3.4.14 Contagem das células em câmaras de Neubauer....49
3.4.15 Transformação de Levedura....50
3.4.16 Teste de marcas....51
3.4.17 Mini-preparação de plasmídio de levedura (miniprep de levedura)....51
3.4.18 Ensaio para determinação da ativação do gene *Lac Z*....51
3.4.19 Teste *de pingos*....52
3.4.20 Revelação de atividade amilolítica com vapores de iodo....52
3.4.21 Teste *de sobrevivência*....53
3.4.22 Análise de fluorescência em citometria de fluxo....53
3.4.23 Separação das células em *cell sorter*....53
3.4.24 Teste de flutuação....53
4 – RESULTADOS....55
4.1 GENE DA GLICOAMILASE....55
4.1.1 Padronização dos ensaios de atividade de glicoamilase....55
4.1.1.1 Linhagens que apresentam melhor halo de degradação de amido....55
4.1.1.2 Tempo de exposição das leveduras a vapores de iodo....56
4.1.1.3 Simulação de triagem de duplo-híbrido....56
4.1.2 Utilização do gene da glicoamilase como repórter....60
4.1.2.1 Construção do gene da glicoamilase sob o controle de um promotor indutível....60
4.1.2.2 Avaliação da eficiência da construção ^{GAL}UAS CYC-1 GLICOAMILASE....63
4.1.2.3 Sequenciamento parcial da construção ^{GAL}UAS CYC-1 GLICOAMILASE....63
4.1.3 Tentativas de utilização do gene da glicoamilase como repórter....66
4.1.3.1 Troca do gene da glicoamilase....66
4.1.3.2 Retirada do primeiro AUG....67
4.1.3.3 Clonagem do gene da glicoamilase sob o controle do promotor GAL1....70
4.2 GENE EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)....74
4.2.1 Padronização dos experimentos....74
4.2.1.1 Enriquecimento dos transformantes em meio líquido após transformação....74
4.2.1.2 Análise de fluorescência de leveduras quando expressando EGFP....75
4.2.1.3 Separação das células fluorescentes em citometria de fluxo....78
4.2.2 Modificação de plasmídios para uso de EGFP como repórter....79
4.2.2.1 Construção do gene EGFP sob o controle de um promotor indutível....79
4.2.2.2 Avaliação da eficiência da construção pYES-EGFP....82
4.2.2.3 Clonagem de EGFP sob o controle do promotor CYC-1 e ^{GAL}UAS....82

4.2.2.4 Avaliação da eficiência da construção ^{GAL}UAS CYC-1 EGFP 86
4.3 O GENE CAN1^{-} 89
4.3.1 Análise de resistência a L-canavanina em quatro linhagens de leveduras 89
4.3.2 Obtenção de leveduras YJ0Z e Y190 mutantes resistentes a L-can 89
4.3.3 Teste de sobrevivência a L-can com as leveduras mutantes e selvagens para o gene CAN1^{+} 91
4.3.4 Padronização dos experimentos utilizando promotor constitutivo 91
4.3.5 Construção do gene CAN1^{+} sob o controle de um promotor indutível 94
4.3.5.1 Avaliação da eficiência da construção pYES-CAN 98
4.3.6 Análise da eficiência da construção pYES-CAN utilizando a interação híbrida GBD-p53 GAD-lT como indutora 98
4.3.7 Estabelecimento de concentração ideal de L-can a ser utilizada para a interação híbrida p53+lT 101
4.3.7.1 Ativação do repórter *lacZ* em colônias obtidas das placas contendo 100 µg/ml de L-can 103
4.3.8 Teste de X-Gal com colônias sobreviventes a baixas concentrações de L-can 103
4.3.9 Testes de sobrevivência acoplados a análise de tamanho das colônias 105
4.3.10 Avaliação da mutação obtida nos experimentos de ativação de CAN1^{+} pelo duplo-híbrido 108
4.3.10.1 Teste de flutuação 108
4.3.10.2 Retransformação do plasmídio pVA3 supostamente mutado 110
4.3.11 Simulação de triagem de duplo-híbrido 112
4.3.12 Avaliação do sistema pYES-CAN com mutantes de pVA3 previamente caracterizados. 114
5 – DISCUSSÃO 117
6 – CONCLUSÕES 125
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 126

RESUMO

Desde sua descrição há mais de dez anos, os sistemas de duplo-híbrido têm sido amplamente utilizados para a detecção de interações protéicas bem como para delinear domínios importantes para essas interações. Neste trabalho, três genes foram testados como repórteres alternativos para os sistemas de duplo-híbrido. O primeiro deles foi o da glicoamilase de *Aspegillus awamori*, cuja ativação é detectada pela formação de halo de degradação de amido ao redor das colônias de levedura. Esse gene não se mostrou eficiente quando construído sob o controle de promotores indutíveis, como GAL1 e CYC-1 ^{GAL}UAS, na presença do indutor Gal4. O segundo gene construído como repórter alternativo foi o EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), de *Aequoria victoria*. Esse gene é interessante como repórter por possibilitar, através da fluorescência do seu produto, a separação de células triadaspor citometria de fluxo, facilitando o procedimento de detecção de interação. Apesar da ativação da expressão de EGFP por promotores indutíveis como GAL1 e CYC^{GAL}UAS na presença de Gal4ser bem menor do que a observada quando o promotor constitutivo foi utilizado, é possível utilizá-lo como repórter no sistema de seleçãode duplo-híbrido acoplado a citometria de fluxo. O terceiro gene testado para uso em sistema de duplo-híbrido reverso de levedura foi o gene da arginina permease (CAN1) de *Sacharomyces cerevisiae*. A expressão desse gene possibilita a entrada da L-canavanina (um análogo tóxico da arginina) na célula. A incorporação de L-canavanina no lugar de arginina provoca alterações letais. Portanto, esse gene é interessante para a seleção de mutações que provocam dissociação de interação, situação em que o gene repórter não é ativado pelo duplo-híbrido, viabilizando o crescimento celular. O gene CAN1 se mostrou bastante eficiente quando construído sob o controle do promotor indutível GAL1, na presença de indutores como a proteína Gal4 inteira ou de sua reconstituição pela interação dos híbridos Gal4BD-p53 e Gal4AD-largeT. A eficiência da recuperação de mutantes com esse sistema foi comprovada com a determinação da sobrevivência de 100%, frente a altas concentrações de L-canavanina, quando o híbrido Gal4BD-p53 foi substituído por outro híbrido cujo p53 apresentava a troca do resíduo de cisteína 239 por arginina. Além disso, aparentemente, a L-canavanina foi capaz de gerar mutações quando em concentrações intracelulares subletais, que ocorreram quando a ativação de CAN1 ocorre decorrente do duplo-híbrido. Se comprovado, esse efeito possibilitaria o isolamento de mutantes sem a necessidade de se produzir uma biblioteca de genes mutados por qualquer outro método.

ABSTRACT

Since its description ten years ago, the two-hybrid system has been extensively used to detect protein-protein interactions and to delineate domains important to these interactions. In this work, three genes have been tested as alternative reporter for two hybrid systems. The first one is glucoamylase from *Aspergillus awamori*, in which activation is detected by the formation of starch degradation halos surrounding the yeast colonies. This gene did not show enough sensitivity when tested under the control of inducible promoters such as GAL1 and CYC-1 ^{GAL}UAS, in the presence of the inducer Gal4. The second gene constructed as alternative reporter was EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), from *Aequoria victoria*. This gene is interesting as a reporter because it is possible to screen cells by flow cytometry through the fluorescence of its product, facilitating the detection of interaction. Although the activation of EGFP expression by the inducible promoters GAL1 and CYC-1 ^{GAL}UAS, in the presence of the inducer Gal4, showed to be weaker than its expression under the control of the constitutive promoter PGK, it seems possible to use it as a reporter for the two-hybrid system coupled to flow cytometry although it was not tested yet. A third gene tested, the CAN1^{+} gene from *Saccharomyces cerevisiae,* was constructed for the reverse two hybrid-system.. The expression of this gene enables the entry of L-canavanine, an analogous of arginine, into the cell. The misincorporation of L-canavanine as arginine gives rise to cellular alterations and death. Therefore, this is an interesting gene to select mutations that disrupt interactions, a situation in which the reporter gene is not activated by the two-hybrids, enabling cell growth. The CAN1 gene has showed to be very efficient when constructed under the control of the inducible promoters GAL1 and CYC-1 ^{GAL}UAS, in the presence of inducers such as the Gal4 protein or its reconstitution by the interaction of GAL4BD-p53 and Gal4AD-*large* T hybrids. The efficiency of mutant recovery was confirmed by 100% survival , under high rates of L-can concentrations, when the p53 hybrid was substituted by a mutated p53 sequence. In addition, the L-canavanine apparently was able to create mutations when subletal intra cellular concentrations are used. This occur when the activation of CAN1 is done by the two-hybrid. If proved, these effect would make possible the isolation of mutants without the need of producing a mutant library by different methods.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Iniciação de transcrição em eucariotos **11**

Figura 2: Sistema de duplo-híbrido em levedura **20**

Figura 3: Sistema de duplo-híbrido reverso **22**

Figura 4: Sistema mono-híbrido de levedura **23**

Figura 5: Sistema tri-híbrido de levedura **25**

Figura 6: Gene da glicoamilase como repórter no sistema de duplo-híbrido **30**

Figura 7: Gene EGFP como repórter no sistema de duplo-híbrido **31**

Figura 8: Gene $CAN1^{+}$ como repórter no sistema de duplo-híbrido **33**

Figura 9: Inserção de dímeros de ^{GAL}UAS para construção de YCpGCG1 ..... **46**

Figura 10: Testes de formação de halo de degradação de amido **57**

Figura 11: Determinação de tempo ideal de exposição de leveduras a vapores de iodo **58**

Figura 12: Simulação de seleção de duplo-híbrido **59**

Figura 13: Esquematização da clonagem do gene da glicoamilase sob o controle de um promotor indutível (construção de YCpGCG1) **61**

Figura 14: Verificação da clonagem da seqüência regulatória ^{GAL}UAS a montante do promotor CYC-1 ..... **64**

Figura 15: Presença de ^{GAL}UAS e CYC-1 a montante do gene da glicoamilase na construção YCpGCG1 ..... **65**

Figura 16: Esquematização da troca do gene da glicoamilase do plasmídio YCpGCG1 ..... **68**

Figura 17: Estratégia de eliminação do primeiro ATG (fora de fase) a 5'da glicoamilase **69**

Figura 18: Esquematização da clonagem do gene da glicoamilase sob o controle de um promotor indutível (construção de pYES-glico) **71**

Figura 19: Testes de formação de halo de degradação de amido com a construção pYES-glico **73**

Figura 20: Pesquisa de enriquecimento de transformantes em meio líquido **76**

Figura 21: Análise em citometria de fluxo de leveduras que expressam EGFP constitutivamente 77

Figura 22: Teste de metabolização de X-Gal para tipagem de leveduras que foram separadas em "cell sorter" 80

Figura 23: Esquematização da clonagem do gene EGFP sob o controle de um promotor indutível (construção de pYES-EGFP) 81

Figura 24: Análise da ativação do gene EGFP presente em pYES-EGFP sob microscopia de fluorescência 83

Figura 25: Análise em citometria de fluxo da intensidade de fluorescência das células transformadas com os plasmídios pYES-EGFP e pCL1 84

Figura 26: Esquematização da clonagem do gene EGFP sob o controle de um promotor indutível (construção de YCpGCE) 85

Figura 27: Verificação da construção YCpGCE 87

Figura 28: Análise em citometria de fluxo da intensidade de fluorescência das células transformadas com os plasmídios YCpGCE e pCL1 88

Figura 29: Análise de sensibilidade a L-canavanina de quatro linhagens de levedura utilizada no sistema de duplo-híbrido 90

Figura 30: Análise de sensibilidade de leveduras YJ0Z can^R a L-can 92

Figura 31: Verificação de resistência a L-can de clones mutantes can^R espontâneos 93

Figura 32: Sensibilidade a L-can restituída a leveduras YJ0Z can^R por expressão constitutiva de $CAN1^+$ 95

Figura 33: Sensibilidade a L-can conferida a leveduras HF7c por expressão constitutiva de $CAN1^+$ 96

Figura 34: Esquematização da clonagem do gene $CAN1^+$ sob o controle de um promotor indutível (construção de pYES-CAN) 97

Figura 35: Sensibilidade a L-canavanina de leveduras YJ0Z can^R transformadas com pYES-CAN e pCL1 99

Figura 36: Sensibilidade a L-canavanina de leveduras YJ0Z can^R transformadas com pYES-CAN e com plasmídios que formam duplo-híbrido 100

Figura 37: Ativação do gene repórter *LacZ* em levedura resistentes a L-can.....**104**

Figura 38: Ativação do gene repórter *LacZ* em leveduras sobreviventes a concentrações baixas de L-can.....**106**

Figura 39: Sensibilidade a L-canavanina de leveduras YJ0Z can^R transformadas com pYES-CAN e com plasmídios que formam duplo-híbrido e freqüência de aparecimento de mutantes.....**107**

Figura 40: Ativação do gene repórter *LacZ* em leveduras resistentes a L-can provenientes de colônias grandes.....**109**

Figura 41: Teste de flutuação da resistência a L-canavanina.....**111**

Figura 42: Ativação do gene repórter *LacZ* em leveduras albergando plasmídios pVA3 recuperados de leveduras resistentes a L-can.....**113**

Figura 43: Efeito da mutação C239R em p53 na ativação de $CAN1^+$ pelo duplo-híbrido.....**115**

Tabela 1: Características presentes nos vetores de levedura YIp, YEp, YCp.....**8**

Tabela 2: Porcentagem das células sobreviventes a 100μg/ml de L-can quando albergam os plasmídios pYES-CAN, pTD1, pVA3.....**102**

ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – micrograma (10^{-6} g))
μl – microlitro (10^{-6} l)
μM – micromolar (10^{-6} M)
ηg – nanogramas (10^{-9} g)
5`- a montante
3`- a jusante
ADE – adenina
Amp – Ampicilina
CAN1- gene da permease da arginina
can1 – mutantes resistentes a L-can
cDNA – DNA complementar ao mRNA
°C – graus Celsius
DNA – ácido Desoxirribonucléico
EDTA – Etileno diamino tetra-acetato dissódio
EGFP – *enhanced green fluorescent protein* (proteína verde fluorescente melhorada)
EtBr – brometo de etídio
g – gramas
^{GAL}UAS - Sequência ativadora reconhecida por Gal4
HIS – histidina
IPTG – isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo
Kan - Kanamicina
Kb – Quilobases (10^3 pb)
*lac*Z – gene da beta-galactosidase
LB – Meio Luria Bertani
L-can – L-canavanina
LEU – leucina
LIS – lisina
LT – "large T"
mA – miliAmpere
M- Molar
mg – miligrama (10^{-3} g)
min. - minuto
ml – mililitro (10^{-3} l)
mRNA – ácido ribonucléico mensageiro
nt - nucleotídeo
^{32}P – isótopo 32 do fósforo
pb – pares de bases
PBS – salina tamponada com fosfato
PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
pMol – picomol (10^{-12} M)
RNA – Ácido ribonucléico
RNase – Ribonuclease
rRNA – RNA ribossômico
rpm – Rotações por minuto

s – segundos
SDS – dodecil sulfato de sódio
TAE – Solução 0,04M de Tris-acetato e 0,001M de EDTA
TBE – Solução 0,089M de Tris-borato, 0,089M de ácido bórico e 0,002M de EDTA
Tris – tris-(hidroximetil)-aminometano
TRP – triptofano
URA – uracila
UV - ultravioleta
V - Volts
X-Gal – substrato cromogênico 5-bromo-cloro-3-idolil-beta-D-galactosídio
W – Watts

1.INTRODUÇÃO

O sistema de duplo-híbrido de levedura e sistemas derivados são métodos eficientes de estudo de interações proteína-proteína, proteína-DNA e RNA-proteína. Estes sistemas baseiam-se na exploração de todo o processo de ativação transcricional em levedura bem como das proteínas envolvidas neste processo. Portanto, a compreensão de como ocorre a ativação de transcrição em levedura é fundamental. Paralelamente, é importante saber que outros métodos de detecção de interação são também eficientes e podem ser usados para complementar o sistema de duplo-híbrido.

1.1 Interações protéicas

É evidente que as interações proteína-proteína são bastante comuns e o grau de regulação que elas conferem é grande. Para se entender de maneira correta o seu significado na célula, é necessário que sejam identificadas as diferentes interações moleculares, a extensão em que elas ocorrem, e as suas conseqüências .

1.1.1 Relevância das interações proteína-proteína

As interações proteína-proteína são intrínsecas a virtualmente todo o processo celular. Em vários processos, como replicação de DNA, transcrição, tradução, processamento, secreção, controle do ciclo celular transdução de sinal e metabolismo intermediário, os complexos protéicos estão implicados como componentes essenciais (Alberts & Miake, 1992).

As interações transientes são comuns entre proteínas que controlam um grande número de processos celulares. Todas as modificações nas proteínas, envolvem necessariamente, estas interações transientes. Elas também estão envolvidas no recrutamento e na reunião do complexo transcricional a promotores específicos, no transporte de proteínas através da membrana, no empacotamento de proteínas nativas por chaperoninas, em passos do ciclo de tradução e na montagem e desmontagem de estruturas subcelulares durante o ciclo celular (Goodbourn, 1990).

Uma série de métodos bioquímicos, genéticos e moleculares de detecção de interação protéica vem sendo utilizada ao longo de vários anos.

1.1.2 Métodos de detecção de interação protéica

Dentre os métodos bioquímicos utilizados, os que se destacam são: cromatografia por afinidade (Ratner 1974), blotting por afinidade (Soutar & Wade, 1990), imunoprecipitação (Warner *et al.*, 1993) e cross-linking (Traut *et al.*, 1989). Dentre os métodos moleculares, onde muitas vezes utiliza-se uma biblioteca, destaca-se a utilização de sondas protéicas (Young & Davis, 1983), o processo de *phage display* (Smith, 1985) e o sistema duplo-híbrido de levedura (Song & Fields, 1989). Para os métodos genéticos os mais utilizados são supressores extragênicos (Hartman & Roth, 1973), efeitos letais sintéticos (Dobzhansky, 1946) e fenótipos de superprodução (Rine, 1991). Outros métodos mais recentes como ribossomo *display, cell-wall display, pathfinder* (revisado em Shusta *et al.*, 1999) também estão sendo bastante utilizados mas não serão descritos neste trabalho.

Cromatografia por afinidade

Uma proteína é covalentemente ligada a uma matriz como Sepharose sobre certas condições e usada para selecionar proteínas de um extrato que a ele se ligam permanecendo retidas. A maioria das proteínas desse extrato passam através da coluna ou são lavadas com tampões contendo baixas concentrações de sal. As proteínas que são retidas são eluídas por cofatores, solventes caotrópicos ou SDS (sódio duodecil sulfato). Este método foi utilizado, pela primeira vez, há vinte e cinco anos para se detectar fagos e proteínas hospedeiras que interagem com diferentes formas de RNA polimerase de *E.coli* (Ratner, 1974).

***Blotting* por afinidade**

Em um procedimento análogo àquele utilizando coluna de afinidade, as proteínas podem se fracionadas por PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e identificadas por sua habilidade de se ligar a outra proteína, peptídeo ou outro ligante. Este método é similar ao imunoblotting (Western blotting) no qual usa-se um anticorpo como sonda. Misturas complexas de proteínas, como lisado total, podem ser analisadas sem qualquer purificação. Este método tem sido muito utilizado para

proteínas de membrana, como receptores de membrana celular (Soutar & Wade, 1990). O lisado celular pode ser fracionado antes da eletroforese para aumentar a sensibilidade do método para a detecção de interação com proteínas raras.

Imunoprecipitação

O método clássico de co-imunoprecipitação para a detecção de interação proteína-proteína tem sido utilizado literalmente em milhares de experimentos. Lisados celulares são gerados, os anticorpos são adicionados, o antígeno desejado é precipitado e lavado, e proteínas ligadas são eluídas e analisadas. O antígeno usado para fazer o anticorpo pode ser uma proteína purificada ou um peptídio sintético acoplado a um carreador, e o anticorpo pode ser policlonal ou monoclonal. Uma alternativa é que a proteína pode carregar um epitopo como etiqueta para o qual existam anticorpos comercialmente disponíveis, ou usar proteínas como etiquetas (como GST – Glutationa S Transferase) para as quais estão disponíveis os "beads" para a rápida purificação da proteína fusionada a GST (Warner *et al.*, 1993; Birge *et al.*, 1993).

Cross-linking

O cross-linking pode ser usado para se descobrir a arquitetura de uma proteína ou de uma interação, utilizando material purificado de células, ou para se detectar proteínas que interagem com uma proteína teste em um extrato celular, em toda a célula ou em preparações parcialmente purificadas.

O método clássico de identificação de proteínas que interagem em um complexo protéico purificado envolve a análise em um gel bi-dimensional. O procedimento envolve três passos. (i) o complexo reage com um composto bifuncional da forma RSSR', e os grupos R e R' reagem com seqüências de aminoácidos susceptíveis no complexo protéico. A reação forma adutos na forma P-RSSR'-P'; (ii) as proteínas são fracionadas em um gel SDS na ausência de agentes redutores. O gel separa as proteínas baseado em seu peso molecular sendo que, as proteínas ligadas na forma P-RSSR'-P' migram como espécies de moléculas de alto peso; (iii) é feita uma corrida do gel em segunda dimensão após o tratamento do gel com agentes redutores para clivar as ligações centrais S-S. As espécies não ligadas se alinham na diagonal, pois o seu peso molecular não muda após a redução. As proteína ligadas migram para fora da

diagonal pois elas migram como P-RSSR'-P' na primeira dimensão e como P-RSH e P'-R'SH na segunda dimensão (Traut *et al.*, 1989).

Sondas protéicas para triagem de bibliotecas

Uma proteína marcada pode ser utilizada como sonda na triagem de bibliotecas para identificação de genes que codificam proteínas que interagem com esta sonda. As interações ocorrem em filtros de nitrocelulose entre proteínas imobilizadas (geralmente expressas em *E.coli* de uma biblioteca de cDNA) e a sonda de proteína marcada (Young & Davis, 1983).

Phage display

Smith (1985) foi o primeiro a demonstrar que um fago filamentoso de *E.coli* pode expressar uma proteína fusionada carregando um peptídeo estranho em sua cauda. Estes aminoácidos eram acessíveis a anticorpos de maneira que estes fagos fusionados poderiam ser enriquecidos através de purificação por imunoafinidade. Smith sugeriu que as bibliotecas de fagos fusionados deveriam ser construídos e triados para a identificação de proteínas que se ligam a anticorpos específicos. Nos últimos anos, variações desta tecnologia foram criadas para serem aplicadas a uma variedade de interações proteína-proteína e proteína-peptídeo.

Sistema de duplo-híbrido

O sistema de duplo híbrido (Fields & Song, 1989; Chien *et al.*, 1991; Fields & Sternglanz, 1994) é um método genético que usa a atividade transcricional como uma medida de interação proteína-proteína. Este método será descrito com maior detalhe no item 4 da Introdução.

Supressores extragênicos

Mutações supressoras são mutações que revertem, parcial ou totalmente, um fenótipo causado por uma mutação original (Hartman & Roth, 1973). Os supressores extragênicos não ocorrem nos mesmos genes que carregam as primeiras mutações. Foi proposto que um dos mecanismos desta supressão depende da ocorrência da mutação original e da supressora em genes cujos produtos se interagem fisicamente, de maneira que a mutação original destrói esta interação (a mutação em uma proteína Y para Y* compensa o defeito em X* e restaura a atividade do dímero XY). A

mutação supressora então, produz uma alteração compensadora que restaura a interação. Este tipo de análise de supressor foi bastante explorada em estudos de processos essenciais em leveduras, particularmente em controle do ciclo celular, estrutura de citoesqueleto e processamento de RNA (Moir *et al.*, 1982).

Efeitos sintéticos letais

Mutações em dois genes podem causar morte enquanto mutações somente em um deles não causa. Este fenômeno é chamado efeito sintético letal e pode resultar de interações físicas entre duas proteínas necessárias para a mesma função essencial. Neste caso, o dímero XY é requerido para uma função e a perda desta interação resulta em um fenótipo de morte ou em um fenótipo diferenciado. A mutação em X ou Y afeta, parcialmente, a ligação, mas a mutação em ambos (X* e Y*) a afeta totalmente. Dobzansky (1946) foi o primeiro a descrever os efeitos letais sintéticos em espécies de *Drosophyla*. No entanto, os estudos por efeitos letais sintéticos têm sido realizados com sucesso mais freqüentemente em *Saccharomyces cerevisiae* (Hieter *et al.*, 1985; Koshland *et al.*, 1985).

Fenótipos de superexpressão

A superexpressão de proteínas selvagens pode levar a fenótipos que propiciam o estudo de interações protéicas. Em *Saccharomyces cerevisiae* um plasmídio multicópia geralmente suprime mutações em genes que não estão nesses plasmídios (Rine, 1991). Em outros casos, a superprodução de uma proteína pode causar um fenótipo que é alterado pela superprodução de uma proteína de interação. Por exemplo, a superprodução da proteína Gal4 de levedura, um ativador transcricional de genes induzidos por galactose, leva à transcrição independente de galactose. No entanto, a regulação normal é restaurada se a proteína Gal80, um regulador negativo que se liga a proteína Gal4, é superexpresso, concomitantemente.

Por outro lado, a superexpressão de uma versão protéica não-funcional pode resultar em um fenótipo mutante de disrupção da atividade da proteína selvagem (Herskowitz, 1987). A existência dessas proteínas de dominância negativa pode levar à definição do domínio de oligomerização de uma proteína. A proteína selvagem p53 é um regulador transcricional que é tetramérico e o seu domínio de oligomerização fica próximo à porção C-teminal. Mutações no domínio central do gene p53, encontrados em

tumores, produzem proteínas mutantes de dominância negativa que se ligam e inativam a função da proteína p53 selvagem (Finlay *et al.*, 1989).

1.2 Leveduras como ferramentas biotecnológicas

As leveduras são utilizadas como ferramenta importante em alguns métodos descritos acima, principalmente no sistema de duplo-híbrido. Portanto é necessário que se dê uma ênfase neste fantástico microrganismo.

O uso biotecnológico de leveduras data das primeiras civilizações. Entretanto, mesmo em uma época de grande desenvolvimento e com perspectivas de que este novo século que está prestes a começar seja chamado do século da biotecnologia, as leveduras são ainda bastante utilizadas inclusive na produção, em larga escala, de proteínas eucarióticas. Muitas destas proteínas estão sendo utilizadas em pesquisa básica, com o objetivo de se revelar os mistérios dos fenômenos de regulação celular; outras podem se revelar como poderosas drogas para a indústria farmacêutica. (revisado em Cereghino & Cregg, 1999).

A utilização da levedura como ferramenta molecular é vantajosa quando a comparamos com bactérias e com eucariotos mais desenvolvidos. Em relação às bactérias, as leveduras podem fazer muitas das modificações celulares que as proteínas eucarióticas carecem para Ter atividade biológica. As bactérias, no entanto, muitas vezes produzem proteínas eucarióticas defeituosas, por não conseguirem fazer essas modificações. Em relação aos eucariotos mais desenvolvidos, onde o cultivo celular é dificultado pelos altos índices de contaminação além do crescimento destas células muitas vezes ser lento, as leveduras levam vantagens por serem eucariotos que conseguem se multiplicar rapidamente e tem uma enorme facilidade de manipulação (Moore, 1998).

A expressão de proteínas heterólogas consiste de quatro passos: (i) clonagem da seqüência de DNA da proteína heteróloga dentro de um cassete de expressão contendo um promotor de levedura e uma seqüência de terminação de transcrição; (ii) transformação e manutenção razoavelmente estável do DNA na célula hospedeira;

(iii) síntese da proteína heteróloga em condições específicas de cultura e (iv) purificação da proteína heteróloga e comparação com proteínas nativas. Várias espécies de leveduras, como a *Schizosaccharomyces pombe*, a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Pichia pastoris* têm sido utilizadas como sistemas de expressão de proteínas heterólogas (revisado em Cereghino & Cregg, 1999)

1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Diferente de muitos outros microrganismos, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem os estágios haplóide (aquelas ho) e diplóide bastante estáveis (Dujon, 1996). Portanto, mutações recessivas podem ser convenientemente isoladas e manifestadas em estágios haplóides, e testes de complementação podem ser feitos em linhagens diplóides. O desenvolvimento da transformação com DNA fez da levedura um microrganismo particularmente acessível à clonagem gênica e técnicas de engenharia genética Os plasmídios podem ser introduzidos em células como moléculas de replicação autônoma ou na forma integrativa. O conhecimento da seqüência do DNA do genoma completo da *S.cerevisiae* modificou, significantemente, a maneira com a qual os biologistas moleculares e celulares abordam e conduzem os experimentos (Dujon, 1996; Goffeau *et al.*, 1996)

1.2.2 Vetores de levedura

Para se fazer integração, deleção, alteração e expressão de genes em levedura, uma variedade de vetores foi construída adequando-se a cada situação (Brown & Tuie, 1998). A maioria dos plasmídios utilizados para estudos em levedura são plasmídios que contém sequências que permitem a seleção e propagação em *E.coli*, proporcionando assim uma amplificação e subseqüentes alterações *in vitro*. Os vetores mais comuns de levedura são originados de pBR322. Eles contêm origem de replicação (ori), promovendo um alto número de cópias em *E.coli*, e marcadores selecionáveis de antibióticos, como os que conferem resistência à ampicilina e tetraciclina. Além disto, todos os vetores de levedura contêm marcadores que permitem a seleção de transformantes que contém os plasmídios desejáveis. Os marcadores mais utilizados são: URA3, HIS3, LEU2, TRP1, LIS2, que complementam as mutações auxotróficas específicas em leveduras, como ura3-52,

his3-Δ1, leu2- Δ1, trp1- Δ1, e lis2-201. Estas mutações complementáveis foram escolhidas por apresentarem baixas taxas de mutações reversíveis (Guthrie & Fink, 1991).

Os vários tipos de vetores utilizados podem ser divididos em três categorias específicas: (i) vetores integrativos (YIp); (ii) vetores de replicação autônoma com alto número de cópias (YEp) e (iii) vetores de replicação autônoma com baixo número de cópias (YCp) (tabela1).

Tabela 1: Características presentes nos vetores de levedura: YIP, YEp e YCp. Retirado de (http://www.urmc.rochester.edu/smd/biochem/yeast/Index.html)

Características	YIp	YEp	YCp
Genes ou segmentos de *E.coli: ori, bla; tet*	+	+	+
Genes de levedura *URA3; HIS3; LEU2; TRP1; LYS2*;etc	+	+	+
Leu2-Δ	-	+	-
2μm; 2 μm-ori REP3	-	+	-
ARS1; ARS2; ARS3;etc	-	-	+
CEN3; CEN4; CEN1; etc	-	-	+
Marcadores da hospedeira (levedura): *ura3-52; his3-Δ1; leu2- Δ1;trp1-Δ1;lys2-201*; etc	+	+	+
Estabilidade	++	+	+

1.3 Regulação da transcrição em levedura

A regulação da transcrição está diretamente relacionada a muitos fenômenos biológicos como o crescimento celular, resposta a mudanças ambientais, desenvolvimento de organismos multicelulares e doenças. Os mecanismos de regulação transcricional são basicamente similares nos organismos eucarióticos (McKnight & Yamamoto, 1992). Estes mecanismos estão sendo elucidados pelos estudos que envolvem uma enorme variedade de genes, promotores, proteínas, organismos e abordagens experimentais. Os estudos feitos em levedura enfatizam abordagens genéticas poderosas que, muitas vezes, não são disponíveis em outros organismos eucarióticos.

1.3.1 Os elementos promotores

Os promotores reconhecidos pela RNA polimerase II (Pol II) de levedura contêm os elementos "*upstream*"(UAS-"*upstream activating sequences*"), TATA, e iniciador (Inr –"*Initiation region*") sendo que, estes dois últimos pertencem ao promotor mínimo. Os elementos *upstream* são seqüências de DNA pequenas (10-30 pb), específicas de promotores e tipicamente localizadas entre 50 e 500 pb a montante do sítio de iniciação de transcrição. Estes elementos em levedura são análogos, e em muitos casos homólogos, às seqüências chamadas "enhancers" em mamíferos. No entanto apesar destes elementos funcionarem em distâncias variadas a montante do sítio de iniciação, eles geralmente não ativam transcrição quando localizados a jusante. Em geral, os UAS são reconhecidos por proteínas que se ligam a DNA que determinam propriedades regulatórias particulares de um certo promotor (Barberis & Gaudreau, 1998).

A maioria dos promotores de leveduras contém os elementos TATA (consenso TATAAA) que são importantes para a iniciação de transcrição. Os elementos TATA em levedura são localizados a 40-120 pb a montante do sítio de iniciação do mRNA; a distância precisa não é funcionalmente importante (Harbury & Struhl, 1989). Em contraste, as seqüências TATA da maioria dos eucariotos estão invariavelmente localizadas a 25-30 pb do sítio de iniciação. Os elementos TATA são reconhecidos

pelas "TATA-binding protein" (TBP), um componente da maquinaria de transcrição basal necessária para a transcrição pela Pol II. Naqueles promotores que não contêm o elemento TATA, presume-se que a TBP se ligue em uma seqüência não específica onde é estabilizada por interações proteína-proteína com outros fatores transcricionais (Harbury & Struhl, 1989).

Em leveduras, os elementos iniciadores (Inr) são determinantes primários de onde a transcrição irá começar (Harbury & Struhl, 1989). Eles estão localizados próximos ao sítio de iniciação do mRNA, mas ao contrário dos UAS e dos TATA, eles não contêm uma seqüência consenso relevante. Estes elementos iniciadores têm um pequeno efeito nos níveis de transcrição quando comparados com os elementos UAS e TATA.

Alguns promotores de leveduras contêm elementos regulatórios negativos, chamados operadores, que reprimem a transcrição (Hershcbach & Johnson, 1993). Os operadores se assemelham aos UAS quanto aos sítios de ligação à proteína que funcionam em distância variadas a montante do elemento TATA. Alguns operadores podem reprimir a transcrição quando localizados a montante dos UAS, mas a repressão é muito mais eficiente quando o operador se posiciona entre os elementos UAS e o TATA.

1.3.2 Fatores de transcrição basal

As análises bioquímicas das proteínas de leveduras e de mamíferos levaram às descrições do notável complexo de maquinaria da Pol II no qual a transcrição é iniciada (Buratowski, 1994; Conaway & Conaway, 1993). Em leveduras, os componentes essenciais para uma iniciação precisa *in vitro* são: Pol II, uma enzima com 12 subunidades (Young, 1991) e os fatores de transcrição TBP (Hernandez, 1993; Strhul, 1994), TFIIB (Pinto *et al.*, 1992), TFIIE (Feaver *et al.*, 1994), TFIIF (Henry *et al.*, 1994), e TFIIH (Feaver *et al.*, 1994) (figura 1). TBP se liga ao elemento TATA; TFIIB se posiciona na região entre o TATA e o sítio de iniciação; TFIIF interage com Pol II e é importante para recrutá-la ao promotor; TFIIH fosforila a cauda *C-terminal* (CTD) da maior porção da Pol II, e TFIIE é importante para a

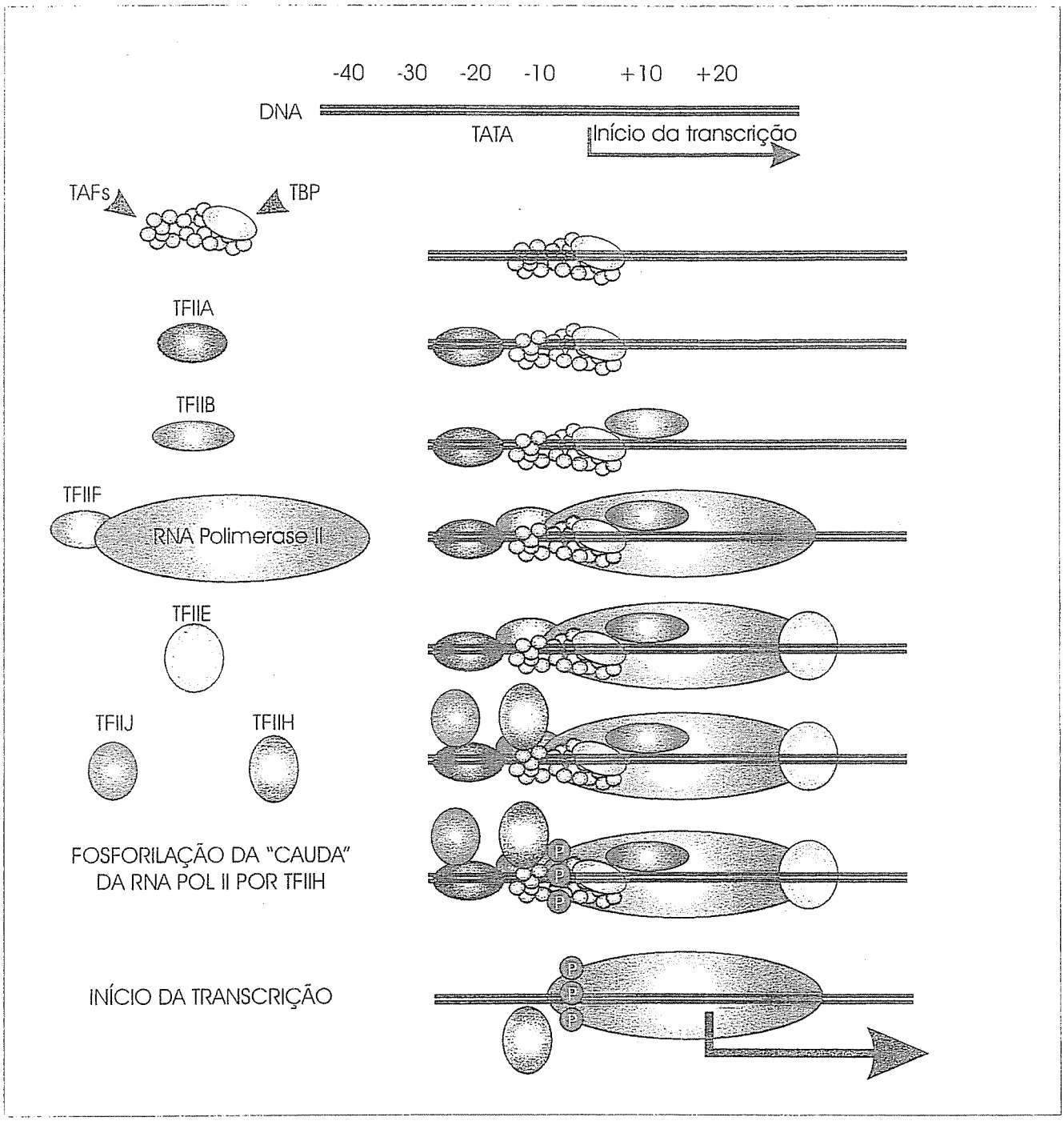


Figura 1: Iniciação da transcrição em eucariotos. O esquema gráfico acima mostra os fatores de transcrição envolvidos na montagem do complexo de transcrição basal em eucariotos bem como a região de ligação de cada um deles.

liberação do promotor. TFIIA, que influencia a ligação do TBP ao TATA, é importante mas não é absolutamente necessária para a precisa iniciação *in vitro* (Jonhson & Herskowitz, 1992). Além disto, "TBP-associated factors" (TAFs) que fazem parte do complexo TFIID (Reese *et al.*, 1994) e componentes da holoenzima Pol II (Srb e outras proteínas) (Kim *et al.*, 1994; Koleske & Young, 1994) podem ser consideradas como fatores transcricionais basais apesar de não serem necessárias para a iniciação.

A "TATA-binding protein" (TBP) é o fator transcricional de eucariotos mais conservado, com o domínio C-terminal (180 resíduos) mostrando mais de 80% de identidade em uma enorme variedade de espécies (Hernandez, 1993; Strhul, 1994). Esta proteína adquire múltiplas funções quando se associa com outras proteínas (TAFs) em distintos complexos (SL1, TFIID, TFIIB) que são específicos para a maquinaria das três RNA polimerases. *In vivo*, TBP parece ser necessária para a transcrição de todos os genes, incluindo aqueles que não contêm o elemento TATA (Cormack & Strhul, 1992).

A TBP de levedura pode se associar com as TAFs em um complexo que se parece com TFIID de outros eucariotos (Reese *et al.*, 1994). Como esperado, as TFIID de leveduras podem participar da transcrição basal e ativada, enquanto que a TBP não é capaz de responder a proteínas ativadoras (Verrijzer, 1994). A levedura contém outros fatores associados a TBP além das TAFs específicas da Pol II que estão presentes em TFIID. Spt3 interage diretamente com TBP e esta interação é requerida em padrões de transcrição normais *in vivo* (Eisenmann, 1992).

A TFIIA se associa e altera a conformação de TBP e estabiliza a interação TBP-TATA, possivelmente interagindo com o DNA logo acima do elemento TATA. No entanto, estudos *in vivo* geraram uma controvérsia sobre a função de TFIIA na transcrição basal e ativada. A TFIIA de levedura contém duas subunidades, ambas essenciais para a viabilidade celular (Ranish *et al.*,1992). Uma interação eficiente entre TFIIA e TBP parece ser essencial para a ativação da transcrição *in vivo*. Um mutante de TBP, que é especificamente defectiva na interação com TFIIA *in vitro*, não é capaz da responder a ativadores acídicos *in vivo* (Stargell & Strhul, 1995). A

fusão de TFIIA com este TBP defectivo restaura a função de ativação, indicando que a interação TBP-TATA é importante para a ativação da transcrição *in vivo*.

A TFIIB e a Pol II são os fatores de transcrição basal que são responsáveis por selecionar o sítio de iniciação de transcrição. Li e colaboradores, (1994) demonstraram que em reações de reconstituição, usando fatores basais de *Saccharomyces cerevisiae*, a substituição de TFIIB e Pol II pelo de *Schizosaccharomyces pombe* é necessária e suficiente para na troca da iniciação para um sítio característico de *S. pombe*. *In vivo*, as mutações afetando TFIIB ou a maior subunidade de Pol II (Rpb1) podem reduzir a iniciação em um sítio normal e aumentá-la em sítios localizados abaixo ou a jusante deste sítio (Furter *et al.*, 1994; *Hull et al.*, 1995).

A TFIIH é um fator de transcrição complexo que fosforila a cauda C-terminal (CTD) da maior subunidade de Pol II. Muitas subunidades de TFIIH já haviam sido identificadas por estudos genéticos, e esses estudos revelaram inesperadas conecções entre a transcrição pela Pol II, o reparo de DNA e o controle do ciclo celular (Feaver *et al.*, 1994; 1993).

A RNA polimerase II (Pol II) de levedura é encontrada em um enorme complexo de multiproteínas denominado holoenzima Pol II (Kim, 1994; Koleske & Young, 1994). Esta holoenzima contém TFIIF, TFIIB e TFIIH. TBP pode se associar fracamente com a holoenzima mas provavelmente não é um componente verdadeiro, e TFIIE e TFIIA não estão presentes. Além disto, a holoenzima Pol II contém proteínas Srb (Srb2-Srb11), Gal11, e Sug1, todas elas inicialmente identificadas por mutações que causaram vários efeitos transcricionais *in vivo* (Koleske & Young, 1994). Alguns componentes da holoenzima Pol II (Srb4, Srb6,Srb7, e Sug1) são essenciais para o crescimento celular, e a perda da função de Srb4 ou Srb6 resulta na perda geral da transcrição pela Pol II (Thompson & Young, 1995). Estes resultados indicam que a holoenzima Pol II tem um papel essencial na transcrição *in vivo*. Wilson *et al.*, (1996) reportaram que os componentes da maquinaria de remodelamento da cromatina (ex: Swi/Snf) se associavam com a holoenzima. Em geral, alguma variação na composição da holoenzima Pol II purificada depende das diferentes condições experimentais usadas para isolar o complexo. É também possível que diferentes formas de

holoenzimas se formem simultaneamente *in vivo* (Chang & Jaening, 1997). De qualquer maneira, as mais importantes características da holoenzima Pol II são: (i) ela é pré-montada independentemente da presença do DNA promotor e ativadores, e (ii) a transcrição *in vitro* composta pela holoenzima, complementada com os fatores transcricionais que não estão no complexo (ex: TBP, TFIIA), pode ser estimulada por ativadores clássicos como Gal4 (Koleske & Young, 1994; Kim *et al.*, 1994) e Gcn4 (Kim *et al.*, 1994). Este resultado não é observado em experimentos similares com a RNA polimerase II purificada (sem o complexo) e somente fatores transcricionais basais (Kim *et al.*, 1994).

1.3.3 Ativadores transcricionais

As células de leveduras contêm uma grande variedade de proteínas ativadoras de transcrição que se ligam ao DNA e, especificamente, reconhecem os elementos promotores por domínios eucarióticos (ex: *homeodomínios*, *zinc finger*, *bZIP*, *bHLH*). Apesar da maioria dos elementos promotores serem ligados por um único ativador transcricional, alguns sítios alvo (ex: AP-1, ATF/CREB, Swi5/Ace2) são reconhecidos por múltiplas proteínas, enquanto outros são reconhecidos por complexos heteroméricos como Hap2-Hap3-Hap5 (McNabb *et al.*, 1995) e Swi4-Swi6 (Primig *et al.*, 1992). Alguns ativadores têm papéis fisiológicos modestos enquanto outros interagem com genes aparentemente com funções não relacionadas. Além disso, existe outra classe de ativadores (ex: Rap1, Abf1, e Reb1) que são abundantes, essenciais para o crescimento celular e interagem com muitos promotores não relacionados (Ju *et al.*, 1990; Marahrens & Stillman, 1992; Sussel & Shore, 1991).

Quando se ligam ao sítio específico, as proteínas ativadoras estimulam a expressão do gene através do domínio de ativação de transcrição (AD- *activation domain*) que é funcionalmente distinto e, geralmente, está fisicamente separado do domínio de ligação ao DNA (BD- *binding domain*). Os domínios de ativação das proteínas da levedura são geralmente definidos por regiões acídicas pequenas que funcionam autonomamente quando fusionadas a domínios de ligação de DNA heterólogos (Brent & Ptashne, 1985). Apesar da carga negativa ser claramente importante, o nível de estimulação transcricional também é influenciado por resíduos hidrofóbicos e outros

componentes que ainda são pouco compreendidos em nível estrutural (Hahn, 1993; Strhul, 1994). Algumas regiões ativadoras se tornam acídicas por fosforilação (Song *et al.*, 1991; Sorger & Pelham, 1988), mas não está claro se a transcrição é aumentada simplesmente pelo aumento da carga negativa. Ativadores de leveduras parecem não conter domínios de ativação ricos em prolina e glutamina, pois os domínios de mamíferos deste tipo não funcionam em células de levedura (Kunzler *et al.*, 1994; Ponticelli *et al.*, 1995). No entanto, nem todos os ativadores de leveduras contêm regiões que são acídicas ou podem ser fosforiladas, sugerindo que existam outros tipos de domínios de ativação em levedura.

