

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DEBORA REGINA DOS SANTOS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO EM
LEVEDURAS E SUAS VARIAÇÕES E APLICAÇÃO EXPERIMENTAL DO
SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO CLÁSSICO

CURITIBA

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA DO SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO EM
LEVEDURAS E SUAS VARIAÇÕES E APLICAÇÃO EXPERIMENTAL DO
SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO CLÁSSICO

Trabalho de conclusão de curso para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas. Realizado no departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR, sob a orientação da: Prof.^a Dr.^a Adriana Frohlich Mercadante.

CURITIBA

2009

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1.1. A proteína Prion celular	02
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	04
2.1. O sistema de duplo-híbrido clássico	04
2.2. Variações de Y2H no núcleo.....	06
2.3. Duplo-híbrido com Proteínas Citosólicas e Integrais de Membrana.....	10
2.4. Duplo-híbrido com Proteínas Transmembranas e Extracelulares	19
2.5. Vantagens e limitações dos sistema de duplo-híbrido	20
2.5.1 Falsos positivos e falsos negativos	21
2.6. Métodos de validação das interações protéicas encontradas no Y2H	22
2.7. Aplicações do Y2H e suas variantes.....	24
2.7.1 O Y2H no estudo de patologias e drogas	24
2.7.2 O Y2H no mapeamento de vias de sinalização	26
2.7.3 O Y2H na descoberta de ligantes e suas funções.....	26
2.7.4 O Y2H no estudo de homologias.....	27
3 OBJETIVOS	29
3.1. Objetivos Gerais.....	29
3.2. Objetivos Específicos	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Linhagens celulares e Vetores Utilizados.....	30
4.1.1. Linhagens de Leveduras	31
4.1.2. Vetores	31
4.2. Varredura da Biblioteca de Epitélio Olfatório	33
4.3. Construção da Isca de PrPc.....	36
4.3.1. Obtenção do Inserto	36
4.3.2. Digestão do Inserto e do pGilda	37
4.3.3. Quantificação do PrPc e do Vetor	38
4.3.4. Inserção do PrPc no Vetor	38
4.3.5. Transformação das Bactérias.....	38
4.3.6. PCR de Colônia.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1. Varredura da Biblioteca de cDNA de Epitélio Olfatório	41
5.2. Construção da Isca de PrPc	47
5.2.1. O Desenho dos Iniciadores.....	48
5.2.2. Obtenção de Insertos.....	48
5.2.3. Digestão, Quantificação, Ligação e Transformação	50
5.2.4. PCR de Colônias	51
6. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE SIGLAS

5-FOA – ácido 5-fluorótico

AD – Domínio de Ativação

cDNA – DNA complementar

CFU – Unidades Formadoras de Colônias

CM – Meio Completo

Cub – Domínio C-terminal da ubiquitina

CT-ORM93 - isca correspondente ao domínio carboxi-terminal do receptor olfatório M93

DBD – Domínio de Ligação ao DNA

EGY48 – Linhagem de leveduras onde é transformada a presa

FKBP12 – (FK Binding Protein 12) Proteína intracelular chamada imunofilina

FK506 – a droga também conhecida como Tacrolimus, um fármaco imunossupressor da classe dos macrolídeos

GAL – Galactose

GLU – Glucose

GEF – Fatores permutadores de nucleotídeos de guanina

HBV – Vírus da Hepatite B

His – Histidina

LEU – Leucina

LEU2 – Gene repórter que ativa a produção de leucina

mRas – Ras de mamífero

MAPPIT – sistema de duplo-híbrido baseado na ativação da via da Janus-quinase (JAK)

rMAPPIT – Sistema MAPPIT Reverso

MASPIT – Sistema MAPPIT envolvendo três moléculas híbridas

MbY2H - Sistema de membrana baseado na fragmentação da ubiquitina

MDM2 – Oncogene regulador negativo do p53

MS – Espectrometria de Massa

NOS – Neurônios Olfatórios Sensoriais

Nub – Domínio N-terminal da ubiquitina

pGilda – vetor onde é clonada a isca.

pJG4-5 – vetor onde é clonada a presa.

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
Pol III Y2H – Sistema RNA Polimerase III baseado no duplo-híbrido
PrP^c – Proteína Prion Celular
Raff – Rafinose
RD – Domínio de Repressão
RE – Retículo Endoplasmático
RFY206 – Linhagem de levedura onde é transformada a isca
RRS – Sistema de Recrutamento Ras
RTA – Sistema Transativador Reprimido
rRRS – Sistema Reverso de Recrutamento Ras
snRNA – Pequeno RNA nuclear
SCINEX-P – Sistema de duplo-híbrido baseado a Ire1p do RE
SRS – Sistema de Recrutamento SOS
STAT3 – Fatores de transcrição utilizados no sistema MAPPIT
SUS – Sistema de Fragmentação da Ubiquitina
TF – Fator de Transição
Trp – Triptofano
Ub – Ubiquitina
UBPs – Proteases ubiquitina-específicas endógenas
Ura – Uracila
URA3 – Gene repórter que ativa a produção de orotidina-5'-fosfato (OMP) descarboxilase
yRas – Ras de levedura
Y2H – Duplo-Híbrido em Leveduras
YPD - yeast extract-pepton-dextrose *medium*- meio contendo extrato de levedura, peptone e dextrose.
rY2H – Duplo-Híbrido em Leveduras Reverso

RESUMO

O sistema de duplo-híbrido em leveduras é um engenhoso ensaio genético criado em leveduras para detectar interações entre proteínas. Esta técnica tem se tornado cada vez mais popular no estudo de interações devido às muitas vantagens que ela apresenta como a capacidade de reportar interações proteicas *in vivo*, fácil implementação, custos relativamente baixos e, principalmente, a possibilidade de análises em larga escala onde podem ser feitas varreduras de busca por possíveis interações mesmo que os componentes que interagem com uma determinada proteína alvo não sejam conhecidos. Entretanto, apesar de abrir inúmeras possibilidades, esta técnica também apresenta algumas limitações que dificultam o seu uso. Mas ainda assim, as vantagens desta abordagem inspiram cada vez mais pesquisadores a utilizarem o duplo-híbrido e buscarem estratégias que superem as limitações deste sistema. Pensando em todas as possibilidades que o sistema de duplo-híbrido pode proporcionar ao estudo dos interactomas, o presente trabalho buscou apresentar, através de uma revisão bibliográfica, uma visão geral sobre as atuais aplicações do sistema de duplo-híbrido e as tecnologias variantes baseadas neste sistema, e também uma visão experimental sobre a funcionalidade prática da estratégia do duplo-híbrido clássico. Durante o desenvolvimento experimental deste trabalho, foram acompanhados experimentos referentes à construção de iscas de proteínas príon celular PrP^c que futuramente serão utilizadas em varreduras de uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório através da técnica de duplo-híbrido clássico, e também servirão como uma base para a implementação do sistema de duplo-híbrido no laboratório de neurobiologia do Departamento de Patologia Básica da UFPR.

1. INTRODUÇÃO

Muitos processos bioquímicos são mediados através de interações específicas entre proteínas. Desta forma, a exploração global e de caminhos específicos de determinadas proteínas e redes de interações é crucial para o entendimento de vários processos relacionados à biologia dos organismos como, por exemplo, para a elucidação completa dos mecanismos de funcionamento das células, para o entendimento de doenças, na descoberta e desenvolvimentos de drogas ou mesmo no estabelecimento de relações evolutivas.

E assim, a busca pela elucidação destes problemas diversos juntamente com o avanço da tecnologia impulsionam a pesquisa de proteômica e de interactomas a se desenvolverem a uma velocidade cada vez maior. Isto tem permitido o desenvolvimento de muitas estratégias de busca de possíveis interações protéicas. Além da variedade de técnicas bioquímicas *in vitro* já utilizadas, como ensaios de co-immunoprecipitação, cromatografia de afinidade e técnicas baseadas em mecanismos de fluorescência (Fiebt *et al.*, 2008), novos métodos *in vivo*, utilizando bactérias, leveduras e células de mamíferos, têm sido criados com base em estratégias genéticas que buscam habilitar varreduras de larga escala para pequenas moléculas que compõem bibliotecas de proteínas ligantes.

Dentre as várias técnicas desenvolvidas, uma tem recebido especial interesse na avaliação de interações protéicas: o sistema de duplo-híbrido. O sistema de duplo-híbrido é um ensaio genético criado em leveduras para detectar interações entre proteínas e, desde a sua primeira descrição em 1989, ele tem se tornado cada vez mais popular na área de pesquisa de interactomas devido às muitas vantagens que apresenta como, por exemplo, reportar interações protéicas *in vivo*, fácil implementação, custos relativamente baixos e, principalmente, a possibilidade de análises em larga escala onde podem ser feitas varreduras de busca por possíveis interações mesmo que as proteínas que interagem com uma determinada proteína alvo não sejam conhecidas (Brukner *et al.*, 2009).