Em células de leveduras, os ativadores podem estimular a transcrição aumentando o recrutamento de TBP ao promotor (Imbalzano *et al.*, 1994). Os domínios de ativação de Gcn4 parecem acelerar o tempo de acesso de TBP ao elemento TATA do gene HIS3 (Klein & Strhul, 1994). O(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(is) os domínios de ativação acídicos aumentam o recrutamento da TBP para o TATA não é (são) conhecido (s). Uma possibilidade é que os domínios de ativação acídicos interagem diretamente com TFIIA e/ou TBP estabilizando o complexo TBP-TFIIA-TATA no contexto da cromatina. Uma outra alternativa é que os domínios de ativação acídicos podem causar alterações diretamente na estrutura da cromatina aumentando o acesso da TBP ao promotor (Axelrod & Majors, 1993; Morse, 1993).

Apesar do conhecimento sobre ativação transcricional em leveduras ser direcionado aos domínios de ativação acídicos, existem evidências para a existência de outros tipos de ativação que funcionam por diferentes mecanismos moleculares. Primeiro: vários ativadores de leveduras parecem não conter regiões muito acídicas. Segundo: mutações que alteram a TBP de maneira a não mais responder a ativadores acídicos não afetam a transcrição pela Pol II na maioria dos genes e, não afetam o crescimento celular (Arndt *et al.*, 1995; Lee & Strhul, 1995; Stargel & Strhul, 1995). Terceiro: ativadores transcricionais abundantes como Rap1, Abf1 e Reb 1 também têm papéis importantes em origens de replicação de DNA, telômeros e silenciadores de mating-type (Ju *et al.*,1990; Marahrens & Stillman, 1992; Sussel & Shore, 1991). Essas proteínas devem não só interagir especificamente com a maquinaria da Pol II mas devem também ter diversas funções que afetariam a cromatina.

1.3.4 Fatores transcricionais intermediários (co-fatores)

Fatores intermediários não se ligam a elementos promotores e não são componentes da maquinaria basal. Eles têm sido identificados por mutações que têm efeitos seletivos na transcrição. Em princípio, uma proteína intermediária com um domínio de ativação age como um co-ativador que estimula a transcrição, através da associação com proteínas que se ligam ao DNA (Horiuchi *et al.*, 1995). Além disto, uma proteína intermediária pode ser um adaptador/mediador da transdução de sinal de um domínio de ativação para o componente da maquinaria basal. Finalmente, uma proteína intermediária aumenta a transcrição alterando a estrutura da cromatina (Cote *et al.*, 1994).

1.3.5 Repressão transcricional

Devido à complexidade envolvendo a transcrição basal e o processo de ativação transcricional, a transcrição pode ser reprimida por uma variedade de mecanismos distintos (Herschbach & Jonhson, 1993). A forma mais simples de repressão de um gene envolve a ligação específica de proteínas repressoras em sítios de DNA, chamados operadores, nos promotores. Os sítios operadores que inibem a transcrição podem estar localizados em várias posições nos promotores. As proteínas repressoras podem competir com as ativadoras ao se ligarem em sítios coincidentes ou de sobrepostos (ex: Acr1 e ativadores ATF/CREB competem pela ligação no sítio ATF/CREB1) (Vincent & Strhul, 1992). As proteínas que se ligam entre os elementos UAS e TATA também reprimem a transcrição, provavelmente inibindo a comunicação entre os ativadores e a maquinaria basal (13). Em alguns casos os repressores de levedura podem funcionar, mesmo quando se ligam a montante de todo o promotor (Jonhson & Herskowitz, 1985; Strhul, 1985) provavelmente por mecanismos diferentes de um simples impedimento estérico.

Para aquelas proteínas repressoras que não se ligam ao DNA, a forma mais simples de ação envolve a interação proteína-proteína que bloqueia a função dos ativadores. A interação dos repressores deve simplesmente mascarar a ligação ao DNA e/ou a função de ativação transcricional de um ativador. Por exemplo, a proteína Gal80

reprime a ativação transcricional por bloquear funcionalmente o domínio de ativação de Gal4 (Ma & Ptashne, 1987). No entanto, como Gal80 é fortemente associada a Gal4 sobre todas as condições fisiológicas, a repressão não é simplesmente mascarada, mas requer uma mudança conformacional em Gal4 e/ou Gal80 (Leuther & Jonhston, 1992).

Apesar dos mecanismos de repressão molecular diferirem em detalhes, eles compartilham propriedades importantes: (i) geralmente operam em um gene ou conjunto de genes; (ii) geralmente funcionam através da inibição da função dos ativadores; (iii) são indiretos, bloqueando a função estimulatória de um ativador específico mas não interferindo diretamente na maquinaria de transcrição basal ou no gene (Herschbach & Jonson, 1993).

Os organismos eucariotos também têm uma variedade de mecanismos de repressão que regulam negativamente a transcrição de muitos genes aparentemente não relacionados. O mecanismo de repressão mais geral envolve a proteção do DNA pelos nucleossomos, que restringe severamente o acesso das proteínas regulatórias transcricionais ao promotor (Grunstein, 1990). A ruptura da estrutura normal dos nucleossomos pela perda das histonas (Han & Grunstein, 1988), a mudança na dosagem das histonas (Clark *et al.*, 1988), as mutações nas histonas (Mann & Grunstein, 1992), ou por seqüências poli dA:dT (Iyer & Struhl, 1995) resultam em transcrição aumentada. A repressão pelos nucleossomos é mecanicamente simples e afeta a transcrição de todos os genes. No entanto, diferenças intrínsecas no posicionamento e estabilidade dos nucleossomos, bem como a habilidade de ativadores específicos e TBP de interagirem com os nucleossomos de uma determinada região, podem alterar a extensão na qual genes individuais são afetados *in vivo*.

Outro mecanismo de repressão global envolve proteínas que interferem diretamente com os componentes da maquinaria de transcrição basal. Como no caso da repressão por nucleossomos, os inibidores dos fatores de transcrição basal devem reprimir todos os genes, apesar de genes individuais serem afetados em alguns casos (Auble *et al.*, 1994).

A caracterização dos mecanismos de transcrição basal e regulada em levedura bem como o conhecimento molecular de ativadores e repressores transcricionais permitiram a sua utilização na construção de sistemas de detecção de interação proteína-proteína como os sistemas de duplo-híbrido em levedura.

1.4 Sistemas de duplo-híbrido em levedura

O sistema de duplo-híbrido de levedura (Song & Fields, 1989) vem sendo amplamente aplicado no estudo de interações protéicas ao longo de mais de dez anos desde sua primeira descrição. Variações do sistema têm sido desenvolvidas (Brent & Ptashne, 1994) e também amplamente aplicadas de acordo com cada tipo de abordagem que se pretende utilizar.

1.4.1 Sistema duplo-híbrido

O sistema de duplo-híbrido tem sido utilizado para identificar proteínas que se ligam a outras proteínas e para delinear domínios ou resíduos críticos para interação entre elas. É um método sensível de detecção de interações transientes e fracas, que provavelmente ocorrem em complexos nativos grandes.

Este sistema é baseado no fato de que virtualmente todos fatores de transcrição eucarióticos (Gal 4, por exemplo) consistem de dois domínios fisicamente separáveis: o domínio que reconhece e se liga a uma região específica de DNA ("DNA binding domain") e o domínio responsável pela ativação de transcrição ("transcriptional activation domain") (Keegan *et al.*, 1986; Hope & Struhl, 1986; Ma & Ptashne, 1987). Ambos os domínios são necessários para a função de ativação normal e geralmente os domínios são partes de uma mesma molécula. Entretanto, foi demonstrado que um ativador funcional pode ser montado, *in vivo*, a partir de domínios de ligação ao DNA e de domínios de ativação de transcrição provenientes de fatores de transcrição distintos e reunidos via tecnologia de DNA recombinante (Ma & Ptashne, 1988, Brent & Ptashne, 1985). No sistema de duplo-híbrido faz-se a construção de uma seqüência híbrida que codifica o domínio de ligação ao DNA (BD–"*binding domain*") fusionado a uma das proteínas de interesse (denominada "isca"), e de outra seqüência que

codifica a outra proteína de interesse (denominada "presa") fundida ao domínio de ativação de transcrição (AD– "*activation domain*"). A seqüência que contém a "isca" codifica a proteína híbrida 1 (híbrido 1) e a seqüência que contém a "presa" codifica a proteína híbrida 2 (híbrido 2). Quando ocorre interação entre o híbrido 1 e o híbrido 2, ou seja , a "isca" e a "presa", ou DB-X/Y-AD, reconstitui-se o fator de transcrição funcional levando assim à ativação de um gene repórter que está a 3´da região regulatória (UAS) onde este fator se liga (figura 2).

O ensaio de duplo-híbrido tem sido utilizado para detectar interações conhecidas *a priori* entre proteínas previamente clonadas (Fields & Song, 1989; Kato *et al.*, 1992; Goff *et at.*, 1992; Luban *et al.*, 1992; van Aelst *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1993; Li & Fields, 1993; Iwabuchi, 1993; Chardin *et al.*, 1993; Standinger *et al.*, 1993; Jackson, 1993) e para clonar genes codificadores de proteínas que interagem com uma dada proteína de interesse, usando-se bibliotecas onde seqüências de organismos de interesse são fusionadas a domínio de ativação de transcrição como híbrido 2 (Dalton & Treiman, 1992; Chien *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1992; Luban *et al.*, 1993; Durfee *et al.*, 1993; Hardy, 1992; Vojtek *et al.*, 1993).

Dentre os ensaios utilizados para detecção de interação protéica, o sistema de duplo-híbrido oferece três principais vantagens: (i) por ser baseado em um esquema de seleção forte em um microrganismo conveniente, ele permite testar um número enorme de seqüências codificantes em um experimento relativamente simples; (ii) é um ensaio realizado *in vivo* e, portanto, não é limitado pelas condições experimentais de um ensaio *in vitro*; (iii) por ser baseado em ensaios de ligações físicas, uma enorme variedade de interações proteína-proteína pode ser detectada e caracterizada seguindo um único protocolo (Vidal & Legrain, 1999).

1.4.2 Duplo-híbrido reverso

Uma vez que a interação proteína-proteína é identificada, uma variedade de experimentos adicionais é necessária para a caracterização da função, estrutura e regulação da interação observada (White, 1996). A identificação de mutações nas

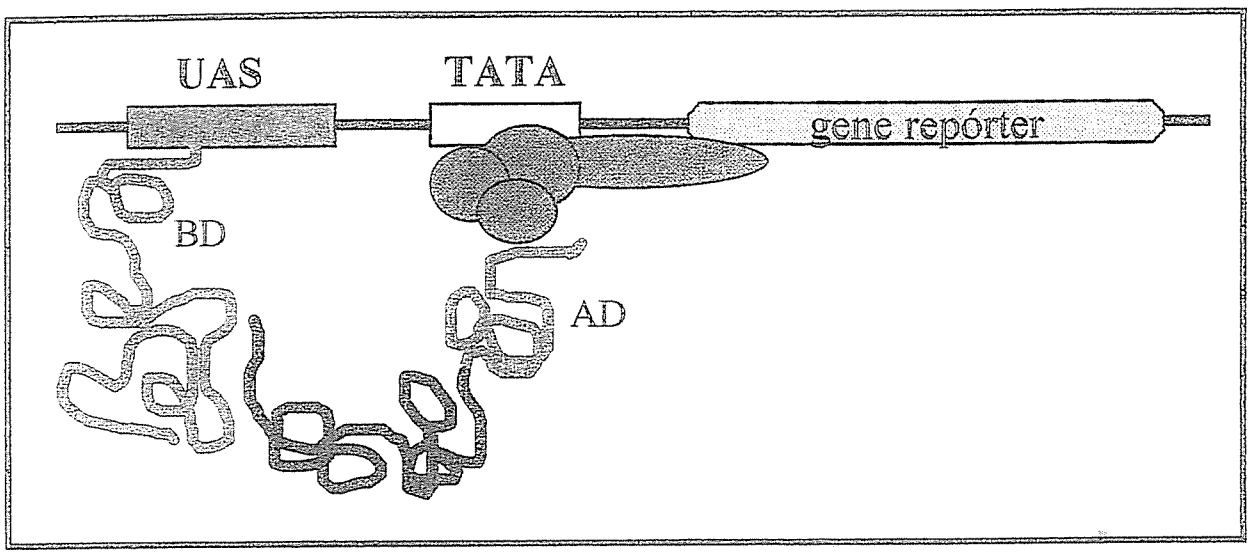


Figura 2: Sistema de duplo-híbrido em levedura. A interação da proteína híbrida 1 com a proteína híbrida 2 leva a ativação do gene repórter. A proteína híbrida 1 é constituída do domínio de ligação se DNA da proteína Gal4 (BD, em azul) em fusão com uma proteína de interesse (vermelho). A proteína híbrida 2 é constituída do domínio de ativação de transcrição da proteína Gal4 (AD, em azul) em fusão com a proteína teste (preto). Somente quando há interação da proteína teste (híbrido 2) com a proteína de interesse (híbrido 1) ocorre a reconstituição da atividade da proteína Gal4 que atua ativando a transcrição do gene.

proteínas que não mais permitem a interação entre elas pode ser útil não só para identificar os componentes estruturais, mas também para gerar ferramentas genéticas para a caracterização das funções *in vivo*. Neste aspecto, dois trabalhos publicados por Vidal e colaboradores, (1996) descrevem o desenvolvimento e a aplicação do sistema de duplo-híbrido reverso especificamente desenvolvido para facilitar a identificação de eventos que dissociam a interação proteína-proteína. Nesta versão, contrária ao duplo-híbrido original, a interação DB-X/AD-Y pode ser tóxica ou letal para as células da levedura pois um marcador tóxico é utilizado como gene repórter (seleção negativa) (Vidal, 1997). Neste contexto, a dissociação entre DB-X e AD-Y confere uma vantagem seletiva de crescimento que pode convenientemente selecionar mutações em regiões importantes de interação ou peptídeos de dissociação protéica (figura3).

Apesar das interações proteína-proteína formarem a base de muitos processos biológicos, outras interações macromoleculares como as interações proteína-DNA e proteína-RNA também são altamente relevantes. O sistema de duplo-híbrido original foi modificado para acomodar a detecção destas interações.

1.4.3 Mono-híbrido

O sistema mono-híbrido usado para estudar proteínas que se ligam ao DNA é uma extensão, por simplificação, do conceito de duplo-híbrido (Chong & Mandel, 1997). Neste caso, o híbrido BD-X é eliminado e as sequências regulatórias de Gal4 ou LexA são substituídas por uma seqüência de DNA específica identificada como um sítio importante no sistema biológico a ser estudado. A proteína que se liga a esta seqüência específica de DNA pode ser identificada e/ou caracterizada quando fundida ao AD. Este sistema se estende ao estudo não só de ativadores transcricionais, mas também ao estudo de repressores transcricionais e proteínas envolvidas com replicação do DNA. Em uma outra abordagem, o híbrido AD-Y é eliminado e se mantém o híbrido BD-X bem como a seqüência regulatória específica do domínio de ligação BD. Neste caso, o interesse se concentra no estudo da proteína X potencialmente capaz de ativar a transcrição por conter domínios de ativação (figura 4). Muitas versões do sistema de duplo-híbrido foram publicadas em Chong &

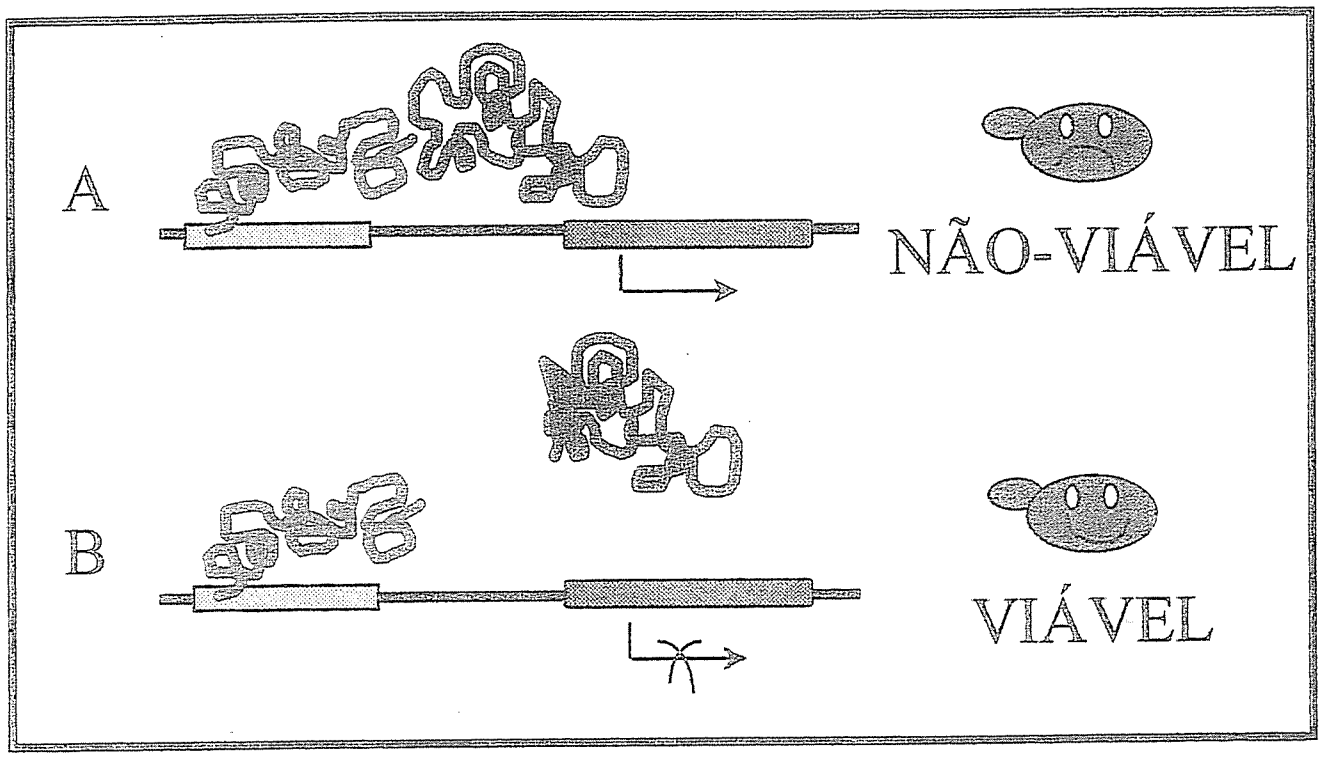


Figura 3: Sistema de duplo-híbrido reverso. A interação de duas proteínas híbridas, formando o duplo-híbrido, leva a ativação de transcrição do gene repórter que, sob certas condições, é tóxico para a levedura (A). Assim, quando ocorrer dissociação de interação por mutação ou por interferência de um inibidor, o gene não será transcrito e as leveduras sobreviverão (B).

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIBLIOTECA

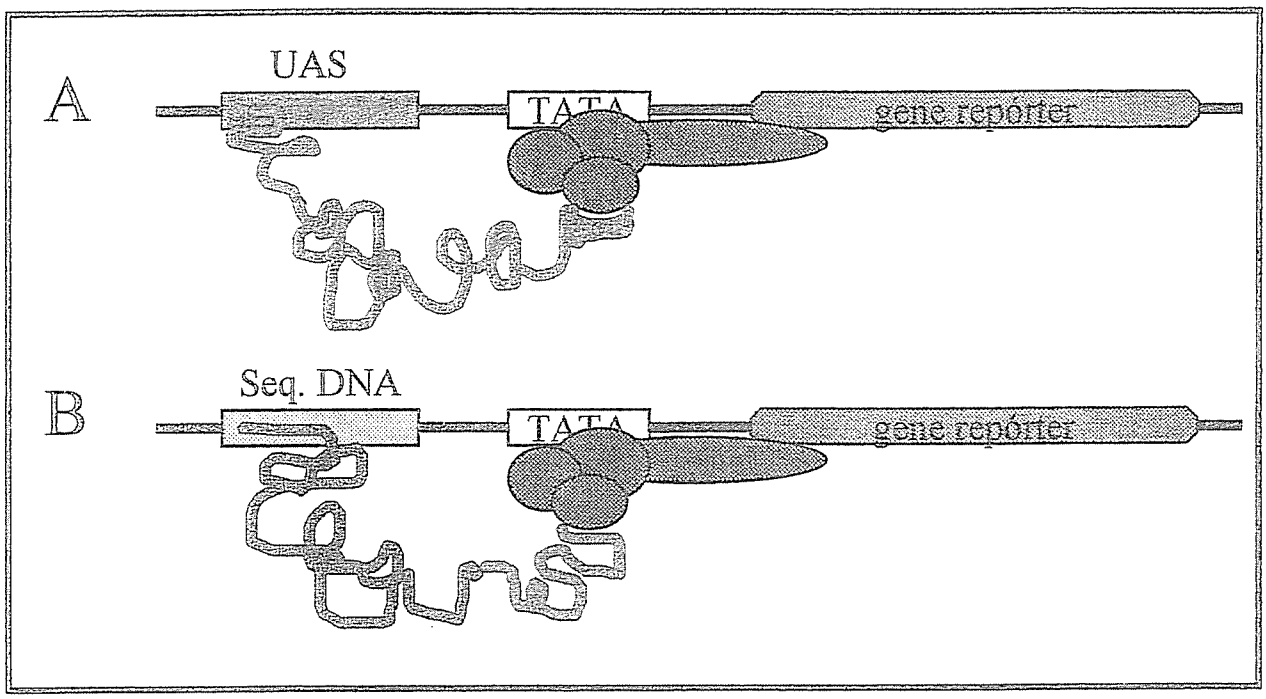


Figura 4: Sistema mono-híbrido de levedura. Neste sistema somente um dos híbridos é utilizado, como o próprio nome diz. Assim, duas abordagens podem ser realizadas. A primeira se resume na utilização do híbrido 1 em estudos de atividade transcricional da proteína fusionada utilizada (em verde, A). A segunda é o uso somente do híbrido 2 para se estudar domínios protéicos de ligação de DNA que interajam com seqüências específicas (em azul, B).

Mandel (1999). Até agora o sistema mono-híbrido tem sido utilizado com sucesso para a identificação de várias proteínas, incluindo o complexo de origem de replicação de levedura Orc6 (Li & Herskowitz, 1993), o fator de transcrição neuronal olfatório de mamíferos (Wang & Reed, 1993),etc.

1.4.4 Tri-híbrido

O sistema tri-híbrido é utilizado para o estudo de interações RNA-proteína e é uma extensão mais complexa do sistema de duplo-híbrido. Neste sistema, ambos os híbridos BD-X e AD-Y estão presentes bem como um terceiro híbrido, uma molécula de RNA que faz uma ponte entre os outros dois (Zhang *et al.*, 1997). A molécula híbrida de RNA consiste da fusão entre uma seqüência conhecida de RNA, que se liga a uma proteína (RBP-"*RNA-binding protein*"), e uma seqüência de RNA (X) a ser caracterizada. Neste contexto RBP é fundida a BD e a reconstituição do fator transcricional se baseia em duas interações como mostrado a seguir: DB-RBP/RNA-X/AD-Y (figura 5). Uma nova proteína Y que se liga a seqüência X de DNA pode ser identificada e potencialmente caracterizada quando fundida a AD.

1.4.5 Limitações do sistema de duplo-híbrido

O sistema de duplo-híbrido convencional tem algumas limitações por utilizar essencialmente ativação transcricional. A principal limitação é que nem a "isca" nem a proteína potencial para interação devem ser capazes de ativar a transcrição por si mesmo. Isto pode ser um problema com ativadores transcricionais que naturalmente contêm domínios que ativam os genes repórteres quando fundidos ao BD. Além disto, muitas proteínas, mesmo não sendo um fator de transcrição podem ativar a transcrição quando fundidas artificialmente ao BD (Ma & Ptashne, 1987). Todas as duas classes de proteínas mencionadas acima são chamadas se "self-activators". Um duplo-híbrido modificado pode ser utilizado para lidar com "iscas" "self-activators"(Du *et al.*, 1996). Nesta abordagem, a proteína "isca" (X) é fundida ao domínio de ativação de transcrição (AD-X) e faz-se a triagem da biblioteca em DB-Y. Du e colaboradores, (1996) fizeram uma seleção inicial, onde muitos clones positivos foram selecionados

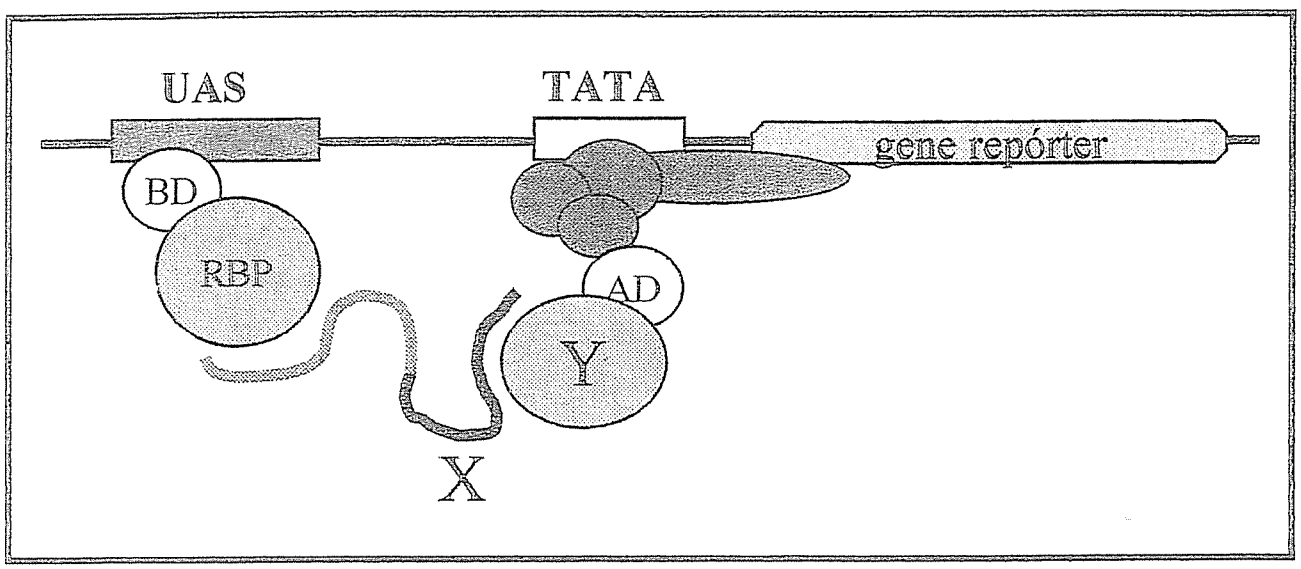


Figura 5: Sistema tri-híbrido de levedura. Neste sistema, a proteína híbrida 1 é composta pelo domínio de ligação ao DNA (BD) em fusão com uma proteína que se liga a um RNA específico (RBP). O híbrido 2 é constituído do domínio de ativação de transcrição (AD) em fusão com um proteína membro de uma biblioteca (Y). Um terceiro híbrido é constituído por um RNA (em vermelho) de ligação específica a RBP em fusão com outro RNA de interesse (preto). A interação feita por X e Y reconstitui a um fator transcricional e ativa o gene repórter.

(5000 para $2x10^6$ transformantes) a maioria deles representando BD-Y que ativa transcrição por si próprio. Estes "self-activators" podem ser eliminados selecionando-se a perda do plasmídio que contém a "isca" AD-X usando CYH2 (cicloeximida) (Durfee *et al.*, 1993) e subseqüentemente testando a habilidade da proteína híbrida DB-Y de ativar a expressão do gene repórter. Dentre os 5000 clones positivos, 46 expressavam BD-Y dependente de AD-X sendo que alguns deles mostraram-se funcionalmente relevantes (Du *et al.*, 1996).

Outra limitação do sistema é que ambas as fusões DB-X e AD-Y devem ser transportadas, apropriadamente empacotadas, para o núcleo (Vidal & Legrain, 1999). Por isto, a maioria dos vetores utilizados no duplo-híbrido codifica AD e BD com um sinal de localização nuclear para levar as proteínas fundidas ao núcleo. No entanto, muitas vezes não é possível reproduzir interações envolvendo proteínas extracelulares: muitas delas são glicosiladas e/ou contêm pontes dissulfeto, modificações geralmente não compatíveis com o sistema para o núcleo. Portanto, o ensaio pode ser limitante usando análises de receptores-ligantes que ocorrem fora da célula (Fields & Sternglanz, 1994). Além disto, interações que são mediadas por modificações pós-traducionais, como fosforilação, podem não funcionar. Por exemplo: proteínas com domínios SH2 necessitam de fosfotirosina na proteína a qual se ligam, e esta fosforilação não deve ocorrer em levedura. Uma alternativa para este problema é a expressão, em levedura, de proteínas eucarióticas que exercem a função de fosforilação quando expressas em levedura. Como exemplo cita-se a expressão em levedura do domínio intracelular de um fator de crescimento derivado de plaqueta. Este fragmento foi capaz de fosforilar as tirosinas de SHPTP2, uma tirosina fosfatase contendo SH2, permitindo a detecção da interação entre SHPTP2 fosforilado e a proteína sinalizadora (Keegan & Cooper, 1996).

Sistemas de duplo-híbrido baseado em transcrição geralmente não podem ser usados quando uma das proteínas ("isca" ou "presa") interage com componentes da maquinaria de transcrição basal de levedura. Um sistema de duplo-híbrido não transcricional foi desenvolvido para contornar este problema (Aronheim *et al.*, 1997). Este sistema é uma variação do sistema de duplo-híbrido onde toda a expressão ocorre no citoplasma da levedura.

A presença de falso-positivos é comum em sistemas de duplo-híbrido e, ao longo de dez anos, desde as primeiras utilizações deste sistema, muitos ensaios foram desenvolvidos para se tentar identificar, da melhor forma possível, aquela falsa interação que não é interessante.

1.4.6 Métodos para identificação de falso-positivos

A procura por proteínas que interajam com outra de interesse muitas vezes pode resultar na seleção de clones falso-positivos. Existem vários tipos de falso-positivos Alguns deles são definidos como células cujos repórteres estão ativos apesar de não haver interação entre o "peixe" e a "isca" na natureza; muitas vezes não ocorrendo interação nem mesmo na levedura. Por ex., quando a isca tem atividade transcricional baixa, a ponto do fenótipo não ser detectado (Golemis & Brent, 1992), a simples entrada de membros da biblioteca pode aumentar a atividade transcricional desta isca proporcionando a maior expressão do repórter e visualização do fenótipo.

Outros falso-positivos podem surgir com a interação da proteína híbrida AD-Y com seqüências de DNA a montante do gene repórter ou proteínas que interajam com sequências promotoras. No entanto, estas duas últimas classes podem ser eliminadas utilizando-se múltiplos genes repórteres cujas seqüências regulatórias são derivadas de promotores diferentes (Gyuris *et al.*, 1993; Barte *et al.*, 1993; Vidal *et al.*, 1996).

Apesar da interação real existir no sistema de duplo-híbrido, a proteína triada pode ser um falso-positivo no contexto biológico. Existe uma série de proteínas que são conhecidas por interagirem com iscas não relacionadas. Serebniskii e Golemis construíram uma lista contendo muitas dessas proteínas (http://www.fcc.edu/research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html). Essas proteínas deveriam ser descartadas, a não ser que o pesquisador acredite que realmente esteja lidando com um clone de relevância para seu estudo. Além disto, o conhecimento de que duas proteínas específicas nunca são expressas no mesmo momento na célula pode descartar a possibilidade de que a interação observada em levedura ocorra naturalmente (Colas & Brent, 1998).

1.4.7 Genes repórteres

O gene repórter é uma peça importante no sistema de duplo-híbrido, pois é através dele que se verifica a interação das proteínas. Portanto, quanto maior o número de genes disponíveis para o sistema, mais fácil se torna o ensaio. A variedade dos genes facilita a escolha daquele que deve ser ideal para o experimento que se quer realizar.

1.4.7.1 Sensibilidade do sistema proporcionada pelos genes repórteres

A sensibilidade do sistema de duplo-híbrido é um fator relevante para o sucesso do experimento. Em geral, o sistema é bastante sensível, mas a sensibilidade pode variar consideravelmente com o tipo de gene repórter que se utiliza ou com o promotor mínimo utilizado. A sensibilidade de um gene repórter é correlacionada com a sensibilidade dos métodos de detecção de sua expressão. Um gene muito sensível é interessante para se detectar interações de proteínas que formam complexos e para detecção de interações transientes. Por outro lado, um gene repórter pouco sensível detecta somente interações fortes e consegue eliminar uma quantidade grande de falso-positivos. Portanto, quanto maior o número de genes repórteres com características diferentes para o sistema, maior o número de interações que poderão ser estudadas.

1.4.7.2 Genes repórteres utilizados no sistema de duplo-híbrido

Em teoria, qualquer gene repórter que funcione em levedura pode ser utilizado para monitorar a ativação transcricional. O gene *lac* Z de *E. coli* é um dos mais utilizados. A atividade enzimática de células de uma colônia individual pode ser medida por métodos padronizados (Ausubel *et al.*, 1987). A atividade das células de uma colônia pode ser visualizada em filtros de nitrocelulose embebidos em X-Gal (Breedon & Nasmyth, 1985). Este método é o preferido para se fazer triagens, pois a cor azul de uma colônia individual torna-a facilmente distinguível dentre tantas outras brancas.

Marcadores prototróficos são também bastante utilizados. Estes repórteres oferecem a vantagem de permitir a seleção de células de uma colônias com atividade

transcricional. HIS3 é um exemplo bastante utilizado. A expressão basal do repórter HIS3 usando um ^{GAL}UAS é muitas vezes suficiente para a prototrofia da célula, portanto, esse crescimento pode ser diminuído na presença de 3-aminotriazol, um inibidor da enzima que é codificada por *HIS3* (Durfee *et al.*, 1993). Assim, a expressão de *HIS3* tem que ser alta o suficiente para contornar a presença do inibidor e tornar a célula capaz de crescer em meio mínimo em histidina.

Para o sistema de duplo-híbrido reverso, marcadores tóxicos devem ser utilizados. Dentre eles, o marcador *URA3* é o mais utilizado por permitir a seleção reversa e direta, em placas contendo ácido 5-fluorótico (5-FOA) ou em meio sem uracil, respectivamente (Brachmann *et al.*, 1996).

Um sistema alternativo utiliza o marcador *CYH2* como repórter reverso e neste caso, interações selvagens conferem um fenótipo de sensibilidade a cicloeximida presente nas placas de seleção (Leanna & Hannink, 1996).

1.4.7.3 Genes repórteres alternativos

Neste trabalho construímos genes repórteres alternativos para o sistema de duplo-híbrido. Um deles, o gene da glicoamilase de *Aspergillus awamori* (figura 6), já foi anteriormente utilizado como repórter para clonagem de promotores fortes (Scorpione *et al.*,1993). Sua expressão provoca a formação de halos de degradação de amido em placas quando expostas a vapores de iodo. A utilização da glicoamilase como repórter oferece, além da vantagem do custo de detecção, economia de tempo na visualização do resultado, uma vez que a detecção de colônias de levedura produtoras de β-galactosidase envolve o crescimento das células sobre filtros de nitrocelulose ou nylon, a permeabilização celular por congelamento em nitrogênio líquido e só então a incubação nas condições apropriadas para o desenvolvimento da cor azul pela degradação de X-gal pela β-galactosidase. A degradação de amido no meio de cultura, em contrapartida, pode ser visualizada imediatamente após o crescimento das colônias pela exposição aos vapores de iodo.

Outro gene construído como repórter alternativo é o da EGFP ("Enhanced Green Fluorescent Protein") de *Aequoria victoria.* (figura 7) (Walmsley *et al.*, 1997). A detecção da ativação

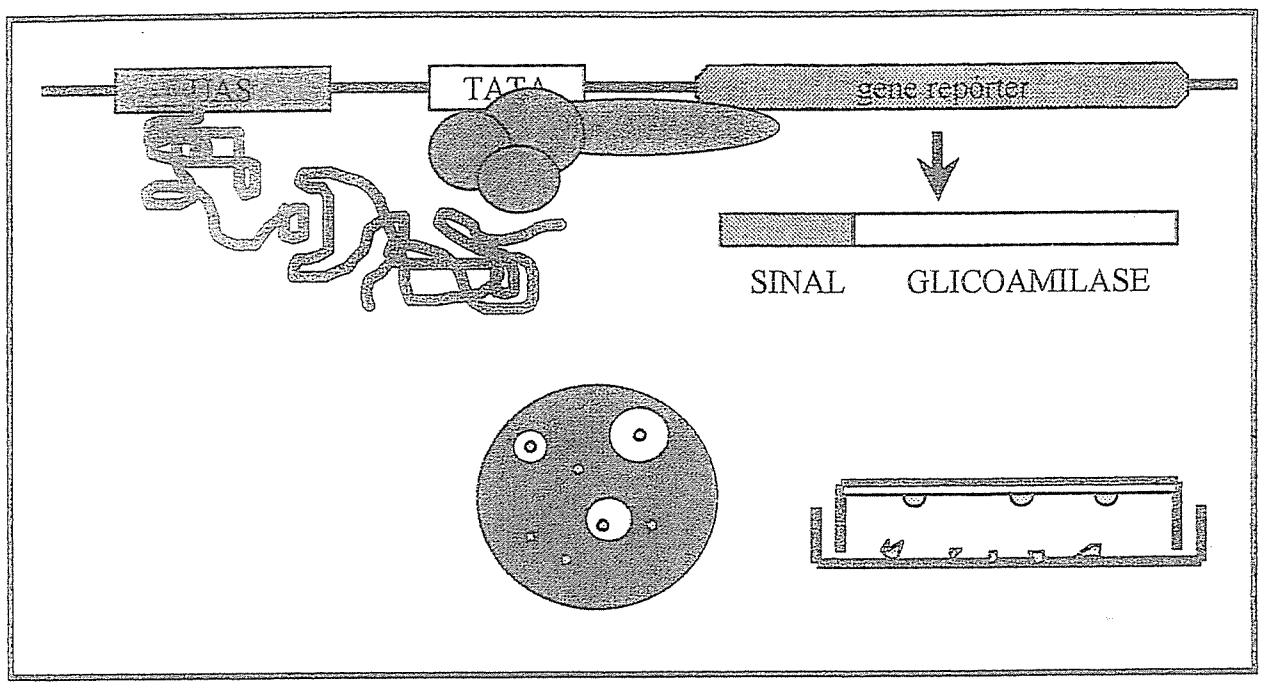


Figura 6: Gene da glicoamilase como repórter no sistema de duplo-híbrido. Quando ocorre a interação da proteína híbrida 1 (em vermelho) com a proteína híbrida 2 (em azul) haverá transcrição do gene repórter que, neste caso, produz uma proteína secretada que degrada o amido presente na placa de seleção. Quando esta placa é revelada com vapores de iodo, o amido do meio se torna roxo, formando um halo ao redor da levedura por não haver amido nesta região.

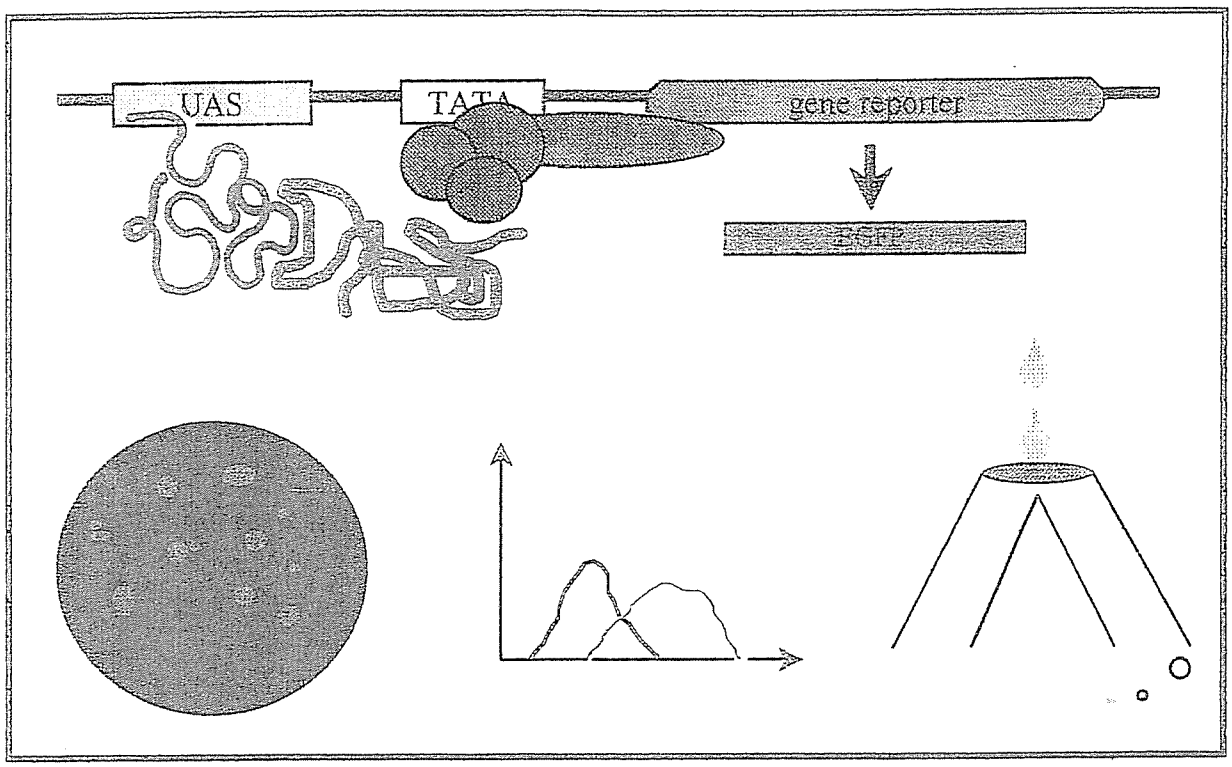


Figura 7: Gene EGFP como repórter no sistema de duplo-híbrido. Quando ocorre a interação da proteína híbrida 1 (em vermelho) com a proteína híbrida 2 (em azul) haverá transcrição do gene repórter que, neste caso, produz uma proteína que tem a capacidade de fluorescer *in vivo*. Assim, pode se detectar a ativação de transcrição pelos níveis de fluorescência observada nas leveduras, através de microscopia de fluorescência ou em um aparelho de citometria de fluxo. Além disto, as células mais fluorescentes podem ser facilmente separadas em *cell sorter*.

deste gene é feita através da emissão de fluorescência das leveduras, após excitação com luz U.V., sendo facilmente visualizada por microscopia de fluorescência. Além disso, pode-se analisar a intensidade de fluorescência de células individuais num FACScan e estas células podem ser separadas em CELL SORTER em uma velocidade de 1000 células por segundo. Essas propriedades permitem a triagem e análise de células em que o gene repórter encontra-se ativado sem haver necessidade de semeadura em placa. Portanto, este ensaio pode se tornar mais rápido, o que é bastante interessante quando se estuda proteínas de uma biblioteca com, por exemplo, 10^6 clones.

O terceiro gene construído como repórter será utilizado no sistema de duplo-híbrido reverso de levedura (figura 8). O gene CAN1 (que codifica para arginina permease) de *Saccharomyces cerevisiae* (Broach *et al.*, 1979) foi o escolhido para este sistema, pois seu produto mata a levedura quando existe L-canavanina (L-can) presente no meio de cultura. Desta maneira só haverá crescimento celular quando não ocorrer a ativação do gene, ou seja, quando não houver interação proteína-proteína ou proteína-DNA.

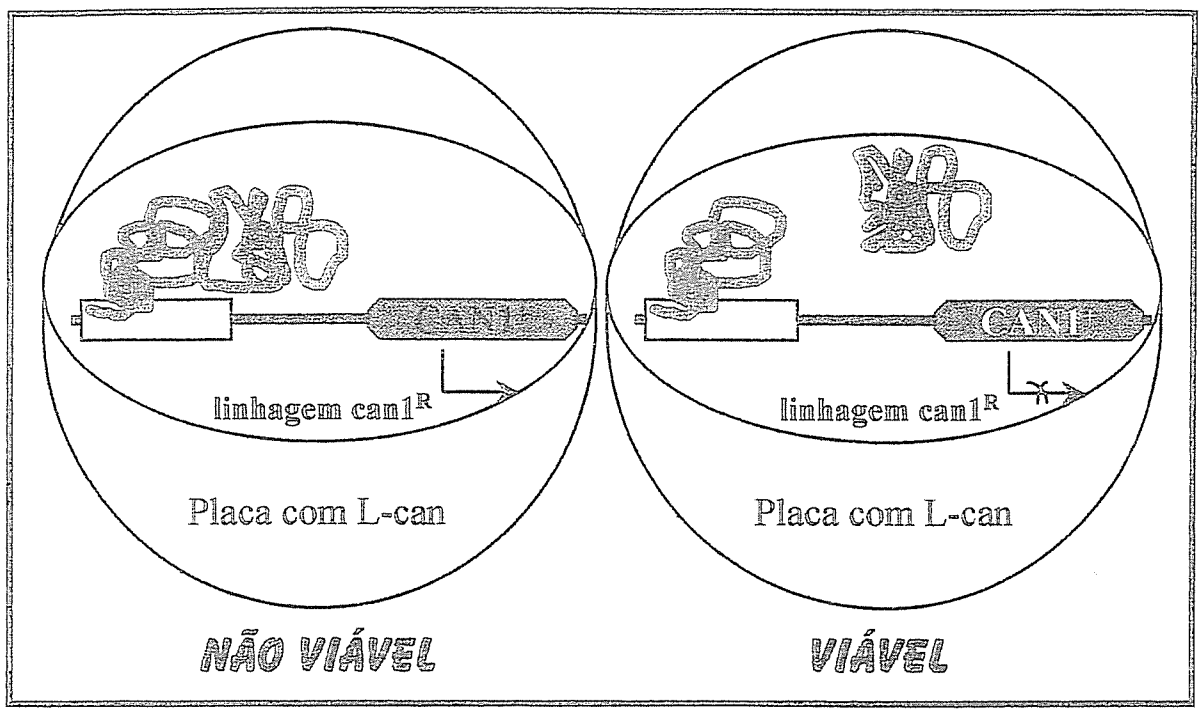


Figura 8: Gene CAN1$^+$ como repórter no sistema de duplo-híbrido. Quando ocorre a interação da proteína híbrida 1 (em azul) com a proteína híbrida 2 (em verde) haverá transcrição do gene repórter que, neste caso, produz uma proteína (arginina permease) que propicia a entrada da L-canavanina presente na placa para o interior da célula. A incorporação do análogo de arginina é tóxica, tornando a levedura inviável. Portanto, crescerão na placa somente as leveduras que não ativaram a transcrição do gene, ou por haver uma mutação que impeça a interação dos híbridos, ou por participação de uma terceira proteína que reprime esta interação.

2. JUSTIFICATIVA

A verificação de interação entre proteínas pode elucidar mecanismos básicos de fisiologia celular e controle de expressão gênica. Além desses aspectos de conhecimento acadêmico, a interação entre proteínas tem sido amplamente usada na triagem de ligantes de interesse, aplicados na indústria farmacêutica e de diagnósticos, como anticorpos e inibidores. Até o momento, o sistema mais utilizado para esses propósitos aplicados tem sido a expressão das moléculas de interesse em fagos e verificação de sua interação com proteínas purificadas, portanto, apresentando as limitações inerentes aos sistemas *in vitro*. A utilização de genes repórteres cuja detecção de expressão seja mais rápida e menos dispendiosa para o sistema de duplo-híbrido, poderá incentivar seu uso nesses casos. Além disso, a disponibilidade de genes repórteres com características diferentes nos permite estudar uma maior variedade de interações de acordo com suas características (ex. interações fortes, repórter menos sensível; interações fracas, repórter mais sensível). Outro aspecto importante, no que diz respeito a genes utilizados no sistema reverso de duplo-híbrido, é a facilidade com que se pode selecionar mutantes que dissociam uma interação protéica e, portanto, delimitam domínios essenciais para a interação entre as proteínas. Vale ressaltar que o sistema de duplo-híbrido avalia a interação das proteínas em ambiente intra celular, avaliando portanto interações com as proteínas de conformação nativa.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Toda a manipulação de DNA, de bactérias e de leveduras feita neste trabalho será detalhada a seguir, bem como o material utilizado para a sua realização.

3.1. Microrganismos

Microrganismos procariotos (bactérias) e eucariotos (leveduras) foram utilizados para se fazer amplificações, expressões e análises de relevância para este estudo.

3.1.1 Bactérias

As bactérias foram utilizadas neste trabalho como ferramenta biomolecular de amplificação dos diversos plasmídios, recombinantes ou não. As linhagens de bactérias utilizadas serão descritas a seguir.

Linhagens bacterianas

Neste trabalho foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* da linhagem MC1061 e da linhagem XL1-Blue. Essas linhagens de bactérias possuem as seguintes especificações genotípicas:

MC1061:

F- araΔ139 D(ara-leu)7696 galE15 galK16 Δ(*lac*)X74 rpsL (Str^r), hsdR2 ($r_k^- m_k^+$) mcrA mcrB1.

XL1-Blue:

F'::Tn10 $proA^+$ B^+ $lacI^q$ Δ (*lac*Z)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_k^- m_k^+) supE44 relA1.

A cepa MC1061 foi escolhida por apresentar maior eficiência de transformação por eletroporação. A linhagem XL1Blue foi algumas vezes utilizada para se fazer análise de alfa-complementação

3.1.2 Levedura

As leveduras foram utilizadas neste trabalho como hospedeiras para a análise da ativação dos genes candidatos a repórter para o sistema de duplo-híbrido. As linhagens de leveduras utilizadas serão descritas a seguir.

Linhagens de levedura

Neste trabalho utilizamos como hospedeiras as leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* das linhagens Y190, HF7c, CG-1945 comercializadas pela empresa americana *Clontech*. As linhagens YJ0Z (Leuther & Johston, 1992) e YPH252 também foram utilizadas como hospedeiras. Todas estas linhagens mencionadas possuem o seguinte genótipo:

HF7c:

MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, LYS2 :: GAL1-HIS3, URA3 :: $(GAL4\ 17\text{-}mer)_3$-CYC1-*lacZ*

Y190:

MATa ura3-52 his3-200 lys2-801 ade2-101 trp1-901 leu2-3 112 gal4Δ gal80Δ, cyh^r2 LYS2 :: ^{GAL1}UAS-$HIS3_{TATA}$-HIS3, URA3 :: $GAL1_{UAS}$-$GAL1_{TATA}$-*lacZ*

YJ0Z:

MATa gal4Δ gal 80Δ ura3-52 leu2-3 112 ade-1 his3 MEL-1 GAL1-LacZ

CG-1945:

MATa ura3-52 his3-200 lys2-801 ade2-101 trp1-901 leu2-3 112 gal4-542 gal80-538 cyh^r2 LYS2:: ^{GAL1}UAS-$^{GAL1}TATA$-HIS3 URA3::GAL4 17MERS(X3)-$^{CYC1}TATA$-^{lacZ}

YPH 252

MATα ura3-52 $lys2\text{-}801^{amber}$ $ade2\text{-}101^{ocre}$ trp1-Δ1 lys3-Δ200,leu2-Δ1

3.2 Meios de cultura

Todos os meios de cultura descritos foram esterilizados em autoclave a uma pressão de 120 Kgf/cm^2 por 15 minutos.

3.2.1 Meios de cultura para bactéria

2xYT:
Bactopeptona 1%
Extrato de levedura 0.5%
NaCl 1%
PH = 7,4

LB:
Triptona 1%
Extrato de levedura 0.5%
NaCl 1%

Para meio LB sólido deve-se acrescentar ágar a 1.5%

SOB:
Bactotriptona 2%
Extrato de levedura 0.5%
NaCl 10mM
KCl 2,5 mM
$MgCl_2$ 10mM
$MgSO_4$ 10mM

SOC: Adicionar 1ml de solução de glicose 2M (esterilizada por filtração) a 100ml de SOB.

A estocagem das bactérias foi feita em baixas temperaturas (-90°C), mantendo os estoques viáveis por longos períodos. Para tanto, é necessário adicionar 400µl de glicerol esterilizado a 1ml de cultura líquida da bactéria que se deseja estocar e mantê-la a –20°C por 24 horas, antes de transferir para o local de estocagem definitiva a –90°C.

3.2.2 Meios de cultura para levedura

YPD:
Extrato de levedura 1%
Peptona (para levedura) 2%
Dextrose 2%

SD:
YNB w/o aminoacids and ammonium persulfate 0.17% (*Difco*)
Dextrose 2%
Sulfato de amônio 0.5%

Para se fazer SD e YPD sólidos deve-se acrescentar ágar a 2%

Para os experimentos utilizando o gene da glicoamilase como repórter, foi adicionado 0,1% (p/v), 0,5% (p/v) ou 2% (p/v) de amido (*Sigma* ou *Difco*).

Para os experimentos utilizando o gene $CAN1^+$ como repórter, concentrações variadas de L-canavanina (Sigma) foram adicionadas ao meio SD sólido.

Os meios foram esterilizados da mesma maneira descrita para os meios de cultura de bactérias.

As leveduras utilizadas foram mantidas em meio de cultura sólido (YPD para as "vazias" e SD seletivo para as que continham plasmídios) a 4°C e repicadas periodicamente. Estoques a –90°C utilizando glicerol (já descrito para as bactérias) também foram realizados.

3.3 Soluções de antibióticos, aminoácidos e bases nitrogenada:

Antibióticos:

Ampicilina: utiliza-se 100µg/ml de ampicilina a partir de um estoque de 100mg/ml.

Canamicina: utiliza-se 100µg/ml de canamicina a partir de um estoque de 7mg/ml.

Aminoácidos e bases nitrogenadas (Sigma):

Adenina: utiliza-se 250µl de adenina (estoque:2mg/ml) para 25ml de meio de cultura

L-histidina: utiliza-se 250µl de histidina (estoque:2mg/ml) para 25ml de meio de cultura

L-canavanina: quantidades variadas de L-canavanina (estoque:5mg/ml) foram utilizadas nos vários experimentos realizados

L-leucina: utiliza-se 250µl de leucina (estoque:3mg/ml) para 25ml de meio de cultura

L-lisina: utiliza-se 250µl de lisina (estoque:3mg/ml) para 25ml de meio de cultura

L-triptofano: utiliza-se 250µl de triptofano (estoque:2mg/ml) para 25ml de meio de cultura

Uracil: utiliza-se 250µl de uracil (estoque:2mg/ml) para 25ml de meio de cultura

3.4 Métodos

3.4.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) utiliza um DNA molde para a sua amplificação. Quando este DNA está purificado, 1ng do mesmo é acrescido à reação; quando não está purificado ou seja, quando o plasmídio não foi isolado de uma bactéria hospedeira, uma PCR *de colônia* é realizada.

3.4.1.1 PCR utilizando DNA purificado

Reações de PCR foram conduzidas, utilizando os iniciadores e programas descritos abaixo, em reações de 100 µl (para amplificação e purificação de fragmentos) contendo tampão de PCR 1X, 200 µM de cada nucleotídeo trifosfatado, 0,01 U/µl de polimerase *Taq*, 0,25 a 1 µM de cada iniciador e o molde do DNA a ser amplificado (geralmente 1ng). O DNA foi amplificado em aparelhos termocicladores e o resultado das amplificações foi analisado em géis de agarose contendo brometo de etídio.

Tampão de *PCR*
NaCl 40 mM
$MgCl_2$ 1,5 mM
0,1% Triton X-100
Tris-Cl 10 mM pH = 8,4

3.4.1.2 PCR *de colônia*

Colônias de bactérias foram retiradas diretamente da placa com ponteiras de micropipeta esterilizadas. As ponteiras contendo as bactérias foram então limpas oito vezes sobre meio LB sólido contendo ampicilina e utilizadas como molde para a PCR através de quatro refluxos com micropipeta em 10 µl da solução para a reação (como descrita no item 3.4.1.1). A placa é incubada a 37°C para estoque das bactérias.O produto de PCR é separado em gel de agarose 0.8% contendo brometo de etídio. A presença de uma banda do tamanho esperado indica que o DNA foi amplificado e que a colônia correspondente contém o plasmídio ligado ao inserto desejado.

3.4.1.3 Iniciadores (*primers*) utilizados nas *PCR*

Iniciadores para **amplificação do CYC-1** :
5'*Sac* I *Xho* I CYC-1 *promoter*
5'GAC TCC GAG CTC GCA CTC GAG ATC GAC TAT ATA TAT GTC TG 3'

3'*Spe* I CYC-1 *promoter*
5'CGC GGC ACT AGT ATT AAT TTA GTG TGT GT 3'

Iniciadores para **amplificação da região 3'do gene Glico** :
5'*Spe* I Glico
5'ATG TCG TTC CGA TCT CTA CTC GCC C 3'

3'*Pst* I Glico

5'CGG TCC AGA AGG ACT GCA GGT AGC 3'

Sequência do GAL_{UAS}

5'*Sac* I (*upper strand*- 60 nucleotídeos)

5'CGG AGT ACT GTC CTC CGC TCG AGC GGA GTA CTG TCC TCC GAA CGG AGT ACT GTC CTC CGG

3'*Bam* HI (*lower strand*- 68 nucleotídeos)

5'GAT CCC GGA GGA CAG TAC TCC GTT CGG AGG ACA GTA CTC CGC TCG AGC GGA GGA CAG TAC TCC GAG CT

A sequência 3'*Bam* HI de GAL_{UAS} foi utilizada como iniciador na amplificação descrita na figura 5 (Resultados).

3.4.1.4 Programas utilizados nas *PCR*

Programa utilizado para amplificar CYC-1:

I- 1 ciclo de 5 min. a 94°C
II- 1 ciclo de 1 min. a 94°C
III- 1 ciclo de 1 min. a 55°C
IV- 1 ciclo de 2 min. a 72°C
V- 25 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 55°C e 2 min. a 72°C
VI- 1 ciclo de 10 min. a 72°C
VII- 1 ciclo de 15 min. a 04°C

Programa utilizado para amplificar região 5'do gene Glico:

I- 1 ciclo de 4 min. a 94°C
II- 1 ciclo de 1 min. a 94°C
III- 1 ciclo de 1 min. a 58°C
IV- 1 ciclo de 2,5 min a 72°C
V- 25 ciclos de 1 min. a 94°C, 1min. a 58°C e 2,5 min. a 72°C
VI- 1 ciclo de 19 min. a 72°C
VII- 1 ciclo de 15 min. a 04°C

Programa utilizado para amplificar GAL_{UAS}, CYC-1 e parte do gene Glico

I- 1 ciclo de 5 min. a 94°C
II- 1 ciclo de 1 min. a 94°C
III- 1 ciclo de 1 min. a 50°C
IV- 1 ciclo de 2 min. a 72°C

V- 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 5o°C e 2 min. a 72°C
VI- 1 ciclo de 10 min. a 72°C
VII- 1 ciclo de 15 min. a 04°C

3.4.2 Seqüenciamento de DNA

A seguir descreve-se como foram realizadas as reações de sequenciamento bem como os iniciadores e programas utilizados.

3.4.2.1 Reação de seqüenciamento

O seqüenciamento do DNA foi realizado segundo a técnica de terminação com didesoxi-ribonucleotídeos (descrita por Sanger *et. al.*, 1977). Para a reação foi utilizado um Kit comercial (*Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing*) da empresa ***Amersham - Life Science***, cujas instruções descritas no manual foram seguidas. O seqüenciamento foi feito automaticamente utilizando o sistema de seqüenciamento automático de DNA ***Automated Laser Fluorescent (A.L.F.)*** comercializado pela empresa ***Pharmacia Biotech***.

Para as reações são utiizados 500 ng de DNA plasmidial em um volume de 5µl. Nos tubos apropriados adicionam-se: o DNA, 1 pmol de iniciador, 2 µl de uma mistura de reação que inclui didesoxi-ribonucleotídeos (estes, ao serem incorporados, bloqueiam o elongamento da cadeia porque não apresentam a hidroxila 3' terminal necessária para formar a ligação fosfodiéster seguinte). Adiciona-se uma gota de óleo mineral e os tubos são colocados em uma máquina de PCR seguindo-se o programa ALF40 (a seguir). Ao terminar adiciona-se 4 µl de *Stop Solution* e segue-se a eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante usando-se o sequenciador automático *A.L.F.*

3.4.2.2 Iniciadores (*primers*) utilizados nos sequenciamentos

Iniciador **M13** ***Reverse*** (*Pharmacia Biotech*)
5'CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

Iniciador **M13 Universal** ***Foward*** (*Pharmacia Biotech*)
5'CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'

3.4.2.3 Programas para o sequenciamento

Programa ALF40
I- 95°C por 2 min.
II- 37°C por 1.30 min.
III- 72°C por 1.24 min

IV- 95°C por 0.36 min.
V- Repetir passos 2, 3 e 4 por 34 vezes
VI- 72°C por 10 min.
VII- 04°C por 15 min.

3.4.3 Eletroforese de DNA

Na grande maioria das eletroforeses de DNA realizadas neste trabalho utilizou-se géis de agarose como malha para separação. Quando o fragmento a ser analisado apresentava um tamanho muito pequeno (<300pb) utilizou-se géis de poliacrilamida.

3.4.3.1 Eletroforese de DNA em gel de agarose

A agarose (0,8 - 1 % p/v) é fundida em TAE 1X em forno de microondas na potência máxima por 1-2 minutos. Após a completa dissolução da agarose no tampão é acrescentada solução brometo de etídio para uma concentração final de 0,5 µg/ml. O gel é polimerizado em cuba de eletroforese à temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. Para corrida de DNA aplica-se uma voltagem de 1 a 5 V/cm.

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

3.4.3.2 Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida

Para se fazer um gel 8% num volume final de 40ml usa-se:

10,6ml de 30% acrilamida/bis (29:1)- estoque
8,0ml de TBE 5x (54g de Tris, 27,5g de Ácido bórico, 20ml de 0,5M de EDTA, p/100ml)
21,4ml de ddH_2O

Procedimento: Separa-se 10ml da solução preparada como descrito acima para vedar a superfície inferior da placa montada. A esses 10ml de solução acrescenta-se 200µl de persulfato de amônia e 15 µl de TEMED. Após a polimerização do gel de vedação, acrescenta-se 300µl de persulfato de amônia e 20µl de TEMED aos 30ml restantes da solução para polimerização do gel de corrida. Uma vez o gel polimerizado as amostras foram aplicadas e submetidas à corrida em cuba vertical com TBE 1x a 100V por aproximadamente 1.30 horas. A seguir procede-se a coloração descrita abaixo.

3.4.3.3 Coloração de gel de poliacrilamida por prata

Solução A: Fixadora (álcool/ac.acético) volume final 1000ml
100ml de etanol
5ml de ac.acético glacial

Solução B: Prata (nitrato de prata) volume final 300ml
0,3g de $AgNO_3$
100ml de solução A (fixadora)
200ml de ddH_2O

Solução C: Reveladora (formol/ NaOH) volume final 1000ml
30g de NaOH
3ml de formaldeído 37%
completar com ddH_2O para 1000ml

Usam-se 250 a 300ml de solução em cada etapa

Remove-se o gel da placa e coloca-se na solução A por 10 min. para fixar o DNA. Em seguida o gel é transportado para a solução B onde permanece por 10 min.para incorporação da prata. Usa-se água deionizada durante 1min para tirar o excesso de prata. Transfere-se o gel para a solução C incubando-o até que as bandas se tornem bem nítidas. Para cessar a revelação, o gel é transferido novamente para a solução A (fixadora).

3.4.4 Precipitação de DNA

O DNA pode ser precipitado da seguinte forma: o volume da mistura que contém o DNA é completado para 100 µl com H_2O. Acrescenta-se 25 µl de acetato de amônio 10 M, 250 µl de etanol absoluto, 1 µl de glicogênio e vortexa-se. Precipitação a -20°C por 10 minutos seguidos de uma centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. Elimina-se o sobrenadante e ressuspende-se o DNA em H_2O.

3.4.5 Purificação de DNA em gel de agarose

Para purificação de DNA a partir de bandas recortadas de géis de agarose foi utilizado o kit *Geneclean*™ (BIO 101, Inc.), de acordo com as recomendações do fabricante, como descrito a seguir:

Bandas contendo DNA são excisadas de um gel de agarose contendo brometo de etídio usando-se ondas longas de UV para visualizá-lo. O volume da agarose é calculado de acordo com o seu peso (1g = 1ml) e é então adicionado um volume de NaI igual a 3 vezes a esse peso. O gel é dissolvido a 55°C, devido à propriedade caotrópica da solução de NaI.

Glassmilk, uma matriz de sílica capaz de se associar ao DNA, é adicionada em seguida à solução (5 µl para até 5 µg) e a mistura é deixada no gelo por 15 minutos. A matriz contendo o DNA ligado é coletada por centrifugação e lavada com 0,5 ml de tampão *New Wash* por três vezes. O DNA é eluído do *glassmilk* com água a 55°C e recolhido após uma centrifugação.

3.4.6 Digestão de DNA com enzima de restrição

O DNA a ser digerido é colocado em um tubo de micro-centrífuga contendo a enzima de restrição desejada em excesso de 5 vezes (sendo que a quantidade padrão utilizada é de uma unidade de enzima para cada micrograma de DNA), o tampão próprio para ela e água. A concentração de DNA nunca excede 0,2 µg/µl e a quantidade de enzima utilizada nunca é maior que 10% do volume. A mistura é incubada a 37°C por 2 horas.

3.4.7 Ligação de fragmentos

A mistura de ligação é composta de 100 ng do vetor (digerido pelas enzimas de restrição apropriadas) misturados ao inserto a ser ligado (3 vezes a quantidade equimolar à do vetor), ambos previamente digeridos e purificados em gel de agarose por *GeneClean*. Acrescenta-se à mistura 2µl do tampão específico da ligase (Gibco, 5x) e 1µl da enzima T4 DNA ligase (*Gibco*, 5U/µl) utilizados para fazer a ligação. A ligação é realizada a 22°C por 4 a 16 horas. Após este período, mantém-se o DNA a 04°C.

3.4.8 Preenchimento das pontas com Klenow polimerase I

Adicionam-se ao tubo: inserto e vetor em quantidades equivalentes àquelas para se fazer uma ligação padrão, 0,5mM de dNTP, 2µl de tampão da Klenow (10x), 3µl da enzima Klenow polimerase I (Difco, 3,9U/µl) e água para um volume final de 20µl.

Após a mistura, mantém-se a temperatura ambiente por 5min. e em seguida a 37°C por mais 5min.. Precipita-se o DNA e faz-se a ligação do inserto no vetor como descrito anteriormente.

3.4.9 Fosforilação, anelamento e formação de dímeros de ^{GAL}UAS (figura 9)

Para a fosforilação adicionou-se 1µg de *lower strand* (1,5µl), 1µl de tampão (Gibco 5x conc.), 1µl de polinucleotídeo quinase (PNK, Gibco, 10U/µl) e água para um volume final de 5µl.

Após a mistura, deixou-se por 30 min. a 37°C e mais 10 min. a 65°C para inativar a enzima.

Acrescentou-se 1µg da fita *upper strand* (1,4µl) e ferveu-se por 5min. deixando, após este tempo, esfriar a temperatura ambiente.

Para a formação dos dímeros de ^{GAL}UAS, acrescentou-se 0,5µl de ATP, 1µl de tampão (Gibco 5x conc.), 1µl de enzima T4 ligase (Gibco) e água para um volume final de 10µl.,Para a ligação ocorrer, deixou-se durante 2 horas a 22°C.

O dímero estava preparado mas não estava pronto para ser ligado ao vetor, pois uma das pontas ainda teriam que ser fosforiladas.

Portanto, adicinou-se à mistura de ligação 1µl de polinucleotídeo quinase (PNK, Gibco, 10U/µl) e 0,25 µl de ATP. Deixou-se por 30 min. a 37°C e mais 10 min. a 65°C para inativar a enzima.

Após o tratamento com PNK, fez-se a ligação normal.

3.4.10 Desfosforilação de vetores

Após a digestão e purificação do vetor a ser ligado, acrescenta-se a este vetor, tampão da fosfatase (Gibco, 5x conc.), enzima fosfatase (Gibco, 10% do volume final) e água para um volume final de 20µl. Deixa-se a 37°C por 30 min e precipita-se ou purifica-se o DNA, como descrito nos itens 3.4.4 e 3.4.5, respectivamente.

3.4.11 Transformação de bactérias

Para a introdução de DNA nas bactérias o método utilizado neste trabalho foi o de eletroporação. Para tanto, a preparação de bactérias eletrocompetentes é necessária e é feita como descrito a seguir, conforme protocolo modificado por Marcelo Bento Soares (comunicação pessoal):

A

5´ CGGAGTACTGTCCTCCGCTCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAACGGAGTACTGTCCTCCGG 3´

3´ TCGAGCCTCATGACAGGAGGCGAGCTCGCCTCATGACAGGAGGCTTGCCTCATGACAGGAGGCCCTAG 5´

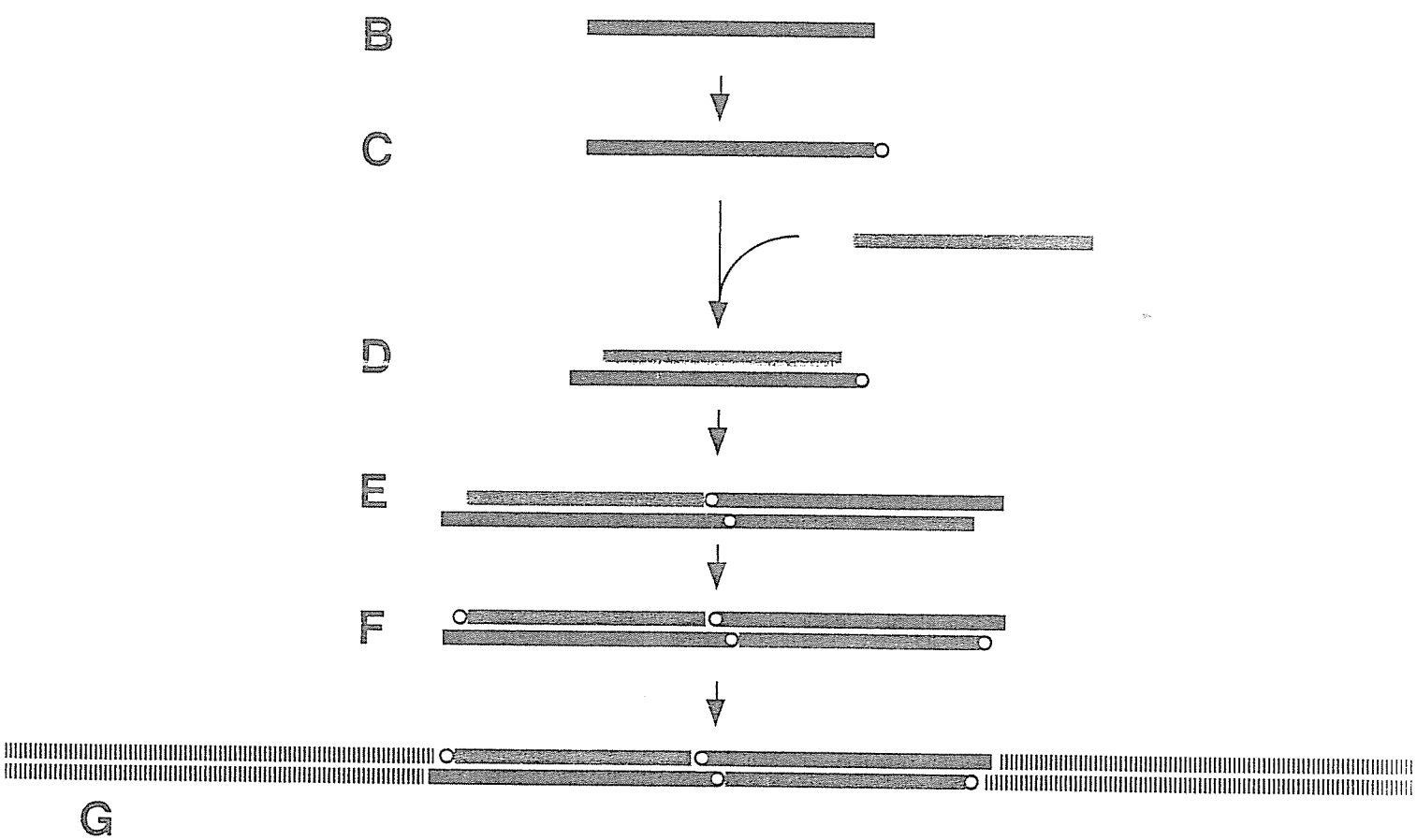


Figura 9: Inserção de dímeros de GALUAS para construção de YCpGCG1. Os oligonucleotídeos cujas seqüências estão mostradas em A foram utilizados na construção (fitas *upper* em cinza e *lower* em preto) do cassete de expressão presente em YCpGCG1. Inicialmente a fita *lower* (B) foi fosforilada (C) e anelada à fita *upper* (D). Uma ligação foi feita para a formação do dímero GALUAS (E) que foi novamente fosforilado (F) para permitir sua ligação ao vetor YCpCG desfosforilado (G).

3.4.11.1 Preparação de bactérias eletrocompetentes

Uma colônia da bactéria selecionada é inoculada em 100 ml de meio 2xYT, contendo, no caso da bactéria XL1Blue, o antibiótico desejado na concentração final de 100 mg/ml. Esse primeiro passo é chamado pré-inóculo e deve ser colocado em um agitador a 37°C para crescimento por 12 a 16 horas. Em seguida são utilizados 10 ml desse pré-inóculo para inocular 1L de 2xYT sem antibióticos. O crescimento em agitador a 37°C é acompanhado até a turbidez medida a 600nm de 0.2-0.25. Tão logo essa densidade de crescimento seja alcançada o frasco contendo a cultura deve ser resfriado no gelo. Uma vez frio, a cultura é centrifugada a 16000 G por 10 minutos a 4°C para coletar as células. O sobrenadante é descartado e o sedimento é ressuspendido em 50 ml de glicerol 10% frio (4°C) e esterilizado. A suspensão é centrifugada novamente por 15 minutos nas mesmas condições anteriores. As células são então lavadas por mais duas etapas de ressuspensão e sedimentação com 100 ml de glicerol 10% a 4°C seguido de centrifugação por 15 minutos nas condições já descritas. Uma última etapa de lavagem é feita com 50 ml de glicerol 10% a 4°C e sedimentação por 20 minutos de centrifugação nas condições já descritas. O sobrenadante é descartado e as células são ressuspendidas em 1 - 2 ml de glicerol frio (4°C). As células em suspensão são diluídas com glicerol 10 % até que uma alíquota de 25 µl diluída em 10 ml de glicerol 10 % alcance uma turbidez a 600nm de 0.15. A suspensão é então separada em alíquotas de 40 µl que são estocadas a -70°C.

3.4.11.2 Eletroporação de bactérias

Células eletrocompetentes armazenadas a -70°C são descongeladas em gelo por 15 minutos. Em seguida adiciona-se o DNA ou a mistura de ligação (1 a 5ng de plasmídios pequenos ou 1µl da mistura de ligação) e incuba-se em gelo por 5 minutos. As células são então transportadas para cubetas de eletroporação e submetidas a um choque elétrico de 2,5 KV (resistência de 200 OHMs, capacitância de 25µFD). As bactérias são incubadas em meio SOC a 37°C por 1 hora e semeadas em LB contendo o antibiótico necessário para a seleção dos transformantes.

3.4.12 Extração de DNA plasmidiano

As extrações de DNA plasmidiano foram feitas geralmente pelo método conhecido como miniprep de bactéria. Quando da necessidade de obtenção de quantidades maiores de DNA (>5µg) o método conhecido como maxiprep de bactéria foi utilizado.

3.4.12.1 Mini-preparação de plasmídio bacteriano (miniprep de bactéria)

Colônias individuais são crescidas a 37°C com agitação em 3 ml de LB contendo antibiótico por 12-16 horas, centrifugadas e ressuspendidas em 100µl de GTE. A elas são adicionados 200µl de solução de lise, no gelo. Depois de 5 min., adicionam-se 150 µl de KOAc, mistura-se por inversão (4 vezes) e centrifuga-se por 5 min.. Ao sobrenadante acrescentam-se 400 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1) e centrifuga-se por 1 min.. A fase aquosa é retirada e misturada com 2 volumes de etanol absoluto gelado (-20°C) e centrifugada por 10 min., em microcentrífuga, para a coleta do DNA. O sedimento é ressuspendido em 20 µl de solução de TE/RNAse e incubado a 37°C por 20 min. O DNA é então estocado a 4°C.

GTE:
Glicose 50 mM
EDTA 10 mM
Tris-Cl pH 8.0, 25 mM

Solução de lise p/ bactéria:
NaOH 0,2 N
SDS 1 %

KOAc:
Acetato de potássio (5M) 60ml
Ácido acético glacial 11.5ml
Água 28.5ml

TE/RNAse:
Tris-Cl (pH = 7.4) 10mM
EDTA (pH = 8) 1mM
RNAse pancreática livre de DNAse 20µg/ml

3.4.12.2 Maxi preparação de plasmídio bacteriano (*Plasmid maxi protocol-QIAGEN*)

No dia anterior a preparação inocula-se uma colônia em 50 ml de LB, contendo antibiótico, e incuba-se com agitação a 37°C por 16 horas. No dia seguinte adiciona-se todo o pré-inóculo em 450 ml de LB, contendo antibiótico e incuba-se a 37°C até atingir a turbidez medida a 600 nm em torno de 1.0-1.2 (aproximadamente 3 horas). Centrifuga-se a 6000 rpm em rotor GSA por 15 min. a 4°C. O sedimento é ressuspendido em 10 ml de tampão P1 e transferido para tubo *Sorvall* de 50 ml. Adicionam-se 10 ml de tampão P2, mistura-se e incuba-se a temperatura ambiente por

5 min. Adicionam-se então 10 ml de tampão P3, mistura-se e incuba-se no gelo por 20 min. Centrifuga-se a 12.000 rpm em rotor SS-34 por 40 min. a 4°C. O sobrenadante é removido e filtrado em frasco esterilizado com lã de vidro. Pode-se congelar o material neste ponto. Equilibra-se a coluna de purificação com 10 ml de tampão QBT. O sobrenadante filtrado é despejado na coluna. Lava-se 2x a coluna com 30 ml de tampão QC. O DNA é então eluído com 15 ml de tampão QF diretamente em um tubo Corex de 30 ml. O DNA é precipitado com 0.7 volumes de isopropanol. Centrifuga-se a 9.500 rpm em rotor HB-4 por 30 min. a 4°C e ressuspende-se o sedimento em 1 ml de água. O DNA é estocado a 4°C.

3.4.13 Hibridação *de colônia*

Várias colônias foram transferidas para a membrana Hybond N+ (*Amersham*) e lisadas como descrito nas páginas 9.37 a 9.58 , vol 2 de Sambrook *et al.* (1989).

A sonda radioativa foi feita seguindo-se as recomendações do kit Prime-it (*Stratagene*) utilizando-se como molde o fragmento codificante para p53 de murino (72-390) retirado do plasmídio pVA3 (Clontech).

A hibridação de colônia foi conduzida segundo descrito em Church, GM & Gilbert, W (1984).

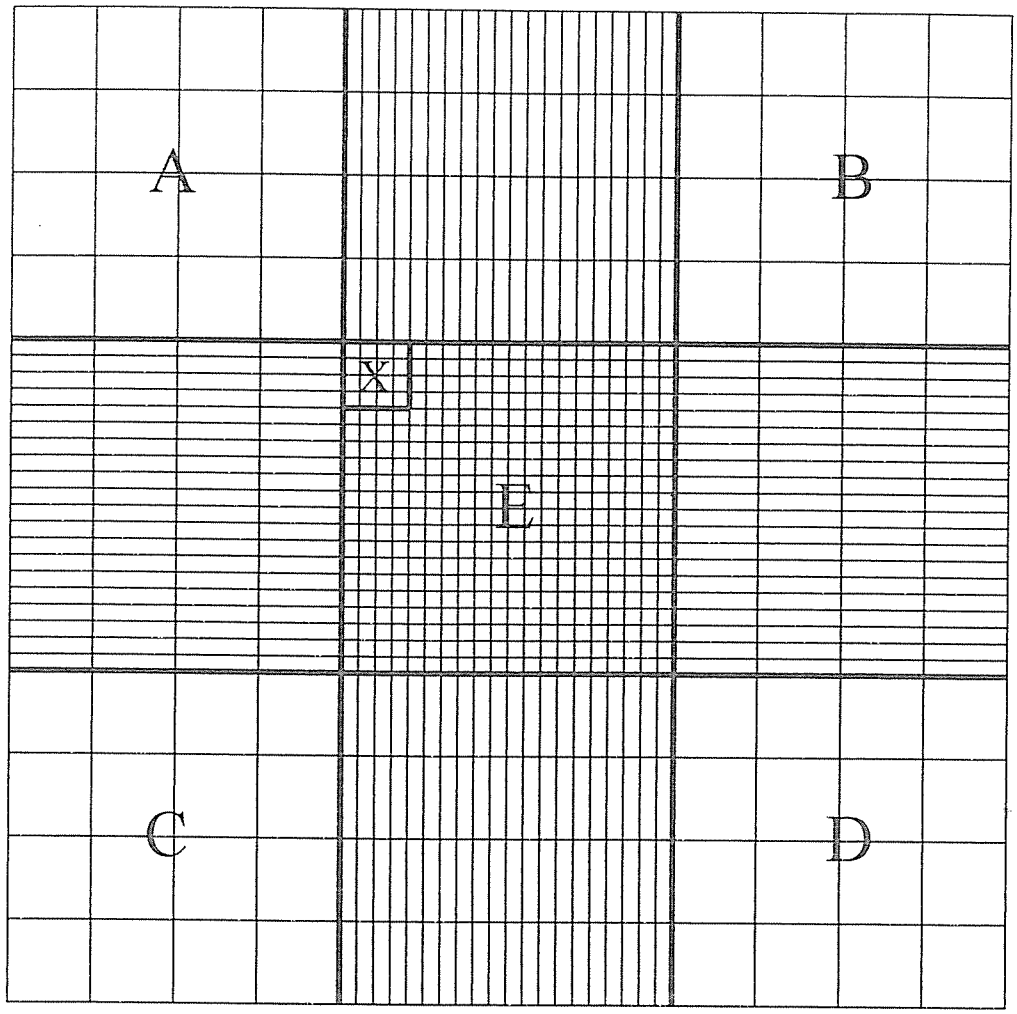
A membrana seca ao ar foi envolta em filme de PVC e exposta contra filme de raio X (Braf QA-S Kodak, EUA) na presença de intensificadores (Kodak, EUA) a –70°C por um período de 36 horas.

As autorradiografias foram reveladas utilizando-se revelador e fixador para filmes de raioX Kodak (Brasil) preparados conforme especificação do fornecedor.

3.4.14 Contagem das células em câmaras de Neubauer

Uma alíquota é retirada da cultura a ser contada e convenientemente diluída para uma concentração dez vezes menor. Em seguida esta diluição é pingada em uma câmara de Neubauer, coloca-se uma lamínula por cima do pingo e leva-se ao microscópio óptico.

Câmara de Neubauer: É formada por nove quadrados de 1mm^2 de área, portanto tem 9mm^2 de superfície. Cada um dos nove quadrados é subdividido. Os quatro quadrados chamados externos (A, B, C, D) são divididos em 16 pequenos quadrados, medindo cada um 1/16 do mm^2. O quadrado central (E) é dividido em 25 pequenos quadrados medindo cada um 1/25 do mm^2. Cada um destes, por sua vez, é dividido em outros 16 quadradinhos medindo 1/400 do mm^2 como mostrado a seguir:



Deve-se contar as leveduras presentes nestes dezesseis quadradinhos nos quatro quadrados (um deles representado por X) localizados nos cantos do quadrado E. Após a contagem do número de células em cada um dos quatro quadrados, separadamente, calcula-se a média dos quatro, multiplica-se por 25 (referente aos vinte e cinco quadrados maiores) e o valor resultante é multiplicado por 10^4 células/ml. Este é o número de células/ml na alíquota que foi diluída. Para a cultura inicial, multiplica-se este valor por dez.

3.4.15 Transformação de Levedura [Gietz, R. D. e R. H. Schiestl (1996)]

As células são obtidas através do inóculo de uma colônia em YPD e crescimento com agitação por 12-16 horas. A cultura é diluída 1:100 em YDP (repique) e crescida com agitação pelo mesmo período de tempo. As células são contadas em câmara de Neubauer e inoculadas em YPD a uma densidade de 5 x 10^6 células/ml (30°C, agitação a 150 rpm). O crescimento é acompanhado até densidade de 1,6 a $2x10^7$células/ml. O número total de células é calculado e as células são coletadas por centrifugação por 5 min. a 3000 G, ressuspendidas em 30ml de H_2O e centrifugadas. O sedimento é ressuspendido em 400µl de LiAc 0,1M. O volume equivalente a $2x10^9$

células é centrifugado em microcentrífuga e ressuspendido em 1 ml de LiAc 0,1 M. 50 µl de células competentes ($1x10^8$ células) são centrifugados, o sobrenadante é desprezado e sobre o sedimento adiciona-se nessa ordem: 240 µl de PEG 4000 50% (p/v), 36 µl de LiAc 1 M, 25 µl de ss-DNA 2 mg/ml fervido por 5 min e resfriado em banho de gelo e 50 µl de solução de DNA contendo 1 µg de cada plasmídio. O sedimento é então ressuspendido e incubado a 30°C por 30 min, sem agitação. Um choque térmico a 42°C é aplicado em seguida por 30 min. Centrifuga-se novamente por 15 seg e remove-se o sobrenadante. O sedimento é ressuspendido em 500 µl de H_2O de onde se semeiam em meio seletivo.

LiAc: Acetato de lítio dissolvido em água (0.1 ou 1 M).

PEG: Polietilenoglicol (3350) dissolvido em água (50% p/v).

ss-DNA: DNA de esperma de salmão dissolvido em água (2 mg/ml).

3.4.16 Teste de marcas

Esse é um simples teste utilizado para eliminar a possibilidade de se selecionar um contaminante dentre os transformantes de leveduras. Uma mesma colônia selecionada é semeada em placas contendo meios diferentes, cada um com carência de um nutriente específico. Nos meios onde faltam os aminoácidos para os quais a levedura testada é auxotrófica, esta não deve crescer.

3.4.17 Mini-preparação de plasmídio de levedura (miniprep de levedura)

Culturas são crescidas a 30°C em meio seletivo, centrifugadas e a elas é adicionada solução de lise. Mistura-se em agitador, adicionam-se fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e pérolas de vidro (Sigma, 425-600 microns, G-8772), mistura-se novamente e centrifuga-se. Ao sobrenadante é adicionado acetato de amônio (0,25 V de solução 10 M), 1 µl de glicogênio e dois volumes de etanol absoluto. A mistura é deixada a -20°C por 10 min e depois centrifugada por 10 min. O sedimento é lavado com etanol 80 % e ressuspendido em água. O DNA é estocado a 4°C.

Solução de lise p/ levedura:
Triton 2 %
SDS 1 %
NaCl 100 mM
Tris-Cl pH 8,0 10 mM
Na_2EDTA 1 mM

3.4.18 Ensaio para determinação da ativação do gene *Lac Z*

Ensaio de metabolização de X-Gal

Colônias de leveduras são crescidas em filtro (geralmente uma membrana de nitrocelulose com poros de 0.45μm) depositado sobre meio sólido seletivo. O filtro é mergulhado em nitrogênio líquido para quebrar as células e é em seguida colocado sobre papel de filtro embebido com X-Gal 2% em tampão Z e deixado na estufa a 37°C por 1 a 3 horas. Neste tempo, colônias de células que expressam beta-galactosidase devem apresentar a cor azul devido a metabolização de X-Gal em um composto dessa cor.

Tampão Z (*Z-buffer*):
60 mM Na_2HPO_4
40 mM NaH_2PO_4
10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$
0,025% p/v SDS
pH = 7

Quando necessária a presença de beta-mercaptoetanol, essa substância deve estar na concentração final de 50mM.

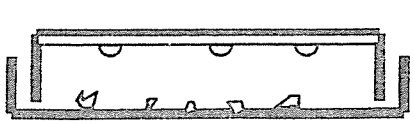
X-Gal: Dissolver o X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-S-D-galactopiranosídio) em N, N-dimetilformamida (DMF) na concentração de 20 mg/ml.

3.4.19 Teste *de pingos*

Culturas de leveduras são crescidas com agitação a 30°C em 5 ml de meio líquido seletivo até que atinjam a fase estacionária (aproximadamente 2 X 10^7 células/ml). Ao atingirem esta fase, são pingadas (pingos de 10-30μl) em placas seletivas contendo amido (experimentos com o gene Glico) ou L-can (experimentos com o gene $CAN1^+$). Após 24 horas de incubação das placas a 30°C, é possível se fazer a análise de degradação de amido ou a análise de sobrevivência.

3.4.20 Revelação de atividade amilolítica com vapores de iodo

Após o pingo das leveduras em placas contendo 0,1; 0,5 ou 2% (p/v) de amido, as placas são incubadas a 37°C por 36 horas. Retira-se a placa da estufa e coloca-se aproximadamete 0,5g de cristais de iodo na tampa da placa e fecha-se para os vapores entrarem em contato com o meio contendo amido como mostrado a seguir:



Os cristais são mantidos na tampa por aproximadamente 2 a 3 minutos. Os vapores coram de roxo o meio contendo amido e visualiza-se o halo translúcido ao redor da colônia de levedura, se esta expressar o gene da glicoamilase.

3.4.21 Teste de sobrevivência

Culturas de leveduras são crescidas com agitação a 30°C em 5ml de meio líquido seletivo por aproximadamente 36 horas. Após este período uma alíquota é retirada para a contagem das células. Estas células são semeadas em placas com concentrações variadas de L-can ou em placas sem L-can, para controle. As placas são levadas para uma estufa a 30°C por 72 horas. As colônias são contadas e é feita a análise de sobrevivência.

OBS: As colônias são contadas sempre no terceiro dia após semeadura.

3.4.22 Análise de fluorescência em citometria de fluxo

A análise de citometria de fluxo foi realizada no FACScan (Becton Dickinfon Immunocitometry Systems) do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, sob a supervisão do Prof. Keneth Gollob.

As amostras a serem analisadas são diluídas em PBS 1x a uma concentração de 10^6 células/ml. Em seguida elas são levadas ao aparelho para a análise de fluorescência.

O fluxo foi ajustado para 100.000 células por segundo durante a análise. A fluorescência foi detectada em FL2 e a luz de excitação foi produzida com comprimento de onda de 488nm.

3.4.23 Separação das células em *cell sorter*

Para a separação das células foi escolhida uma região que abrange ~35% das células mais fluorescentes no gráfico. Esta região foi selecionada baseando-se no perfil de fluorescência do controle positivo. O programa *NORMAL-R SORT MODE* do FACScan foi utilizado para este experimento. A freqüência utilizada para a passagem das células no aparelho foi de 3500-4000 células por segundo.

3.4.24 Teste de flutuação (Luria & Delbruck, 1943)

Uma colônia de levedura é diluída em 500µl de água e uma alíquota é levada ao microscópio para que se faça a contagem das células. São colocadas 100 células em cada um de dez tubos com 1 ml de meio seletivo e 1000 células em um tubo com 10 ml de meio seletivo. Após o crescimento por 38 horas em agitação a 30°C, as células

chegam a uma concentração de 10^6 células/ml. São semeadas 10 placas seletivas com 10^5 células provenientes dos 10 tubos contendo 1ml de cultura e 10 placas seletivas com 10^5 células provenientes do tubo contendo 10ml de cultura. Após 72 horas de incubação a 30°C as placas são analisadas.

4. RESULTADOS

Neste trabalho, três genes foram escolhidos como candidatos a repórteres alternativos para o sistema de duplo-híbrido em levedura. São eles: glicoamilase de *Aspergillus awamori*, EGFP ("Enhanced Green Fluorescent Protein") de *Aequoria victoria* e CAN1 de *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1 GENE DA GLICOAMILASE

O gene da glicoamilase foi o primeiro dos três genes a ser testado. Antes de se construir um sistema baseado neste gene repórter, algumas padronizações iniciais foram feitas, utilizando um vetor epissômico de expressão constitutiva.

4.1.1 Padronização dos ensaios de atividade de glicoamilase

Foram feitos experimentos iniciais para se estabelecer as melhores condições de visualização da expressão do gene da glicoamilase, para sua utilização como repórter. Para tanto, analisamos a expressão do gene sob o controle de um promotor forte e constitutivo. Utilizamos o plasmídio epissômico YEpG1 (Scorpioni *et al.*, 1993), gentilmente cedido pela Drª. Ana Clara Guerrini Schenberg - ICB, USP, no qual o gene da glicoamilase encontra-se posicionado a jusante do promotor PGK (fosfoglicoquinase de levedura). Foram analisadas diferentes linhagens de levedura, variou-se a concentração de amido no meio de cultura, estabeleceu-se o tempo ótimo de exposição a vapores de iodo e foram conduzidas simulações de seleção de duplo-híbrido.