Pensando em todas as possibilidades que o sistema de duplo-híbrido pode proporcionar ao estudo dos interactomas, o presente trabalho buscou apresentar uma visão geral sobre as atuais aplicações do sistema de duplo-híbrido e as tecnologias variantes baseadas neste sistema, e também sobre a funcionalidade prática da estratégia do duplo-híbrido clássico.

Para realizar esta busca, este projeto de monografia foi desenvolvido em duas frentes de estudo, uma de revisão bibliográfica sobre o sistema clássico de duplo-híbrido em leveduras e as adaptações desenvolvidas com base nesta técnica, e a outra foi a realização de um trabalho prático sobre o tema de estudo, onde foram acompanhados experimentos referentes à construção de iscas de proteínas príon celular PrP^c que serão utilizadas em varreduras de uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório através da técnica de duplo-híbrido clássico.

A seguir será apresentada uma breve descrição da PrP^c e da motivação do projeto envolvendo esta proteína.

1.1. A proteína príon celular

A proteína príon celular (PrP^c) é uma glicoproteína de 33-35 kDa que é ligada à membrana através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) após a clivagem de um peptídeo sinal de 22 aminoácidos. A proteína contém uma ponta N terminal de 100 aminoácidos, flexível. Três domínios de alfa-hélice inter espaçados por dois domínios de beta-conformação formam um domínio globular (Revisado por Linden et al., 2008; Stahl et al., 1987).

A PrP^c é expressa normalmente em vários tecidos e tipos celulares, mas tem maior expressão no sistema nervoso central (Bendheim *et al.*, 1992). Esta proteína é de grande interesse médico, pois pode sofrer modificações conformacionais que podem gerar diversas patologias priônicas. Na modificação conformacional, a proteína príon celular muda para uma isoforma insolúvel – o que caracteriza o principal evento patogênico – de conformação anormal e resistente a proteases, denominada Príon ou PrP^{Sc} (Meyer *et al.*, 1986). A Príon (PrP^{TSE} ou PrP^{Sc}) (*proteinaceous infectious particle*) é a isoforma transmissível, scrapie ou patogênica da PrP^c, ela é responsável pelas encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE), um grupo de doenças neurodegenerativas fatais que afetam humanos e outros animais (Bolton *et al.*, 1982). Esta PrP^{Sc} acumula-se nas células e em depósitos extracelulares similares a placas, convertendo mais proteínas normais à forma patogênica, disparando a neurodegeneração (Wilson e Nixon, 2009).

Além da importância médica, também tem sido bastante discutida a função da proteína príon normal. Uma das formas de se elucidar esta questão seria descobrir quais

proteínas celulares interagem com a PrP^c e muitas destas já foram identificadas através do sistema duplo-híbrido (Chiesa e Harris, 2009).

Sabe-se que a PrP^c é expressa no sistema olfatório de camundongos tanto em neurônios periféricos quanto neurônios centrais, e é restrita a axônios tanto nos neurônios olfatórios sensoriais (NOS) do epitélio olfatório quanto nas células mitrais do bulbo olfatório. A presença da proteína príon celular nas células NOS, nas células mitrais e dendríticas indicam que esta é uma proteína importante para a função do bulbo olfatório (Le Pichon e Firestein, 2008). Além disto, ela também está envolvida na capacidade olfatória (pois camundongos nocaute para o gene *Prnp*, o que codifica a proteína príon celular, mostram deficiência na olfação. Foi constatado que as células mitrais receberiam uma inibição facilitada nos animais nocaute, com alterações nas propriedades das sinapses dendrodendríticas, mas que as interações bioquímicas da PrP^c com a maquinaria sináptica precisam ser melhor esclarecidas (Le Pichon *et al.*, 2009).

A partir destas informações, e dos estudos disponíveis na literatura que demonstraram a possibilidade de utilização do sistema de duplo-híbrido na investigação de proteínas que interagem com a PrP^c, foi desenvolvido um projeto de pesquisa (mestrado) no laboratório de Neurobiologia, do Dpto. De Patologia Básica – UFPR, onde estão sendo investigadas possíveis proteínas relacionadas ao epitélio olfatório que interagem com a PrP^c utilizando-se o sistema de duplo-híbrido clássico.

É importante destacar também que a elucidação das interações protéicas no sistema olfatório poderá trazer informações sobre o funcionamento do olfato e das funções fisiológicas das proteínas estudadas, como a PrP^c, além de poder facilitar o entendimento do mecanismo molecular das doenças causadas por príons.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO CLÁSSICO

O sistema de duplo-híbrido em leveduras (“Y2H – Yeast Two Hybrid”) foi primeiramente descrito por Fields and Song em 1989. Eles descreveram uma revolucionária técnica de análise *in vivo* de interações protéicas, um sistema genético para detecção direta de interações proteína-proteína em leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Esta técnica foi inspirada em conhecimentos desenvolvidos alguns anos antes, por Brent e Ptashne que em 1985 demonstraram que era possível remontar um novo (e funcional) ativador transcricional pela fusão de um domínio de ligação ao DNA de um repressor LexA de *E. coli*, ao domínio de ativação de uma segunda proteína, a Gal4 de leveduras (MacDonald, 2001). A Gal4 é um ativador transcricional encontrado em leveduras que se liga a uma sequência específica de DNA (UAS – *the upstream activation domain*) e ativa a transcrição na presença de galactose. Na Gal4 podem ser identificados dois domínios distintos: um domínio N-terminal de ligação ao DNA (“DBD – DNA Binding Domain”) e um domínio de ativação C-terminal (“AD – Activation Domain”), responsável pela ativação da transcrição. Estes dois domínios conseguem manter suas funções de maneira independente um do outro (Brukner *et al.*, 2009).

A partir destas descobertas, Fields and Song desenvolveram uma forma de monitorar interações protéicas baseadas nas propriedades modulares da Gal4. A idéia básica foi fusionar duas proteínas de interesse aos domínios de ligação e de ativação da Gal4, respectivamente, e desta forma, a interação entre estas proteínas reconstituiria um fator de transcrição funcional que poderia ativar a expressão do gene repórter na presença de galactose (figura 1). Este sistema depende de duas construções, uma chamada de “isca”, onde uma proteína é ligada ao DBD da Gal4, e uma chamada de “presa”, onde a outra proteína de interesse é ligada ao AD da Gal4. Após a interação entre isca e presa, o fator de transcrição Gal4 é reconstituído e então ele recruta a RNA Polimerase II, levando a transcrição da *GALI-lacZ* gene de fusão. Este gene repórter codifica a enzima β -galactosidase que marca as colônias onde ocorre interação quando é utilizado um substrato colorimétrico (Suter *et al.*, 2008). Em sistemas de Y2H clássicos, os fatores transcricionais tipicamente utilizados são as proteínas ativadoras Gal4 e LexA (Golemis *et al.*, 1999), sendo que cada uma destas apresenta propriedades

particulares que podem ser levadas em consideração no momento da seleção do sistema a ser utilizado.

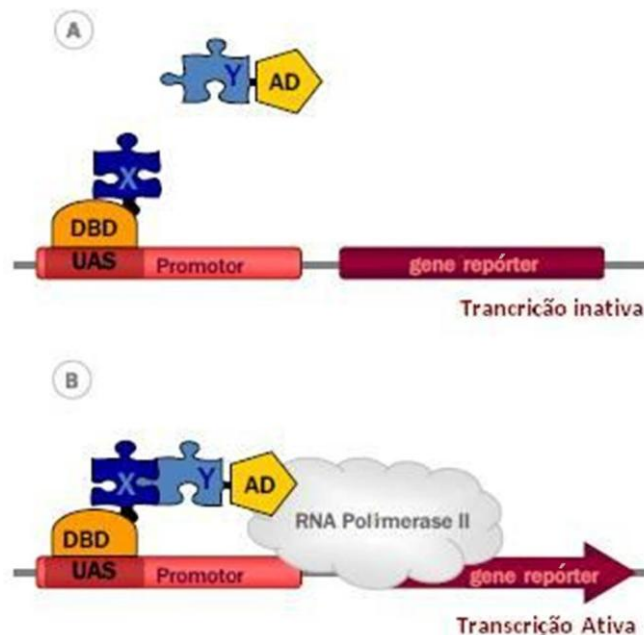


FIGURA1: O SISTEMA DE DUPLO-HÍBRIDO CLÁSSICO – (A) A proteína de interesse X é fusionada ao domínio de ligação (DBD), uma construção chamada de isca. A possível proteína de interação Y é fusionada ao domínio de ativação (AD) e é chamada de presa. (B) a isca se liga à sequência de ativação (UAS) do promotor. A interação entre isca e presa recruta o AD e reconstitui o fator de transcrição funcional. Levando ao recrutamento adicional da RNA Polimerase II e subsequente transcrição do gene repórter (FONTE: Adaptado de Brukner *et al.*, 2009).