4.1.1.1 Linhagens que apresentam melhor halo de degradação de amido

O plasmídio YEpG1 foi introduzido em quatro linhagens de levedura previamente utilizadas no sistema de duplo-híbrido: YJ0Z, HF7c, CG-1945 e Y190, seguindo o protocolo de transformação descrito em "Material e Métodos". Estas linhagens foram escolhidas para uso neste trabalho por conterem pelo menos um repórter para o sistema, o que nos permite comparar os resultados obtidos.

Dois clones resultantes de cada uma das transformações foram subcultivados em meio líquido, alíquotas de cultura estacionária (crescidas por 1 dia) foram pingadas

(ver "Material e Métodos") em placas contendo 2% p/v ou 0,5% p/v de amido adicionado ao meio e, após a revelação com vapores de iodo, foi observado que a linhagem de levedura Y190 apresentava o maior halo de degradação de amido dentre as quatro linhagens analisadas (figura 10). A utilização da concentração de amido menor que a previamente descrita (Scorpioni *et al.*,1993) permite melhor visualização de atividade amilolítica em todas as linhagens testadas (10B). É importante ressaltar que todas as linhagens testadas só apresentaram atividade amilolítica quando albergam o plasmídio YEpG1 (dados não mostrados e resultados descritos em 4.1.1.3).

4.1.1.2 Tempo de exposição das leveduras a vapores de iodo

Foi testada a capacidade de recuperação de leveduras após a exposição a vapores de iodo. Após quatro minutos de exposição, os vapores de iodo se tornam muito tóxicos para as leveduras, quase não havendo crescimento em meio líquido em 24 horas. A exposição durante dois minutos foi suficiente para que o amido do meio fosse bem corado pelos vapores de iodo (figura 10) e também ideal para uma boa recuperação das células em meio líquido (figura 11).

4.1.1.3 Simulação de triagem de duplo-híbrido

Foi feita uma simulação de triagem (*screening*) de biblioteca para se verificar a possibilidade de visualização de halo diretamente nas placas da transformação e também a possibilidade de se detectar a presença de somente um clone positivo, ou seja, que expressa a glicoamilase, dentre muitos clones negativos. Para tanto, seguiu-se o protocolo de transformação de levedura utilizando-se a levedura Y190 como hospedeira. Foi utilizada na transformação uma mistura de DNA de dois plasmídios que contêm a mesma marca de seleção. Assim, cada transformante selecionado contém ora um, ora o outro plasmídio. Na mistura foram colocados 1μg de pCL1 e 50ng de YEpG1 para que uma proporção muito maior (38:1) das leveduras recebesse o plasmídio pCL1, que não expressa a glicoamilase, enquanto uma pequena porcentagem receberia o plasmídio YEpG1 que expressa a glicoamilase constitutivamente. Foi possível detectar a ativação do gene da glicoamilase em colônias isoladas de levedura, crescidas diretamente nas placas de transformação, que apresentaram halo de degradação de amido (figura 12).

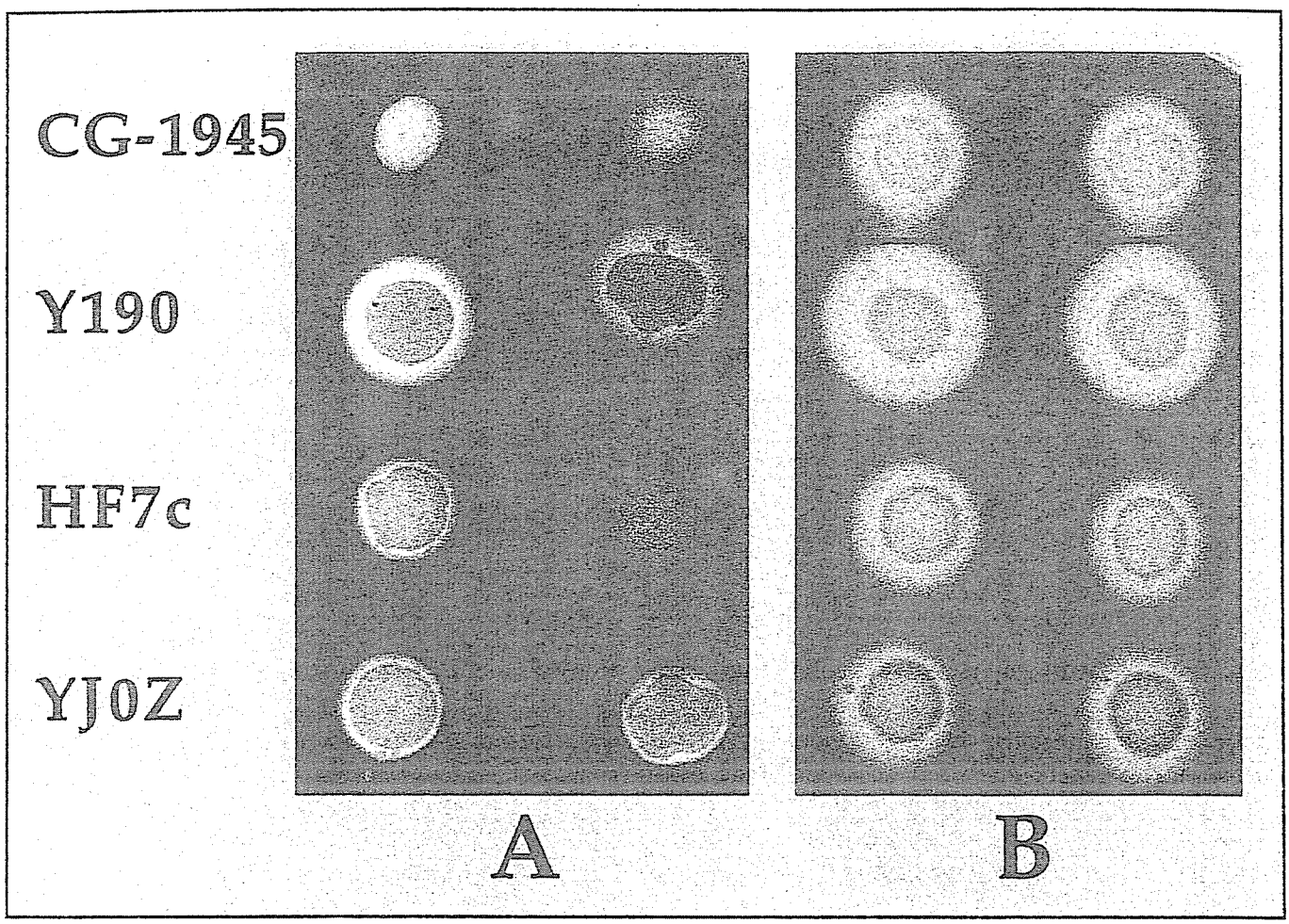


Figura 10: Testes de formação de halo de degradação de amido. Quatro linhagens de levedura utilizadas no sistema de duplo-híbrido (CG-1945, Y190, HF7c e YJ0Z) contendo o plasmídio YEpG1, que determina a expressão constitutiva do gene da glicoamilase, foram testadas quanto a formação de halo de degradação de amido após revelação com vapores de iodo por 2 minutos. Dois clones de cada linhagem foram cultivados em meio SD -LEU e alíquotas de 10µl de culturas estacionárias foram utilizadas para teste *de pingos* em placas contendo 2% p/v (A) ou 0,5% p/v (B) de amido.

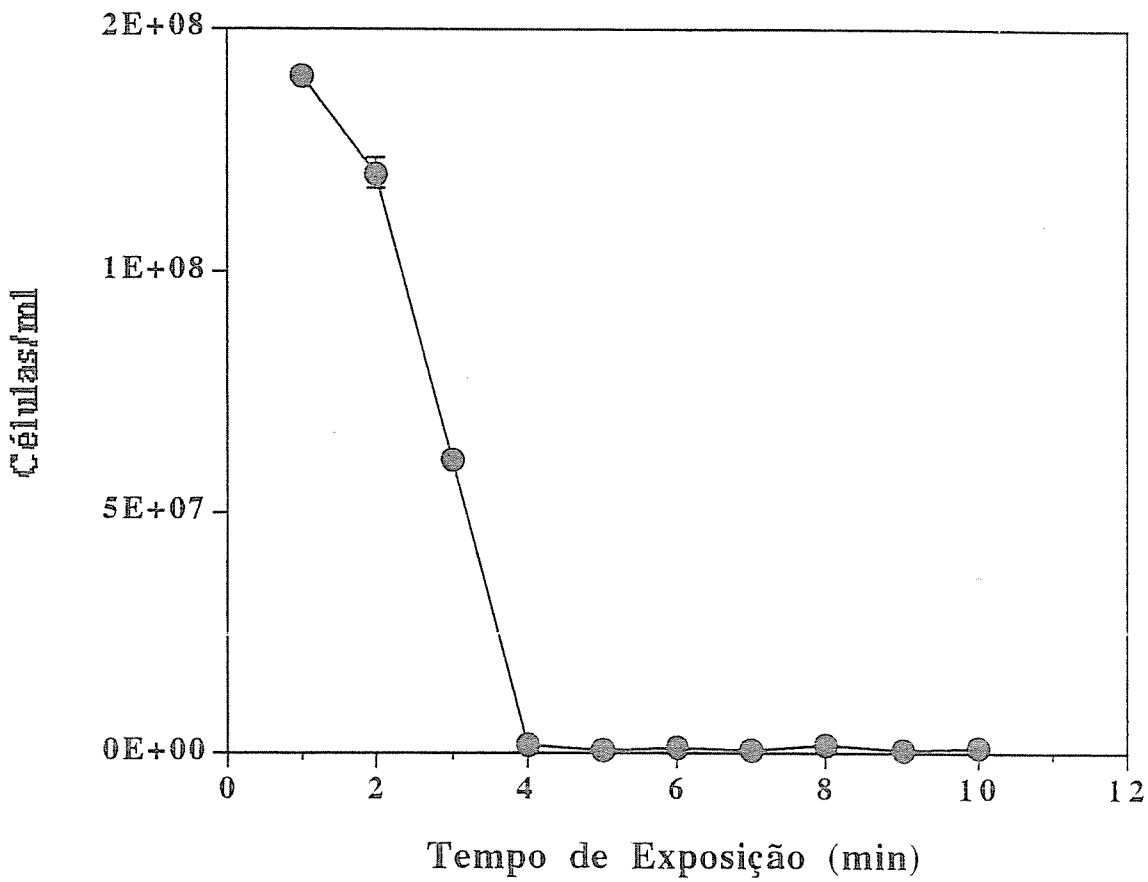


Figura 11: Determinação de tempo ideal de exposição de leveduras a vapores de iodo. Colônias de leveduras Y190 foram retiradas de placas com meio sólido acrescido de 0,5% p/v de amido nos tempos de exposição a vapores de iodo indicados, inoculadas em meio líquido e incubadas por 48h, quando a concentração de células foi determinada. Está mostrada a média entre duplicatas.

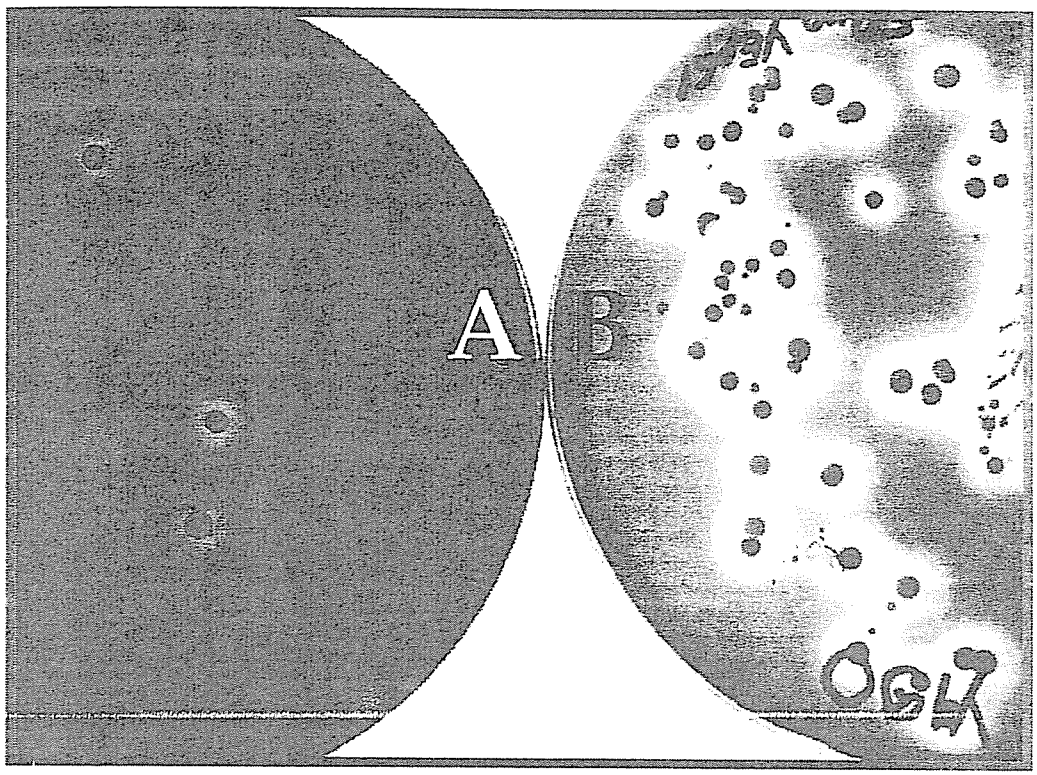


Figura 12: Simulação de seleção de duplo-híbrido. A linhagem de levedura Y190 foi transformada com uma mistura de DNA contendo 1µg do plasmídio pCL1 (para simular transformantes negativos) e 50ηg de YEpG1 (que expressa a glicoamilase). As leveduras transformadas foram semeadas em placas contendo meio SD -Leu + 0,5% p/v de amido e, após três dias de incubação a 30°C, foi realizada a revelação da placa com vapores de iodo. Foi possível visualizar o halo de degradação de amido em colônias provenientes da transformação que expressam a glicoamilase (3A). Em uma outra transformação foi utilizado 1µg de YEpG1 e 100% dos transformantes apresentaram halo de degradação de amido (3B).

O passo seguinte do trabalho seria, então, a construção de um plasmídio que permitisse o uso do gene da glicoamilase como repórter em sistemas de duplo-híbrido.

4.1.2 Utilização do gene da glicoamilase como repórter

Para utilização do gene da glicoamilase como repórter no sistema de duplo-híbrido, foi necessário realizar uma construção gênica na qual este gene foi posicionado sob o controle de um promotor indutível. Desta maneira, só haverá transcrição do gene repórter se o mesmo for induzido por um ativador transcricional ou, alternativamente, pela interação dos híbridos do sistema.

4.1.2.1 Construção do gene da glicoamilase sob o controle de um promotor indutível

Para utilização em sistemas de duplo-híbrido, o plasmídio a ser construído deve conter um promotor mínimo e uma região regulatória ativadora (*Upstream Activating* Sequence - UAS) a qual um dos híbridos se liga. O promotor mínimo do gene *CYC-1* (de *Saccharomyces cerevisiae*) e uma repetição de 3 vezes da seqüência regulatória onde a proteína Gal4 se liga (constituindo uma sequência ^{GAL}UAS sintética), foram escolhidos para a construção do novo gene repórter do sistema de duplo-híbrido.

Para esta construção, várias etapas foram realizadas (figura 13). A primeira delas foi a retirada do gene da glicoamilase do plasmídio YEpG161 (Scorpioni *et al.*,1993) e sua ligação no vetor pBluescript SK (Stratagene). O plasmídio YEpG161 foi digerido com as enzimas de restrição *Hind* III e *Bgl* II, liberando a sequência estrutural do gene da glicoamilase e o vetor pBluescript foi digerido com as enzimas *Hind* III e *Eco* RI. Após a ligação das extremidades *Hind* III de gene (glicoamilase) e vetor (pBluescript), as extremidades *Bgl* II do gene e *Eco* RI do vetor foram preenchidas através de tratamento com a enzima Klenow DNA polimerase I. Em seguida, uma ligação de extremidades cegas (*blunt*) foi realizada para se concluir a clonagem do gene e a formação do novo plasmídio pBLglico. A verificação da clonagem foi feita através da digestão com a enzima de restrição *Bam* HI, que corta pBLglico em dois sítios, liberando um fragmento de ~1,5Kb. A visualização de duas bandas, sendo uma delas de 3,3Kb e outra de 1,5Kb foi possível quando, o plasmídio pBLglico digerido com *Bam* HI foi submetido a um gel de agarose 0,8% (os dados de separação de fragmentos de DNA por eletroforese, para confirmação das várias construções realiza-

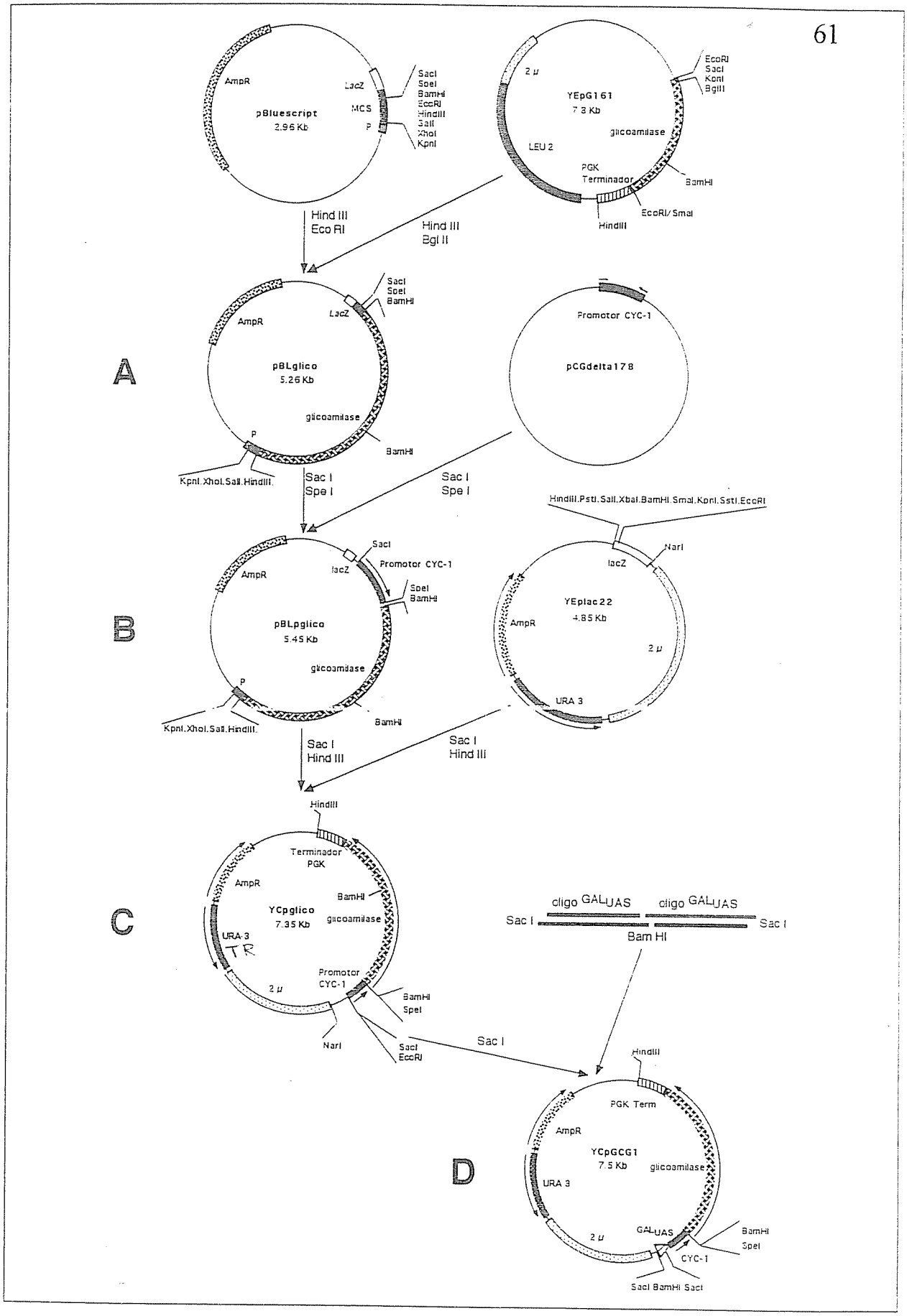


Figura 13: Esquematização da clonagem do gene da glicoamilase sob o controle de um promotor indutível (construção de YCpGCG1). Várias etapas foram realizadas para esta construção: (A) clonagem do gene da glicoamilase em pBluescript; (B) clonagem de CYC-1 a montante do gene da glicoamilase; (C) transferência da construção CYC-1 glicoamilase para o vetor de levedura YCplac22; (D) introdução da sequência regulatória ^{GAL}UAS a montante de promotor CYC-1.

das, não estão mostrados).

A segunda etapa da construção foi a clonagem do promotor mínimo CYC-1 a montante do gene da glicoamilase no plasmídio pBLglico. Para isto, foi feita uma amplificação por PCR do promotor CYC-1 presente no plasmídio pCGdelta178 (ver detalhes em "Material e Métodos"). O produto de PCR foi então digerido com as enzimas de restrição *Sac* I e *Spe* I cujos sítios estavam presentes nos iniciadores. O plasmídio pBLglico foi digerido com as mesmas enzimas, possibilitando assim uma ligação direcional do inserto. A verificação da clonagem do CYC-1 no plasmídio pBLglico, formando assim o plasmídio pBLpglico, poderia ser feita através da amplificação de CYC-1 quando uma PCR *de colônia* fosse realizado com alguns clones obtidos. No entanto, observou-se uma contaminação na solução de iniciadores (*primers*) utilizados para amplificação de CYC-1, pois o controle negativo também havia gerado amplificação. Foi feito então um PCR *de colônia* utilizando-se iniciadores universais com posterior digestão do produto de PCR com a enzima de restrição *Spe* I, para liberar o fragmento correspondente ao promotor CYC-1. O produto de PCR digerido foi submetido a um gel de poliacrilamida 8% e uma banda de ~150pb foi visualizada, confirmando-se assim a clonagem do promotor mínimo a montante do gene da glicoamilase.

A próxima etapa foi a transferência do promotor CYC-1 e do gene glicoamilase para o vetor de levedura centromérico YCplac22 (ori, Amp^R, CEN4, ARS1, TRP1, cedido pelo Dr Gietz, Universidade de Manitoba). Este vetor foi digerido com as enzimas de restrição *Sac* I e *Hind* III. O plasmídio pBLpglico também foi digerido com estas enzimas, liberando dois fragmentos de ~2,5Kb e ~3,2Kb. O fragmento de ~2,5Kb, correspondente ao promotor CYC-1 e ao gene da glicoamilase, foi purificado e ligado ao vetor YCplac22. A verificação da clonagem foi feita através da digestão do novo plasmídio YCpglico com a enzima de restrição *Bam* HI. Esta construção libera dois fragmentos sendo um de ~5,8Kb e outro de ~1,5Kb se a construção é feita corretamente. Foi possível visualizar a presença das duas bandas esperadas em alguns dos clones digeridos que foram submetidos a um gel de agarose 0,8%. Um destes clones foi escolhido para a próxima etapa de construção.

Esta etapa se concentrou na introdução da seqüência regulatória ^{GAL}UAS sintética (3 repetições da seqüência de ligação de Gal4, sendo cada uma de 17 *mer*) a montante do promotor CYC-1 no plasmídio YCpglico. Dispúnhamos de um par de oligonucleotídeos sintéticos complementares que formam uma duplex de 68pb, contendo três sítios de ligação de Gal4 e possuindo extremidades coesivas compatíveis com os sítios de restrição de *Sac* I e *Bam* HI. Foi feita a fosforilação (ver "Material e Métodos") de apenas um dos oligos (o que resulta na extremidade *Bam* HI fosforilada)

e o anelamento dos mesmos para a sua ligação. O produto desta ligação era constituído, portanto, de duas seqüências ^{GAL}UAS sintéticas invertidas, ligadas entre si pelas extremidades *Bam* HI e apresentando extremidades coesivas *Sac* I desfosforiladas. Esse produto foi então submetido a fosforilação. Por sua vez, o plasmídio YCpglico foi digerido apenas com a enzima de restrição *Sac* I e em seguida foi desfosforilado para se impedir sua recircularização. Após a ligação do inserto ao vetor, foi feita a verificação da clonagem por PCR *de colônia* utilizando-se como iniciador direto um dos oligos que constituem a ^{GAL}UAS sintética e um dos iniciadores universais (figura 14). No gel de agarose 0,8% foi possível visualizar uma banda amplificada de ~2,6Kb correspondendo ao gene glicoamilase, o promotor CYC-1 e as duas seqüências de ^{GAL}UAS. O plasmídio YCpGCG1 estava então construído e poderia ser agora testado quanto à expressão regulada.

4.1.2.2 Avaliação da eficiência da construção ^{GAL}UAS CYC-1 GLICOAMILASE

Concluídas as etapas de clonagem, foi feita uma transformação de levedura utilizando a linhagem Y190 como hospedeira. O plasmídio YCpGCG1 foi introduzido na levedura sozinho ou, concomitantemente, com o plasmídio pCL1 (LEU2) que expressa, constitutivamente, a proteína Gal4 inteira. A proteína Gal4 é responsável pela transativação de genes que são precedidos por ^{GAL}UAS; portanto, seria esperada a expressão de atividade amilolítica nos co-transformantes. As placas seletivas para presença de YCpGCG1 ou de ambos plasmídios foram expostas a vapores de iodo para verificação da transativação. A ausência do halo de degradação de amido indica que não ocorreu a transativação expressiva do repórter por Gal4 (dados não mostrados). As possíveis razões para esse resultado estão relacionadas adiante.

4.1.2.3 Sequenciamento parcial da construção ^{GAL}UAS CYC-1 GLICOAMILASE

Foi feito um sequenciamento do clone utilizado na transformação de leveduras, que cobriu parte da seqüência de ^{GAL}UAS, o promotor CYC-1 e o início da porção codificadora do gene da glicoamilase. Verificou-se o correto posicionamento destas porções, assim como a exatidão das seqüências de cada uma delas na região de leitura confiável do resultado (figura 15).

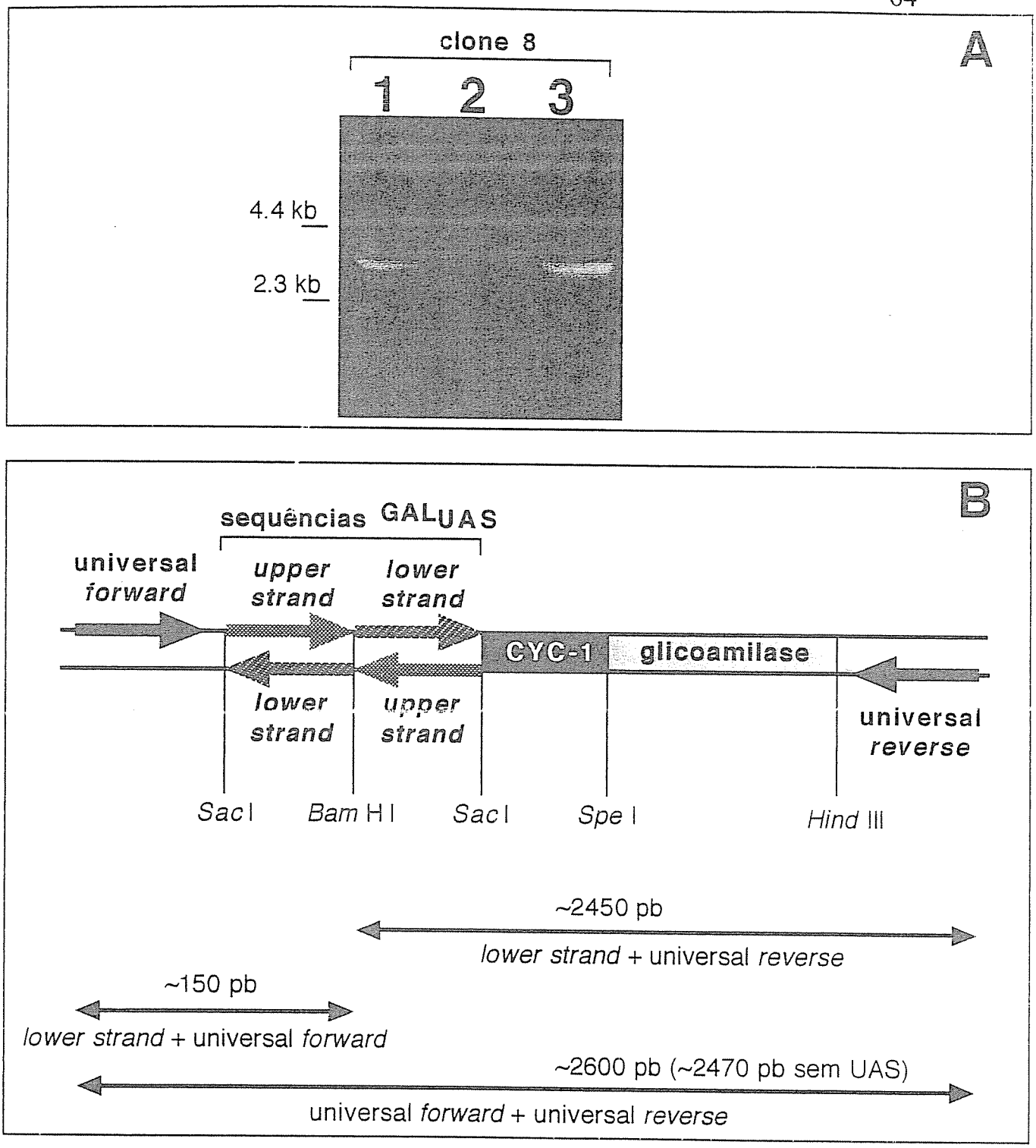


Figura 14: Verificação da clonagem da sequência regulatória GALUAS a montante do promotor CYC-1. Um ensaio de PCR *de colônia* foi realizado com vários clones recombinantes. O gel de agarose 0,8% p/v (5A) mostra, para um clone escolhido como exemplo, a amplificação ou não da região de interesse de acordo com os três conjuntos de iniciadores utilizados. São eles: lower strand + *universal reverse* (canaleta 1); *lower strand* + *universal forward* (canaleta 2); *universal forward* + *universal reverse* (canaleta 3). Foi possível visualizar uma banda de ~2.6Kb nas canaletas 1 e 3. Em 5B está mostrada a região de anelamento da cada iniciador e o tamanho da banda referente ao produto amplificado.

```
UAS/CYC-glico CGGAGTACTG TCCTCCGCTC GAGCGGAGTA CTGTCCTCCG AACGGAGTAC  50
Clone 8.seq   ---------- ---------- ---------- ---------- ----------

UAS/CYC-glico TGTCCTCCGG GATCCCGGAG GACAGTACTC CGTTCGGAGG ACAGTACTCC 100
Clone 8.seq   ---------- ---------- ---------- ---------- --TGTACTCC   8

UAS/CYC-glico GCTCGAGCGG AG-GACAGTA CTCCGAGCTC GCACTCGAGA TCGCATATAT 149
Clone 8.seq   GCTCGAGCGG AGNGACAGTA CTCCGASKCC AANCTCGAGA WCGCATATAT  58

UAS/CYC-glico ATATGTGTGC GACGACACAT GATCATATGG CATGCATGTG CTCTGTATGT 199
Clone 8.seq   ATATGTNTGC GACGACACAT GATCATATGG CATGCATGTG CTCTGTATGT 108

UAS/CYC-glico ATATAAAACT CTGTTTTCTT CTTTTCTCTA AATATTCTTT CCTTATACAT 249
Clone 8.seq   ATATAANACT CTGTTTTCTT CTTTTCTCTA AATATTCTTT CCTTATACAT 158

UAS/CYC-glico TAGGTCCTTT GTAGCATAAA TTACTATACT TCTATAGACA CGCAAACACA 299
Clone 8.seq   TAGGTCCTTT GTAGCATAAA TTACTATACT TCTATAGACA CGCAAACACA 208

UAS/CYC-glico AATACACACA CTAAATTAAT ACTAGTGGAT CCCCCGGGCT GCAGGAATTG 349
Clone 8.seq   AATACACACA CTAAATTAAT ACTAGTGGAT CCCCCGGGCT GCAGGAATTG 258

UAS/CYC-glico ATCTatgGGG GATCTCAGCA atgTCGTTCC GATCTCTACT CGCCCTGAGC 399
Clone 8.seq   ATCTATGGGG G--------- ---------- ---------- ---------- 269
```

Figura 15: Presença de ^{GAL}UAS e CYC-1 a montante do gene de glicoamilase na construção YCpGCG1. O resultado do sequenciamento do clone 8 (figura 14), quando comparado com a sequência teórica de YCpGCG1, mostra a presença do final de ^{GAL}UAS (posições 1-128 da sequência teórica, em *itálico*), de CYC-1 (sublinhado) e da porção 5' do gene da glicoamilase. Estão denotados dois códons atg (sublinhados e em letras minúsculas), sendo que o segundo deles corresponde à metionina inicial da glicoamilase.

4.1.3 Tentativas de utilização do gene da glicoamilase como repórter

Um detalhe que nos chamou a atenção durante a análise detalhada da sequência de bases da construção acima foi a presença de dois ATG na porção inicial do gene da glicoamilase. Eles estão separados por 13 nucleotídeos um do outro sendo que, somente o segundo códon de iniciação está na fase de leitura correta para o gene da glicoamilase. Relatos na literatura demonstraram que a presença de um AUG anterior e próximo ao AUG inicial inibe a expressão do gene em até 99% (Sherman *et al.*, 1996). Portanto o 1° AUG presente na porção 5' do gene poderia estar impedindo a correta tradução da glicoamilase. Entretanto, não foi descartada a possibilidade de mutação na região codificadora do gene da glicoamilase ou a possibilidade de um erro de construção não detectado pelo sequenciamento. Outra possibilidade seria que a ativação da transcrição estaria sendo inibida pela presença de seqüências ^{GAL}UAS em orientação invertida. No entanto esta hipótese é pouco provável se forem considerados os resultados publicados por Ruden, Ma e Ptashne (1988). Os autores mostram que a inversão da seqüência regulatória não afeta a expressão do gene. Em Remacle *et al.* (1997), foram colocadas seqüências ^{GAL}UAS em distâncias variadas e a expressão do gene também não é afetada. Portanto, partimos para a verificação de três hipóteses que explicariam o insucesso da expressão com a nossa construção:

- PROBLEMA: Gene da glicoamilase mutado
  SOLUÇÃO: Trocar o gene por outro que seja funcional

- PROBLEMA: Presença de dois AUG em fase de leitura diferentes
  SOLUÇÃO: Retirar o primeiro AUG que está fora de fase

- PROBLEMA: Erro na construção do cassete de expressão ou ^{GAL}UAS CYC-1 nãoé um promotor forte o suficiente para detecção da ativação do gene
  SOLUÇÃO: Colocar o gene sob o controle de outro promotor responsivo a Gal4

Essas três tentativas de solução foram exploradas como descrito a seguir.

4.1.3.1 Troca do gene da glicoamilase

A primeira tentativa de se resolver o problema da expressão de glicoamilase foi feita trocando-se o gene já clonado em YCpGCG1 por outro que estava clonado no vetor YEpG1 e que apresentava o halo de degradação de amido.

Esta clonagem foi realizada em duas etapas (figura 16), evitando-se a utilização de amplificação por PCR, que poderia introduzir mutações. A primeira delas foi a introdução do novo gene da glicoamilase no vetor pBluescript. Para isto, este vetor foi digerido com as enzimas de restrição *Hind* III e *Bam* HI enquanto que o plasmídio YEpG1 foi digerido com as enzimas de restrição *Hind* III e *Bgl* II para a liberação do gene. O gene foi purificado após a digestão e ligado ao vetor por uma reação de ligação forçada, pois os sítios de restrição de *Bam* HI e *Bgl* II são compatíveis, ou seja, as extremidades coesivas são complementares e não necessitam de tratamento adicional para que ocorra a ligação. A verificação da clonagem foi feita pelo teste de metabolização de X-gal, uma vez que as bactérias hospedeiras apresentam alfa-complementação pelo vetor sem inserto (XL1Blue). Algumas colônias brancas foram escolhidas, o plasmídio foi extraído e a clonagem foi confirmada através da determinação do tamanho do novo vetor pBLglico2 (~5.3Kb, plasmídio linearizado com *Hind* III).

A segunda etapa da clonagem foi a troca do gene previamente clonado em YCpGCG1 pelo novo gene clonado em pBLglico2. Ambos plasmídios foram digeridos com as enzimas de restrição *Hind* III e *Spe* I, liberando cada um o gene da glicoamilase nele contido. O gene novo e o vetor YCpGC1 (agora sem o gene) foram purificados e ligados para a formação do novo vetor YCpGCG2. A verificação da clonagem foi feita pela digestão do vetor com as enzimas de restrição *Sal* I e *Pst* I, que liberaram um fragmento de ~1.1Kb detectado por eletroforese em gel de agarose 1.0%.

A linhagem de levedura Y190 foi transformada com o novo plasmídio YcGCG2 juntamente com o plasmídio pCL1 que expressa Gal4 inteira. Novamente não foi possível observar a ativação do gene nos co-transformantes gerados em placas seletivas SD -TRP,-LEU + 0,5% de amido, expostas a vapores de iodo (não mostrado). Portanto, desfavorece-se a hipótese de ausência de expressão por ocorrência de mutações na região codificante da glicoamilase.

4.1.3.2 Retirada do primeiro AUG

A segunda tentativa para se resolver o problema da falta de expressão de glicoamilase se concentrou na retirada do primeiro AUG posicionado a 13 nucleotídeos do segundo (funcional). O esquema da estratégia utilizada encontra-se na figura 17.

Foi feito um PCR para amplificar somente o começo do gene, utilizando como molde o plasmídio YCpGCG1. Para tanto foi preciso construir um par de iniciadores sendo que um deles se anelaria entre os dois AUG, incluindo na extremidade 5' um sítio de

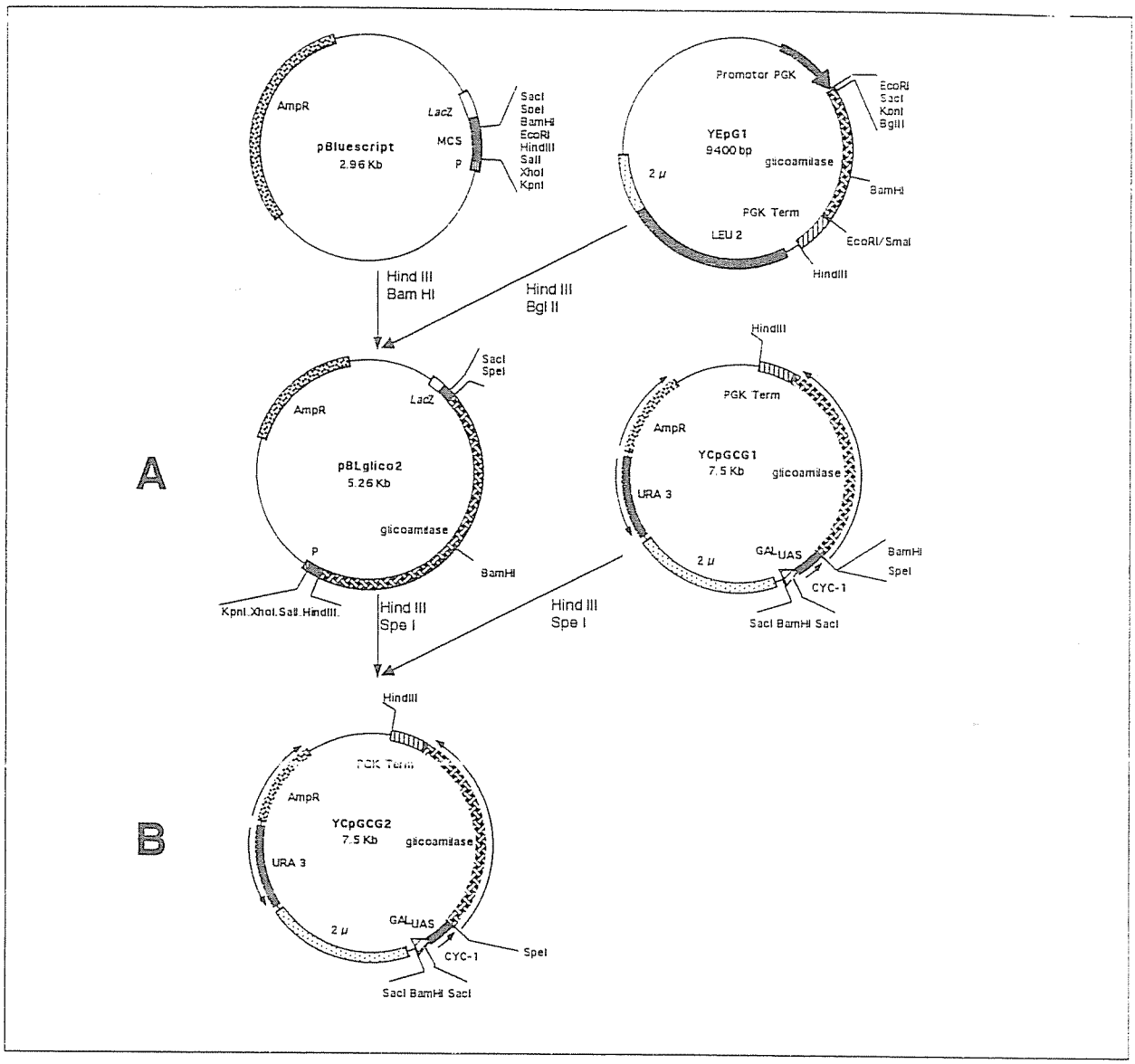
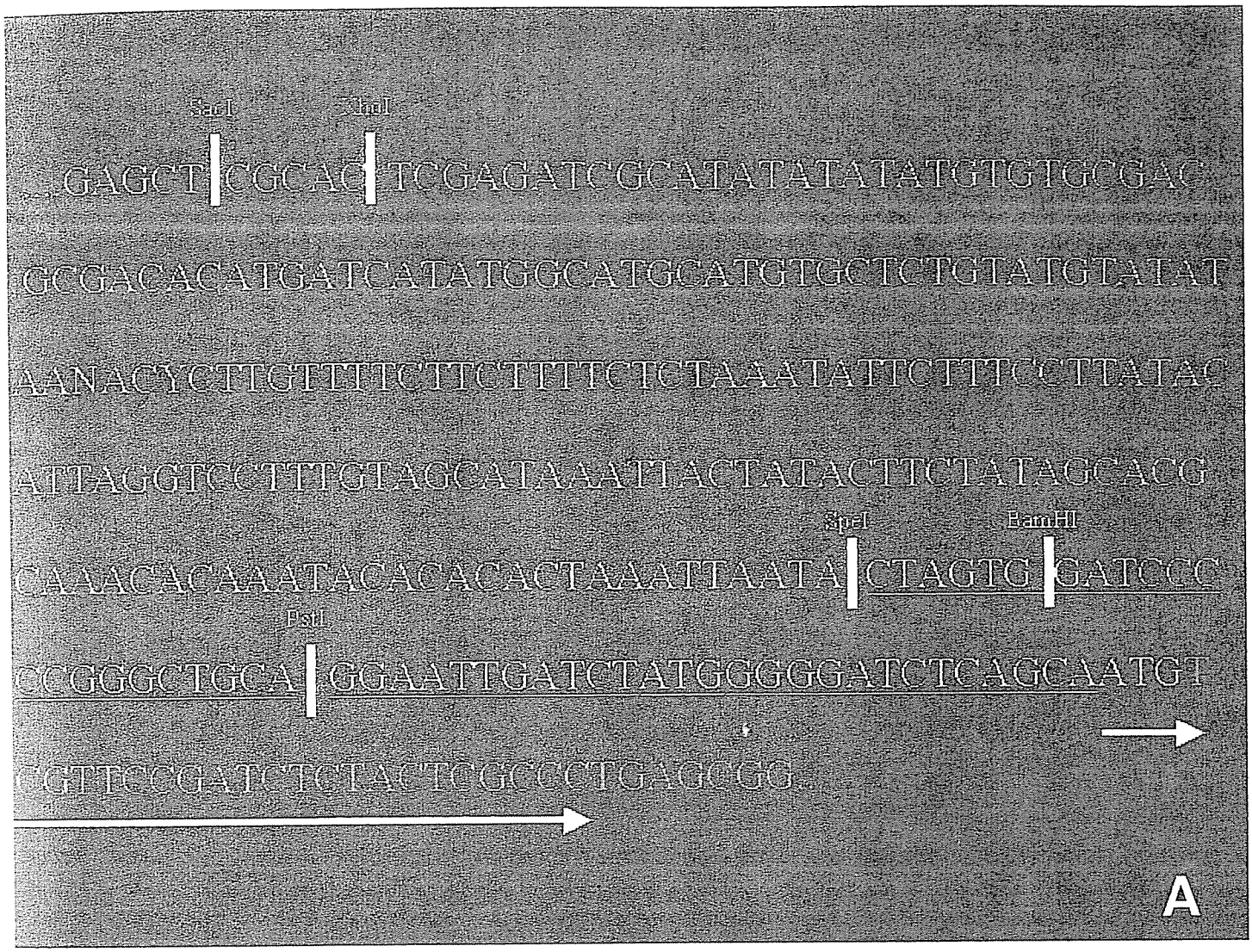


Figura 16: Esquematização da troca do gene da glicoamilase do plasmídio YCpGCG1. Duas etapas foram realizadas para esta construção: (A) clonagem do gene da glicoamilase em pBluescript; (B) substituição do gene da glicoamilase de YCpGCG1 pelo gene contido em pBLglico2.



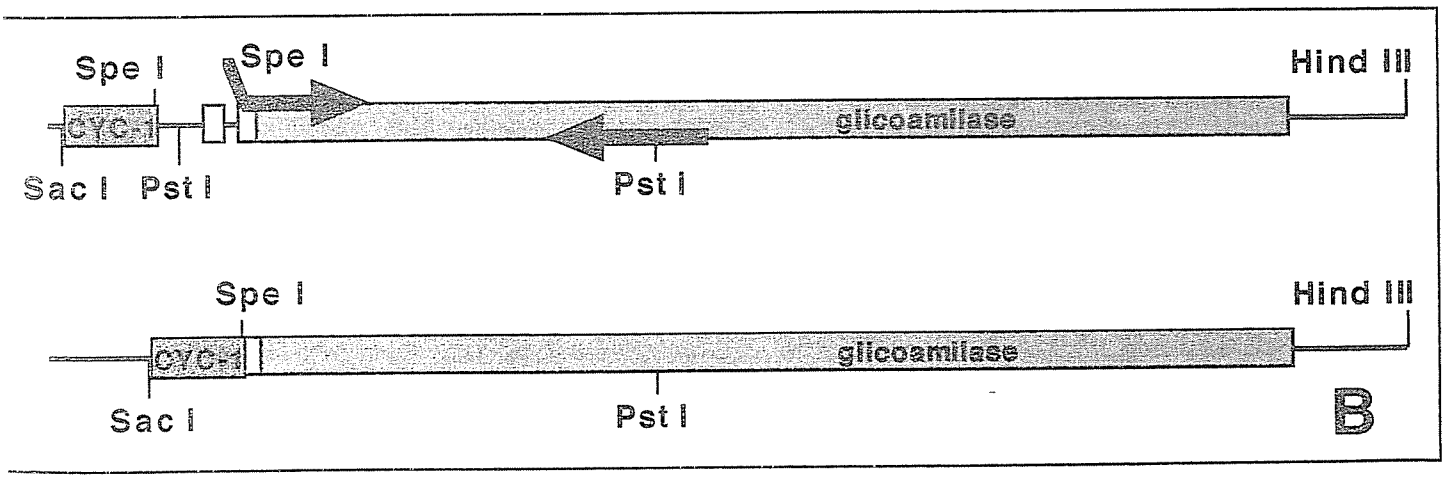


Figura 17: Estratégia de eliminação do primeiro ATG (fora de fase) a 5' da glicoamilase. A sequência da construção GALUAS, CYC-1, glicoamilase está representada acima. Em verde está representado o promotor CYC-1, clonado entre os sítios *Sac* I e *Spe* I. Em amarelo estão anotados os dois códons ATG presentes, sendo o segundo deles o que inicia a fase aberta de leitura correta (em vermelho). Com o uso de dois iniciadores (setas em preto em B e iniciador direto mostrado por seta em branco em A), foi amplificada por PCR a região que compreende desde o segundo ATG até o sítio de *Pst* I presente no gene da glicoamilase. Com a ligação do sítio *Spe* I inserido pela PCR ao sítio *Spe* I encontrado a 3' de CYC-1, eliminou-se a região sublinhada em A e o primeiro ATG. O iniciador incluiu, a 5' do ATG verdadeiro, a sequência ACC, para melhorar o consenso de apresentação do códon iniciador.

restrição para a enzima *Spe* I. O outro iniciador se anelaria a jusante do primeiro sítio de restrição para a enzima *Pst* I do gene glicoamilase (figura 17). Foi obtido um produto de PCR de ~750pb e este fragmento foi utilizado para substituir um fragmento equivalente (porém sem o primeiro AUG) retirado do gene da glicoamilase já clonado no vetor YCpGCG1 por digestão com *Spe* I e *Pst* I. Note que agora a região a jusante do sítio de *Spe* I contém apenas o segundo AUG, que é funcional. Os mesmos ensaios de ativação do repórter foram realizados com o plasmídio que contém o gene da glicoamilase sem o primeiro AUG e, da mesma maneira, não foi obtido halo de degradação de amido (não mostrado).

4.1.3.3 Clonagem do gene da glicoamilase sob o controle do promotor GAL1

A última tentativa feita para se obter a transativação do gene da glicoamilase foi a clonagem do mesmo sob o controle do promotor GAL1, no vetor pYES2 (URA3, Amp^r, 2μ ori, pGAL1, T CYC-1).

Para esta clonagem (figura 18) o plasmídio pYES2 foi digerido com as enzimas de restrição *Xho* I e *Eco* RI. O plasmídio pBLglico1 foi digerido com as enzimas de restrição *Sal* I e *Eco* RI para possibilitar a retirada do gene da glicoamilase e sua ligação no vetor pYES2. Foi feita uma ligação forçada do vetor e do inserto, ambos purificados, pois os sítios de restrição de *Sal* I e *Xho* I são compatíveis, portanto as pontas não necessitam de qualquer tratamento para que ocorra a ligação. A verificação da clonagem foi realizada pela digestão do novo plasmídio pYES-glico1 com as enzimas de restrição *Sal* I e *Bam* HI. Desta maneira, foi visualizada uma banda de ~5.4kb e outra de ~1.8Kb referente a liberação de quase todo o gene quando o plasmídio recombinante foi digerido e submetido a um gel de agarose 0,8% (não mostrado).

Uma transformação de levedura utilizando a linhagem YJ0Z (ura3) como hospedeira foi realizada e o plasmídio pYES-glico1 foi inserido juntamente com o plasmídio pCL1 que expressa Gal4 inteira. Mais uma vez não foi possível se detectar a expressão da glicoamilase nos co-transformantes analisados (não mostrado).

A troca do gene da glicoamilase no plasmídio pYES-glico 1 foi feita com um novo gene da glicoamilase enviado pela Dr^a. Elizabete Vicente, ICB, USP. O novo plasmídio pYES-glico2 foi submetido aos mesmos experimentos realizados anteriormente, para se tentar obter a formação do halo de degradação de amido. Igualmente não foi possível visualizar o halo em nenhum dos clones obtidos.

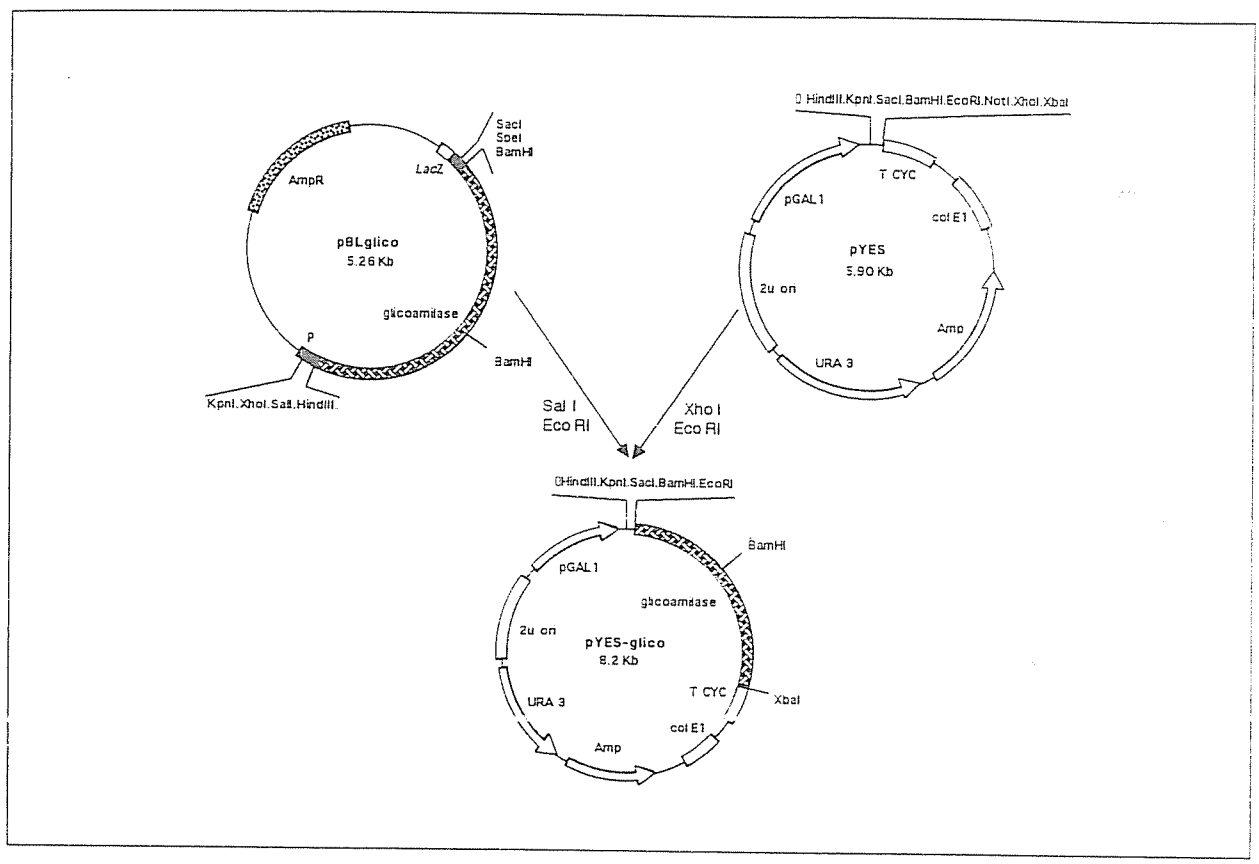


Figura 18: Esquematização da clonagem do gene da glicoamilase sob o controle de um promotor indutível (construção de pYES-glico). O gene da glicoamilase foi retirado do plasmídio pBLglico1 e clonado em pYES2.

Um último experimento usando os plasmídios construídos para o gene da glicoamilase foi feito mudando-se a concentração de amido presente nas placas de revelação de 0,5% para 0,1% (figura 19). Novamente não conseguimos visualizar o halo de degradação de amido.

Desta forma, vetores centroméricos ou episssômicos construídos com o gene da glicoamilase sob transativação por Gal4 não foram eficazes para funcionar em sistemas de duplo-híbrido.

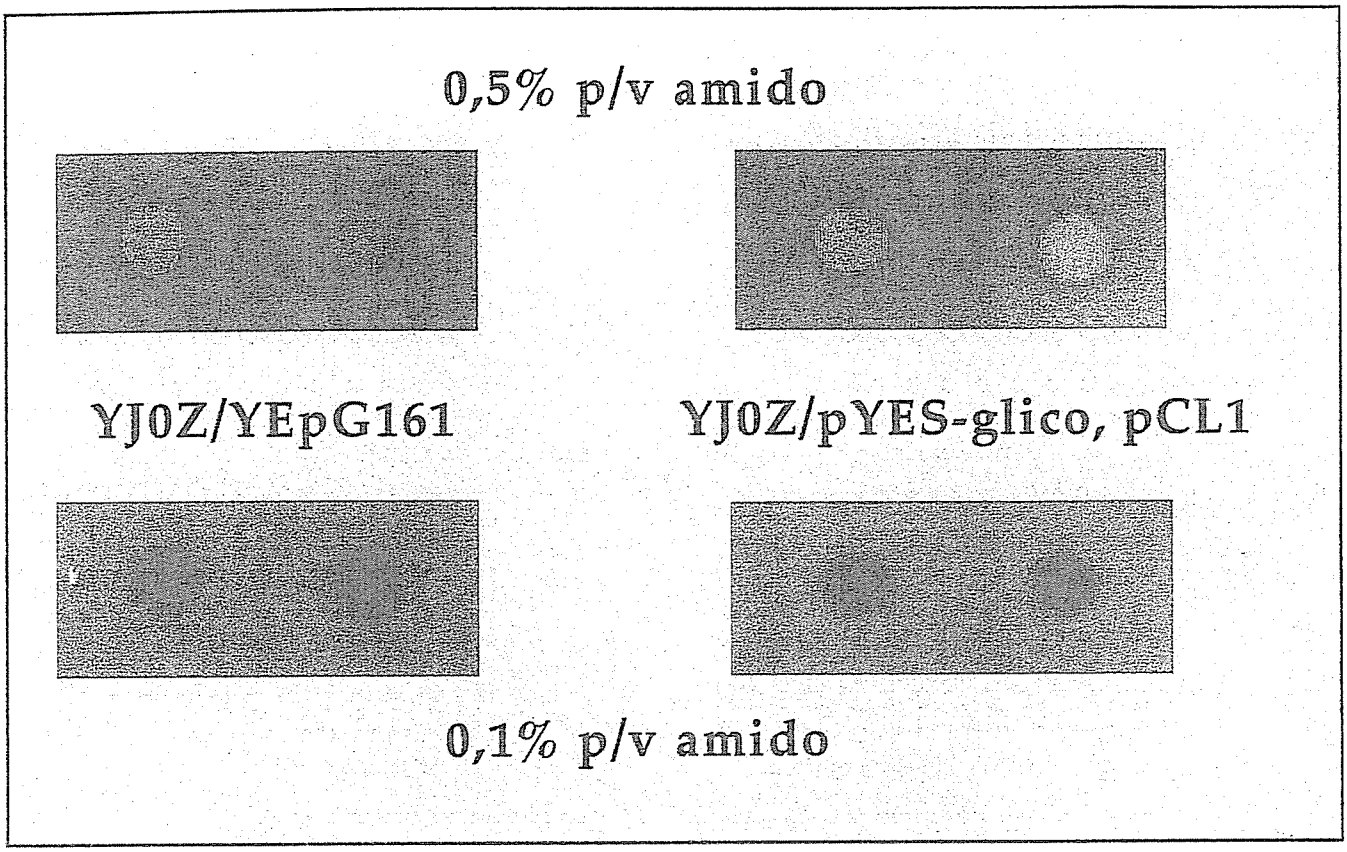


Figura 19: Testes de formação de halo de degradação de amido com a construção pYES-glico. A linhagem YJ0Z contendo o plasmídio YEpG161 (que contém o gene da glicoamilase mas sem promotor) ou os plasmídios pYES-glico e pCL1 (que expressa o indutor Gal4), foram testadas quanto a formação de halo de degradação de amido após revelação com vapores de iodo. Dois clones de cada linhagem foram cultivados em meio líquido seletivo apropriado e alíquotas de 10µl de culturas estacionárias foram utilizadas para teste *de pingos* em placas seletivas contendo as concentrações de amido indicadas.

4.2 GENE EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)

O gene EGFP foi o segundo dos três genes a ser testado. O interesse maior do uso de EGFP como repórter reside na possibilidade de seleção dos clones positivos (nos quais a transcrição do gene é ativada), através de citometria de fluxo e separação em selecionador de células (*cell sorter*). Antes de se construir o gene no sistema, algumas padronizações foram feitas. Essas padronizações podem ser úteis também para outras abordagens, como a clonagem de promotores (ver "Discussão").

4.2.1 Padronização dos experimentos

Como realizado para o gene da glicoamilase, também foram feitas padronizações para se estabelecer as melhores condições de utilização do gene EGFP como repórter para sistemas de duplo-híbrido. Três passos inerentes a um protocolo de seleção do duplo-híbrido foram padronizados: um procedimento para enriquecimento de leveduras transformadas, os ensaios de detecção de fluorescência e a separação de células fluorescentes de não fluorescentes.

4.2.1.1 Enriquecimento dos transformantes em meio líquido após transformação.

Inicialmente era necessário lidar com o problema de que, quaisquer células, inclusive leveduras não transformadas (a grande maioria num experimento de transformação), são contadas em citometria de fluxo. Desta forma, seria importante avaliar o grau de enriquecimento de células transformadas em uma cultura em meio líquido, quando esse crescimento é seletivo para leveduras que receberam o plasmídio. Se o número de leveduras não transformadas for insignificante, o experimento é possível.

Foi conduzido o seguinte experimento: a linhagem Y190 previamente transformada com um plasmídio TRP1 e mantida em meio seletivo, foi transformada com um plasmídio LEU2. Este é um típico experimento de seleção de duplo-híbrido onde o plasmídio TRP1 expressa a "isca". Assim, as $2x10^8$ células submetidas ao protocolo de transformação foram transferidas para um tubo contendo 5 ml de meio líquido SD - TRP-LEU (tubo 1, onde crescem as leveduras que, mantendo o plasmídio TRP1, foram também transformadas com o plasmídio LEU2). Outras $2x10^8$ células igualmente submetidas a transformação com o plasmídio LEU2 foram transferidas para um tubo contendo meio líquido SD sem complementação nutricional (tubo 2, onde nenhuma levedura será capaz de crescer), simulando a situação das leveduras não

transformadas. No dia seguinte, foi verificada a presença de $7,2x10^7$ células/ml no tubo 1, enquanto que no tubo 2 foi verificada a presença de $4,5x10^6$ células/ml ou seja, uma diminuição de 16 vezes no número de células. Cada cultura então foi diluída numa proporção de 1:100, ou seja, 100 µl da cultura 1 em 10 ml de meio SD -TRP-LEU para o tubo 1 e 100 µl da cultura 2 em 10 ml de meio SD para o tubo 2. Após 24 horas, novas alíquotas foram retiradas para contagem do número de células em cada tubo. Foi verificada a presença de $7,6x10^7$ células/ml no tubo 1 e $6x10^4$ células/ml no tubo 2 ou seja, haviam 1200 vezes menos células no tubo 2 em relação ao tubo 1 (figura 20). Foi obtido, desta maneira, um enriquecimento substancial das células que receberam o plasmídio na transformação, o que é bastante interessante quando se quer utilizá-las num aparelho de FACScan com um número praticamente insignificante de células não transformadas. Estabelecemos assim um protocolo de seleção a ser aplicado às células após a transformação.

4.2.1.2 Análise de fluorescência de leveduras quando expressando EGFP

Inicialmente utilizamos dois clones (denominados L1/10 e L2/3) da levedura YPH252 transformada com um plasmídio que contém o gene EGFP sob o controle do promotor PGK (um promotor forte e constitutivo). Esses clones foram gerados por Gisele Nóbrega, orientada pela Drª. Elizabete Vicente, ICB, USP, a partir do gene EGFP subclonado neste trabalho no plasmídio pYES2 (ítem 4.2.2.1).

Além desses dois clones que expressam EGFP constitutivamente, dois controles foram utilizados para medida de fluorescência em citometria de fluxo, sendo eles: a linhagem hospedeira YPH252 sem qualquer plasmídio e a linhagem hospedeira transformada com um plasmídio que contém o gene EGFP, mas do qual o promotor PGK foi retirado.

As quatro amostras (L1/10, L2/3 e os dois controles) foram submetidas a uma análise de fluorescência em um aparelho de FACScan do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG. Foi altamente significativa a diferença de fluorescência das células que contém o gene EGFP sob o controle do promotor PGK em relação àquelas que não expressam EGFP ou por não conter o gene, ou por não possuir o promotor PGK a montante do gene EGFP (figura 21).

As mesmas culturas foram submetidas a uma análise de fluorescência em microscopia de fluorescência. Alíquotas retiradas das culturas em meio líquido foram depositadas sobre lâminas convencionais de microscopia e cobertas com lamínula. As lâminas foram levadas ao microscópio de fluorescência e foi possível visualizar leveduras

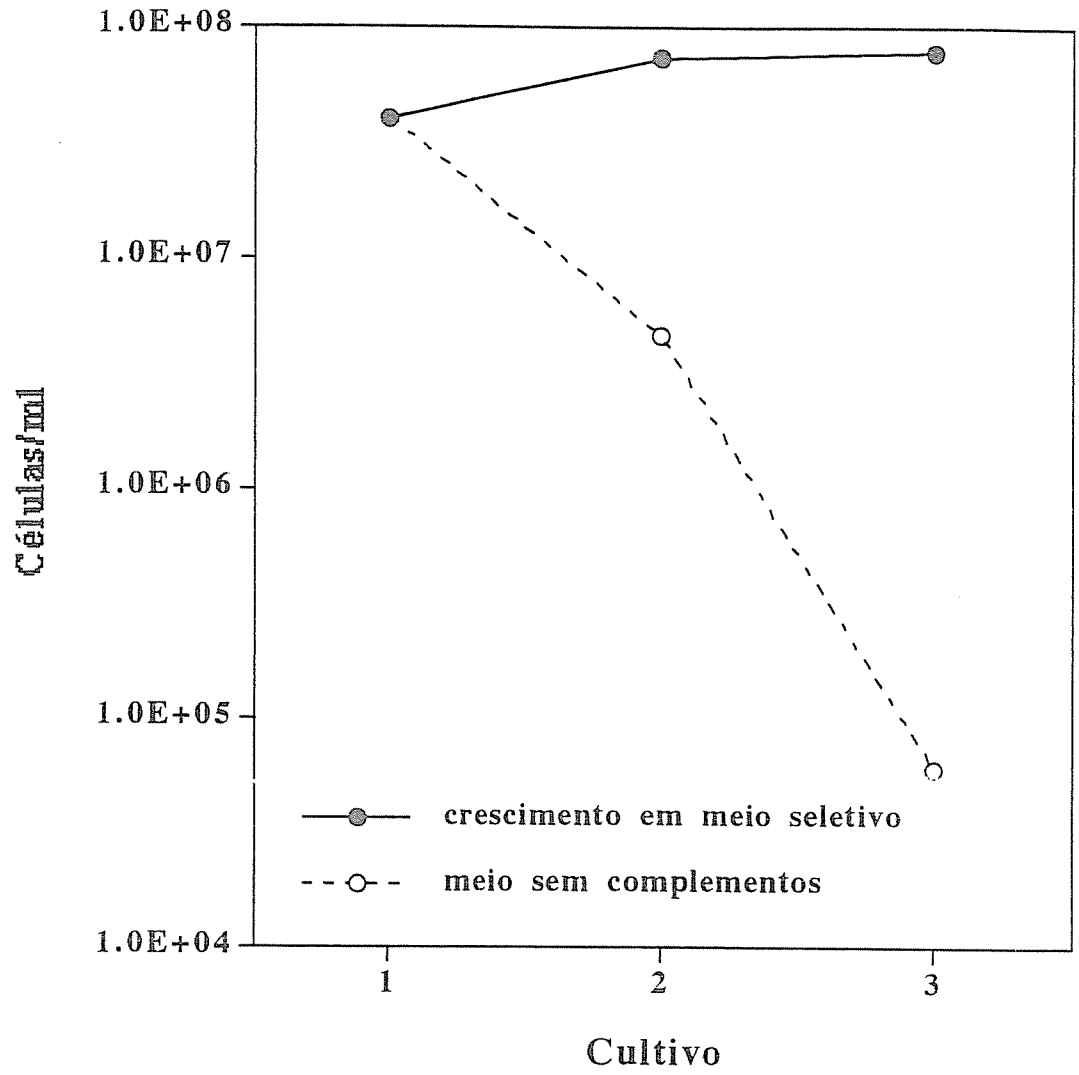


Figura 20: Pesquisa de enriquecimento de transformantes em meio líquido. Submeteram-se $2x10^8$ células Y190 contendo um plasmídio TRP1 a transformação com um plasmídio com a marca de seleção LEU2 e as células foram inoculadas (cultivo 1) em dois tubos de cultura com 5ml de meio líquido, sendo um deles SD -TRP -LEU (meio seletivo para os transformantes duplos) e o outro SD apenas (não permite o crescimento de Y190, que é ADE-), como indicado. Após 24 horas de incubação (cultivo 2), a concentração de células foi determinada e foi feita uma subcultura por outras 24 horas (cultivo 3) com a diluição de 1:100. O número de células/ml está mostrado. Observou-se claramente o enriquecimento dos transformantes com esse protocolo de subcultivo.

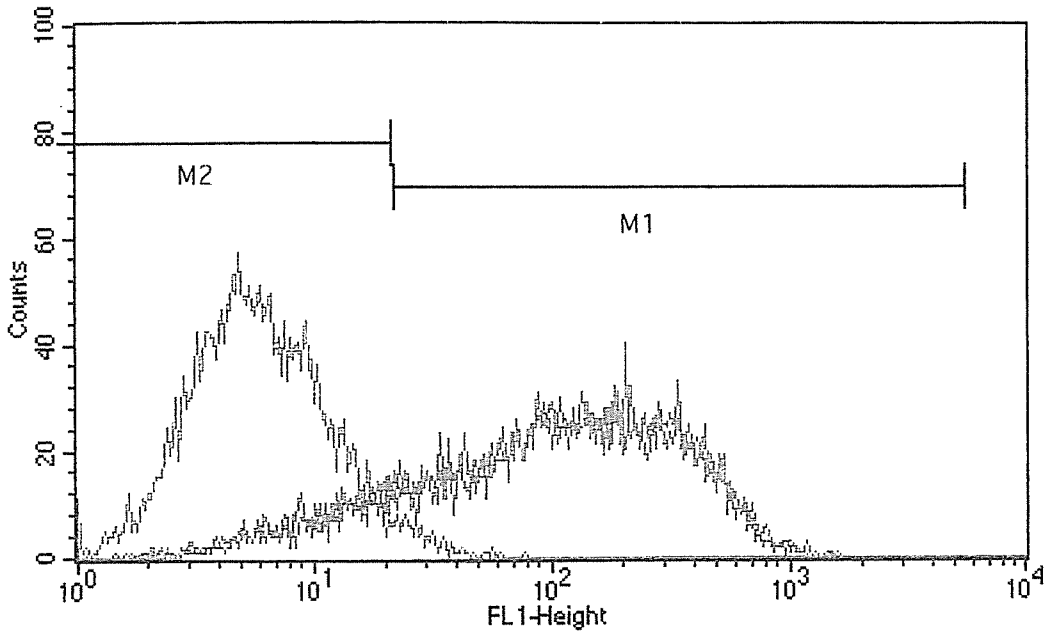


Figura 21: Análise em citometria de fluxo de leveduras que expressam EGFP constitutivamente. O gráfico acima mostra a distribuição de intensidade de fluorescência de células provenientes da linhagem YPH252 em três situações: sem plamídio (em amarelo), contendo o plasmídio com EGFP sob o controle de PGK (dois clones, em azul e em rosa) ou contendo o plasmídio com EGFP sem promotor (em verde). As culturas foram diluídas para uma concentração de $1x10^6$ células/ml e submetidas ao aparelho de FACScan.

verdes provenientes das duas culturas que expressavam EGFP sob o controle do promotor PGK (não mostrado). Como esperado, as leveduras provenientes das culturas controle não apresentavam fluorescência.

4.2.1.3 Separação das células fluorescentes em citometria de fluxo

Uma simulação de *cell sorter* foi realizada para se avaliar a capacidade de separação das células fluorescentes quando somente algumas delas entre milhares apresentam expressão de EGFP. Duas linhagens de levedura albergando plasmídios diferentes foram escolhidas para este experimento por razões discutidas a seguir. A primeira delas é representada pelo clone L1-10 constituído de uma levedura hospedeira Ade^+ (YPH252), contendo o plasmídio LEU2 que expressa EGFP constitutivamente. A outra é a linhagem YJ0Z (Ade^-) contendo o plasmídio pCL1 (ativa a transcrição do repórter *lacZ* presente nessa levedura); pCL1 também é LEU2 mas não expressa EGFP. Uma mistura das duas linhagens de levedura foi feita de modo que se obtivesse 30 células expressando EGFP para cada 10^6 que não expressam, por ml de PBS. Esta mistura foi levada ao aparelho de FACScan e foi realizada a separação das células sob protocolo de *cell sorter*.

Inicialmente, seiscentas células foram separadas e diretamente semeadas em placas contendo SD -LEU, seletivas para ambas leveduras. Aproximadamente dez vezes mais colônias que o esperado cresceram na placa, mostrando que provavelmente houve um erro na freqüência de fluxo ou na contagem das células no *cell sorter*. Desta forma não foi possível avaliar se todas as células que foram selecionadas são capazes de gerar colônias quando semeadas diretamente após a passagem pelo protocolo de seleção. Todavia, este procedimento parece ser viável.

A passagem foi repetida e outras cem células foram coletadas num segundo tubo e transferidas para meio líquido (SD -LEU) para continuarem o crescimento. Após dois dias de incubação, as células foram contadas de modo que ~1000 células pudessem ser semeadas em placas contendo meio sólido SD -LEU. Após 72 horas de incubação foi possível distinguir leveduras Ade^- de leveduras Ade^+ pela coloração avermelhada daquelas que são Ade^-, fenômeno que acontece quando a adenina presente no meio é esgotada. Das 441 colônias da placa, 76 apresentaram coloração avermelhada enquanto que 365 permaneceram brancas. Portanto, 83% das leveduras eram Ade^+ ou seja, eram aquelas que possuíam o plasmídio expressando EGFP, enquanto que 17% das leveduras eram Ade^- ou seja, não expressavam EGFP mas possuíam um plasmídio que tem capacidade de ativar a transcrição do gene *LacZ*.

Um teste de metabolização de X-Gal foi feito com algumas colônias brancas e avermelhadas para se confirmar a tipagem dessas leveduras. Das 20 colônias avermelhadas testadas, todas geraram leveduras azuis quando incubadas com o substrato X-Gal enquanto que, das 30 colônias brancas testadas, apenas uma se tornou azul (figura 22). Assim, como poucas leveduras não demonstraram o fenótipo avermelhado apesar do genótipo Ade-, podemos inferir que houve enriquecimento bastante significativo em apenas um ciclo de seleção (~83% das leveduras viáveis separadas eram positivas).

4.2.2 Modificação de plasmídios para uso de EGFP como repórter

Para utilização do gene EGFP como repórter no sistema de duplo-híbrido, à semelhança do que foi feito para o gene da glicoamilase, foi necessário que se fizesse uma construção gênica na qual este gene se posicionasse sob o controle de um promotor indutível. Desta maneira, só haveria transcrição se o gene repórter fosse induzido por um ativador transcricional ou pela interação dos híbridos do sistema. Duas construções foram realizadas, colocando-se o gene EGFP sob controle do promotor GAL1 ou do promotor CYC-1 auxiliado por seqüências UAS sintéticas.

4.2.2.1 Construção do gene EGFP sob o controle de um promotor indutível

O plasmídio pYES2 foi utilizado na primeira construção gênica para a utilização de EGFP no sistema de duplo-híbrido. Este gene foi clonado a 3' do promotor GAL1 (que contém sítios de ligação de Gal 4). A figura 23 mostra um esquema da construção. O plasmídio pYES2 foi digerido com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Not* I. O plasmídio pEGFP-N1 (Clontech, Kan^R) também foi digerido com as enzimas *Eco* RI e *Not* I para liberar o gene EGFP. Após a purificação do vetor pYES2 digerido e do gene EGFP, foi feita uma ligação para a conclusão desta clonagem. A verificação desta clonagem foi feita através da digestão do novo plasmídio pYES-EGFP com a enzima de restrição *Sal* I. Quando pYES-EGFP é digerido com esta enzima, ele se torna um plasmídio linear com ~6.9Kb. Após a digestão com *Sal* I, foi possível confirmar a presença de EGFP em pYES2 pela visualização de uma banda, correspondente ao plasmídio recombinante linearizado, em um gel de agarose 0,8% (não mostrado).

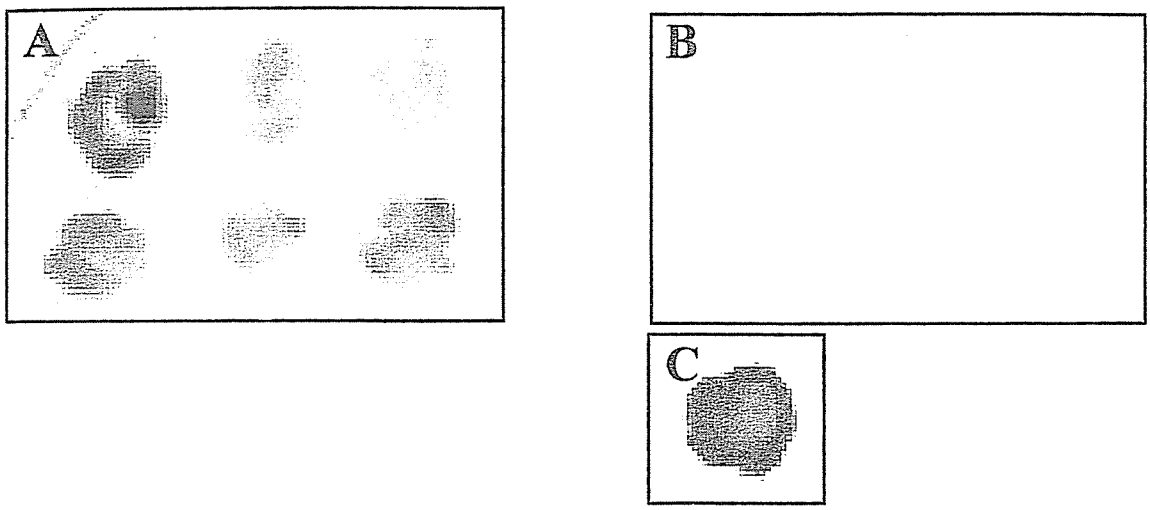


Figura 22: Teste de metabolização de X-Gal para tipagem de leveduras que foram separadas em "cell sorter". A partir de duas pré-culturas foi feita uma mistura contendo a proporção de 30 células YPH252 (Ade+, contendo um plasmídio LEU2 que expressa EGFP constitutivamente) para cada 10^6 células YJ0Z (Ade-, contendo o plasmídio pCL1 (LEU2, que ativa o gene repórter *Lac*Z nesta levedura). Aproximadamente 100 células foram separadas num aparelho de "cell sorter" e inoculadas em meio líquido SD -LEU para crescimento com agitação por 48 horas. Leveduras foram semeadas em placa seletiva -LEU e após dois dias de incubação a 30°C algumas colônias foram escolhidas para tipagem através do teste de metabolização de X-Gal. Leveduras YJ0Z que estariam sendo separadas erroneamente pelo "cell sorter" apresentariam desenvolvimento de cor azul. Fora observado que 17% das colônias apresentavam fenótipo Ade- (coloração avermelhada) e todas estas se tornaram azuis no ensaio de X-Gal (exemplificado por 6 colônias em A). O restante das colônias apresentava fenótipo aparente Ade+ sendo que, dentre 30 destas colônias testadas (6 testes mostrados em B), somente uma desenvolveu a cor azul (C). Assim, aproximadamente apenas 17% da cultura representavam leveduras que não se desejava selecionar.

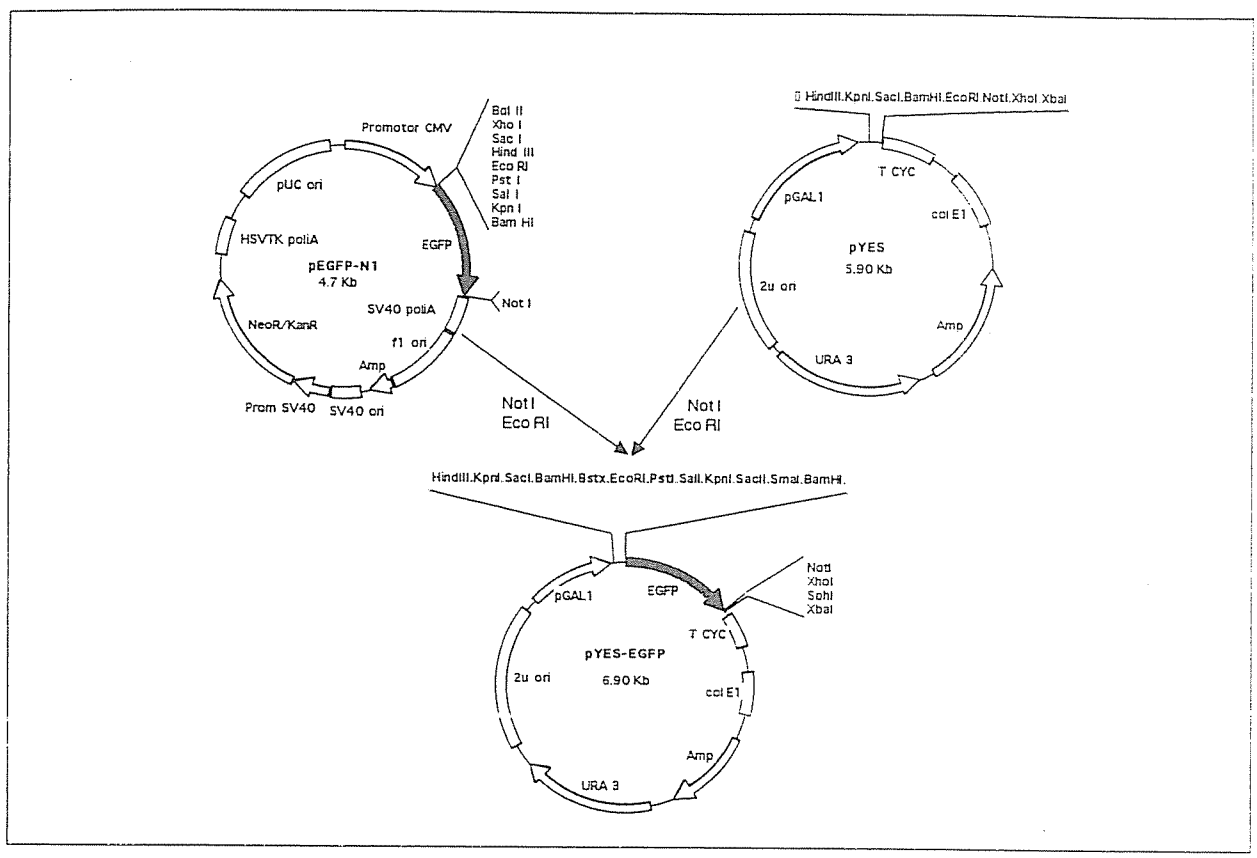


Figura 23: Esquematização da clonagem do gene EGPF sob o controle de um promotor indutível (construção de pYES-EGFP). O gene EGFP foi retirado do plasmidio pEGFP-N1 e clonado em pYES2.

4.2.2.2 Avaliação da eficiência da construção pYES-EGFP

A linhagem de levedura YJ0Z (Ura- Leu-) foi transformada com o plasmídio pYES-EGFP (URA3) e foi possível verificar a ativação do gene repórter naquelas leveduras que continham também o plasmídio pCL1 (LEU2), que expressa Gal4 inteira. As leveduras foram levadas ao microscópio de fluorescência, onde se verificou a transativação do repórter, detectando-se ~98% de leveduras verdes (a figura 24 mostra um exemplo da fluorescência apresentada).

O mesmo procedimento foi feito com o controle do experimento: leveduras contendo somente o plasmídio pYES-EGFP sem a presença de um indutor. Foi observada a presença de fluorescência em ~10% das leveduras analisadas (não mostrado).

Foi testada, também, a ativação do repórter utilizando-se ativadores fracos (híbridos contendo o domínio de ligação a DNA de Gal4 e o domínio N terminal do fator de transcrição TEAD-4 de camundongo, Pessoa e Ortega, resultados não publicados) e os primeiros resultados nos mostraram que não houve a ativação do gene. Deste modo, resultados preliminares indicam que esta construção de EGFP fornece um repórter pouco sensível e, portanto, importante para se estudar interações fortes.

As mesmas amostras submetidas à análise de microscopia de fluorescência foram examinadas por citometria de fluxo. A análise de fluorescência no aparelho de FACScan revelou que as leveduras que continham os plasmídios pYES-EGFP e pCL1 apresentavam fluorescência maior do que aquelas que não continham o indutor (figura 25). Desta forma, é possível detectar a ativação do gene repórter EGFP por Gal4. Seleções através do protocolo de *cell sorter* aparentemente só seriam possíveis fazendo-se vários ciclos de enriquecimento, devido à diferença pequena de fluorescência entre as amostras.

4.2.2.3 Clonagem de EGFP sob o controle do promotor CYC-1 e ^{GAL}UAS

A segunda construção feita utilizando o gene EGFP envolveu sua clonagem no plasmídio YCpGCG1 que contém ^{GAL}UAS e o promotor CYC-1, trocando-se o gene da glicoamilase pelo gene EGFP (figura 26). O plasmídio YCpGCG1 foi digerido com as enzimas de restrição *Pst* I e *Sal* I para liberar o gene da glicoamilase e para se fazer a purificação do vetor linearizado (agora denominado YCpGC). O plasmídio pYES-EGFP foi digerido com as enzimas de restrição *Pst* I e *Xho* I para liberar o gene EGFP e permitir a purificação deste último. Foi feita uma ligação forçada de EGFP em YCpGC já que as enzimas de restrição *Sal* I e *Xho* I criam extremidades coesivas

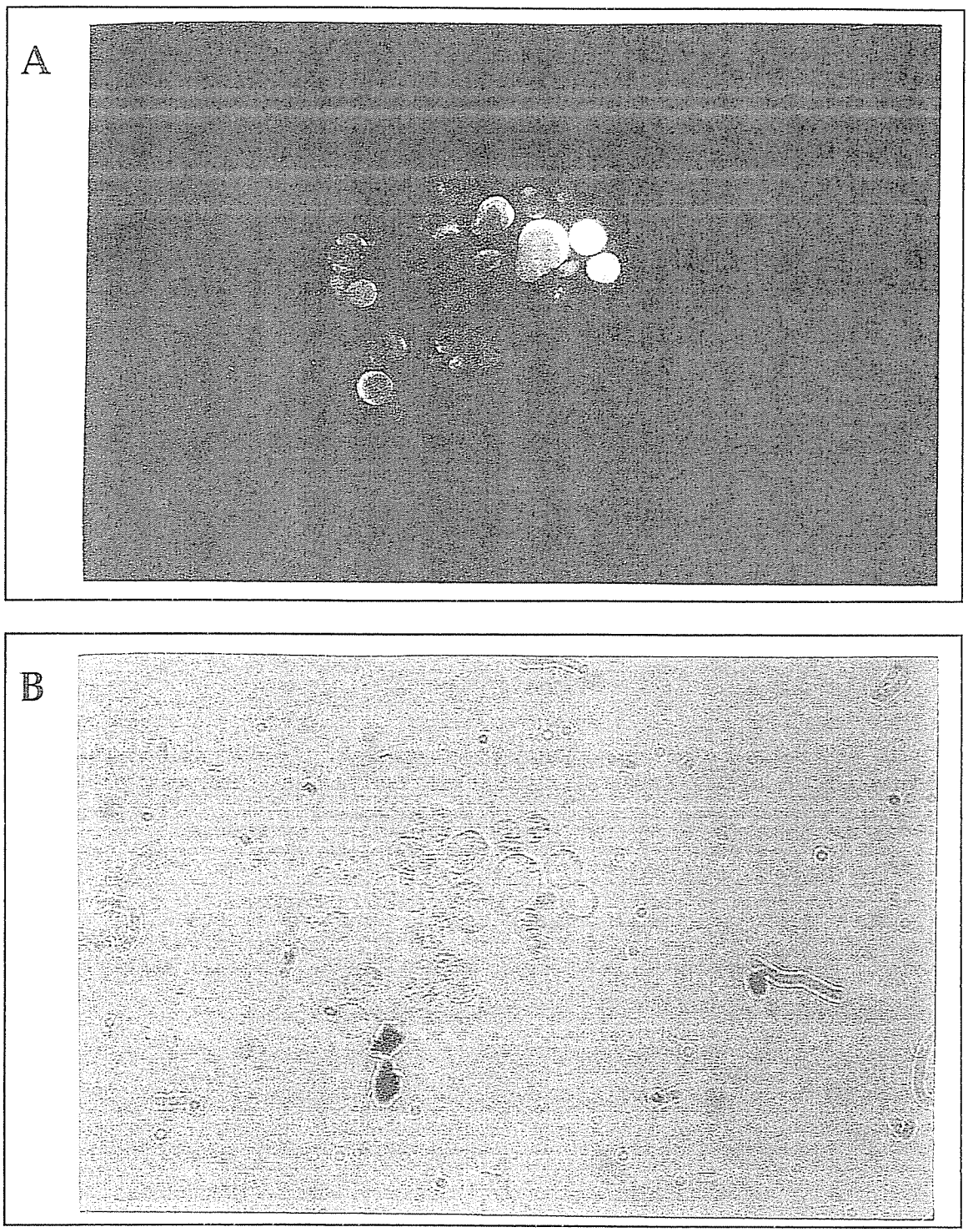


Figura 24: Análise da ativação do gene da EGFP presente em pYES-EGFP sob microscopia de fluorescência. A cultura de células transformadas com os plasmídios pYES-EGFP e pCL1 (que expressa o indutor Gal4) foi submetida a microscopia de fluorescência. Foi possível detectar a fluorescência das células quando o filtro de excitação apropriado era utilizado (A). As mesmas células visualizadas por microscopia ótica estão mostradas (B). Contagens de vários campos indicaram que 98% das células apresentam fluorescência.

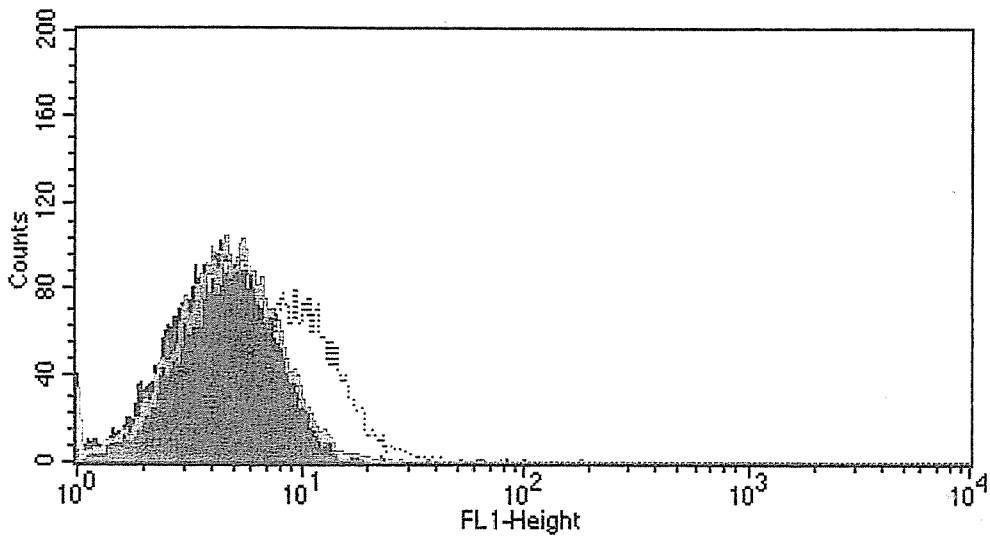


Figura 25: Análise em citometria de fluxo da intensidade de fluorescência das células transformadas com os plasmídios pYES-EGFP e pCL1. Culturas de leveduras YJ0Z contendo o plasmídio pYES-EGFP apenas (em verde) ou conjuntamente o plasmídio pCL1 (em rosa) foram analisadas. Como um controle adicional, foram utilizadas leveduras YJ0Z contendo apenas o plasmídio pYES-glico1, portanto sem a presença de EGFP (área em lilás). As células provenientes de pré-cultura em meio líquido foram diluídas para uma concentração de $1x10^6$ células/ml e submetidas ao aparelho de FACScan. A distribuição de células em função da intensidade de fluorescência (FL1-Height) está mostrada.