O desenvolvimento desta abordagem genética do Y2H permitiu a realização de seleções de interações protéicas através de varreduras de bibliotecas de cDNA feitas a partir de proteínas presas carregando domínios de ativação. A grande vantagem desta tecnologia é que as interações podem ser observadas em um sistema *in vivo*, no entanto, como os organismos vivos são muito mais complexos do que os sistemas *in vitro*, este sistema exige um maior planejamento de execução dos experimentos. Isto fica mais claro ao lembrar que a técnica do Y2H envolve a transformação de células de levedura com DNA da isca e da presa em diferentes vetores sobre o controle de promotores específicos de leveduras, desta forma destaca-se o fato de que é preciso um grande cuidado com o planejamento da seleção, pois os níveis de expressão vão depender do promotor utilizado e das características do ambiente onde a célula irá crescer.

Assim, é importante destacar que para que a técnica seja eficiente, são necessários métodos de controle de expressão e especificidade, e, além disso, o gene

repórter adequado precisa codificar uma proteína cuja função providencie uma leitura simples e adequada.

Pensando nestas características, muitos sistemas de duplo-híbrido são desenvolvidos utilizando-se reações colorimétricas proporcionadas pela ativação do gene *lacZ*, e comumente também são utilizados marcadores auxotróficos que permitem o crescimento em meios mínimos (como p. ex. *LEU2*, *HIS3*, *ADE2*, *URA3*, *LYS2*, que são marcadores utilizados em leveduras que necessitam da suplementação de certos aminoácidos essenciais não sintetizados pelas próprias células para o seu crescimento, a seleção é realizada através de um vetor de expressão que contém um gene que complementa a mutação da cepa e restaura sua capacidade de crescer em meio mínimo deficiente do respectivo aminoácido) (Brukner *et al.*, 2009). Na verdade, em muitos casos são utilizados mais de um vetor contendo um gene repórter para aumentar a especificidade das análises de Y2H.

Inicialmente o sistema de duplo-híbrido clássico foi desenvolvido focando a investigação de interações entre proteínas, mas a idéia básica deste sistema abriu caminhos para o desenvolvimento de algumas adaptações para o estudo de alguns elementos de natureza não protéica. E assim, desde a década de 90 o sistema de duplo-híbrido já foi expandido para detecções de muitas interações que ocorrem entre proteínas e outros elementos como, por exemplo, proteínas e RNA (SenGupta *et al.*, 1996) ou proteínas e ligantes não protéicos (Licitra e Liu, 1996).

Estas expansões são resultados da intensa busca de alguns pesquisadores por adaptações que superem as limitações encontradas no Y2H clássico. Desta forma, vem crescendo cada vez mais o número de adaptações desenvolvidas com base no Y2H que possibilitam a análise daquelas interações que não podem ser investigadas através do sistema clássico, e a cada nova adaptação descrita nos meios científicos abrem-se novas possibilidades de exploração de sistemas e de investigação de elementos novos. A seguir serão abordadas algumas destas adaptações desenvolvidas com base no sistema de duplo-híbrido clássico.

2.2. VARIAÇÕES DE Y2H NO NÚCLEO

O sistema de duplo híbrido clássico é baseado na reconstituição de fatores de transcrição e, por isto, não é adequada sua utilização na análise de interação entre proteínas iscas que podem ativar a transcrição diretamente, ou seja, sem a necessidade

de qualquer interação com as presas. Visando a análise deste tipo de isca, muitos pesquisadores desenvolveram adaptações baseadas no Y2H clássico que permitem a análise daquelas proteínas que não podem ser analisadas através do duplo-híbrido clássico como, por exemplo, proteínas auto-ativadoras ou inibidores de interações.

Em 1999, Serebriiskii e seus colegas (Serebriiskii *et al.*, 1999) adaptaram a estratégia básica do duplo-híbrido para criar um novo **sistema de isca dupla** desenvolvido para permitir a varredura de bibliotecas de proteínas que interagem com a proteína 1, fusionada ao DBD-A (LexA), mas não interagem com a proteína 2, fusionada ao DBD-B (do repressor cI do bacteriófago λ), e desta forma cada isca é direcionada a um gene repórter diferente (operador LexA ativa o *LEU2* e *LacZ*, e o operador cI ativa a *LYS2* e *GusA*).

A vantagem da utilização de mais de uma isca é que esta estratégia permite comparar especificidades de interação e assim eliminar falsos positivos gerados por interações inespecíficas. Por exemplo, se durante uma varredura uma proteína de interação fusionada a um domínio de ativação se associar unicamente com a isca primária fusionada ao LexA mas não com a isca alternativa fusionada ao cI, a ativação do gene repórter fará com que as colônias contendo a isca apropriada se tornem azuis em um meio contendo X-Gal mas não em um meio contendo X-Gluc. Além disto, as colônias resultantes desta interação crescem em um meio com ausência de leucina, mas falham em crescer em um meio sem lisina. Mas em contraste a isto, interações inespecíficas entre isca e presa onde ocorre interação com as duas iscas podem revelar um crescimento em meio sem leucina e lisina e coloração azul com X-Gal e X-Gluc. Desta forma é possível isolar as colônias onde ocorrem interações inespecíficas e selecionar os clones verdadeiramente positivos.

Além da possibilidade de eliminação de falsos positivos, o trabalho acima citado ainda aponta aplicações para o sistema de isca dupla na identificação de mutações que interrompem a interação com uma ou com ambas as partes de uma proteína, e também na investigação de drogas, aonde pares de iscas reagentes podem ser aplicadas em um controle simultâneo para a especificidade de cada interação (Serebriiskii *et al.*, 1999).

Outra estratégia desenvolvida com base no sistema duplo-híbrido clássico foi o **sistema triplo-híbrido**. Neste sistema um terceiro ligante híbrido sintético é adicionado ao sistema de Y2H clássico (figura 2) para reconstituir a transcrição do gene repórter. As três moléculas híbridas consistem em uma proteína de fusão chamada de “gancho”, uma segunda proteína de fusão híbrida chamada de “peixe” e um terceiro híbrido

sintético ligante chamado de “isca”. O híbrido ligante é um heterodímero constituído de dois diferentes pequenos ligantes orgânicos, A e B, enquanto o gancho é formado por um receptor do ligante A fusionado a um domínio de ligação ao DNA (p.ex. LexA), e o peixe por sua vez é formado pela fusão entre o receptor do ligante B e um domínio transativador (p.ex. a proteína bacteriana B42) (Licitra e Liu, 1996). Se os ligantes A e B se ligarem aos seus respectivos receptores, ocorre a aproximação dos domínios de ligação ao DNA e de transativação e a conseqüente ativação do gene repórter (p.ex. *LacZ*).

Assim como o duplo-híbrido clássico, o sistema de triplo-híbrido não é facilmente aplicado a muitas proteínas associadas à membrana, limitando assim os tipos de receptores para proteínas solúveis ou domínios solúveis de proteínas associadas a membrana. Mas apesar das limitações, este sistema já foi utilizado em várias aplicações como detecção de interações entre receptores e pequenas proteínas-ligantes, de interações proteína-RNA e ainda para encontrar pequenas moléculas inibidoras de quinases (Licitra e Liu, 1996, SenGupta *et al.*, 1996, Becker *et al.*, 2004).

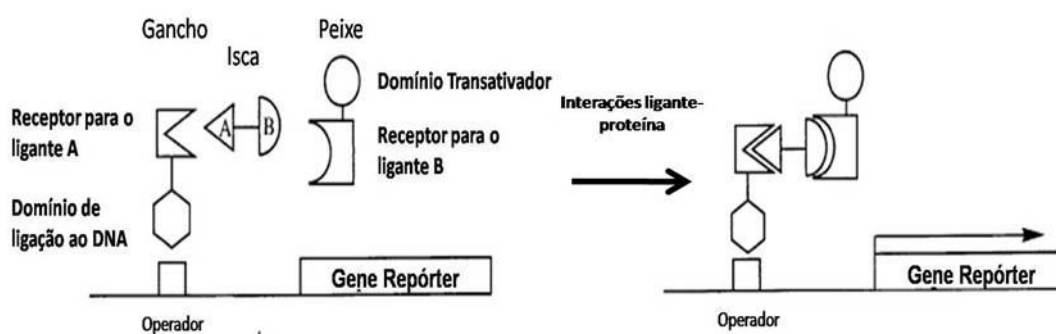


FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS COMPONENTES DO SISTEMA DE TRIPLO-HÍBRIDO – A isca híbrida sintética consiste em dois ligantes conectados, o A e o B. A presa 1 (gancho) consiste em um receptor para o ligante A fusionado a um domínio de ligação ao DNA (DBD) de um fator de transcrição. A presa 2 (peixe) consiste em um receptor para o ligante B fusionado ao domínio transativador (DA) do fator de transcrição. A interação das três moléculas híbridas forma um complexo trimérico e resulta na proximidade de DA e DBD levando à ativação do gene repórter (FONTE: Adaptado de Licitra e Liu, 1996).

O sistema de duplo-híbrido reverso (“rY2H – Reverse Yeast Two Hybrid”) é semelhante ao Y2H clássico, porém, a interação entre isca e presa promove a expressão de um gene repórter que diminui a viabilidade celular sob determinadas condições (seleção negativa). Este sistema foi desenvolvido para selecionar positivamente interações protéicas interrompidas por mutações e para também identificar e caracterizar

estas mutações utilizando marcadores contra-seletivos (Kim *et al.*, 2007). Neste sistema, comumente é utilizado o gene repórter URA3 da levedura como um marcador contra-seletivo, pois a ativação da URA3 torna as leveduras sensíveis ao 5-FOA (ácido 5-fluorótico) que é convertido a um metabólito tóxico pela orotidina-5'-fosfato (OMP) descarboxilase, o produto catalítico do URA3. Desta forma, quando submetidas ao 5-FOA, as colônias onde houve interação isca-presa tornam-se inviáveis (Vidal *et al.*, 1996).

Huang e Schreiber aplicaram este sistema em uma varredura de pequenas moléculas que interrompem interações protéicas (Huang e Schreiber, 1997). Neste modelo, a interrupção da interação isca-presa pelas pequenas moléculas restabelece a viabilidade celular mesmo na presença do metabólito tóxico.

Outra alternativa criada para a realização de varreduras de pequenas moléculas inibidoras de interações protéicas compondo uma biblioteca é o **sistema transativador reprimido** (“**RTA** – Repressed Transactivator System”) (Brukner *et al.*, 2009, Joshi *et al.*, 2007, Hirst *et al.*, 2001) (Figura 3 – A). Neste sistema a isca utilizada é uma proteína auto-ativante (como p.ex. um fator de transcrição) fusionada ao domínio de ligação ao DNA do gene repórter Gal-4. Então a presa é fusionada à porção N-terminal do domínio de repressão transcricional (“**RD** – Repression Domain”) da Tup1, um repressor geral da levedura de brotamento *Saccharomyces*. Se ocorrer interação isca-presa, a RNA Polimerase II não será recrutada e a transcrição do gene repórter é reprimida. Mas na ausência da interação, a ativação do gene repórter URA3 torna as leveduras sensíveis ao 5-FOA (ácido 5-fluorótico). Desta forma, quando submetidas ao 5-FOA, apenas as colônias onde houve interação isca-presa mantêm-se viáveis.

Outro sistema desenvolvido, com base no Y2H clássico, utilizado em avaliação de interações envolvendo fatores de transcrição é o **sistema RNA polimerase III baseado em duplo-híbrido** (“**Pol III Y2H**”) (Figura3 – A). Neste sistema eles utilizaram um gene *SNR6* modificado com a introdução de um domínio de ligação GAL4 (UAS_G-*SNR6*). Assim como no Y2H clássico, uma determinada proteína é fusionada ao domínio de ligação DBD-Gal4 formando a isca. Já a presa é construída de forma diferente, ela é fusionada ao τ 138p, uma subunidade do complexo protéico multimérico TFIIC, um dos dois fatores transcricionais envolvidos na transcrição mediada pela RNA polimerase III (Pol III). Se houver uma interação isca-presa, o complexo TFIIC se liga ao DNA e recruta o segundo fator transcricional (TFIIIB) e a enzima RNA-Pol III, o que irá ativar a transcrição do gene repórter *SNR6* para produzir

U6 snRNA (Marsolier *et al.*,1997). Ao utilizar uma linhagem de leveduras mutante pra U6 snRNA que é termo-sensível, é possível realizar a seleção das células onde ocorre a interação através do aumento da temperatura pois a transcrição do gene repórter permitirá às células crescerem a 37°C.

Marsolier e seus companheiros (Marsolier *et al.*1997) também descobriram que o gene modificado *SNR6* não pode ser ativado por ativadores da RNA Polimerase II, como VP16 e p53, fusionados ao domínio de ligação Gal4, mas o UAS_G-SNR6 pode ser fortemente ativado quando a GAL80, uma proteína de interação, é fusionada ao $\tau 138p$. Este resultado indica que este sistema de duplo-híbrido pode ser utilizado na avaliação de interações entre proteínas que participam da regulação da RNA Polimerase II.

2.3. DUPLO-HÍBRIDO COM PROTEÍNAS CITOSÓLICAS E INTEGRAIS DE MEMBRANA

As proteínas associadas a membrana constituem uma grande série de funções celulares essenciais, e juntas elas podem compor aproximadamente um terço de todas as proteínas em uma célula eucariótica típica (Stagljar and Fields, 2002). Há uma grande diversidade de proteínas associadas a membrana que desencadeiam respostas celulares específicas, e assim, por causa da fácil acessibilidade e papéis essenciais na célula, têm-se dado considerável importância diagnóstica e terapêutica às proteínas de membrana.

Até o momento, as variações do Y2H clássico apresentadas neste trabalho eram utilizadas na avaliação de interações entre proteínas que necessitam ser translocadas até o núcleo, não podendo desta forma ser utilizadas no estudo de proteínas localizadas em outros compartimentos celulares, como é o caso por exemplo de proteínas de membrana que possuem natureza hidrofóbica e não podem ser analisadas utilizando-se o núcleo como modelo de estudo. Uma maneira de avaliar proteínas naturais de um meio extra-nuclear utilizando o Y2H clássico é retirar da proteína a sequência sinal que marca a localização dela e adicionar um sinal de localização nuclear, mas isto pode interferir na conformação terciária de algumas proteínas e por isto nem sempre pode ser aplicado. E assim, buscando contornar estas limitações do sistema de duplo-híbrido clássico, foram desenvolvidas diversas adaptações baseadas no Y2H que utilizam abordagens diferentes de interação e permitem a avaliação de proteínas de membrana e proteínas citosólicas.

Algumas destas adaptações feitas para a investigação de interações que ocorrem no citosol utilizam como ferramenta a via de sinalização Ras. As proteínas Ras pertencem a superfamília das GTPases monoméricas. As proteínas Ras possuem um grupamento lipídico ligado covalentemente, que auxilia no ancoramento da proteína à membrana – neste caso, à fase citoplasmática, onde a proteína atua. A Ras auxilia na transmissão de sinais da superfície celular para outras partes da célula. Esta proteína possui dois estados conformacionais distintos, quando ligadas ao GTP estão ativas e quando ligadas ao GDP estão inativas. Duas outras classes de proteínas sinalizadoras regulam a atividade da Ras, são os fatores permutadores de nucleotídeos de guanina (GEFs), que ligam GTP e ativam a Ras, e as proteínas ativadoras das GTPases (GAPs) que aumentam a velocidade de hidrólise do GTP pela Ras, inativando-as (ALBERTS *et al.*, 2004). A adaptação baseada no Y2H clássico descrita a seguir utiliza o SOS, um tipo de GEF que ativa a Ras através da estimulação da permuta de seu GDP por GTP.

O **sistema de recrutamento SOS** (“**SRS** – SOS Recruitment System”) (figura 3 – B) (Aronheim *et al.* 1997 a,b), utiliza a via Ras de sinalização em leveduras. Quando localizada na membrana plasmática, o fator GEF *cdc25* estimula a troca GDP/GTP na Ras ativando-a e promovendo o estímulo de crescimento celular. Entretanto, na linhagem de leveduras mutantes termo-sensíveis *cdc25-2*, a Ras da levedura (*yRas*) se torna inativa em temperaturas restritivas (36°C) devido a perda da função do fator permutador de nucleotídeos de guanina do *Cdc25*. Desta maneira, a célula pode crescer a 25°C, mas torna-se inviável a 36°C. Mas Aronheim e seus colegas (Aronheim *et al.*, 1997 – a) descobriram que o fator GEF humano *hSOS*, quando ligado a membrana plasmática, pode ativar a Ras habilitando assim a célula portadora da mutação do *Cdc25-2* para crescer a 36°C. No SRS, a isca é uma proteína solúvel X fusionada à porção C-terminal truncada da *hSOS*, que é ativa mas incapaz de se ligar a membrana plasmática; e a presa pode ser uma proteína integral de membrana ou uma proteína insolúvel que pode ser ancorada na membrana por meio de um sinal de miristoilação. Se houver interação isca-presa, o *hSOS* ativa a Ras da levedura e promove a cascata de sinalização, habilitando assim as leveduras termo-sensíveis para crescerem em 36°C.