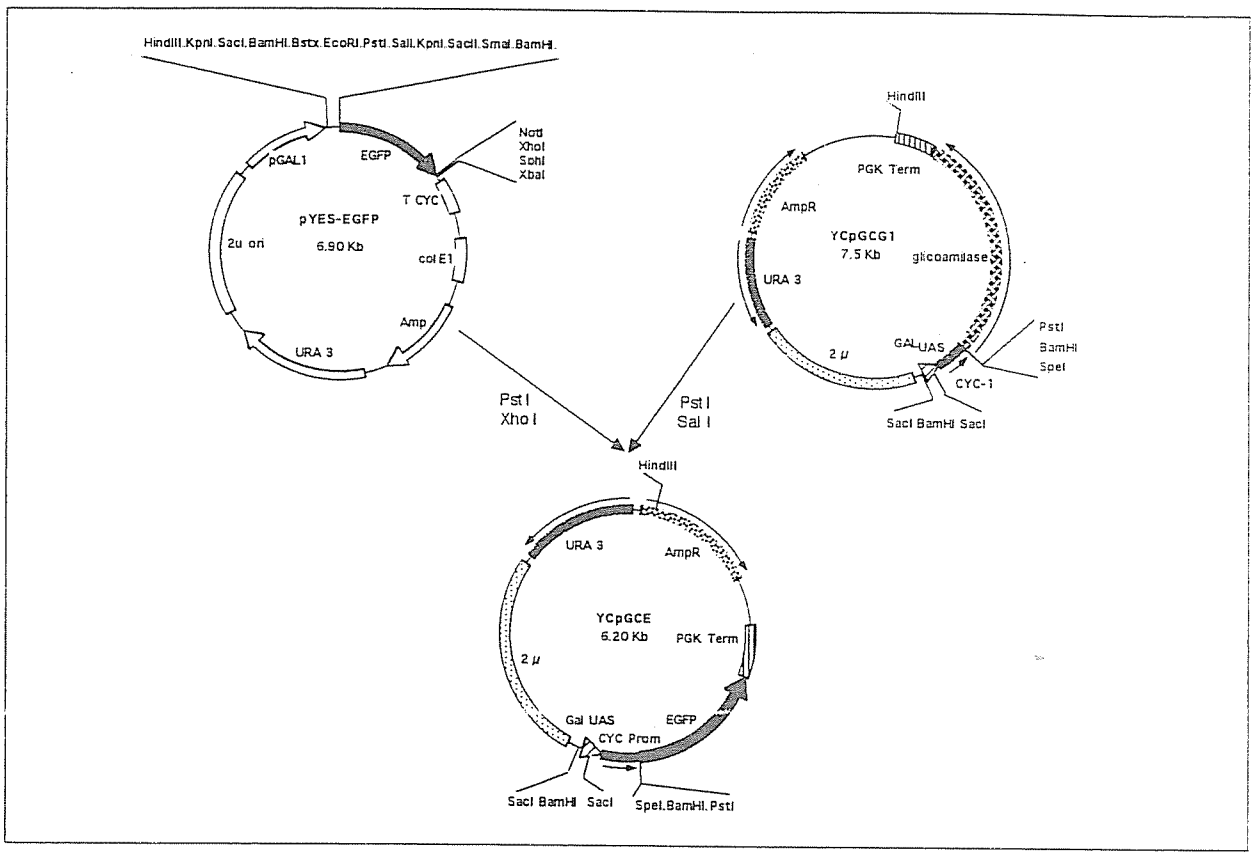


Figura 26: Esquematização da clonagem do gene EGPF sob o controle de um promotor indutível (construção de YCpGCE). O gene EGFP foi retirado do plasmídio pYES-EGFP e clonado em YCpGCG1, substituindo o gene da glicoamilase ali presente.

compatíveis. A clonagem de EGFP em YCpGC, resultando no plasmídio YCpGCE1, foi confirmada através da reação de PCR *de colônia* na qual foi amplificada uma região de ~1.1Kb quando foram utilizados iniciadores universais que se anelam a 5' de ^{GAL}UAS e a 3' do gene EGFP (figura 27).

4.2.2.4 Avaliação da eficiência da construção ^{GAL}UAS CYC-1 EGFP

O novo plasmídio YCpGCE1 foi introduzido na linhagem de levedura YJ0Z que possuía ou não o plasmídio pCL1, para a análise dos níveis de fluorescência em aparelho de FACScan. Dois controles foram utilizados no experimento. São eles: (i) leveduras contendo somente o plasmídio YCpGCE1 sem a presença do indutor e (ii) leveduras contendo o plasmídio YCpGCG1, que não contém o gene EGFP, mas o gene da glicoamilase.

As várias amostras (leveduras contendo YCpGCE1 + pCL1 ou os dois controles) foram levadas ao aparelho de FACScan, onde foi realizada a análise de fluorescência. Foi observado um nível de fluorescência significativamente maior nas leveduras que continham o gene EGFP transativado por Gal4 em relação às leveduras que expressavam o gene em níveis basais ou àquelas que não continham o gene EGFP (figura 28). O nível de expressão de EGFP a partir dessa construção é comparável ao obtido a partir do plasmídio pYES-EGFP (figura 17), com a vantagem de que o plasmídio YCpGCE1 permite a troca da seqüência UAS e oferece melhores possibilidades de construção de plasmídios derivados epissômicos ou integrativos, pois sua estrutura básica é comum a uma família de plasmídios (denominada *"set of nine"*).

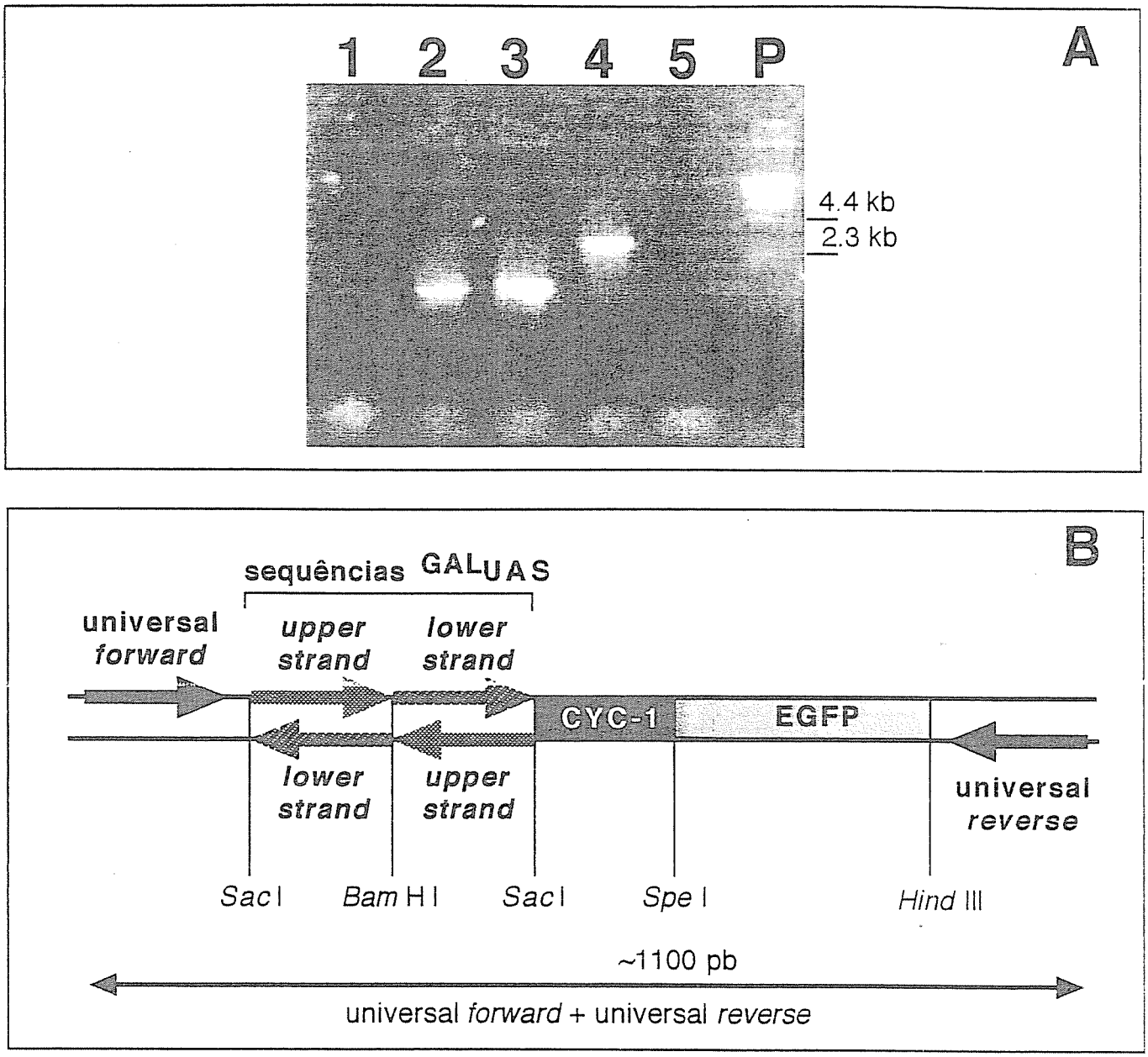


Figura 27: Verificação da construção YCpGCE1. Um ensaio de PCR *de colônia* foi realizado com vários clones recombinantes. O gel de agarose 0,8% p/v (A) mostra, para três clones escolhidos como exemplo, a amplificação (canaletas 2 e 3) ou não (canaleta 1) da região de interesse com os iniciadores representados em B (universal forward + universal reverse). A canaleta 4 mostra a amplificação, com os mesmos iniciadores, utilizando-se como molde o plasmídio YCpGCG1 e a canaleta 5, uma amplificação sem adição de DNA molde. Utilizou-se o padrão de tamanho molecular lambda *Hind* III (P).

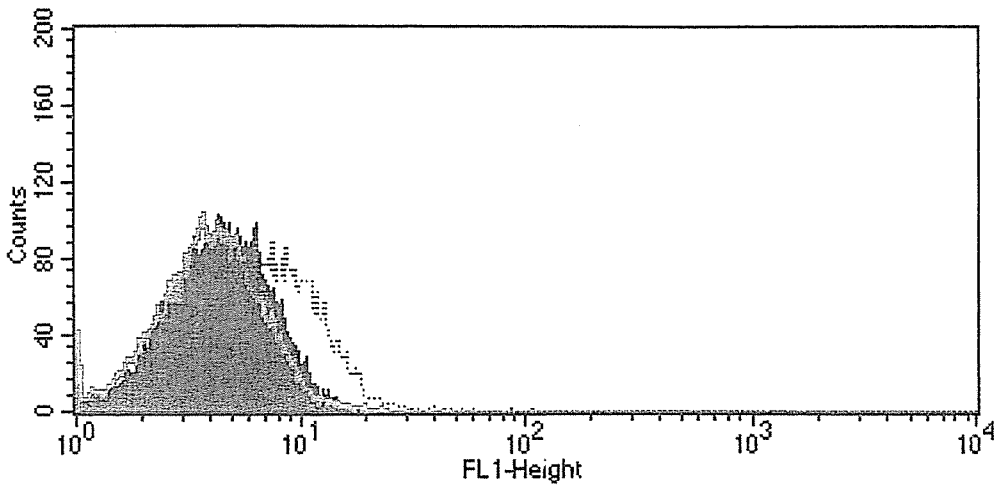


Figura 28: Análise em citometria de fluxo da intensidade de fluorescência das células transformadas com os plasmídios YCpGCE1 e pCL1. Culturas de leveduras YJ0Z contendo o plasmídio YCpGCE1 apenas (em verde) ou conjuntamente o plasmídio pCL1 (em rosa) foram analisadas. Como um controle adicional, foram utilizadas leveduras YJ0Z contendo apenas o plasmídio pYES-glico1, portanto sem a presença de EGFP (área em lilás). As células provenientes de pré-cultura em meio líquido foram diluídas para uma concentração de $1x10^6$ células/ml e submetidas ao aparelho de FACScan. A distribuição de células em função da intensidade de fluorescência (FL1-Height) está mostrada.

4.3 O GENE CAN1

O gene CAN1 foi o último dos três genes a ser testado. Este gene foi testado para uso como repórter no sistema de duplo-híbrido reverso, pois a seleção é dirigida contra a interação dos híbridos.

A expressão de CAN1 resulta na produção de uma permease utilizada normalmente para importe de L-arginina, mas que é capaz de transportar o análogo tóxico L-canavanina. Portanto, o gene CAN1 só pode ser utilizado como repórter em leveduras que não importam L-canavanina. Paralelamente à construção de plasmídios contendo o gene repórter sob controle de um promotor indutível, concentrações da droga que distinguem leveduras que expressam ou não o transportador devem ser determinadas e mutantes resistentes a partir de linhagens sensíveis de interesse devem ser isolados.

4.3.1 Análise de resistência a L-canavanina em quatro linhagens de leveduras

Sendo $CAN1^{+}$ um gene intrínseco de *Saccharomyces cerevisiae*, é necessário que as leveduras hospedeiras do sistema sejam mutantes can^{R}, ou seja, apresentem fenótipo de resistência a L-canavanina (L-can). Deste modo, foi feita uma análise quanto à resistência a L-can das quatro linhagens modificadas para o sistema de duplo-híbrido (HF7c, CG-1945, YJ0Z e Y190) que vinham sendo utilizadas.

Foi verificado que houve crescimento de todas as quatro linhagens de leveduras nas placas que não continham L-can. Porém, nas placas com 0, 5, 10, 20, 40 e 80μg/ml de L-can só houve crescimento de duas linhagens, sendo elas: HF7c e CG-1945 (figura 29). Portanto, estas linhagens apresentam um fenótipo de resistência a L-can enquanto que as linhagens Y190 e YJ0Z apresentam um fenótipo de sensibilidade a L-canavanina.

4.3.2 Obtenção de leveduras YJ0Z e Y190 mutantes resistentes a L-can

Aproximadamente $3,5x10^{7}$ células de YJ0Z foram semeadas em uma placa contendo 10μg/ml de L-can, enquanto que aproximadamente $2,3x10^{7}$ células Y190 foram semeadas em outra placa com a mesma concentração de L-can. Quarenta e oito horas depois foi verificada a presença de 53 colônias de leveduras YJ0Z e 24 colônias de Y190.

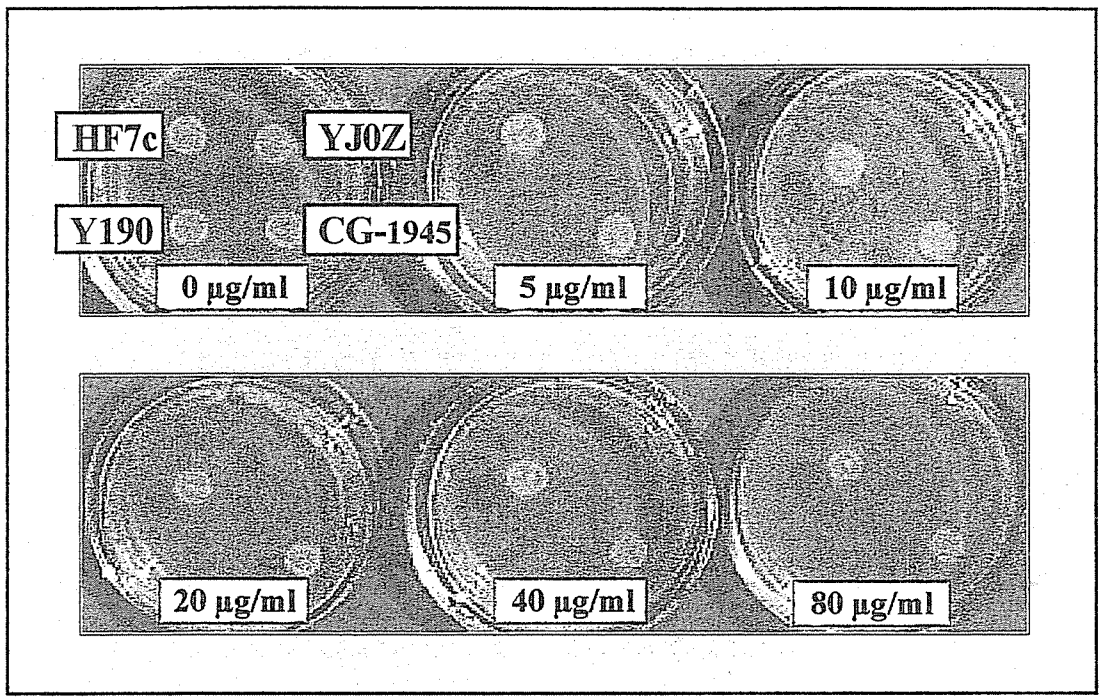


Figura 29: Análise de sensibilidade a L-canavanina de 4 linhagens de levedura utilizadas no sistema de duplo-híbrido. Culturas em meio SD completo das 4 linhagens indicadas (HF7c, YJ0Z, Y190 e CG-1945) foram diluídas para a concentração de 10.000 células / 10µl e este volume foi utilizado em teste *de pingos* (ver "Material e Métodos"). As placas de meio SD completo contendo as concentrações indicadas de L-can foram incubadas por 2 dias a 30°C. Apenas HF7c e CG-1945 são resistentes à droga.

Testes *de pingos*, onde alíquotas de culturas estacionárias são depositadas sobre meio sólido e secas sob fluxo laminar, foram feitos com algumas destas colônias para se confirmar o fenótipo de resistência a altas concentrações de L-can. Esta resistência foi confirmada pelo crescimento confluente a partir de todos os pingos feitos nestas placas (figura 30). O mesmo experimento foi feito com dez clones sobreviventes a L-can da linhagem Y190, obtendo-se o mesmo resultado (não mostrado).

4.3.3 Teste de sobrevivência a L-can com as leveduras mutantes e selvagens para o gene CAN1

Foi realizado um teste de sobrevivência com alguns clones mutantes resistentes a L-can (can^R) e leveduras selvagens sensíveis a L-can, tanto para a linhagem Y190 quanto para a linhagem YJ0Z.

A análise de sobrevivência das leveduras foi feita através da contagem de colônias geradas num período de incubação de 3 dias, tendo-se sempre como referência placas contendo meio sem L-can, onde o número de colônias geradas representa 100% de sobrevivência.

Foi verificado que não houve crescimento de nenhuma colônia nas placas que foram semeadas com 1800 leveduras selvagens para o gene CAN1, a não ser nas placas que não continham L-can. Nestas últimas placas foram semeadas 300 células em duplicatas e cresceram 125±15 colônias de Y190 e 57±14 colônias de YJ0Z, o que nos permite calcular que cresceriam 750 e 342 colônias de Y190 e YJ0Z, respectivamente, a partir de 1800 células semeadas, considerando-se a eficiência de plaqueamento fornecida pelas placas sem L-can. Assim, a sobrevivência a L-can foi <0,13% para Y190 e <0,29% para YJ0Z.

Entretanto, para as leveduras $can1^R$, aproximadamente 100% das leveduras viáveis conseguiram crescer independentemente da concentração de L-can utilizada no experimento. A figura 31 mostra a sobrevivência a L-can das leveduras mutantes e selvagens da linhagem Y190 e da linhagem YJ0Z. Nota-se que a menor concentração de L-can utilizada, 5μg/ml, foi suficiente para distinguir os fenótipos resistente e sensível.

4.3.4 Padronização dos experimentos utilizando promotor constitutivo

Com as quatro linhagens can^R disponíveis, foi feita a análise de sensibilidade a L-can quando se introduz nestas hospedeiras o plasmídio TLC1 (LEU2, cedido pelo pessoal

4.3.4 Padronização dos experimentos utilizando promotor constitutivo

Com as quatro linhagens can^R disponíveis, foi feita a análise de sensibilidade a L-can quando se introduz nestas hospedeiras o plasmídio TLC1 (LEU2, cedido pelo pessoal

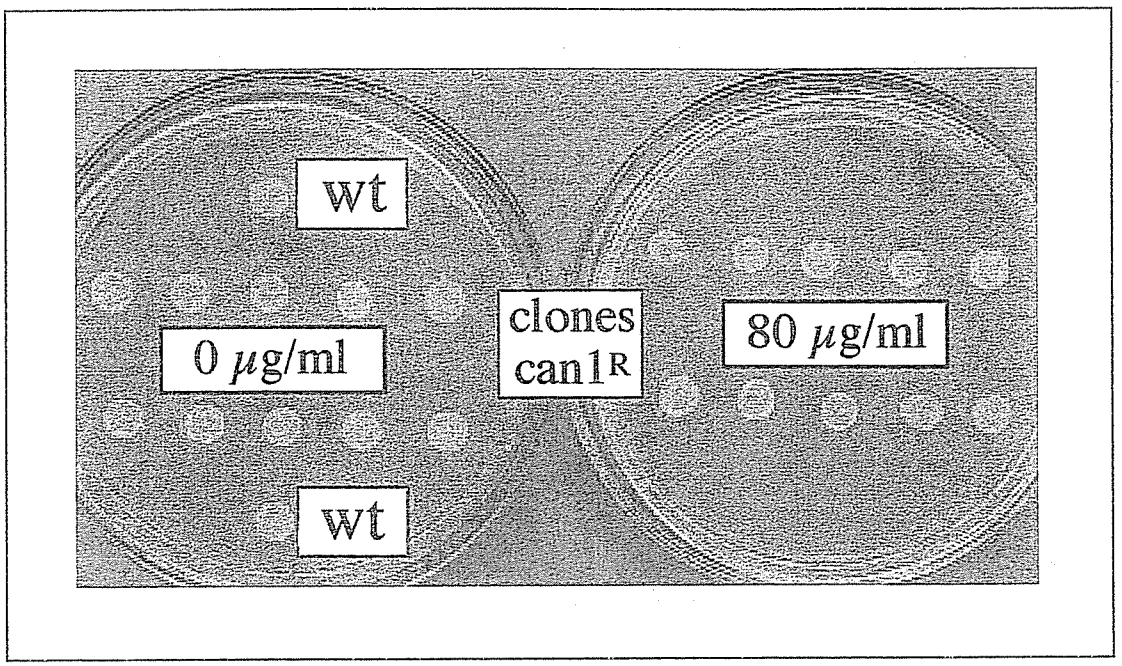


Figura 30: Análise de sensibilidade de leveduras YJ0Z $can1^R$ a L-can. Mutantes $can1^R$ espontâneos da linhagem YJ0Z foram isolados a partir de colônias sobreviventes a 10 μg/ml de L-canavanina. Dez clones foram cultivados em meio líquido SD completo e submetidos a teste *de pingos* (alíquotas de 10 μl de culturas estacionárias) juntamente com dois clones controle (YJ0Z selvagem - wt, sensível a L-can).

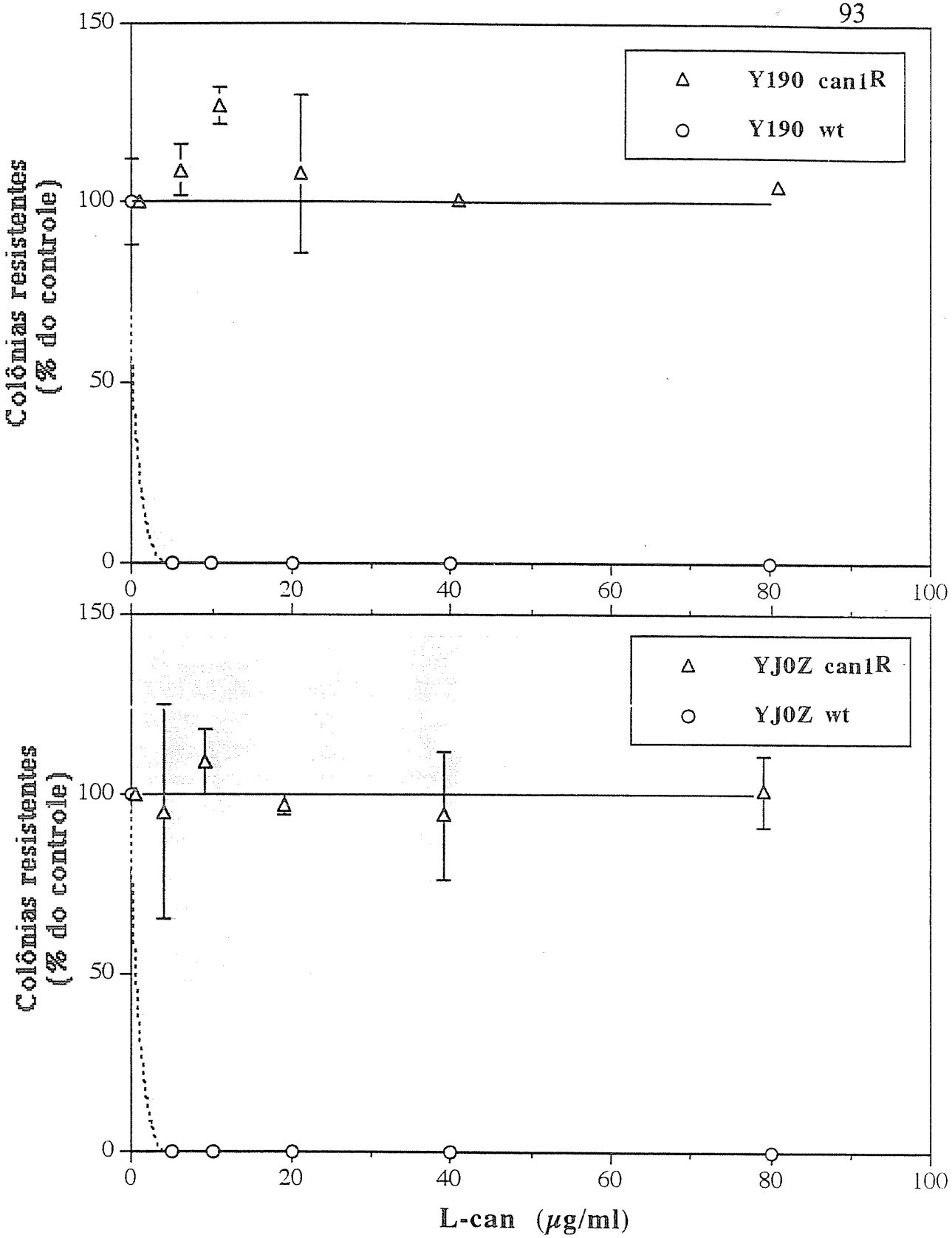


Figura 31: Verificação de resistência a L-can de clones mutantes can1^R espontâneos. Clones de Y190 e YJ0Z resistentes a 10μg/ml de L-canavanina foram cultivados em meio SD completo e o número apropriado de células (1800 células, exceto quando se esperava 100% de sobrevivência, onde foram plaqueadas 300 células) foi utilizado para plaqueamento em meio sólido nas concentrações indicadas de L-can (placas de 5cm de diâmetro). Após 72 horas de incubação, o número de colônias resistentes foi anotado e calculou-se a porcentagem de sobrevivência com relação ao controle sem L-canavanina. Está mostrada a média entre duplicatas.

laboratório de Genética de Microrganismos, ICB, USP) contendo o gene CAN1 sob o controle de um promotor constitutivo.

As linhagens HF7c can^R, YJ0Z can^R e Y190 can^R foram transformadas com o plasmídio TLC1 e como controle foi feita outra transformação utilizando as mesmas leveduras, mas desta vez introduzindo-se o plasmídio pCL1 que também apresenta a marca de seleção LEU2. Após a transformação, os testes *de pingos* e de sobrevivência foram conduzidos nas mesmas condições feitas anteriormente. A figura 32 mostra os resultados obtidos para YJ0Z can^R. Os resultados obtidos para Y190 can^R foram semelhantes (não mostrado). A figura 33 mostra que a resistência a L-can apresentada pela linhagem HF7c era devida à falta de expressão da permease.

Portanto, foi possível produzir o fenótipo de sensibilidade a L-can naquelas linhagens que continham o plasmídio TLC1, o mesmo não acontecendo para aquelas que continham o plasmídio pCL1. A função de pCL1 foi apenas restabelecer prototrofia para leucina.

4.3.5 Construção do gene CAN1 sob o controle de um promotor indutível

A primeira construção utilizando o gene CAN1 foi feita para sua utilização como repórter sob o controle do promotor GAL1 contido em pYES2.

O plasmídio TLC1 foi digerido com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Nco* I e o fragmento liberado, referente ao gene CAN1 e uma seqüência 3' adicional, foi purificado. O vetor pET-28-a (NOVAGEN) também foi digerido com *Bam* HI e *Nco* I e purificado para a clonagem do fragmento CAN1 . Esta clonagem foi necessária pois os sítios de restrição presentes em pYES2 não eram compatíveis com os sítios presentes no fragmento CAN1 , o que dificultava a clonagem. A verificação desta clonagem foi feita pela visualização de uma banda de ~1.8Kb, em um gel de agarose 1%, referente a digestão do novo vetor com a enzima de restrição *Sal* I.

Este novo vetor foi então digerido com as enzimas de restrição *Bam* HI e *Xba* I para novamente liberar um fragmento referente ao gene CAN1 , a seqüência 3' adicional e agora um sítio de *Xba* I. O vetor pYES2 foi também digerido com as enzimas *Bam* HI e *Xba* I e após purificação de fragmento e vetor, fez-se a ligação (esquematizada na figura 34). A verificação da construção do novo plasmídio pYES-CAN foi feita pela digestão com a enzima *Sal* I que, neste caso, torna este plasmídio linear e com tamanho de ~8,9Kb.

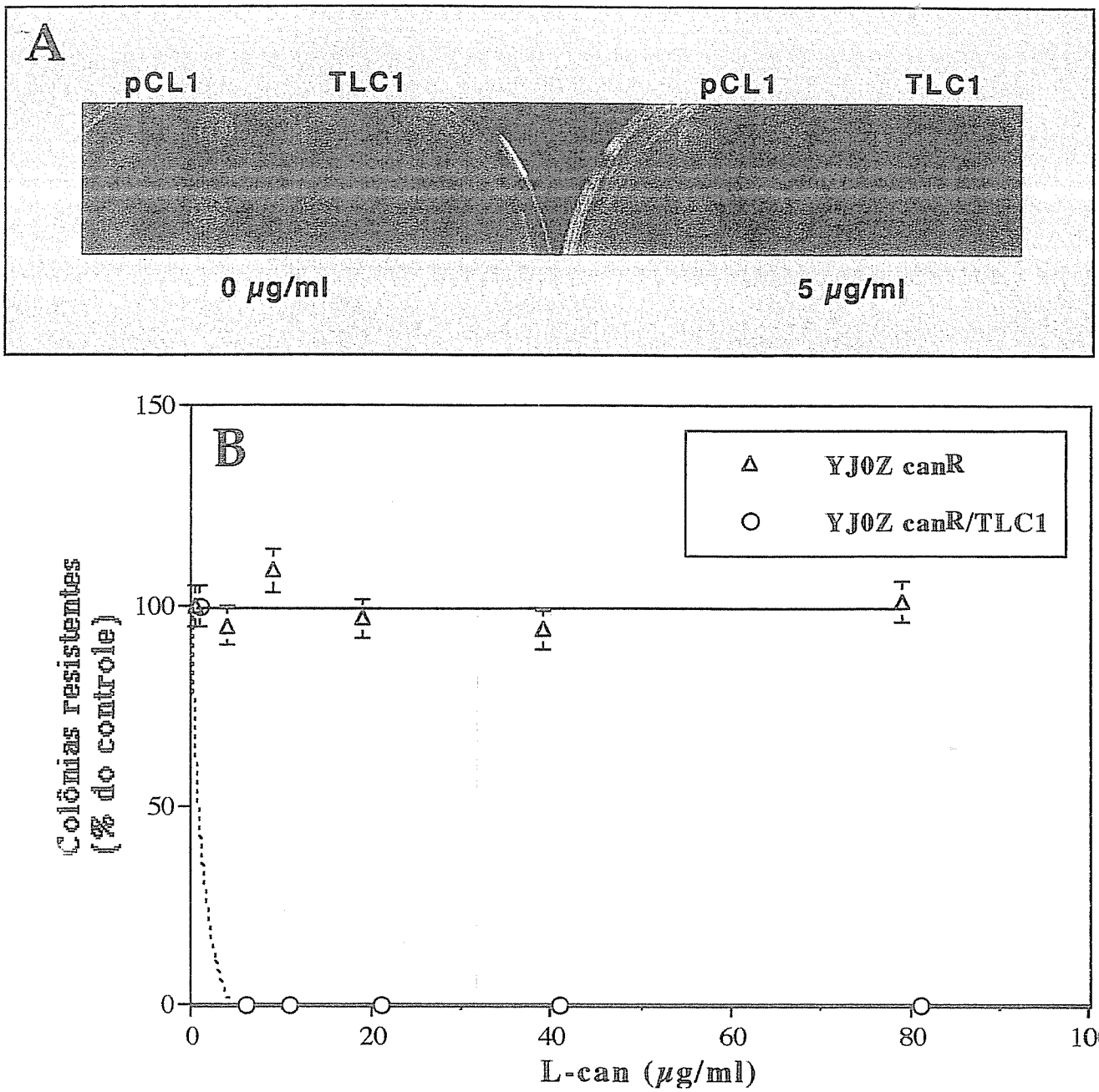


Figura 32: Sensibilidade a L-can restituída a leveduras YJ0Z can^R por expressão constitutiva de CAN1$^+$. A linhagem YJ0Z can^R foi transformada com os plasmídios pCL1 (plasmídio LEU2 não relacionado) ou TLC1 (também LEU2 e que expressa CAN1$^+$ constitutivamente). Dez µl de culturas estacionárias foram utilizados para teste *de pingos* sobre placas SD -LEU contendo as concentrações indicadas de L-canavanina. Está mostrado o crescimento após incubação por 48 horas de 4 clones para cada tipo de transformação (A). Ensaios de sobrevivência a L-can foram conduzidos, comparando-se a linhagem YJ0Z can^R transformada com TLC1 ou sem plasmídio (B). Foram plaqueadas 1800 ou 300 células quando estas continham ou não TLC1, respectivamente, salvo em placas sem L-canavanina, onde foram plaqueadas 300 células. O aparecimento de colônias foi anotado após 72 horas e está mostrada a porcentagem de sobrevivência com relação ao controle sem L-can (média entre duplicatas).

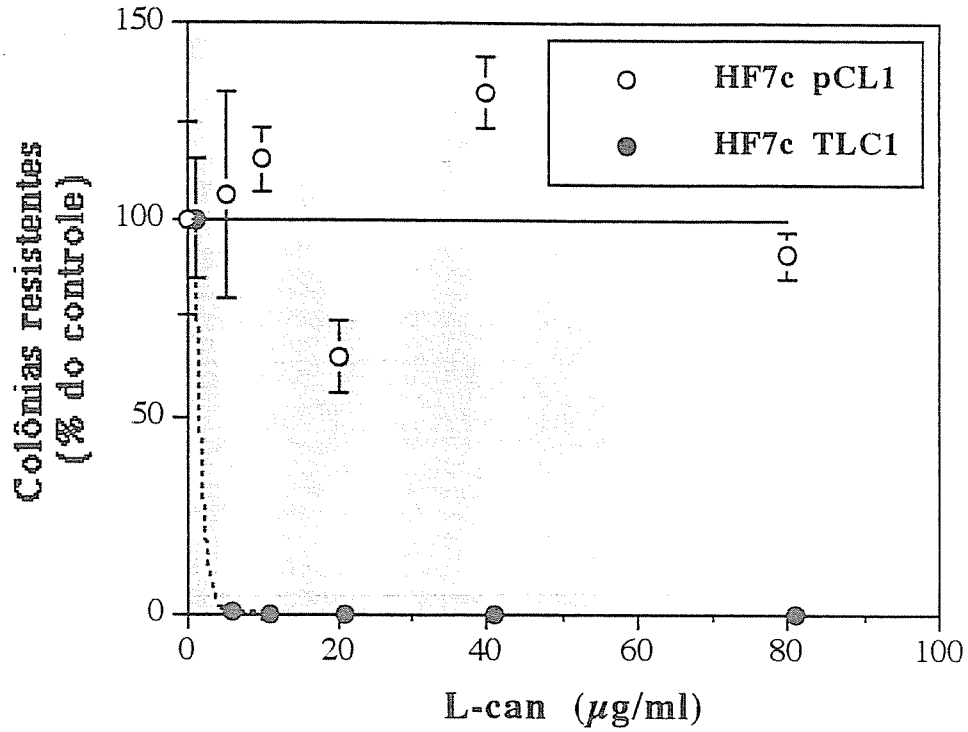


Figura 33: Sensibilidade a L-can conferida a leveduras HF7c por expressão constitutiva de CAN1⁺. A linhagem HF7c foi transformada com os plasmídios pCL1 (plasmídio LEU2 não relacionado) ou TLC1 (também LEU2 e que expressa CAN1⁺ constitutivamente). Ensaios de sobrevivência a L-can foram conduzidos, comparando-se a linhagem HF7c transformada com TLC1 ou com pCL1. Foram plaqueadas 1800 ou 300 células quando estas continham ou não TLC1, respectivamente, salvo em placas sem L-canavanina, onde foram plaqueadas 300 células. O aparecimento de colônias foi anotado após 72 horas e está mostrada a porcentagem de sobrevivência com relação ao controle sem L-can (média entre duplicatas).

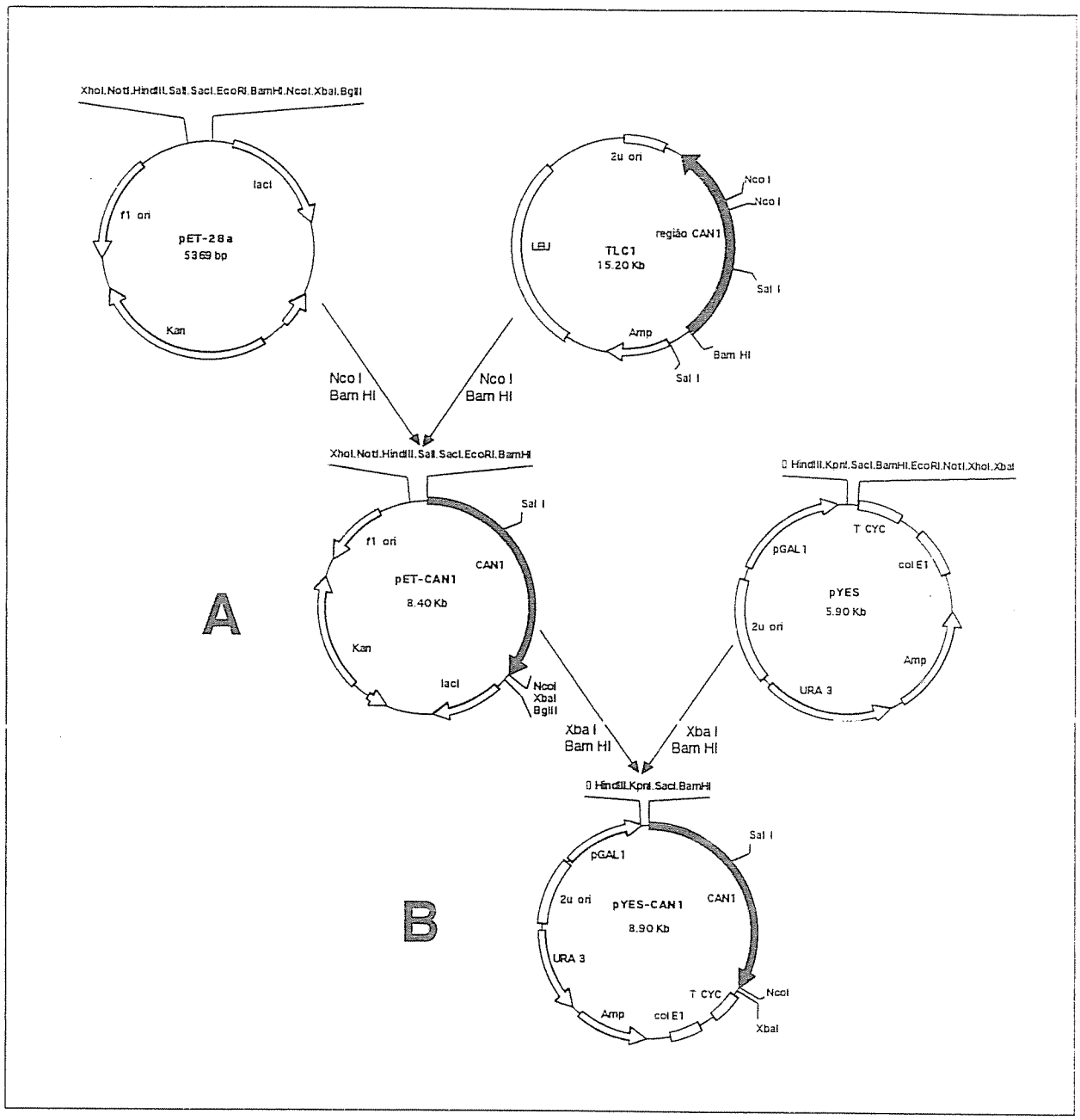


Figura 34: Esquematização da clonagem do gene CAN1$^+$ sob o controle de um promotor indutível (construção de pYES-CAN). Duas etapas foram realizadas para esta construção: (A) clonagem do gene CAN1$^+$ em pET-28a para ganho do sítio *Xba* I; (B) clonagem do gene CAN1$^+$ em pYES2, obtendo-se pYES-CAN.

4.3.5.1 Avaliação da eficiência da construção pYES-CAN

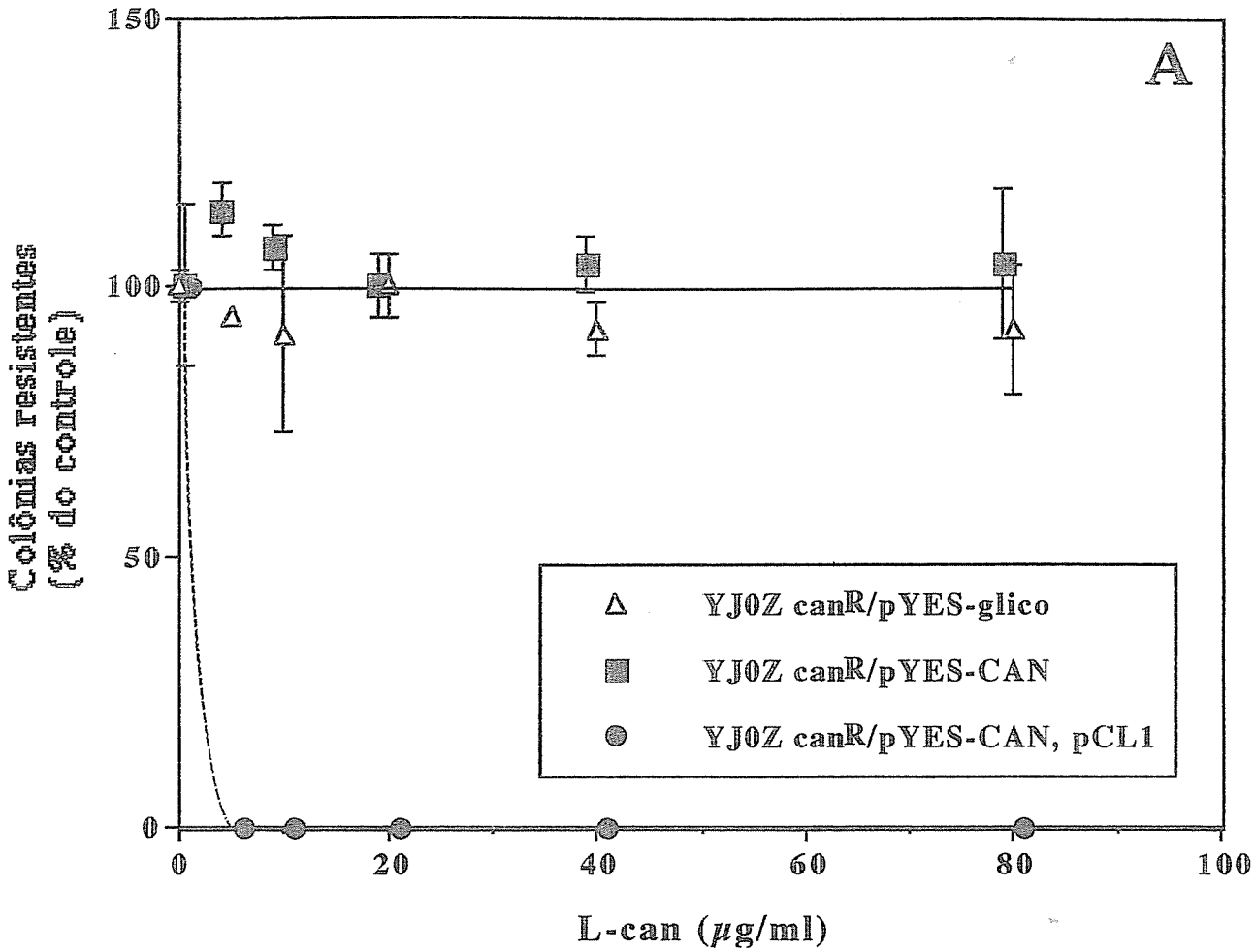
A linhagem de levedura YJ0Z can1^R foi transformada com o plasmídio pYES-CAN (URA3) juntamente com o plasmídio pCL1 (que expressa Gal4 inteira) e algumas leveduras transformadas que cresceram em placas SD -URA -LEU foram escolhidas para se fazer os testes *de pingos* e de sobrevivência (figura 35). Estes testes foram conduzidos nas mesmas condições feitas anteriormente. A análise dos testes revelou que o gene repórter CAN1$^+$ é sensível pois as leveduras que continham o plasmídio pYES-CAN juntamente com pCL1 apresentaram alta sensibilidade a L-can (a sobrevivência frente a 5μg/ml de L-can foi <0,08%, já que a eficiência de semeadura em placas neste experimento foi de 70% e 1800 células foram semeadas nessa placa). Já aquelas leveduras que continham somente o plasmídio pYES-CAN apresentaram alta resistência a L-can (~100% de sobrevivência a 80μg/ml). Portanto, o gene CAN1$^+$ pode ser utilizado em ensaios de seleção reversa de fatores transativadores.

4.3.6 Análise da eficiência da construção pYES-CAN utilizando a interação híbrida GBD-p53 GAD-lT como indutora

Os plasmídios pVA3 (TRP1, que expressa o híbrido 1 GBD-p53) e pTD1 (LEU2, que expressa o híbrido 2 GAD-lT) foram utilizados na transformação da levedura YJ0Z can1^R juntamente com o plasmídio pYES-CAN (URA3). Esta transformação foi feita para se testar a capacidade de ativação de transcrição do gene repórter quando se utilizam dois híbridos que se interagem fortemente, tais como p53 murina e o antígeno *largeT* (lT) de SV40.

Após a transformação, alguns clones foram escolhidos para se fazer o teste de sobrevivência. Foi verificado o aparecimento de colônias nas placas com até 20μg/ml de L-can. Nas placas com concentrações de L-can superiores a 40μg/ml não houve aparecimento de colônias (figura 36A). Levando-se em conta a eficiência de plaqueamento deste experimento que se manteve em torno de 30%, pode-se afirmar que <0,5% das colônias crescem nas placas com concentrações de L-can superiores a 40μg/ml (1800 células semeadas). Portanto, o gene CAN1 é sensível a ativação de transcrição por duplo-híbrido.