Broder e seus colegas (1998) encontraram alguns problemas utilizando o SRS e então o adaptaram desenvolvendo um novo sistema de recrutamento de proteínas designado **sistema de recrutamento Ras** (“**RRS** – Ras Recruitment System”) (figura 3 – B), o qual é baseado na ativação da Ras, localizada na membrana plasmática, através da interação entre duas proteínas híbridas. Assim como o SRS, este sistema utiliza

linhagens de leveduras termo-sensíveis Cdc25-2, mas ao invés de utilizar o SOS humano, este sistema utiliza uma Ras de mamífero constitutivamente ativada (uma Ras sem a sequência consenso “CAAX box” localizada na porção Carboxi-terminal da proteína, responsável pela permuta de nucleotídeos), mas que precisa da localização na membrana para ativar a cascata de sinalização. Na construção da isca, a proteína solúvel X é fusionada diretamente a uma Ras de mamífero ativa constitutivamente (mRAS), enquanto a proteína Y, a presa, é ancorada na membrana (p. ex. via miristoilação). Durante a interação, a X-mRAS é recrutada para a membrana, onde ela ativa a cascata de sinalização e complementa a mutação Cdc25-2, habilitando as células a crescerem em temperaturas restritivas.

Os dois sistemas apresentados, SRS e RRS, podem ser utilizados na análise de interações entre iscas solúveis e presas associadas à membrana. Mas em alguns casos, o alvo de estudo é uma isca associada à membrana e as presas é que são as moléculas solúveis, como por exemplo, na análise de proteínas que possivelmente interagem com a porção citoplasmática de um determinado receptor. Para o estudo destas iscas associadas à membrana, foi desenvolvido o **sistema reverso de recrutamento Ras** (“**rRRS** – Reverse Ras Recruitment System”) (figura 3 – B). Ele é semelhante ao RRS: também é baseado na via de sinalização Ras, também utiliza linhagens de leveduras mutantes para o cdc25-2 termo-sensíveis, e também utiliza uma Ras de mamífero. Mas ao contrário do RRS, este sistema utiliza uma isca integral de membrana, enquanto a presa solúvel é fusionada a uma mRas mutante citoplasmática (Stagljar e Fields, 2002). A interação entre isca e presa recruta a mRas na membrana, resultando assim na cascata de sinalização e no crescimento das mutantes cdc25-2 em temperaturas não permissivas (36°C).

Esta técnica tem sido utilizada em procedimentos de seleção, entretanto ela apresenta um inconveniente, a chance de falsos positivos é bem alta, pois a aproximação de proteínas integrais de membrana ou proteínas associadas a membrana a mRas podem levar a um crescimento das leveduras independente de interação isca-presa (Stagljar e fields, 2002). Estas presas podem localizar a Ras mesmo sem interação isca-presa por uma interação direta da presa com a Ras e não com a isca. Esta desvantagem pode ser contornada com o uso de promotores induzíveis (promotores que são ativados somente através da indução por algum elemento, como p. ex. a galactose), mas isto também pode complicar o potencial de adaptação do sistema de rRRS para varreduras em larga escala.

O **sistema de fusão à proteína-G** (figura 3 – C) também é utilizado no estudo de interações entre iscas integrais de membrana e presas solúveis onde a sinalização via proteína-G é utilizada como leitura repórter. Neste sistema, a presa solúvel é fusionada à subunidade γ da proteína G heterodimérica, enquanto a isca é uma proteína integral de membrana. Se a presa interagir com a isca localizada na membrana, o complexo formado irá seqüestrar a subunidade β da proteína G, o que impede a formação do complexo heterodimérico da proteína G e subsequente parada da sinalização. (Ehrhard. *et al.*, 2000). Há sugestões de que, assim como o sistema RTA Y2H, este sistema possa ser utilizado na avaliação de drogas que interrompem as interações proteína-proteína, sendo que nos dois sistemas a interrupção da interação poderia ser medida através da seleção em uma biblioteca e comparação entre o ganho de sinal em algumas células e a perda de sinal em outras (Ehrhard. *et al.*, 2000).

O **sistema de fragmentação da ubiquitina** (“SUS - Split-ubiquitin system”) é utilizado para a detecção de interações protéicas que ocorram entre proteínas citosólicas e de membrana (Johnsson and Varshavsky, Stagljär *et al.* 1998a,b). A ubiquitina é uma pequena proteína composta de 76 aminoácidos, altamente conservada e presente em todas as células eucarióticas, que se liga covalentemente a lisinas de outras proteínas. A ligação de uma cadeia curta de ubiquitinas a um resíduo de lisina marca a proteína para a destruição proteolítica intracelular, nos proteassomos (Alberts, *et al.* 2004).

A técnica SUS é baseada na reconstituição da ubiquitina (Ub) fragmentada (figura 3 – D). A ubiquitina é dividida em dois fragmentos independentes, um fragmento N-terminal (Nub) e um C-terminal (Cub), ambos mantêm sua afinidade original uma pela outra e podem associar-se espontaneamente, mas esta associação pode ser bloqueada através de mutações pontuais no fragmento Nub. A isca é construída através da fusão de uma proteína ao fragmento Cub e à uma proteína repórter clivável, e a presa é construída pela fusão da proteína presa ao fragmento Nub mutante. Assim a associação entre isca e presa permite a reconstituição da ubiquitina. A ubiquitina reconstituída é então reconhecida por proteases ubiquitina-específicas endógenas (UBPs). As UBPs clivam entre o resíduo C-terminal (Gly76) da Ub e o primeiro resíduo da proteína alvo, permitindo assim a liberação da proteína repórter fusionada ao fragmento C-terminal-Cub (Stagljär *et al.* 1998a,b). O sistema SUS Y2H apresenta a vantagem de que o pequeno tamanho dos fragmentos de ubiquitina nas proteínas híbridas pode minimizar a possibilidade de impedimento estérico.

A reconstituição da ubiquitina fragmentada e a clivagem pelas UBPs independem da localização específica no citosol, e por isto este sistema também pode ser utilizado no estudo de proteínas de membrana. Dois exemplos já descritos são os sistemas de membrana baseados na fragmentação da ubiquitina que utiliza a URA3p como proteína repórter e o sistema de membrana baseado na fragmentação da ubiquitina.

A versão URA3p do sistema de fragmentação da ubiquitina (figura3 – D) utiliza a fusão de uma versão desestabilizada da proteína de levedura URA3, a rURA3p, ao motivo Cub. E então uma proteína integral de membrana é fusionada ao complexo Cub-rURA3 montando assim a isca, enquanto a proteína presa é fusionada ao motivo Nub mutado. As leveduras que expressam a rURA3p não podem crescer em um meio contendo ácido 5-fluorótico (5-FOA). Entretanto, se a célula co-expressar uma proteína que interage com a proteína de fusão, i. e., a presa, o complexo formado pode reconstituir a ubiquitina. Esta associação leva a clivagem da porção C-terminal da Cub e libera a rURA3p no citosol, e então ela é degradada pelo proteossomo 26S, habilitando assim as células a crescerem em um meio contendo 5-FOA. Desta forma, as colônias onde ocorre interação isca-presa podem ser identificadas pela habilidade de sobreviverem em meio seletivo contendo 5-FOA (Johnsson *et al.* 1994).

O sistema de membrana baseado na fragmentação da ubiquitina, **MbY2H** (“Membrane Transactivator Split-Ubiquitin”) (Stagljar *et al.* 1998b, Fetchko e Stagljjar, 2004), também é baseado na reconstituição da ubiquitina através da interação entre isca e presa. No MbY2H (figura3 – D), as iscas são proteínas integrais de membrana ou de periferia que são fusionadas à porção C-terminal da ubiquitina (Cub) seguido por um fator de transcrição artificial, o qual consiste da proteína bacteriana LexA e da proteína transativadora VP16 do *Herpes simplex* (proteína alvo-Cub-LexA-VP16). As presas construídas neste sistema são proteínas citosólicas ou de membrana que são fusionadas à metade N-terminal da ubiquitina (Nub). A interação isca-presa reconstitui a ubiquitina nativa, a qual é clivada pelas UBPs, liberando então a LexA-VP16 que entra no núcleo e ativa a transcrição do gene repórter (i.e. HIS3 e LacZ).

O sistema de ubiquitina fragmentada também foi utilizado em uma adaptação voltada para a análise de proteínas citosólicas, a CytoY2H (figura3 – D). Aqui a isca é ligada à Cub e ao fator de transcrição VP16-LexA e é ancorada na membrana do RE devido à fusão com uma pequena proteína integral de membrana localizada no RE, a Ost4p. A presa citosólica se liga à isca ancorada e reconstitui a ubiquitina, as UBPs

clivam e liberam a proteína repórter, e a ativação do gene repórter é ativada. A ligação da isca com a Ost4p restringe as interações ao citoplasma. Este sistema pode ser aplicado em proteínas que são difíceis de estudar em um contexto nuclear e que não ocorrem necessariamente próximas a membrana (Brokner *et al.*, 2009).

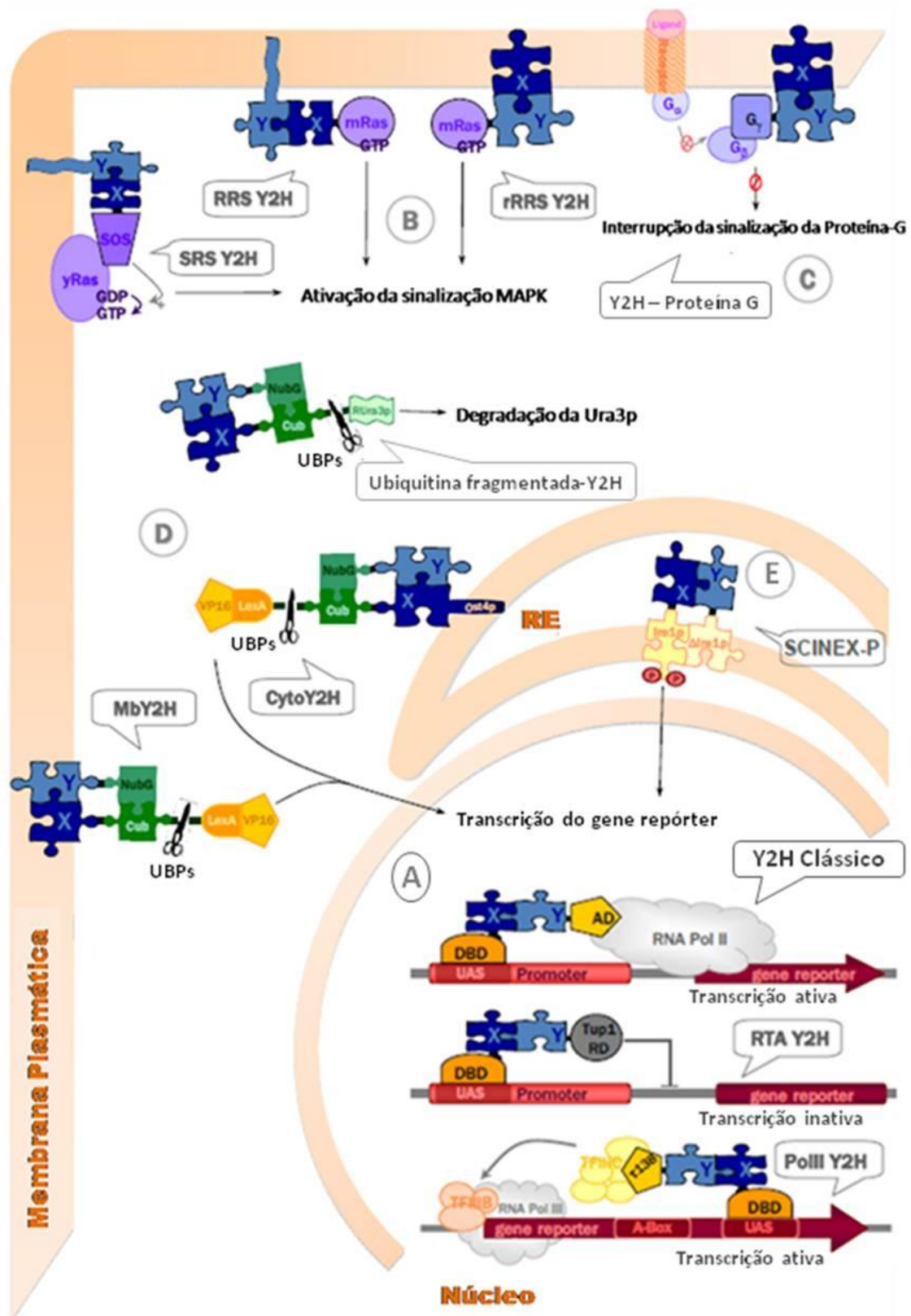


FIGURA 3: SISTEMAS DE DUPLO-HÍBRIDO EM LEVEDURAS – Este esquema inclui alguns sistemas de duplo-híbrido, bem como suas localizações na célula e seus modos de operação. Em (A) estão apresentados os sistemas de duplo-híbrido nucleares: o duplo-híbrido clássico (Y2H Clássico), o sistema de transativação reprimida (RTA Y2H) e o sistema da RNA polimerase III baseado em duplo-híbrido (Pol III Y2H). Em (B) estão representados os sistemas baseados na ativação da sinalização Ras: o sistema de recrutamento SOS (SRS Y2H), o sistema de recrutamento Ras (RRS Y2H), e o sistema reverso de recrutamento Ras (rRRS Y2H). (C) Sistema de duplo-híbrido baseado na sinalização da Proteína G (Y2H – proteína G), onde a interação entre isca e presa promove a interrupção da via de sinalização da proteína G. (D) Sistemas baseados na fragmentação da ubiquitina (ubiquitina fragmentada – Y2H) que envolve a reconstituição da ubiquitina através aproximação dos fragmentos Cub e Nub fusionados à isca e à presa. Suas localizações dependem da natureza das proteínas X ou Y, e das proteínas repórter utilizadas. O MbY2H utiliza a fragmentação da ubiquitina na investigação de interações entre proteínas associadas a membrana. O CytoY2H também é baseado na reconstituição da ubiquitina, é utilizado na investigação de proteínas citosólicas. A proteína X é ancorada na membrana do Retículo Endoplasmático (RE) através de uma âncora de Ost4p, e a interação entre as proteínas X e Y possibilita a reconstituição da ubiquitina, clivagem pelas UBPs e liberação da proteína repórter. (E) Sistema SCINEX-P Y2H, que permite a análise de interações protéica ocorridas no meio redutor do interior do retículo endoplasmático, baseado na dimerização da proteína Ire1p responsável pela sinalização gerada pelo acúmulo de proteínas mal-dobradas. (FONTE: Adaptado de Brukner *et al.*, 2009)

Além de todas estas abordagens baseadas na utilização de leveduras (Resumidas na Tabela 1), também foram desenvolvidas variantes do Y2H objetivando a avaliação de interações proteína-proteína em células mamíferas. Uma delas, o **sistema MAPPIT** (figura4 – A), é baseado na sinalização de citocinas do tipo I envolvendo receptores de citocinas induzidos por ligantes que sinalizam e ativam a via da Janus-quinase (JAKs), recrutando transdutores de sinais e ativando fatores de transcrição (STAT3) (figura 4 – A). No MAPPIT, a proteína isca é fusionada à porção intracelular de receptores de citocina mutantes que não podem recrutar o fator de transcrição STAT3. As proteínas presas são fusionadas a séries de seis sítios funcionais de ligação para STAT3. A interação entre isca e presa resulta na fosforilação e ativação do fator de transcrição STAT3 e indução da luciferase repórter responsiva ao STAT3 no núcleo. A estimulação do gene repórter é utilizada como medida de interação entre isca e presa (Ulrichs *et al.* 2008). O sistema de MAPPIT padrão utiliza células embrionárias de rim humanas (HEK293T), mas pode ser utilizado em outros tipos celulares que expressem quantidades suficientes de STAT3.

Uma adaptação do MAPPIT, o **sistema MAPPIT reverso** (rMAPPIT) foi inspirada no sistema de duplo-híbrido reverso. Descrita em 2005, por Eyckerman e seus colaboradores (*apud* Suter, 2008), esta técnica utiliza uma proteína presa fusionada a um domínio protéico que atua como um inibidor para a atividade do receptor e

recrutamento da STAT. A interrupção da interação isca-presa por uma proteína competidora, ou por uma pequena molécula, resulta na dissociação do inibidor do receptor e ativação da sinalização. Exemplos de aplicação deste sistema incluem as investigações de interrupção de interações protéicas entre a proteína de ligação FKBP12-FK506 e o membro ALK da família de fatores transformantes de crescimento pela droga imunossupressora FK506 e a interrupção nutlin-dependente das interações protéicas entre o supressor de tumor p53 e a MDM2 ubiquitina-ligase.