Variações na sensibilidade a L-can poderiam ocorrer devido ao fato do plasmídio pYES-CAN, que contém o gene repórter, ser epissômico, tendo um número de cópias



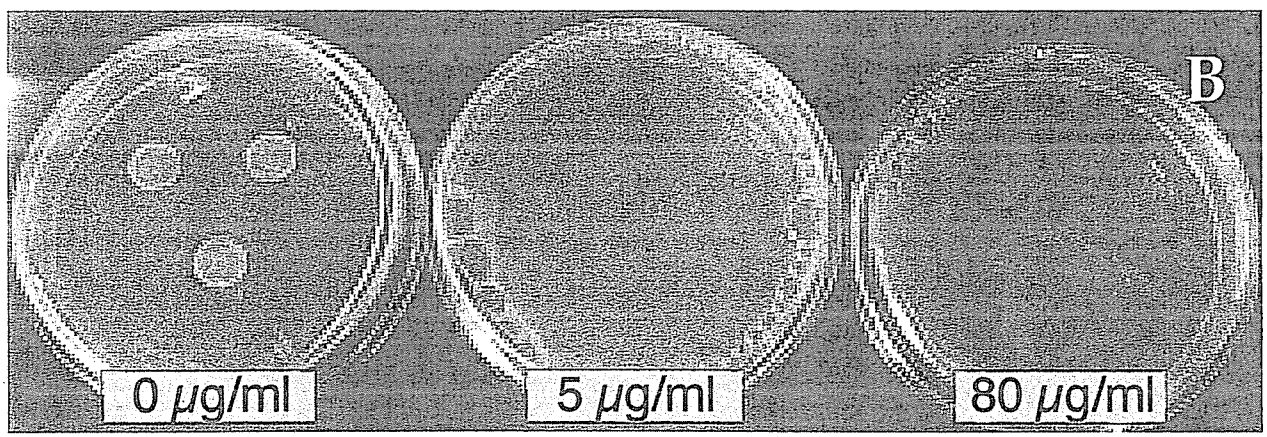


Figura 35: Sensibilidade a L-canavanina de leveduras YJ0Z can^R transformadas com pYES-CAN e pCL1. A linhagem YJ0Z can^R foi transformada com os plasmídios pYES-CAN e pCL1 (que expressa o indutor Gal4). Como controle, foi utilizada a mesma linhagem transformada com pYES-glico ou com pYES-CAN somente, sem indutor. Para ensaio de sobrevivência (A) foram plaqueadas 1800 células ou 300 células quando as leveduras tinham a expressão de CAN1$^+$ induzida ou não, respectivamente, salvo em placas sem L-canavanina, onde foram plaqueadas 300 células. O aparecimento de colônias foi anotado após 72 horas e está mostrada a porcentagem de sobrevivência com relação ao controle sem L-can (média entre duplicatas). A sensibilidade a L-canavanina de YJ0Z can^R transformadas com pYES-CAN e pCL1 pode ser demonstrada em teste *de pingos*, onde três clones foram analisados nas concentrações indicadas de L-can (B).

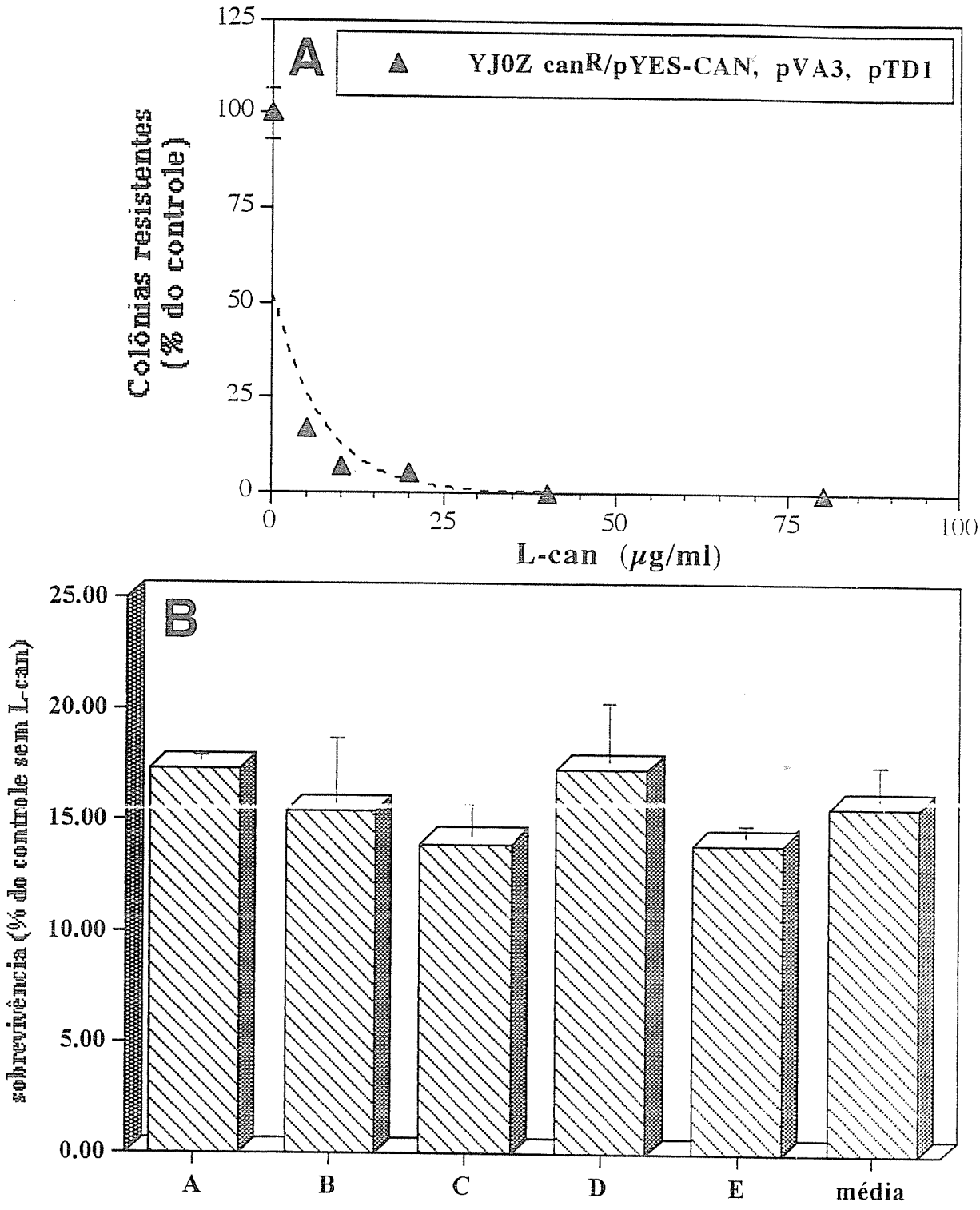


Figura 36: Sensibilidade a L-canavanina de leveduras YJ0Z can^R transformadas com pYES-CAN e com plasmídios que formam duplo-híbrido. A linhagem YJ0Z can^R foi transformada com os plasmídios pYES-CAN, pVA3 (que expressa GBD fusionado a p53 murina, resíduos 72-390) e pTD1 (que expressa GAD fusionado aos resíduos 84-708 do antígeno *large*T de SV40). Para se determinar a sobrevivência às concentrações indicadas de L-can (A) foram semeadas 1800 células, salvo em placas sem L-canavanina, onde foram plaqueadas 300 células. O aparecimento de colônias foi anotado após 72 horas e está mostrada a porcentagem de sobrevivência com relação ao controle sem L-can (média entre duplicatas). Cinco clones independentes da placa sem L-can (denominados **A** - **E**) foram cultivados por 2 semanas em meio líquido seletivo, com diluições de 1:100 a cada dois dias, quando então foram ensaiados quanto à sobrevivênicia a 5 μg/ml de L-canavanina como em A. Estão mostradas a média entre duplicatas para os clones **A** - **E** e a **média** e o desvio padrão para todos os valores obtidos.

por célula variável a um certo grau. A análise de variação clonal é um importante experimento para se testar a reprodutibilidade, em ensaios de duplo-híbrido, de um sistema que utiliza plasmídios episssômicos. Para tanto, cinco clones de YJ0Z can1^R contendo pYES-CAN, pVA3 e pTD1 foram cultivados em meio líquido SD -URA -LEU -TRP sob agitação a 30°C por duas semanas, sendo diluídos numa proporção de 1:100 a cada dois dias. Após este período, a concentração de células de cada clone foi determinada e 200 células foram semeadas em placas sem L-can enquanto 2000 células foram semeadas em placas contendo 5µg/ml de L-can. Duplicatas foram feitas para cada um dos 5 clones. Após a incubação a 30°C por 72 horas, as placas foram analisadas e as colônias contadas. Não houve variação significativa no número de colônias sobreviventes nos clones totalmente independentes (figura 36B), sugerindo que o sistema pode ser utilizado mesmo com o gene repórter albergado em plasmídio episssômico.

O próximo passo seria determinar a fração de leveduras viáveis quando se semeia um número de células equivalentes ao usado para se fazer uma seleção de mutantes e, portanto, estabelecer a concentração ideal de L-can a ser utilizada para a seleção de mutantes de p53 ou lT que não mais interagem. É plausível supor que investigadores interessados em varrer uma biblioteca de 10.000 mutantes aceitariam a presença de 1-10 clones sobreviventes que na verdade apresentam a interação. A ativação ou não do gene repórter *lacZ*, também presente na levedura YJ0Z, poderia facilmente distinguir clones positivos (que perderam a interação) de clones com interação que escaparam do evento letal.

4.3.7 Estabelecimento de concentração ideal de L-can a ser utilizada para a interação híbrida p53+lT

Para se estabelecer a concentração de L-can que deve ser utilizada em um experimento de duplo-híbrido deve-se analisar a quantidade de células usadas no experimento e a concentração ideal da droga para que todas elas sejam inviáveis quando ocorre a interação dos híbridos. No caso da interação de p53 com lT, os resultados iniciais (figura 36A) mostraram que 40µg/ml foram suficientes para a inviabilidade de todas as células semeadas (neste caso foram semeadas 1.800 células em placas de 5cm de diâmetro).

No experimento cujos resultados encontram-se na Tabela 2, várias placas (agora de 10cm de diâmetro) contendo 100µg/ml de L-can foram utilizadas de modo que em cada uma delas variou-se o número de células semeadas. Assim, placas em duplicatas

contendo 10^3, 10^4, $0,5x10^5$ e 10^5 células foram incubadas por 72 horas e analisadas. Como controle, 10^3 células foram semeadas em placas sem L-can.

Tabela 2: Contagem das células sobreviventes a 100 µg/ml de L-can quando albergam os plasmídio pYES-CAN, pTD1 e pVA3

N° de células semeadas	[L-can] µg/ml	N°de colônias placa 1	N° de colônias placa 2	Média	% de sobreviventes
10^3	0	361	307	334	100 +/- 18
10^3	100	0	0	0	<0,3
10^4	100	7	9	8	0,29 +/- 0,05
$0,5x10^5$	100	46	46	46	0,3 +/- 0
10^5	100	106	116	111	0,38 +/- 0,03

Aproximadamente 0,38% das leveduras viáveis semeadas em cada placa contendo L-canavanina sobreviveram à droga. Foi observado o aparecimento de colônias facilmente diferenciáveis entre grandes ou pequenas, nas placas contendo 100µg/ml de L-can. Desta forma, as colônias grandes representavam 0,28% de sobrevivência enquanto que 0,1% de sobrevivência era devido à contribuição de colônias bem menores (não mostrado). É importante ressaltar que o aparecimento de colônias foi sempre analisado no terceiro dia de incubação, para não se alterar a porcentagem de colônias grandes e pequenas. A concentração de 100µg/ml foi considerada razoavelmente suficiente para varredura de biblioteca de mutantes, pois de cada 10.000 clones viáveis, apenas 40 escapariam do evento letal (falsos positivos). Uma destas colônias grandes foi escolhida para se fazer novamente um teste de sobrevivência e observou-se que 87± 0,2% das leveduras sobreviveram a 100µg/ml de L-can (dados não mostrados).

Todavia, qual seria a diferença entre as colônias pequenas e grandes das placas com L-can? Conduzimos, então, um teste de metabolização de X-Gal com algumas destas colônias, para investigar a ativação do gene repórter *lacZ*. Mutações no gene CAN1 ou que abolissem a interação levariam ao aparecimento de colônias grandes já que a permease funcional não estaria sendo expressa. Mutações que afetassem parcialmente a interação gerariam colônias pequenas que apresentariam baixa ativação do gene repórter *lacZ*. Alternativamente, essas colônias pequenas representariam sobreviventes que escaparam do evento letal.

4.3.7.1 Ativação do repórter *lacZ* em colônias obtidas das placas contendo 100 μg/ml de L-can

Como preclaro, a linhagem de levedura YJ0Z já contém um repórter para o sistema de duplo-híbrido que está sob o controle de um promotor responsivo a Gal4. Este repórter (denominado *lac*Z), quando ativado pela interação híbrida p53+lT, produz a enzima beta-galactosidase que degrada o substrato X-Gal e torna a levedura azul. Assim, foi possível conduzir um teste de X-Gal com leveduras provenientes de colônias grandes e pequenas da placa com 100μg/ml de L-can para verificar se a interação híbrida ocorria ou não nessas leveduras.

Vinte e cinco colônias grandes e vinte colônias pequenas foram escolhidas para que se fizesse um teste de X-Gal. Como controle, algumas colônias da placa sem L-can também foram escolhidas.

Após o contato com o substrato X-Gal e a incubação por uma hora a 37°C, foi verificado que, assim como as leveduras controle, aquelas leveduras oriundas das colônias pequenas também se tornaram azuis. É importante ressaltar que a tonalidade e a cinética de aparecimento da cor azul foi diferente nos dois casos, de maneira que as colônias controle adquiriram uma tonalidade bem mais forte do que as leveduras das colônias pequenas (figura 37A). Surpreendentemente, todas as colônias grandes testadas eram brancas e, portanto, eram mutantes que não mais ativavam os genes repórteres, sendo eles *lac*Z ou CAN1 (figura 37B). Aparentemente, mesmo as colônias pequenas apresentam mutações que afetam, embora fracamente, a interação p53 + lT (pois o teste de X-gal é feito com um subcultivo na total ausência de L-can).

Então nos perguntamos se as colônias que cresceram em placas contendo baixas concentrações de L-can também eram mutantes. Esta resposta foi dada por um teste de X-Gal realizado em seguida.

4.3.8 Teste de X-Gal com colônias sobreviventes a baixas concentrações de L-can

O mesmo procedimento realizado anteriormente foi feito com 25 colônias de cada placa contendo 1, 5 ou 10μg/ml de L-can. Somente três colônias provenientes da placa com 10μg/ml de L-can eram grandes ao terceiro dia de incubação e foram testadas juntamente com outras 22 colônias pequenas presentes nesta placa. Nas placas contendo 1 ou 5μg/ml de L-can (onde foram semeadas 2.000 células) não havia

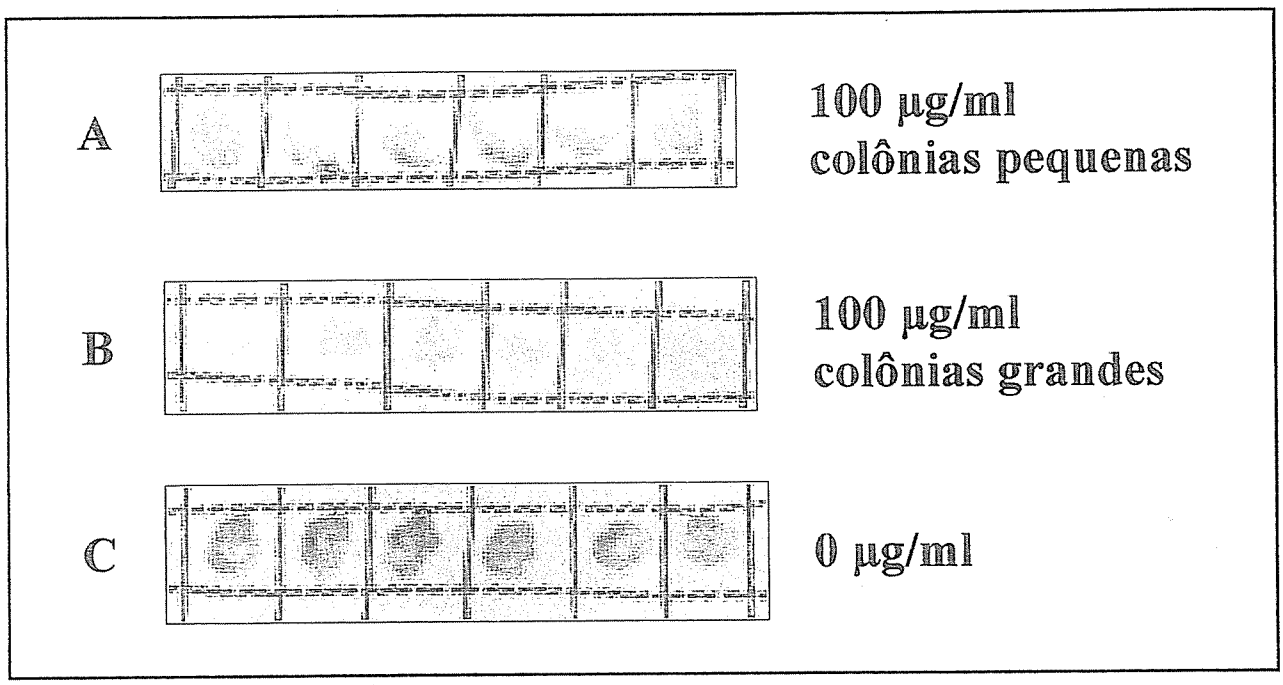


Figura 37: Ativação do gene repórter *LacZ* em leveduras resistentes a L-can. Leveduras YJ0Z can^R contendo os plasmídios pYES-CAN, pVA3 e pTD1 isoladas de placas com 100µg/ml de L-can (A, colônias pequenas e B, colônias grandes) ou de placas sem adição da droga (C) foram inoculadas em filtro de nitrocelulose sobre meio sólido seletivo SD -URA -TRP -LEU na ausência de L-can e submetidas a ensaio de metabolização de X-gal.

colônias grandes, portanto todas as quinze colônias testadas de cada uma destas placas eram pequenas. Nas placas com 10μg/ml foram semeadas 10.000 células (pois a sobrevivência é sensivelmente menor) e por isso foi possível detectar algumas colônias grandes.

Foi verificado que todas as colônias testadas provenientes das placas com 1 e 5μg/ml de L-can se tornavam azuis no ensaio de metabolização do substrato X-Gal (figura 38). A cinética de desenvolvimento da cor azul era, todavia, compatível com células não submetidas à droga, indicando que essas colônias representam sobreviventes que escaparam de eventos letais e toleraram as baixas concentrações intracelulares de L-can. A presença da droga, no entanto, claramente retardou o crescimento das leveduras.

Daquelas colônias provenientes da placa com 10μg/ml de L-can, somente as três grandes forneceram leveduras brancas (mutantes) e as restantes tornaram-se azuis (em igual intensidade a leveduras controle). Assim, o sistema de duplo-híbrido reverso baseado em $CAN1^+$ permitiu não somente o isolamento de mutantes previamente gerados, quando se trabalhou em concentrações altas de L-can, mas também abre a possibilidade de se isolar mutantes. Estes mutantes poderiam estar sendo gerados ao acaso, ou induzidos por concentrações subletais de L-canavanina (ver adiante).

4.3.9 Testes de sobrevivência acoplados a análise de tamanho das colônias

Para se entender melhor o aparecimento de mutantes resistentes a L-canavanina que perderam a capacidade de ativar também o repórter *lacZ*, foram conduzidos ensaios de sobrevivência de um clone retirado da placa sem L-can, utilizando placas (em duplicatas) contendo 0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 e 200 μg/ml de L-can, foi realizado. Nas placas com 10, 20, 30, 40 e 50 μg/ml de L-can, 10^4 células foram semeadas, enquanto que nas placas contendo 100, 150 e 200 μg/ml de L-can foram semeadas 10^5 células. Desta forma, não teríamos nenhuma placa com zero colônias. Nas placas sem L-can foram semeadas 10^3 células (figura 39).

Foi observado que houve o aparecimento de colônias grandes e pequenas nas placas com até 200 μg/ml de L-can. A sobrevivência a essa concentração da droga foi de 0,23%, o que representaria a ocorrência de 23 resistentes a cada 10.000 leveduras analisadas. Aparentemente, a freqüência de colônias grandes permanece constante, mesmo aumentando-se em muito a concentração de L-canavanina. Estas colônias representam 0,21% do total, seja quando se utilizam 10 ou 200 μg/ml de L-can. A

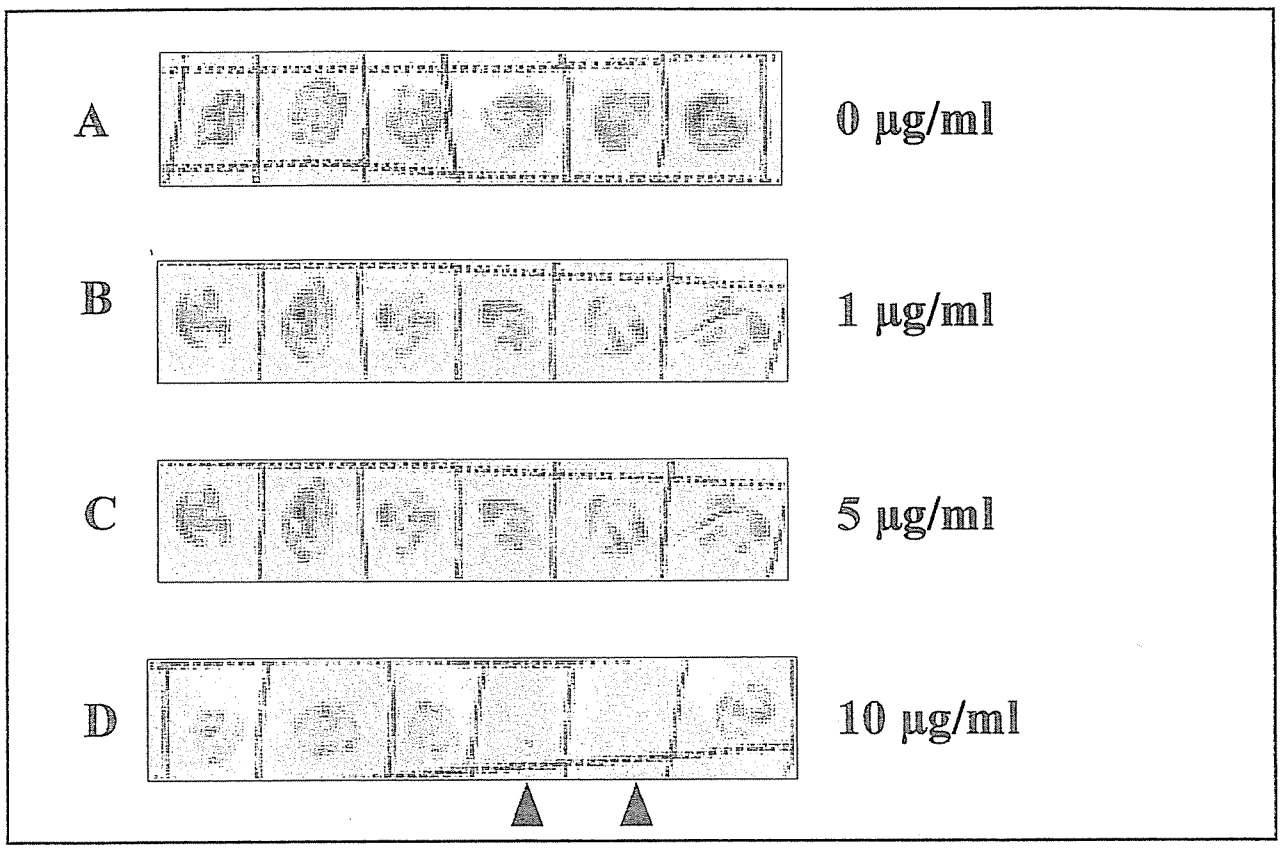


Figura 38: Ativação do gene repórter *LacZ* em leveduras sobreviventes a concentrações baixas de L-can. Leveduras YJ0Z can^R contendo os plasmídios pYES-CAN, pVA3 e pTD1 isoladas de placas com as concentrações indicadas de L-can foram inoculadas em filtro de nitrocelulose sobre meio sólido seletivo SD -URA -TRP -LEU na ausência de L-can e submetidas a ensaio de metabolização de X-gal. Setas indicam leveduras isoladas de duas dentre as três colônias grandes presentes na placa com 10 µg/ml de L-can.

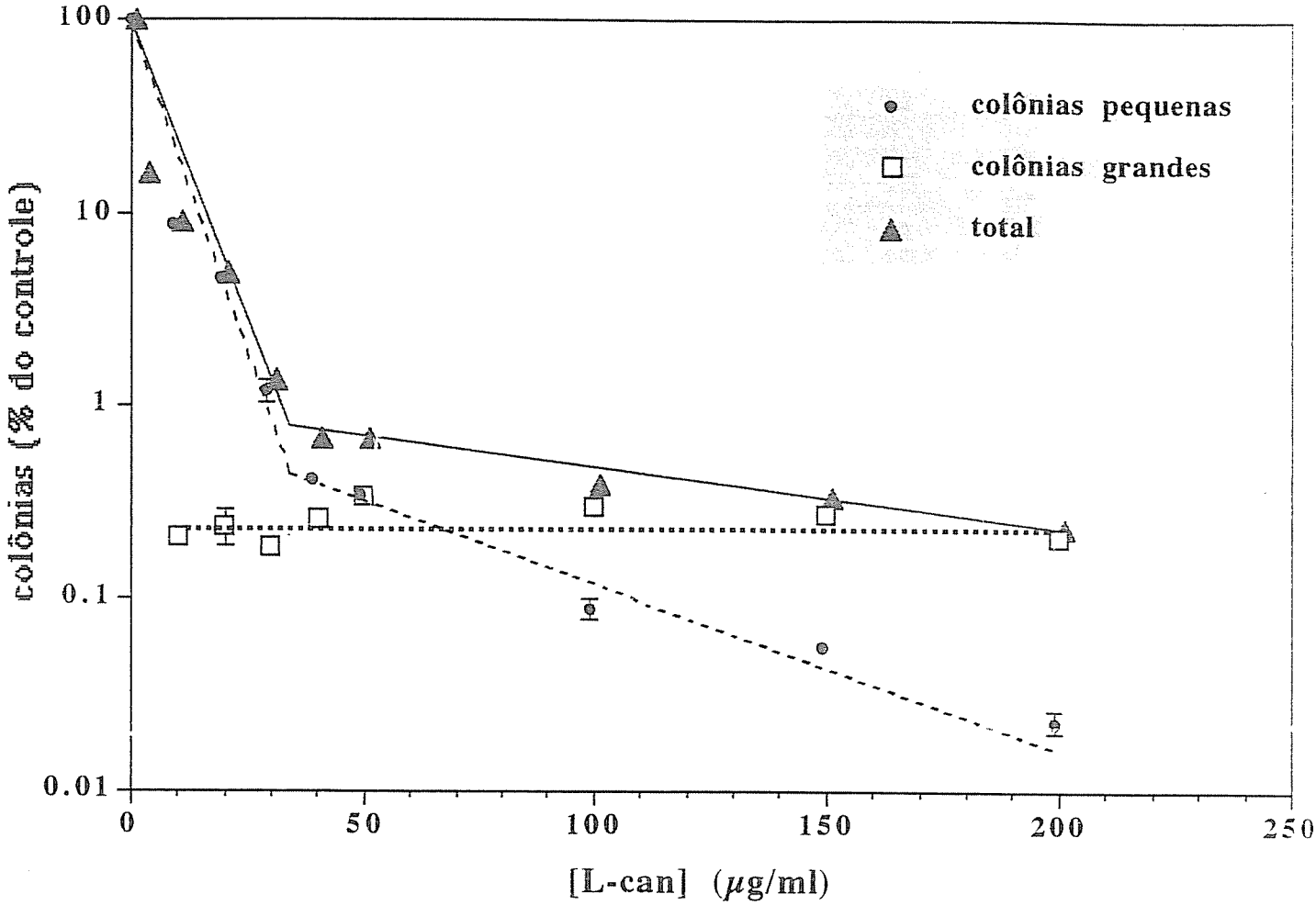


Figura 39: Sensibilidade a L-canavanina de leveduras YJ0Z can^R transformadas com pYES-CAN e com plasmídios que formam duplo-híbrido e frequência de aparecimento de mutantes. A linhagem YJ0Z can^R contendo os plasmídios pYES-CAN, pVA3 (que expressa GBD fusionado a p53 murina, resíduos 72-390) e pTD1 (que expressa GAD fusionado aos resíduos 84-708 do antígeno *large*T de SV40) foi utilizada em ensaio de sobrevivência às concentrações indicadas de L-can. O aparecimento de colônias (grandes - quadrados; pequenas - círculos ou totais - triângulos) foi anotado após 72 horas de incubação e está mostrada a porcentagem de colônias com relação ao controle sem L-can (média entre duplicatas). As curvas de sobrevivência com mudança de inclinação (para colônias pequenas e totais) foram traçadas arbitrariamente para ilustrar o comportamento complexo.

quantidade de células semeadas na placa com 5 µg/ml foi insuficiente para que eventos com essa freqüência fossem observados.

Um teste de X-Gal por amostragem foi realizado com colônias grandes provenientes de cada uma das placas utilizadas no experimento. Verificou-se que todas as colônias grandes ensaiadas quanto à ativação do gene repórter *lacZ* permaneceram sem desenvolver a cor azul (figura 40).

As colônias pequenas, obtidas de placas com 5-40 µg/ml de L-can apresentaram ativação de *lacZ* compatível com a linhagem original, como observado anteriormente, enquanto a ativação deste repórter em colônias pequenas obtidas de placas com altas concentrações da droga é sensivelmente menor (dados não mostrados) o que é consistente com os resultados prévios (figura 38). O comportamento diferenciado de colônias pequenas é suportado pela sensível quebra na taxa de sobrevivência em função do crescimento da dose de L-can. Concentrações que levam a sobrevivência de cerca de 1% apresentam o efeito de letalidade em função de dose esperado. A partir de 40-50 µg/ml de L-can os sobreviventes são representados por células que não ativam nenhum dos genes repórteres ou que os ativam parcialmente; estas últimas respondem ao aumento de concentração da droga com diminuição de sobrevivência, porém em grau menor (inclinação menor da curva) que as células não mutantes.

Paralelamente a este experimento, testes de sobrevivência foram realizados com a levedura YJ0Z can1^R contendo os plasmídios pCL1 e TLC1, separadamente, em placas contendo 200µg/ml de L-can. Somente houve aparecimento de colônias nas placas controle, que não continham L-can. Nas placas contendo 200µg/ml de L-can não houve o aparecimento de colônias, sendo que 10^5 células foram semeadas(dados não mostrados).

4.3.10 Avaliação da mutação obtida nos experimentos de ativação de CAN1 pelo duplo-híbrido

Era interessante a avaliação do momento de origem das mutações detectadas nos experimentos anteriores, e que se caracterizasse melhor os mutantes. Para tanto, foi realizado um teste de flutuação (ver "Material e Métodos") e uma retransformação utilizando o plasmídio pVA3 obtido de diversos clones resistentes a L-canavanina que não ativavam o gene repórter *lacZ*.

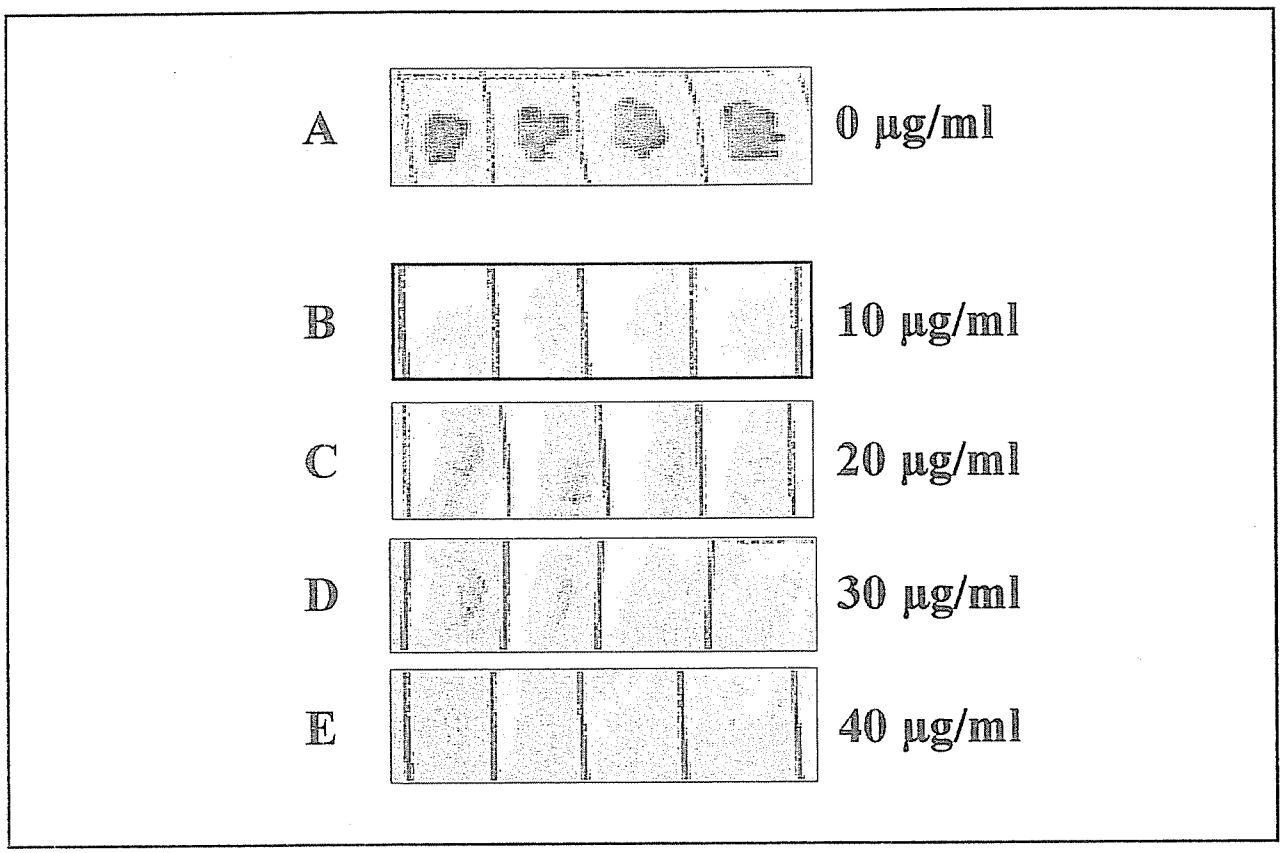


Figura 40: Ativação do gene repórter *LacZ* em leveduras resistentes a L-can provenientes de colônias grandes. Leveduras YJ0Z can^R contendo os plasmídios pYES-CAN, pVA3 e pTD1 isoladas de placas com as concentrações indicadas de L-can foram inoculadas em filtro de nitrocelulose sobre meio sólido seletivo SD -URA -TRP -LEU na ausência de L-can e submetidas a ensaio de metabolização de X-gal.

4.3.10.1 Teste de flutuação

Um teste de flutuação (Luria & Delbruck, 1943) foi realizado com o intuito de se avaliar se as mutações detectadas surgiram na placa com L-canavanina ou em um evento anterior ao plaqueamento. Para tanto, foi feita uma análise comparativa da porcentagem de leveduras resistentes a L-can em placas semeadas com células provenientes de dez culturas independentes, em relação à porcentagem de sobreviventes em dez placas semeadas com células provenientes de uma única cultura dez vezes maior que as independentes, sendo que todas as onze culturas têm origem única (ver "Material e Métodos"). A concentração de L-canavanina escolhida foi de 100 µg/ml, pois nesta situação todos os resistentes avaliados mostraram-se mutantes. Os resultados estão mostrados na figura 41.

A média entre o número de clones resistentes provenientes das dez culturas independentes foi de 0,09% e o desvio padrão 0,02%. As dez placas da cultura única forneceram a média de 0,15% de sobrevivência e um desvio de 0,03%. Ambos desvios representam cerca de 20% do valor das médias. Como se pode perceber, o desvio ao redor da média foi equivalente nas duas situações, o que não seria esperado caso as mutações estivessem se originando durante a formação da população de células a partir do inóculo inicial. Uma vez que o inóculo inicial nas culturas independentes foi de aproximadamente 100 células, e a freqüência de resistentes encontra-se na ordem de 0,1%, a possibilidade de existência de células resistentes no inóculo inicial fica bastante desfavorecida. Assim, o evento mutagênico ocorre na placa com L-canavanina, suportando a hipótese de que concentrações subletais da droga acarretam mutagênese nos plasmídios que formam o duplo-híbrido, que consequentemente passam a apresentar resistência a L-canavanina. Então, é possível com esse sistema não somente selecionar proteínas que não interagem, mas também gerar mutantes que afetam a formação do duplo-híbrido.

4.3.10.2 Retransformação do plasmídio pVA3 supostamente mutado.

Uma colônia grande e negativa no teste de X-Gal foi retirada da placa contendo 100µg/ml de L-can e usada como inóculo de meio líquido SD -TRP por 48 horas, quando se extraiu o DNA plasmidiano através de miniprep de levedura (ver "Material e Métodos"). O DNA retirado da levedura foi inserido em bactéria por eletroporação. Dez colônias de bactérias foram escolhidas para se fazer purificação do DNA pelo método de miniprep de bactéria (ver "Material e Métodos"). Todos os dez plasmídios obtidos foram submetidos a uma digestão com a enzima *Eco* RI para identificação

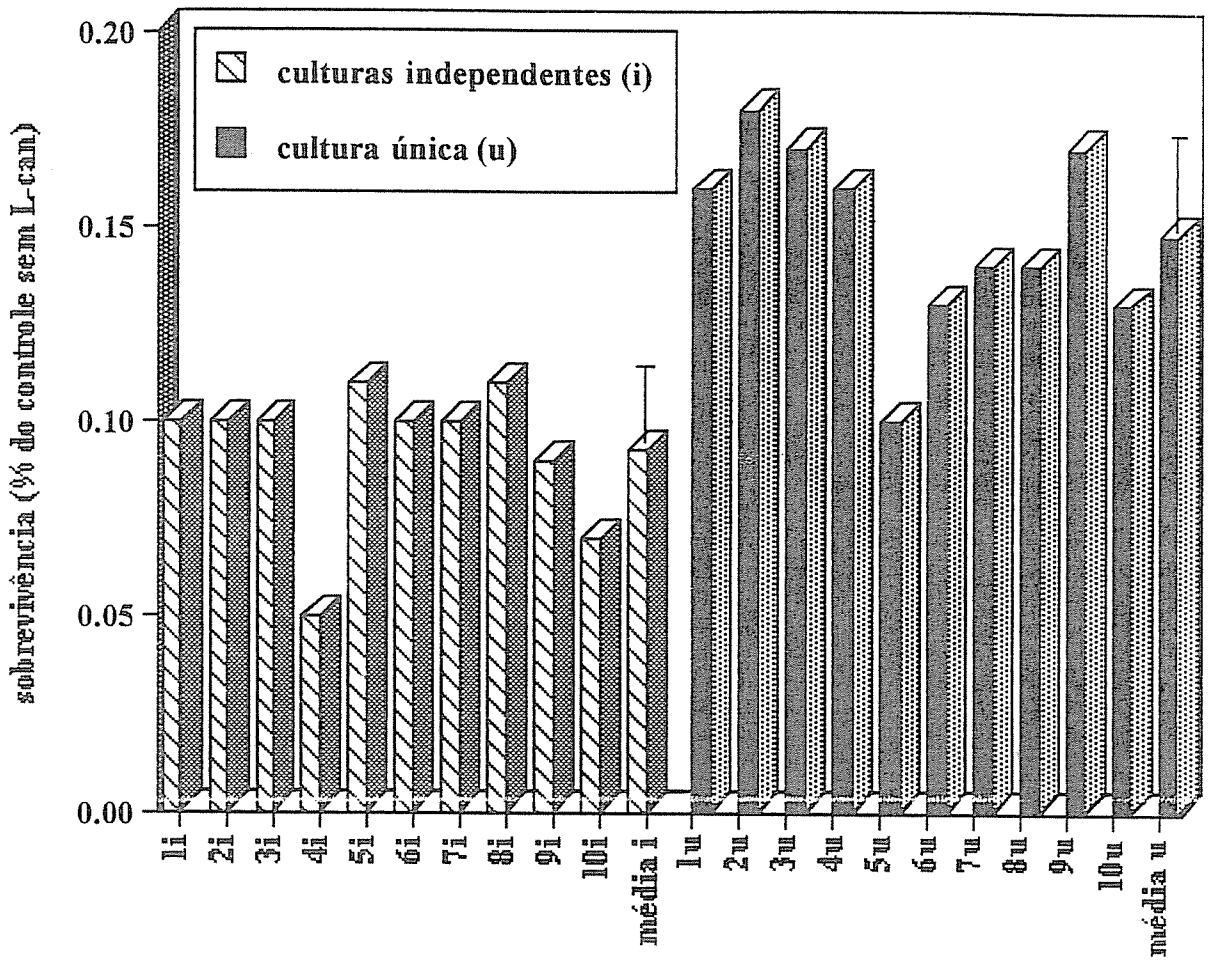


Figura 41: Teste de flutuação da resistência a L-canavanina. Um clone da linhagem YJ0Z can^R contendo os plasmídios pYES-CAN, pVA3 e pTD1 foi utilizado. Cem células foram inoculadas em dez culturas independentes de 1 ml (i) e 1000 células foram utilizadas para inocular uma cultura única de 10 ml (u). As culturas foram crescidas por 38 horas até atingirem concentração superior a 10^6 células/ml e determinou-se a sobrevivência a 100µg/ml de L-can. Dez determinações foram conduzidas para a cultura única (1u-10u) para se estimar o erro experimental (plaqueando-se 1000 células na placa sem L-canavanina e 100 mil células em cada uma das dez placas com a droga) e uma determinação foi feita para cada cultura independente (1i-10i, semeando-se 1000 e 100 mil células em placas sem ou com L-can, respectivamente). Estão mostradas as médias das dez determinações (média i e média u) e o desvio padrão.

(podendo ser: pYES-CAN, pVA3 ou pTD1). Aqueles clones que tinham um perfil eletroforético equivalente ao de pVA3 selvagem digerido com a enzima *Eco* RI foram utilizados para se fazer uma transformação da levedura Y190 juntamente com o plasmídios pTD1 selvagem. Como controle, foi realizada uma transformação similar utilizando o plasmídio pVA3 selvagem.

Após a transformação, algumas colônias foram escolhidas das placas contendo SD - TRP -LEU para um teste de X-Gal. Todos os clones que continham o plasmídio pVA3 isolado da levedura resistente a L-can foram incapazes de metabolizar o substrato X-Gal. Os clones provenientes da placa controle se tornaram azuis (figura 42A).

Uma parte do DNA utilizado para fazer a transformação descrita anteriormente foi separada para que se fizesse uma digestão do plasmídio pVA3 mutado com as enzimas de restrição *Eco* RI e *Bam* HI para a liberação do inserto correspondente ao gene p53. Foi verificado que o plasmídio mutado não era capaz de ser digerido pela enzima de restrição *Bam* HI cujo sítio estava localizado a 3' do gene. Também foi verificado que o plasmídio pVA3 mutado, quando linearizado pela enzima *Eco* RI, apresentava um tamanho menor do que o plasmídio pVA3 selvagem digerido com a mesma enzima.

Outros cinco clones de leveduras resistentes a L-can, também provenientes de colônias grandes na placa com 100µg/ml, foram analisados quanto à capacidade de formarem o duplo-híbrido quando retransformados com o plasmídio pTD1 selvagem. Neste caso, após a eletroporação da bactéria com o DNA proveniente das várias leveduras, foi feita uma hibridação de colônia (ver "Material e Métodos"), utilizando como sonda o fragmento *Eco* RI/*Bam* HI do plasmídio pVA3 (correspondente a p53). Desta maneira, foi facilitada a análise da bactéria que continha o plasmídio de interesse (pVA3). Após a identificação de alguns clones de bactéria que continham o plasmídio de interesse foi feita a purificação do DNA e a retransformação como descrita anteriormente. Foram obtidos clones contendo pVA3 e pTD1 de apenas três dos cinco clones resistentes inicialmente escolhidos.

O teste de X-Gal foi feito com colônias provenientes das três retransformações e de uma transformação controle com plasmídios selvagens. Todas as leveduras contendo plasmídios pVA3 recuperados permaneceram brancas no ensaio de metabolização de X-Gal, exceto as leveduras controle (figura 42B). Mutação em pTD1 e em pYES-CAN nos clones resistentes não foram analisadas. Também não foi determinado se a mutação ocorreu no fragmento codificante para p53 ou em outros alvos de pVA3, como por exemplo, o domínio de ligação a DNA de Gal4.

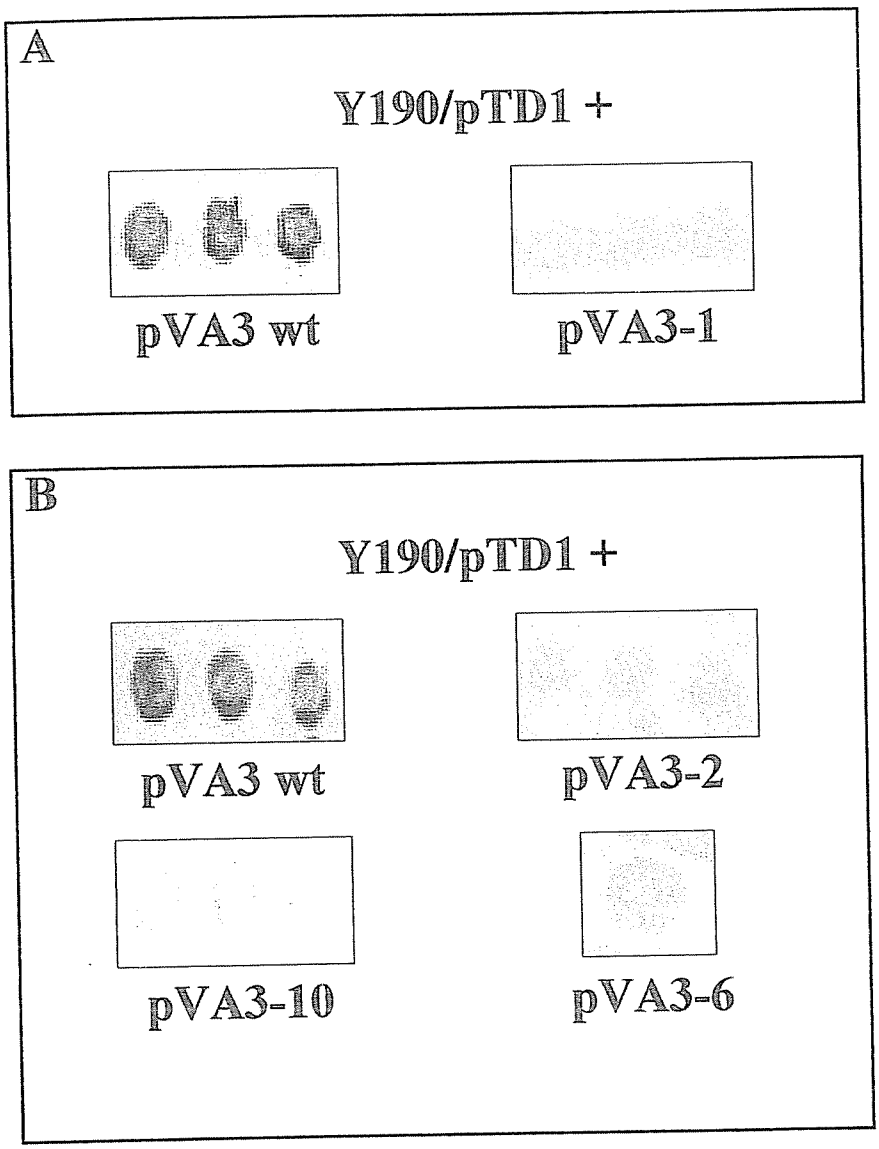


Figura 42: Ativação do gene repórter *LacZ* em leveduras albergando plasmídios pVA3 recuperados de leveduras resistentes a L-can. Leveduras YJ0Z can^R contendo os plasmídios pYES-CAN, pVA3 e pTD1 geraram clones resistentes a 100µg/ml de L-can. Plasmídios foram extraídos dessas leveduras e analisados. Aqueles identificados como pVA3 por perfil de restrição (pVA3-1) ou por hibridação com sonda de p53 (pVA3-2, pVA3-6 e pVA3-10) foram utilizados para transformar leveduras Y190 conjuntamente com pTD1. Como controle foi utilizada uma cópia selvagem de pVA3 (wt). Os transformantes foram submetidos a teste de X-Gal. Apenas um transformante envolvendo pVA3-6 foi obtido (mostrado).