Em 2006, Caligiuri e seus colegas (Caligiuri et al., 2006) publicaram uma nova metodologia que reunia as vantagens da técnica do triplo-híbrido com o sistema MAPPIT. Esse trabalho aponta que o Y3H apresenta muitas vantagens, mas também possui limitações como a necessidade de translocação das proteínas até o núcleo e a baixa permeabilidade das células de leveduras a pequenas moléculas não-híbridas, o que impede o uso do Y3H na determinação da habilidade de pequenos componentes de interferir com uma interação proteína alvo-ligante híbrido específico. E assim, visando superar estas limitações, foi desenvolvido o sistema chamado de **MASPIT** (figura4 – B) que é baseado na formação de um complexo protéico envolvendo três construções híbridas em um sistema semelhante ao MAPPIT. A isca é construída através da fusão de uma enzima deidrofolato redutase - DHFR de *E. coli* (eDHFR) a um receptor Epo quimérico e a presa é – assim como no MAPPIT – uma proteína fusionada a séries de seis sítios funcionais de ligação para STAT3. Além da isca e da presa, também é construído um terceiro componente híbrido composto de uma pequena molécula de interesse que é conectada ao metotrexato (MTX) por um ligante de polietileno-glicol (PEG). O MTX interage com a eDHFR e a pequena molécula de interesse interage com a proteína presa-gp130, levando assim ao recrutamento da STAT3 e indução da expressão do gene repórter (Caligiuri *et al.*, 2006).

Na publicação desta metodologia foram apontados alguns usos para o MASPIT como: um método complementar ao Y3H para varreduras de bibliotecas de cDNA e identificação de alvos; utilização no estabelecimento de relações entre atividade e estrutura de pequenas moléculas; na identificação de variantes de uma proteína alvo resistentes a drogas; além de também prover uma plataforma de ensaio para determinação de especificidades e potenciais de pequenas moléculas interagirem com proteínas alvo em células intactas.

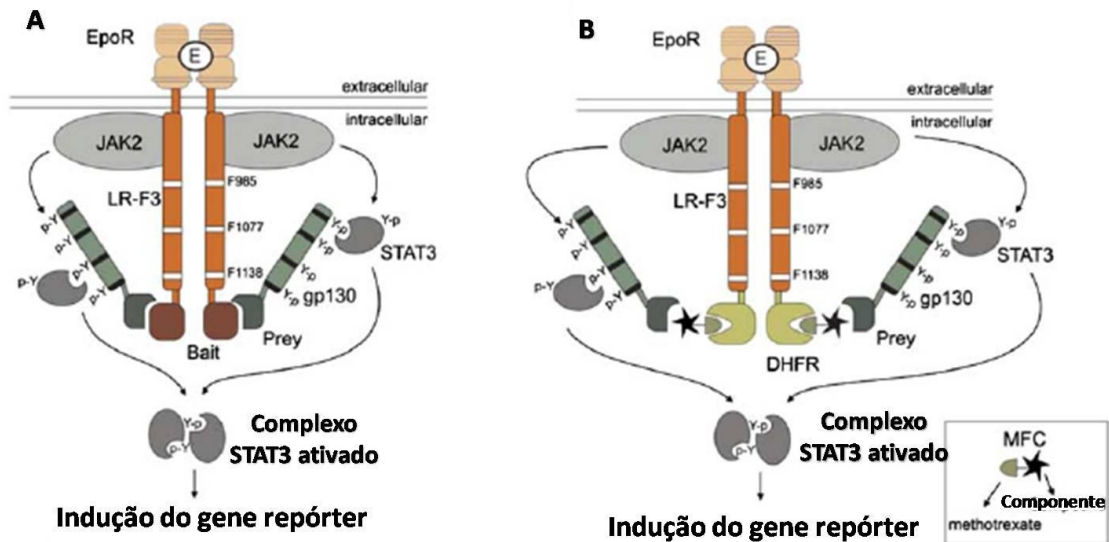


FIGURA 4: PRINCÍPIOS DO MAPPIT E MASPIT – A) O sistema MAPPIT: a isca (“bait”) é fusionada a parte intracelular do receptor Epo deficiente no recrutamento da STAT3 e a presa (“prey”) é uma proteína ligada a séries de seis sítios funcionais de recrutamento STAT3 da cadeia gp130. A associação isca-presa estimula a ativação da STAT3 e indução da luciferase repórter. B) O sistema MASPIT: o eDHFR é fusionado a um receptor quimérico e pode interagir com o MTX ligado a uma pequena molécula de interesse. Esta molécula por sua vez pode interagir com a presa e assim recrutar o STAT3, que promove a indução do gene repórter. (FONTE: Retirado de Caligiuri *et al.*, 2006)

Estas adaptações do Y2H para abordagens em células de mamíferos têm sido tradicionalmente difíceis de aplicar em larga escala, por isto, elas são mais usualmente aplicadas para confirmar resultados obtidos através dos sistemas de duplo-híbridos em leveduras. Mas além de sistemas de duplo-híbrido direcionados às células de mamíferos, também são utilizadas inúmeras alternativas de acesso às interações protéicas de mamíferos em modelos de leveduras. Todos eles são baseados na complementação de fragmentos protéicos e têm sido aplicados em análises de larga escala e também apresentam um grande potencial na descoberta de drogas e engenharia de proteínas (Suter *et al.*, 2008).

TABELA1: Resumo dos diferentes sistemas de duplo-híbrido em leveduras e suas especificidades.(FONTE: adaptado de Brukner *et al.* ,2009)

Ano	Método Y2H	Possíveis iscas	Resposta	Localização Celular
1989	Y2H Clássico	Proteínas não-transativadoras capazes de entrar no núcleo	Ativação transcricional	Núcleo
1994	Sistema de recrutamento SOS (SRS)	Proteínas citosólicas, transativadoras	Sinalização Ras	Periferia da Membrana
1994	Sistema de fragmentação da ubiquitina	Proteína citosólicas, de membrana e nucleares	Auxotrofia para Uracila e resistência ao 5-FOA.	Citosol
1998	Sist. de membrana de Fragmentação da ubiquitina (MbY2H)	Proteínas de membrana	Ativação transcricional	Periferia da Membrana
1998	Sistema de Recrutamento Ras	Proteínas citosólicas, transativadoras	Sinalização Ras	Periferia da Membrana
1999	Sistema de isca dupla	Duas proteínas não-transativadoras capazes de entrar no núcleo	Ativação transcricional	Núcleo
2000	Sistema de Fusão a Proteína-G	Proteínas de membrana	Sinalização inibidora da Proteína-G	Periferia da Membrana
2001	RNA Pol. III baseado Y2H (Pol III Y2H)	Proteínas transativadoras (na via da RNA Pol. II)	Ativação transcricional	Núcleo
2001	Sistema de repressão do transativador (RTA)	Proteínas transativadoras capazes de entrar no núcleo	Inibição da transativação transcricional.	Núcleo
2001	Sistema reverso de Recrutamento da Ras (rRRS).	Proteínas de membrana	Sinalização Ras	Periferia da Membrana
2003	Sistema SCINEX-P	Proteínas transmembranas e extracelulares	Cascata de Sinalização e ativação transcricional.	Retículo Endoplasmático (RE)
2007	Sistema de duplo-híbrido citosólico (CytoY2H)	Proteínas citosólicas, transativadoras	Ativação transcricional.	Periferia da membrana do RE.

2.4. DUPLO-HIBRIDO COM PROTEÍNAS TRANSMEMBRANAS E EXTRACELULARES

O sistema SCINEX-P (“Screening for Interactions Between Extracellular Proteins”) publicado em 2003 por Urech *et al.* permite avaliar interações protéicas no

meio oxidativo do retículo endoplasmático (RE). Este sistema explora as propriedades da Ire1p, uma proteína do tipo I da membrana do RE, envolvida na resposta de proteínas não-dobradas ou dobradas incorretamente em leveduras. O acúmulo de proteínas dobradas incorretamente dentro do RE induz a dimerização de proteínas transmembrana do tipo I (Ire1p) no RE da levedura. Isto induz a expressão de um ativador transcricional Hac1p que vai ativar a transcrição de chaperonas. O SCINEX-P (figura3 – E) é baseado na complementação de Ire1p mutantes e no crescimento defeituoso causado por mutações nos genes IRE1 e DER1, que tornam as células sensíveis ao crescimento em temperaturas não permissivas. Neste sistema as proteínas de interesse são fusionadas a porção luminal N-terminal de derivados truncados de Ire1p mutantes portadores de mutações pontuais no domínio quinase ou de deleções da porção C-terminal. A interação entre duas proteínas híbridas vai reconstituir a dimerização Ire1p e então ativar a cascata de sinalização envolvida na resposta gerada quando há proteínas mal-dobradas. A dimerização das Ire1p híbridas reconstitui a sinalização e permite o crescimento das colônias sob temperatura não permissiva.