4.3.11 Simulação de triagem de duplo-híbrido

Foi feita uma simulação de triagem (*screening*) de biblioteca para se verificar a possibilidade de detecção de um "mutante" que não mais ativa a transcrição de $CAN1^-$ nas placas da transformação. Para tanto, seguiu-se o protocolo de transformação de levedura utilizando a levedura YJ0Z $can1^R$, já contendo o plasmídio pYES-CAN, como hospedeira. Foi utilizada na transformação uma mistura de DNA de três plasmídios sendo que, dois deles contêm a mesma marca de seleção (LEU 2) e o outro não (TRP 1). Assim, cada transformante selecionado contém ora um, ora o outro plasmídio LEU 2 e todos contém o mesmo plasmídio TRP. Na mistura foram colocados 1μg de pVA3, 1μg de pTD1 e 50ng de YEpG1 para que uma proporção muito maior (38:1) das leveduras recebesse os plasmídios pVA3 e pTD1 cujas proteínas híbridas se interagem e ativam o gene da permease, enquanto uma pequena porcentagem receberia os plasmídios pVA3 e YEpG1 que não têm a capacidade de ativar o gene da permease da arginina. Estas leveduras que receberam os plasmídios pVA3 e YEpG1 simulam mutantes no sistema de duplo-híbrido que perderam a capacidade de ativar o gene repórter reverso. Os transformantes foram semeados em placas contendo 100μg/ml de L-can e em placas controle sem L-can. Nas placas que não continham L-can foram contadas 1336 colônias enquanto nas placas com 100μg/ml de L-can foram contadas somente 13 colônias sendo que, todas elas ativam o gene da glicoamilase (pois albergam o plasmídio YEpG1) quando semeadas em meio contendo 0,5% de amido (dados não mostrados). Assim, foi possível simular a triagem de mutantes de dissociação de interação viabilizando a utilização de $CAN1^+$ como repórter para o sistema de duplo-híbrido reverso.

4.3.12 Avaliação do sistema pYES-CAN com mutantes de pVA3 previamente caracterizados

Mutantes de p53 que perdiam a capacidade de interação com *large*T e não geravam o duplo-híbrido já haviam sido isolados (Li & Fields, 1993). Na verdade, os plasmídios pVA3 e pDT1 comercializados pela empresa Clontech foram utilizados nessa publicação. Um mutante de p53, onde ocorre a troca de um resíduo de Cisteína na posição 239 por uma Arginina, foi gentilmente cedido pelo Dr. S. Fields, Universidade de Washington, S.L., E.U.A. Utilizamos esse mutante para transformação de leveduras YJ0Z $can1^R$ conjuntamente com pTD1 selvagem e pYES-CAN. Alguns transformantes triplos foram ensaiados quanto à metabolização de X-Gal e forneceram resultados negativos, como esperado. A análise do efeito dessa mutação de ponto sobre a sensibilidade a L-canavanina está mostrada no experimento da figura 43. A mutação em p53 fez com que as leveduras

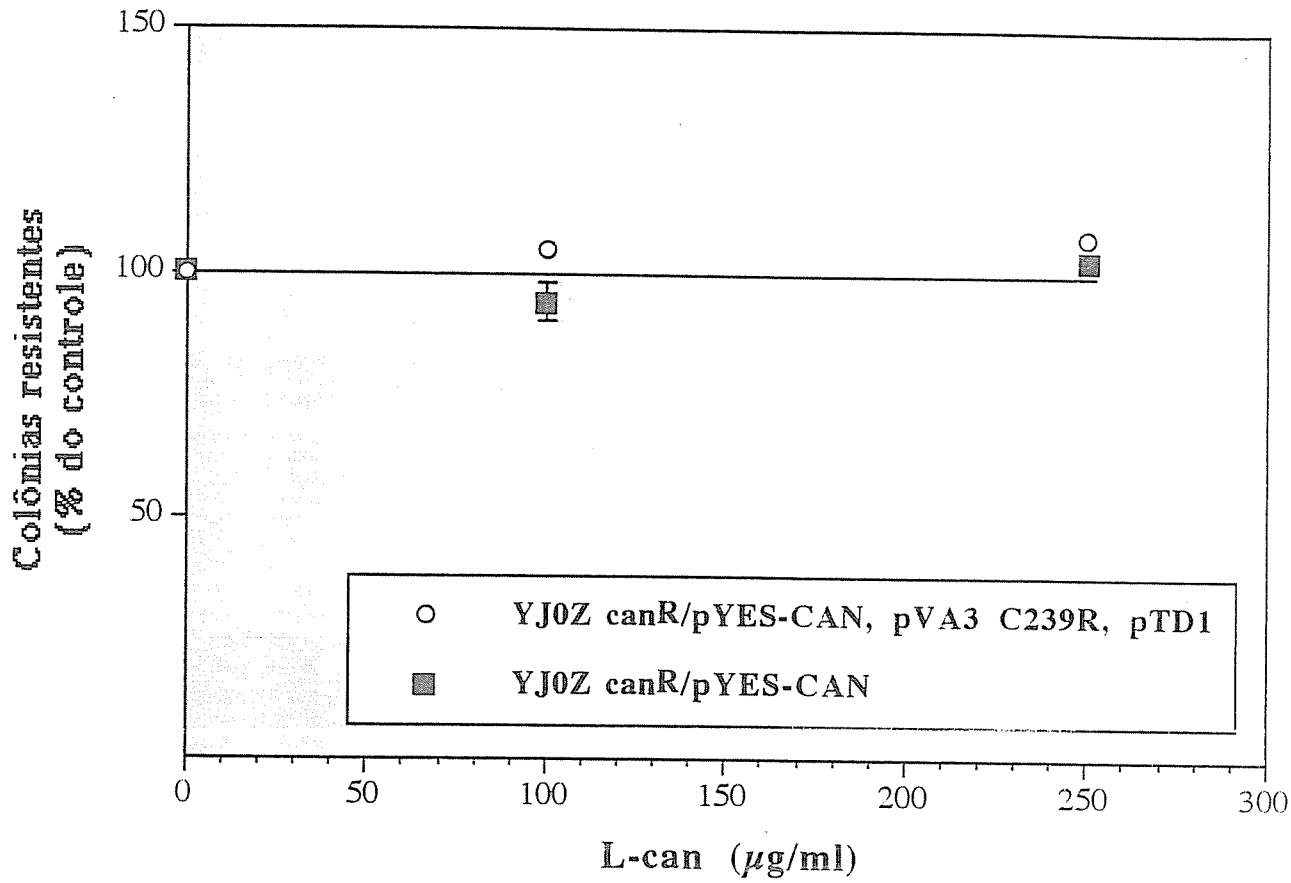


Figura 43: Efeito da mutação C239R em p53 na ativação de CAN1$^+$ pelo duplo-híbrido. A linhagem YJ0Z can^R foi transformada com o plasmídio pYES-CAN apenas ou conjuntamente com pVA3 C239R (que expressa GBD-p53 com a troca do resíduo Cisteína 239 por Arginina) e pTD1 (que expressa GAD-*large*T). Ensaios de sobrevivência a L-can foram conduzidos, utilizando-se as concentrações indicadas da droga. Foram semeadas 1000 células em todas as placas. O aparecimento de colônias foi anotado após 72 horas e está mostrada a porcentagem de sobrevivência com relação ao controle sem L-can (média entre duplicatas).

resistissem a concentrações muito altas de L-can, indicando que clones mutantes previamente originados tem uma chance de sobrevivência de 100% com a utilização do sistema baseado em pYES-CAN. Portanto, são eficientemente selecionados.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, três genes foram avaliados para utilização como repórteres alternativos nos sistemas de duplo-híbrido de levedura: o da glicoamilase de *Aspergillus awamori*, o da EGFP ("Enhanced Green Fluorescent Protein") de *Aequoria victoria* e o da arginina permease (CAN1) de *Saccharomyces cerevisiae*.

5.1 O gene da glicoamilase se mostrou pouco sensível para o sistema de duplo-híbrido

O gene da glicoamilase não se mostrou eficiente como repórter para o sistema de duplo-híbrido quando foi construído sob o controle de promotores indutíveis como GAL1 e ^{GAL}UAS CYC-1 na presença do indutor Gal4. Algumas hipóteses podem ser consideradas para se explicar a não detecção de ativação do gene. Vamos, porém, descartar a possibilidade de mutação na porção estrutural deste gene, da presença dos dois AUG a 5' do gene ou do erro de construção dos plasmídios, pois estes problemas já foram discutidos e analisados nos resultados deste trabalho através da troca do gene, da retirada do primeiro AUG e da troca de promotores na construção.

A primeira hipótese da não detecção de ativação de glicoamilase é que este gene pode não ser sensível o suficiente quando utilizamos os promotores indutíveis descritos acima. No entanto, no trabalho realizado por Scorpioni *et al.* (1993), o gene da glicoamilase foi utilizado como repórter em uma construção onde uma biblioteca de promotores se posicionava a montante do gene. Nove clones produtores de halo foram selecionados, ou seja, os pesquisadores encontraram nove promotores que ativam o gene suficientemente bem para o sucesso da visualização do halo em placas contendo 2% de amido. Podemos pensar que os promotores selecionados nesta publicação são mais eficientes do que os promotores utilizados em nosso trabalho e muitos deles podem ser promotores constitutivos como o promotor PGK, que ativou o nosso gene repórter o suficiente para visualização do halo, e também para uma triagem de poucos positivos dentre muitos negativos (figura 12). Podemos também pensar que outros promotores com a mesma

força de Gal1 não foram selecionados pela falta de sensibilidade do gene e não pela falta de ativação do mesmo. Comparando os nossos resultados obtidos com o gene EGFP, podemos ver claramente que o promotor PGK (figura 21) tem um poder de ativação gênica muitas vezes superior aos promotores GAL1 e ^{GAL}UAS CYC-1 quando induzidos por Gal4 (figuras 25 e 28, respectivamente). Outro trabalho publicado por Nacken *et al.*, (1996), mostra que a atividade do gene GUS sob o controle do promotor PGK é mais de 100 vezes superior à atividade do mesmo gene sob o controle do promotor Gal10/CYC-1 em *Saccharomyces cerevisiae*. Portanto, promotores da força deste último podem não ser suficientes para a detecção de interação protéica nos sistemas de duplo-híbrido quando utilizamos o gene da glicoamilase, que se mostrou pouco sensível, como repórter, nas linhagens testadas.

Outro fato que pode explicar a não detecção de ativação do gene utilizando as nossas construções, é a sensível diferença na expressão do gene dependendo da linhagem de levedura hospedeira utilizada (figura 10). Vimos que as linhagens de levedura Y190 e CG-1945 apresentam, respectivamente, o maior e menor halo de degradação de amido tanto em placas com 0,5% (p/v) como em placas com 2% (p/v) de amido. Esta diferença pode estar não só na expressão da enzima dentro da célula como também na exportação da enzima para fora da célula. Novamente comparando-se aos resultados publicados por Scorpioni e colaboradores (1993), a linhagem utilizada (*Saccharomyces cerevisiae*, linhagem GRF18) é também diferente das linhagens por nós utilizadas (HF7c, CG-1945, YJ0Z, e Y190). Podemos propor que novas linhagens devem ser testadas como hospedeiras para as nossas construções, levando-se em conta que estas hospedeiras têm que ser GAL80$^-$ para não reprimirem a ativação de Gal4. Uma outra alternativa é a utilização de uma construção onde o gene da glicoamilase seja repórter no sistema utilizando VP16 e HSV como ativadores. Neste caso, hospedeiras selvagens para Gal80 podem ser utilizadas. Insistimos na utilização da glicoamilase como repórter para este sistema pois, além da facilidade da detecção de interação protéica, este gene se mostrou potencialmente útil quando utilizamos promotores como PGK (figuras 10 e 12).

Uma alternativa que mantém a vantagem da facilidade de detecção da interação protéica é a utilização de genes como a α-amilase (*Bacillus subtilis*) ou *glaB* que codifica a glicoamilase de *Aspergillus oryzae* (Hata *et al.*, 1997). Este gene se mostrou eficiente na produção de halo quando sob o controle do promotor ADH1 na linhagem YPH499 de *Saccharomyces cerevisiae*.

5.2 Sistemas de duplo-híbrido com seleção por *cell sorter* são viáveis

A utilização do gene EGFP como repórter no duplo híbrido de levedura possibilita, através da fluorescência do seu produto, a separação de células triadas por citometria de fluxo facilitando o procedimento de detecção de interação protéica. Os nossos resultados indicam que o gene EGFP pode ser utilizado neste sistema, mesmo quando construído sob o controle de promotores como Gal1 e GALUAS CYC-1 na presença de Gal4. Apesar da diferença entre a expressão do gene sob o controle de um promotor constitutivo (PGK) ser relativamente grande quando se comparada à expressão do gene sob o controle de promotores indutíveis, é possível se fazer a separação daquele grupo de células que apresentam maior fluorescência. Além disso, o enriquecimento da cultura após a transformação favorece a diminuição de leveduras não transformadas (figura 20) e a possibilidade de se fazer vários "rounds" de separação das células mais fluorescentes permite que o perfil de fluorescência em citometria de fluxo seja aperfeiçoado, facilitando a captura daquelas que melhor expressam EGFP. Em nossos resultados, obtivemos, somente com um "round" de separação, 83% de recuperação das células fluorescentes quando tínhamos no meio de cultura somente uma delas para cada milhão de células que não expressavam EGFP. Em um recente trabalho publicado por Bell *et al.* (1999) foi feito um enriquecimento de clones que expressavam altos níveis de fluorescência em condições especiais (com ou sem glicose) através de oito "rounds" de separação.

No caso de EGFP, uma variação do número de cópias deste repórter não é vantajosa para o sistema. Pode-se pensar que uma mesma resposta em fluorescência seja resultado tanto da ativação por várias interações fracas em múltiplas cópias do repórter clonado em vetores epissômicos, quanto da ativação de uma ou poucas cópias do repórter devido à

interação forte. Portanto, a integração da construção contendo o gene repórter ou a utilização de vetores centroméricos parece relevante neste caso. Nossos resultados indicam que a expressão de EGFP sob o controle do produtor indutível ^{GAL}UAS CYC-1 (figura 25) é praticamente igual à expressão do mesmo gene sob o controle de GAL1 (figura 28) sendo que, no primeiro caso o plasmídio construído é centromérico e, no segundo caso, o plasmídio é epissômico. Portanto, temos a expressão de EGFP em baixos números de cópias, propiciando, de maneira exata, a separação daquelas células que realmente contém uma interação forte entre seus híbridos. O que pode estar ocorrendo aí, é um gargalo na produção da proteína funcional de modo que a grande variação da expressão do repórter não influenciará nos resultados. A visualização da expressão de EGFP em baixos números de cópias também é confirmada por Moschäuser *et al.* (1998) que fizeram a integração de várias versões deste gene sob o controle do promotor ACT1 em *Candida albicans*. Em algumas destas versões, a expressão da proteína é evidente em microscopia de fluorescência. A importância da expressão de EGFP em cópia única, também é confirmada por Bell *et al.* (1999) que mostra que é possível se fazer uma biblioteca de promotores, controlando o gene EGFP, para a triagem daqueles que são induzidos por cobre. Neste caso, dois vetores, sendo um epissômico e outro integrativo, foram construídos e os autores concluíram que a heterogeneidade da expressão de EGFP é drasticamente reduzida quando o vetor integrativo é utilizado. No entanto, quando utilizamos o sistema de duplo-híbrido, mesmo que o gene repórter esteja integrado, teremos também a heterogeneidade de expressão já que praticamente todos os vetores que codificam os híbridos são epissômicos. Isto pode ser vantajoso quando se objetiva estudar interações fracas que serão detectadas somente quando um número maior de cópias dos híbridos estiver na célula. Por outro lado, se o interesse se concentra no estudo de interações fortes, o melhor seria usar somente vetores centroméricos.

Não podemos descartar a possibilidade de detectar a interação, utilizando o gene EGFP, em microsccopia de fluorescência. No caso de se fazer um estudo de confirmação de interação entre duas proteínas já caracterizadas, o procedimento é enormemente facilitado pela simplicidade de visualização de células fluorescentes em microscopia. Devemos, neste caso, fazer a seleção dos transformantes antes de levá-los ao microscópio, para

evitar que se observe células não transformadas. Alguns trabalhos mostram que ativação de EGFP muitas vezes não é detectada em microscopia de fluorescência (Walmsley *et al.*, 1997). Em resultados de microscopia obtidos com as nossas construções para o uso de EGFP como repórter, pudemos verificar que 98% das células observadas apresentavam fluorescência quando transformadas com o indutor Gal4 (figura24). Para as células transformadas sem o indutor, pudemos verificar que 10% delas apresentavam uma pequena fluorescência, correspondendo à transcrição basal deste repórter. Nestes experimentos, utilizamos o plasmídio epissômico pYES-EGFP e portanto a variação de intensidade de fluorescência destas células é esperada.

É importante ressaltar que apesar de conseguirmos observar a ativação do repórter induzido pela proteína Gal4 inteira, ainda não foram feitos testes utilizando duplo-híbridos verdadeiros como, por exemplo, a interação dos híbridos Gal4BD-p53 e Gal4AD-lt. Estes testes devem ser realizados para comprovação de que o gene EGFP seja realmente apropriado para ser utilizado como repórter alternativo para sistemas de duplo-híbrido em levedura.

5.3 O gene $CAN1^+$ se mostrou eficiente par ser utilizado em sistemas de duplo-híbrido reverso

Uma alternativa interessante para o estudo de interações proteína-proteína é o sistema de duplo-híbrido reverso, onde mutações que afetam a interação são positivamente selecionadas. Uma variação possível deste sistema permite investigar quais resíduos de aminoácidos são importantes para a função de um domínio ativador de transcrição; neste caso falaríamos em sistemas de mono-híbrido reverso. Uma outra possibilidade de ensaio de mono-híbrido reverso seria aquela em que mutações em um domínio de ligação a DNA evitassem a ligação de uma proteína a sua seqüência de DNA específica.

A utilização do gene da arginina permease (CAN1) como repórter em qualquer um dos três casos descritos acima implica na utilização de leveduras que sejam resistentes a L-canavanina pela interrupção de transcrição do gene CAN1. Pudemos observar por nossos

resultados que as linhagens de levedura CG-1945 e HF7c são linhagens resistentes a esta droga (figura 29) sendo que, a linhagem HF7c tem sua resistência comprovada por um defeito em CAN1 pois a inserção de um plasmídio que contém o gene selvagem sob o controle de um promotor constitutivo promove a sensibilidade da levedura a L-can (figura 33). No entanto, tínhamos um interesse especial em utilizar a linhagem YJ0Z por ser, dentre as quatro utilizadas comercialmente no duplo-híbrido, a única que não metaboliza uracil e, portanto, o plasmídio pYES-CAN (URA3) poderia ser utilizado. Para todos os nossos experimentos com o gene CAN1 utilizamos então uma levedura mutante para este gene (YJ0Z can^R).

O gene CAN1 se mostrou altamente eficiente quando testado sob o controle de um promotor indutível GAL1 na presença do indutor Gal4. Não observávamos o aparecimento de sobreviventes nem mesmo em concentrações inferiores a 5μg/ml de L-can (figura 35) ou quando 10^5 células eram semeadas em placas contendo L-can (item 4.3.5.1). A utilização de um indutor forte como a proteína Gal4 inteira simula a situação de um ensaio de mono-híbrido reverso, esteja ele visando a seleção de mutantes do domínio ligante de DNA ou ativador de transcrição.

Nos testes utilizando como indutores a interação dos híbridos Gal4BD-p53 e Gal4AD-lT, os resultados obtidos foram surpreendentes. Muitas das leveduras que sobreviveram a concentrações superiores a 50μg/ml de L-can eram na verdade leveduras resistentes cujos híbridos perderam a capacidade de interagir (figura 37) e portanto não mais ativavam o gene CAN1. O restante daquelas que sobreviveram também eram resistentes mas a diferença é que a interação destes híbridos ainda ocorria, mesmo que muito fracamente (figura 37). É importante ressaltar que devem ser feitas caracterizações mais detalhadas destes mutantes espontâneos que passam a resistir a altas concentrações de L-can, uma vez que as análises preliminares detectaram mutações em p53 nos clones onde a interação foi abolida, mas mutações em outros componentes do sistema não foram analisadas. Assim, não é possível afirmar se o comportamento observado pode ser generalizado ou restringe-se à utilização de p53.

No caso específico da interação de p53-lT, nossos resultados indicam que concentrações inferiores a 50μg/ml de L-can não foram suficientes para conferir total sensibilidade a L-can (figura 36). Portanto para o estudo de caracterização de domínios importantes para esta interação, deve-se utilizar concentrações superiores a esta. Isto mostra que, para cada estudo específico onde se quer analizar o domínio importante para a interação de duas proteínas, o ideal é que se faça uma caracterização das concentrações de L-can necessárias para que não ocorra sobreviventes quando a interação é completa, não se esquecendo que a expressão basal do gene não deve conferir sensibilidade à célula.

Assim, como a sobrevivência a 200μg/ml de L-can foi de 0,2%, espera-se a geração de 20 mutantes a cada 10.000 clones submetidos à seleção. Investigadores que gerassem, por mutagênese anterior à seleção, cerca de 20 mutantes que bloqueassem a interação a cada 10.000 clones, obteriam o dobro do número de clones do que quando utilizassem o duplo-híbrido sem a introdução prévia de mutações, desta forma a cada dois clones analisados, um deles seria um mutante construído. A análise dos mutantes espontâneos pode ser indesejável pelo consumo de tempo e reagentes, quando objetiva-se a observação do fenótipo de alterações específicas desvalorizando o uso de CAN1 como repórter. Todavia, é possível que algum agente potencializador da letalidade produzida por L-canavanina seja capaz de diminuir em muito a freqüência de aparecimento desses mutantes. Na verdade, foi relatado que L-canavanina aumenta a susceptibilidade de células de mamífero a choque térmico (Li & Laslo, 1985; Kelley & Carter, 1981). Assim, é possível que com o uso de altas temperaturas seja possível ajustar a sensibilidade ao agente letal de forma que o aparecimento de mutantes espontâneos seja muito diminuído. Vale lembrar que quando o indutor Gal4 inteiro é utilizado, a alta concentração intracelular de L-can que é supostamente alcançada permite que 10^5 leveduras sejam analisadas sem que mutantes sejam gerados pelo sistema.

Todavia, conseguimos comprovar que clones mutantes previamente caracterizados de p53 (como troca da cisteína 239 por uma arginina) que não interagem com large T apresentam sobrevivência de 100% mesmo frente a altas concentrações de L-canavanina (figura 43). Isso indica que é possível recuperar mutantes gerados por um único evento

raro com 100% de chance. Assim, os mutantes previamente gerados estarão eficientemente representados nas placas de seleção. Esta mutação havia sido previamente caracterizada por Li & Fields, (1993) através da seleção de uma biblioteca de mutantes utilizando como repórter o gene *lac* Z. Um número calculado entre 1000 e 2000 tranformantes foram triados, em placas contendo X-Gal. Este número poderia ser maior, e o trabalho de seleção poderia ser menor se os autores tivessem em mãos um gene repórter reverso, como URA 3 utilizado por Vidal *et al.* (1996), Cicloeximida (CYH2) utilizado por Leanna & Hannink, (1996) ou o gene $CAN1^{+}$ por nós utilizado.

A utilização de um plasmídio episssômico (pYES-CAN) neste caso não deve interferir em nossos resultados pois não nos interessa quantificar a dissociação de interação e sim determinar se a mutação é importante o suficiente para que as duas proteínas não mais interajam. Além disso, nossos resultados indicam que a variação clonal das leveduras que contém este plasmídio expressando o gene CAN1 não é significante (figura 36).

6. CONCLUSÕES

O gene da glicoamilase se mostrou pouco sensível para o sistema de duplo-híbrido de levedura quando testado sob o controle dos promotores indutíveis GAL1 e ^{GAL}UAS CYC-1, na presença do indutor Gal4.

A princípio, o gene EGFP pode ser utilizado no sistema de duplo-híbrido sob controle de promotores indutíveis como GAL1 e ^{GAL}UAS CYC-1 na presença do indutor Gal4. No entanto, a reconstituição da atividade de um fator transcricional através da interação de híbridos protéicos deve ser testada, para a confirmação da eficiência do sistema, utilizando este gene.

O gene CAN1^{+} se mostrou eficiente como repórter no sistema de duplo-híbrido reverso quando sob o controle do promotor indutível GAL1, na presença de indutores como Gal4 e a interação dos híbridos Gal4BD-p53 e Gal4AD-lT.

Mutações pontuais, como uma única troca de aminoácido, podem ser eficientemente selecionadas se causarem disrupção de interação entre duas proteínas híbridas.

A L-can mostrou-se capaz de gerar mutações espontâneas nos híbridos do sistema e, possivelmente, pode ser utilizada na seleção de mutantes de dissociação de interação sem a necessidade da produção de uma biblioteca de mutantes.

A utilização de um vetor epissômico para a construção de pYES-CAN não traz problemas de variação clonal para o sistema, na linhagem de levedura YJ0Z can^{R}.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

van Aelst, L., Barr, M., Marcus, S., Polverino, A. e Wigler, M. (1993). Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A 90*: 6213-7.

Arndt, K.M., Ricupero-Hovasse, S. eWinston, F. (1995). TBP mutants defective in activating transcription in vivo. *EMBO J. 14*: 1490-97.

Alberts, B. e Miake, R. (1992). Unscrambling the puzzle biological machines: the importance of the details. *Cell 68*: 415-420.

Auble, D.T., Hansen, K.E., Mueller, C. G. F., Lane, W.S., Thorner, J. e Hash, S. (1994). Mot 1, a global repressor of RNA polymerase II transcription, inhibits TBP binding to DNA by an ATP-dependent mechanism. *Genes Dev. 8:* 1920-34.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. e Struhl, K. (1987). *Current protocols in molecular biology*. New York; John Wiley e Sons.

Axelrod, J.D. e Majors, J. (1993). GAL4 disrupts a nucleosome to activate GAL1 transcription in vivo. *Genes Dev. 7*: 857-69.

Barberis, A. E Gaudreau, L. (1998). Recruitment of the RNA polymerase Iiand its implications in gene regulation. *Biol. Chem. 379*: 1397-405.

Bartel, P., Chien, C. T., Sternglanz, R. e Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques 14*: 920-4.

Birge, R.B., Fajardo, J.E., Reichman, C., Shoelson, S.E.,Songyang, Z., Cantley, L.C. e Hanafusa, R.N. (1993). Identification and characterization of high-affinity interaction between v-Crk and tyrosine-phosphorrylated paxilin in CT10-transformed fibroblast. *Mol. Cel.Biol 13*: 4648-4656.

Breedon, L. E Nasmith, K. (1985). Regulation of the HO gene. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. 50:* 643-650.

Brent, R. e Ptashne, M. (1984). A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene. *Nature 312*:612-15.

Brent, R. e Ptashne, M. (1985). A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell 43*: 729-36.

Brown, A.J.P. e Tuite, M.F. (1998). Yeast Gene Analysis. *Methods in Microbiol. 26*.Acad.Press, NY

Buratowski, S. (1994). RNA polymerase III transcription in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Genet Eng (N Y) 16*: 1-9.

Clark-Adams, C.D.,Norris, D., Osley, M.A., Fassler,J.R. e Winston F. (1988). Changes in histone gene dosage alters transcription in yeast. *Genes Dev 2*: 150-59.

Cereghino,G.P.L. e Cregg, J.M. (1999). Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr.Opin.Biotech. 10:* 422-427.

Chardin, P., Camonis, J. H., Gale, N. W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M. H. e Bar-Sagi, D. (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science 260*: 1338-43.

Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. e Fields, S. (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*: 9578-82.

Colas, P. e Brent, R. (1998). The impact of two-hybrid and related methods on biotechnology. *Trends Biotechnol 16*: 355-63.

Conaway, B.P. e Conaway, J.W. (1993). General iniciation factors for RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem. 62*: 161-90.

Cormack, B. P. e Struhl, K. (1992). The TATA-binding protein is required for transcription by all three nuclear RNA polymerases in yeast cells. *Cell 69*: 685-96.

Cote, J., Quinn, J.,Workman, J.L. e Peterson, C.L. (1994). Stimulation of Gal4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast SWI/SNF complex. *Science 265:* 53-60.

Dalton, S. e Treisman, R. (1992). Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell 68*: 597-612.

Dobzhansky, T. (1946). Genetics of natural populations. XIII. Recombination and variability in populations of *Drosophyla pseudobscura*. *Genetics 31:* 269-290.

Dujon, B. (1996). The yeast project: what did we learn. *Trends Genet. 7*: 263-270.

Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. e Elledge, S. J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev 7*: 555-69.

Eisenmann, D.M., Arndt, K.M., Ricupero, S.L., Rooney, J.W. e Winston, F. (1992). SPT3 interacts with TFIID to allow normal transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev. 6*: 1319-31.

Feaver,W.J., Henry, N.L.,Bushnel, D.A., Sayre, M.H., Brickner, J.H., *et al.* (1994). Yeast TFIIE: cloning expression and homology to vertebrate proteins. *J. Biol. Chem. 269:* 27549-53.

Feaver, W.J., Henry, N.L. e Kornberg, R.D. (1994). Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIH/TFIIK. *Cell 79*:1103-9.

Feaver, Wj., Svejstrup, J.Q., Bardwell, L., Bardwell, A.J., Buratowski, S., *et al.* (1993).Dual roles of a multiprotein complex from S.cerevisiae in transcription and DNA repair. *Cell 75:*1379-87

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

Fields, S. e Sternglanz, R. (1994). The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends Genet 10*: 286-92.

Finlay, C.A., Hinds, P.W. e Levine, A.J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as supressor of transformation. *Cell 57:*1083-1093.

Furter-Graves, E.M., Hall, B.D. e Furter, R. (1994). Role of a small RNA pol II subunit in TATA to transcription start site spacing. *Nucleic Acids Res. 22:* 2932-36.

Goff, S. A., Cone, K. C. e Chandler, V. L. (1992). Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes Dev 6*: 864-75.

Goffeau, A., Barrel, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldman, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Jonhston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakmi, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. e Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science 274*: 546-552.

Goodbourn, S. (1990). Negative regulation of transcription initiation in eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1032: 53-77.

Grunstein, M. (1990). Histone function in transcription. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 6: 643-78

Guthrie, C. e Fink, G.R (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. *Methods in Enzymol.* Acad. Press, NY.

Hahn, S. (1993). Structure (?) and function of acidic transcription activators. *Cell 72*: 481-83.

Han, M. e Grunstein, M. (1988). Nucleossome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell 55*:1137-45.

Hardy, C. F., Sussel, L. e Shore, D. (1992). A RAP1-interacting protein involved in transcriptional silencing and telomere length regulation. *Genes Dev 6*: 801-14.

Harbury, P.A.B. e Struhl, K. (1989). Functional distinctions between yeast TATA elements. *Mol.Cell.Biol. 9*: 5298-304.

Hata, Y., Ishida, H., Ichikawa, A., Suginami, K.e Imayasu, S. (1998). Nucleotide sequence of na alternative glucoamylase-encoding gene (*glaB*) expressed in solid-state culture of *Aspergillus oryzae. Gene 207:* 127-134.

Henry, N.L., Campbell, A.M., Feaver W.J., Poon, D., Weil, P.A. e Kornberg, R.D. (1994). TFIIF-TAF-RNA polymerase II connections. *Genes Dev. 8*: 2868-78.

Hernandez, N. (1993). TBP, a universal eukariotic transcription factor? *Genes Dev. 7:* 1291-308.

Herscbach, B.M. e Johnston, A.D. (1993). Transcriptional repression in eukaryotes. *Annu. Rev. Cell. Biol. 8:* 479-509.

Herskowitz, I. (1987). Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature 329*: 219-222.

Hartman, P.E. e Roth, J.R. (1973). Mechanisms of suppression. Adv.Genet. 17: 1-105.

Hieter, P., Mann, C., Snyder, M. e Davis, R.W. (1985). Mitotic stability of yeast cromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. Cell 40: 381-392.

Hope, I. A. e Struhl, K. (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell 46*: 885-94.

Horiuchi, J.N., Silverman, N., Marcus, G.A. e Guarente, L. (1995). ADA3, a putative trancriptional adaptor, consists of two separable domains and interacts with ADA2 and GCN4 in a trimeric complex. *Mol. Cell. Biol. 15*: 1203-9.

Hull, M.W., McKune, K. e Woychick, N.A. (1995). RNA polymerase II subunit RPB 9 is required for accurate start site selection. *Genes Dev. 9:* 481-90.

Imbalzano, AN, Kwon, H., Green, M.R. e Kingston, R.E. (1994). Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleossomal DNA. *Nature* 370: 481-85.

Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. e Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene 8*: 1693-6.

Iyer, V. e Srhul, K., (1995). Poly(dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic structure *EMBO J.* 14: 2570-79.

Jackson, A. L., Pahl, P. M., Harrison, K., Rosamond, J. e Sclafani, R. A. (1993). Cell cycle regulation of the yeast Cdc7 protein kinase by association with the Dbf4 protein. *Mol Cell Biol 13*: 2899-908.

Johnson A.D. e Herskowits, I. (1985). A repressor (*MATα2* product) and its operator control expression of a set of cell type specific genes in yeast. *Cell 42*: 237-47.

Ju, Q., Morrow, B.E. e Warner, J.R., (1990). REB1, a yeast DNA-binding protein with many targets, is essencial for cell growth and bears some resemblance to the oncogene *myb*. *Mol. Cell. Biol. 10*: 5226-34.

Kato, H., Sumimoto, H., Pognonec, P., Chen, C. H., Rosen, C. A. e Roeder, R. G. (1992). HIV-1 Tat acts as a processivity factor in vitro in conjunction with cellular elongation factors. *Genes Dev 6*: 655-66.

Keegan, L., Gill, G. e Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science 231*: 699-704.

Klein, C. e Strhul, K. (1994). Increased recruitment of TATA-binding protein to the promoter by transcriptional activation domains *in vivo*. *Science 266*: 280-82.

Kim, Y-J, Bjorklung, S., Li, Y., Sayre, M.H. e Kornberg, R.D. (1994). A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat . domain of RNA polymerase II. *Cell 77:* 599-680.

Koleske, A. J. e Young, R. A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators [see comments]. *Nature 368*: 466-9.

Koshland, D., Kent, J.C. e Hartwell, L.H. (1985). Genetic analysis of the mitotic transmission of minichromosomes. *Cell 40:* 393-403.

Kunzler, M., Braus, GH., Georgiev, O., Seipel, K. e Schaffner, W. (1994). Functional differences between mammalian transcription activation domains at the yeast GAL1 promoter. *EMBO J., 13*: 641-45.

Leanna, C. A. e Hannink, M. (1996). The reverse two-hybrid system: a genetic scheme for selection against specific protein/protein interactions. *Nucleic Acids Res 24*: 3341-7.

Lee, M. e Strhul, K. (1995). Mutations on the DNA-binding surface of TBP can specifically impair the response to acidic activators *in vivo*. *Mol. Cell. Biol. 15:* 5461-69.

Leuther, K.K. e Johnston, S.A. (1992). Nondissociation of GAL4 and GAL80 *in vivo* after galactose induction. *Science 256:* 1333-35.

Li, C. G. e Laszlo, A (1985). Amino acid analogs while inducing heat shok proteins sensitize CHO cells to thermal damage. *J.cel.physiol 122*:91-97

Li, Y., Flanagan, P.M., Tschochner, H. e Kornberg, R.D. (1994).RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. *Science 263*: 805-7.

Li, B. e Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *Faseb J 7*: 957-63.

Licitra, E. J. e Liu, J. O. (1996). A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A 93*: 12817-21.

Luban, J., Alin, K. B., Bossolt, K. L., Humaran, T. e Goff, S. P. (1992). Genetic assay for multimerization of retroviral gag polyproteins. *J Virol 66*: 5157-60.

Luban, J., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V. e Goff, S. P. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell 73*: 1067-78.

Luria, S.E. e Belbruck, M. (1943). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics 28*:491-511.

Ma, J. E Ptashne, M. (1987). The carboxyl 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80. *Cell 50:* 137-42.

Ma, J. e Ptashne, M. (1987). A new class of yeast transcriptional activators. *Cell 51*: 113-9.

Ma, J. e Ptashne, M. (1988). Converting a eukaryotic transcriptional inhibitor into an activator. *Cell 55*: 443-6.

Mann, R.K. e Grunstein, M. (1992). Histone H3 N-terminal mutations allow hyperactivation of the yeast GAL1 gene *in vivo*. *EMBO J. 11*: 3297-306.

Marahrens, Y. e Stillman, B. (1992). A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elementes. *Science 255*: 817-23.

Mcknight, S.L. e Yamamoto, K.R. (1992). Transcriptional regulation. Cold Spring Harbor, New York: *Cold Spring Harbor La. Press.*

McNabb, D.S., Xing, Y.Y. e Guarente, L. (1995). Cloning the yeast HAP5- a novel subunit of a heterotrimeric complex requires for CCAAT binding. *Genes Dev. 9*:47-58.

Moir, D., Stewart, S.E., Osmond, B.C. e Botstein, D. (1982). Cold sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties, and pseudoreversion studies. *Genetics 100:* 547-563.

Moore, P. (1998). Applications of yeast in the discovery of human gene function. *Methods in Microb. 26*: 417-430.

Morse, R.H. (1993). Nucleosome disruption by transcription factor binding in yeast. *Science 262:* 1563-66.

Morschhäuser, J., Michel, S., Hacker, J. (1998). Expression of chromosomaly integrated, single-copy *GFP* gene in *Candida albicans*, and its use as reporter of gene regulation. *Mol. Gen. Genet. 257*: 412-420.

Nacken, V., Achstetter, T. e Degryse, E. (1996). Probing the limits of expression levels by varying promoter strength and plasmid copy number in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene 175:* 253-260.

Pinto, I., Ware, D.E. e Hampsey, M. (1992). The yeast SUA7 gene encodes a homolog of human transcription factor TFIIB and is required for normal start site selection in vivo. *Cell 68:* 977-88.

Ponticelli, A. S., Pardee, T. S. e Struhl, K. (1995). The glutamine-rich activation domains of human Sp1 do not stimulate transcription in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol 15*: 983-8.

Priming, M., Sockanathan, S., Auer, H. e Nasmith, K. (1992). Anatomy of a transcription factor for the start of the cell cycle in Saccharomyces cerevisiae. *Nature 358:* 593-97.

Ranish, J. A., Lane, W. S. e Hahn, S. (1992). Isolation of two genes that encode subunits of the yeast transcription factor IIA. *Science 255*: 1127-9.

Ratner, D. (1974). The interaction of bacterial and phage proteins with immobilized *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol. 88:* 373-383.

Reese, J. C., Apone, L., Walker, S. S., Griffin, L. A. e Green, M. R. (1994). Yeast TAFIIS in a multisubunit complex required for activated transcription [see comments]. *Nature 371*: 523-7.

Rine, J. (1991). Gene overexpression in studies of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods. Enzymol.194*: 239-251.

Roy, R., Adamczewski, J.P., Seroz, T., Vermeule, W., Tassan, J-P, ***et al.*** (1994).the MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor. *Cell 79:* 1093-101.

Ruden, D.M., Ma, J. e Ptashne, M. (1988). No strict aligment is required betweena transcriptional activator binding site and the TATA box of a yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85*: 4262-4266.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. e Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A laboratory Manual. 2nd eedn. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY, USA

Scorpioni, R. C., Camargo, S. S., Schenberg, A.C. G.e Astolfi-filho, S. (1993). A new promoter probe vector for *Saccharomyces cerevisiae* using fungal glucoamylase cDNA as the reporter gene. *Yeast 9:* 599-605.

SenGupta, D. J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S. e Wickens, M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA 93*: 8496-501.

Shih, H. M., Goldman, P. S., DeMaggio, A. J., Hollenberg, S. M., Goodman, R. H. e Hoekstra, M. F. (1996). A positive genetic selection for disrupting protein-protein interactions: identification of CREB mutations that prevent association with the coactivator CBP. *Proc Natl Acad Sci USA 93*: 13896-901.

Shusta, E.V., VanAntwerp, J. e Wittrup, K.D. (1999). Biosynthetic polypeptide libraries. *Curr. Opin. Biothec.* 110: 117-122.

Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface *Science 228*: 1315-1317.

Song, O-K.,Dolan, J.W., Yuan, Y-I. e Fields, S. (1991). Pherormone-dependent phospholylation of the yeast STE12 protein correlates with transcriptional activation. *Genes Dev. 5*:741-50.

Sorger, P.K. e Pelham, H.R.B. (1988). Yeast heat shock factor is an essencial DNA-binding protein that exibits temperatura –dependent phospholylation. *Cell 54*: 855-64.

Soutar, A.K. e Wade, D.P. (1990). Ligand blotting, p.55-76. In T. Creighton (ed.), Protein functions: a practical approach. *IRL Press, Oxford.*

Stargell., L.A. e Struhl, K. (1995). Essencial role of the TBP-TFIIA interaction for the response to acidic activators *in vivo. Science 269*:75-78.

Staudinger, J., Perry, M., Elledge, S. J. e Olson, E. N. (1993). Interactions among vertebrate helix-loop-helix proteins in yeast using the two-hybrid system. *J Biol Chem 268*: 4608-11.

Struhl, K. (1985). Negative control at a distance mediates catabolite repression in yeast. *Nature 317*: 822-4.

Struhl, K.(1989). Molecular mechanisms of transcriptional regulation in yeasts. *Annu. Rev. Biochem. 58:* 1051-77.

Struhl, k.(1994). Duality of TBP, the universal transcription factor. *Science 263:* 1103-4.

Sussel, L. e Shore, D. (1991). Separation of transcription activation and silencing functions of RAP1- encoded repressor/activator protein 1: isolation of viable mutants affecting both silencing and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88*: 7749-53.

Thompson, C.M. e Young, R.A. (1995). General requirement for RNA polymerase II holoenzymes *in vivo. Cell 73*: 1361-75.

Traut, R.R., Casiano, C. e Zecherle, N. (1989). Crosslinking of protein subunits and ligands by the introduction of disulphide bonds, p. 101-133. In T. E. Creighton (ed.), Protein function: a practical approach. *IRL Press, Oxford.*

Valay, J.G., Simpson, M. e Faye, G. (1993). The kin28 protein Kinase is associated with a cyclin in *Saccharomyces cerevisiae. J.Mol.Biol. 234*: 307-10.

Verrijzer, C.P., Yokomori, K., Chen, J-L. E Tjian, R. (1994). Drosophila $TAF_{II}150$: similarity to yeast gene TSM-1 and specific binding to core promoter DNA. *Science 264*: 933-41

Vidal, M., Brachmann, R. K., Fattaey, A., Harlow, E. e Boeke, J. D. (1996). Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A 93*: 10315-20.

Vidal, M., Braun, P., Chen, E., Boeke, J. D. e Harlow, E. (1996). Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A 93*: 10321-6.

Vidal, M. (1997) In Bartel e Fields (eds), The Yeast Two-Hybrid Systems. *Oxford University Press, NY*, 109-147.

Vidal, M. e Legrain,P. (1999). Yeast foward and reverse n'-hybrid systems. *Oxford University Press* 27: 919-129.

Vincent, A.C.e Struhl, K. (1992). ACR1, a yeast ATF/CREB repressor. *Mol.Cell. Biol. 12*: 5394-405.

Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M. e Cooper, J. A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell 74*: 205-14.

Walmsley, R. M., Billinton, N. e Heyer, W.-D. (1997). Green fluorescent protein as reporter for the DNA damage-induced gene *RAD54* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast 13*: 1535-1545.

Warner, P.H., Viciana, P.R. e Downward, J. (1993). Direct interaction of *Ras* and the amino-terminal region of Raf-1 *in vitro*. *Nature 364*: 352-355.

White, M. (1996). The yeast two-hybrid system : Foward and reverse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93*: 10001-10003.

Yang, X., Hubbard, E. J. e Carlson, M. (1992). A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science 257*: 680-2.

Young, R.A. (1991). RNA polymerase II. *Annu.Rev.Biochem. 60:* 698-715.

Young, R. e Davis, R. (1983). Yeast RNA polymerase II genes: Isolation with antibody probes. *Science 222:* 778-782.

Yun. D-F., Laz, T.M., Clementes, J.M.e Sherman,F. (1996). mRNA sequences influencing translation and the selection of AUG initiator codons in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Microbiol. 19:* 1225-1239.

Zhang, X. F., Settleman, J., Kyriakis, J. M., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S. J., Marshall, M. S., Bruder, J. T., Rapp, U. R. e Avruch, J. (1993). Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature 364*: 308-13.

Zhang, B., Kraemer, B., Sengupta, D., Fields, S. Wickens, M. (1997). In Bartel, P.L., e Fields, S. (eds), the Yeast Two-Hybrid System. *Oxford University Press*, New York, NY, 298-351.

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