2.5. VANTAGENS E LIMITAÇÕES DOS SISTEMAS DE DUPLO-HÍBRIDO

Os sistemas de duplo-híbrido tem se tornado cada vez mais populares na investigação de interações protéicas devido a vantagens como: relativa facilidade de implementação, rapidez, baixos custos quando comparados aos custos dos métodos bioquímicos tradicionais de avaliação de interações protéicas, possibilidade de varreduras de interações de proteínas não conhecidas previamente, e, além disso, também permite a realização de experimentos em larga escala, nos quais podem ser avaliadas concomitantemente muitas possíveis interações (Vollert & Uetz, 2006). Todas estas características abrem uma gama enorme de possibilidades de estudos de interações de drogas, receptores-ligantes, vias de sinalização, mutações, relações evolutivas, além de muitas outras.

Como descrito anteriormente neste trabalho, apesar destas inúmeras vantagens, os sistemas de duplo-híbrido ainda apresentam algumas limitações que exigem um grande cuidado no momento da preparação dos experimentos. Cada sistema desenvolvido a partir do Y2H clássico possui vantagens e limitações em relação aos outros sistemas e por isto é importante conhecer bem o tipo de interação que se pretende investigar para assim definir qual técnica é adequada ao objeto de estudo. A limitação

mais comumente encontrada nos sistemas de duplo híbrido são os falsos positivos e falsos negativos que podem ter origem em vários fatores limitantes que serão brevemente abordados a seguir.

2.5.1. Falsos positivos e falsos negativos

Falsos negativos em Y2H são interações proteína-proteína que não podem ser detectadas devido às limitações do método de leitura e podem gerar muitos problemas na reprodutibilidade do Y2H, por isto representam uma séria limitação para este sistema. Por exemplo, proteínas de membrana são mais dificilmente detectadas através do Y2H clássico porque o meio redutor do núcleo é muito diferente do meio oxidativo extracelular. Este é um exemplo onde a localização celular das interações avaliadas pode interferir nos resultados, pois a diferença entre o meio abordado na técnica utilizada e o meio natural de ocorrência das interações pode resultar na falta de cofatores importantes para estas interações (Brukner *et al.*, 2009).

Também podem ocorrer falsos negativos gerados pelas diferenças nas modificações pós-traducionais de proteínas de eucariotos superiores quando estas são analisadas em leveduras. Isto pode ocorrer porque a maquinaria de modificações pós-traducionais encontrada nestas células pode não ser adequada àquelas proteínas e por isto elas podem desenvolver uma conformação tridimensional diferente de seu estado natural (MacDonald, 2001).

Todavia, quando são encontradas interações físicas durante as seleções, mas estas não são reprodutíveis em sistemas independentes, ou não podem ser confirmadas por outros testes *in vitro*, elas podem caracterizar um resultado falso positivo. Estima-se que a taxa de falso positivo no sistema Y2H em larga escala seja de 25 a 45% dos resultados (Brukner *et al.*, 2009). Nestes casos, as interações detectadas durante a avaliação do experimento ocorrem por um motivo diferente do esperado no teste e podem, por sua vez, ter origem em várias causas como:

- Superexpressão da isca e/ou da presa, o que pode induzir a ocorrência de ligações irrelevantes;
- A localização das proteínas fusionadas pode não corresponder às suas localizações naturais na célula, podendo assim resultar em uma relação diferente daquela que ocorre no meio natural destas proteínas;

- Podem ainda ocorrer dobramentos incorretos das proteínas avaliadas fazendo com que ocorram interações inespecíficas entre elas.

Outra razão ainda bastante comum em resultados falso-positivos é o potencial de transativação da isca, ou seja, a própria isca ativa a transcrição sem a necessidade de interação com a presa. Pode ocorrer ainda uma interação entre a presa e a proteína repórter ou também, em sistemas de membrana, a presa pode interagir com âncoras de membrana fusionadas a isca (p. ex. interação da presa com a Ost4p na CytoY2H). Além de todos estes fatores indicados anteriormente, ainda podem ocorrer mutações ou outros eventos randômicos de natureza desconhecida que podem alterar os resultados de interações.

Para tentar contornar estes falsos positivos podem ser utilizadas algumas abordagens que aumentam a acurácia das seleções como, por exemplo, a realização de mais de um passo de seleção ou de um teste de dependência da isca, onde presas previamente identificadas são testadas com iscas não relacionadas. Neste teste, as presas que interagem com outras iscas podem ser descartadas devido à possibilidade da realização de interações inespecíficas com as iscas, o que resultaria em um falso positivo (Fetchko e Stagljar, 2004).

Desta forma, pode-se perceber a fundamental importância de se conhecer a natureza das possíveis interações estudadas (como p. ex. em qual tipo de tecido elas podem ocorrer ou ainda se ocorrem no meio citoplasmático, nuclear ou extracelular), pois assim pode-se tentar prever os possíveis problemas, avaliar com cuidado os resultados obtidos e garantir a eficiência e validação do estudo.

2.6. MÉTODOS DE VALIDAÇÃO DAS INTERAÇÕES PROTÉICAS ENCONTRADAS NO Y2H

Como dito anteriormente, uma das principais limitações dos sistemas de duplo-híbrido são as chances de resultados falsos positivos e, por isto, é necessário um grande cuidado no planejamento dos experimentos e da análise dos resultados. Ainda que sejam previamente planejadas estratégias de seleção e aumento da acurácia, depois de identificar as interações muitos pesquisadores ainda recorrem a outras técnicas de análise de complexos protéicos que permitam a validação das interações encontradas através da metodologia de duplo-híbrido utilizada.

Muitas técnicas já foram aplicadas em validações de interações protéicas encontradas através do duplo-híbrido, entre elas podemos citar técnicas *in vitro*, como ensaios de “pull-down” (Jackson, *et al.*, 2001; Tanaka, *et al.*, 2006; Burklen *et al.*, 2007) ensaios *in situ*, como hibridização *in situ* (Tanaka, *et al.*, 2006) e imunohistoquímica/imunocitoquímica (Felkl e Leube, 2008; Jackson, *et al.*, 2001; Tanaka, *et al.*, 2006), ensaios *ex vivo* como a coimunoprecipitação (Wu *et al.*, 2009; Felkl e Leube, 2008; Jackson, *et al.*, 2001; Tanaka, *et al.*, 2006; Dye *et al.*, 2009), e ainda ensaios *in vivo* como a detecção de fluorescência em células vivas (Burklen *et al.*, 2007), Transferência de Energia Fluorescente por Ressonância (FRET) (Felkl e Leube, 2008) e ainda a Transferência de Energia de Bioluminescência por Ressonância (BRET) (Dye *et al.*, 2009).

É comum a utilização de mais de um método de validação, mas a maior parte destes métodos de validação não é passível de análises em larga escala, e, além disto, muitos deles são relativamente trabalhosos e são aplicados somente nas interações selecionadas em varreduras em larga escala realizadas previamente.

Mais recentemente foi reconhecido o valor da espectrometria de massa (MS) em análises de larga escala na pesquisa de interatomas. A MS, uma técnica analítica baseada na determinação da relação massa-carga de íons, tem sido aplicada conjuntamente com a técnica de purificação por afinidade no estudo em larga escala de interações protéicas. Nesta abordagem, a técnica de purificação por afinidade é utilizada para formar complexos protéicos envolvendo proteínas de interesse, esses complexos são então purificados em colunas de afinidade e subsequentemente analisados por MS, que então identifica os diferentes constituintes do complexo. O recente progresso na automação da purificação dos complexos e da análise por MS, junto com métodos computacionais, tem permitido um aumento na acurácia das análises de dados, o que tem tornado esta abordagem uma ferramenta poderosa na pesquisa de interatomas (Brukner *et al.*, 2009).

A seleção das presas que interagem com as iscas pode ser feita de duas maneiras distintas: uma baseia-se na seleção de presas expressas em uma biblioteca de cDNA específica, e a outra na realização de uma seleção global da matriz. Na validação das interações entre presas de uma biblioteca de cDNA pode ser utilizado qualquer uma das várias técnicas de avaliação de complexos protéicos anteriormente citadas, dependendo apenas da adequação do método com o objetivo de estudo. Mas a validação de seleções globais de matriz envolve fatores mais complexos e exige especial atenção.

Na seleção global de matriz, um conjunto definido de clones de leveduras contendo insertos de cDNA (obtidos p. ex. através de diferentes ORFs de uma mesma sequência gênica) em fusão com o DBD ou AD podem ser utilizados em varreduras de um clone contra o outro em uma grade de cruzamentos (Guan e Kiss-Toth, 2008). A validação destes ensaios é uma tarefa difícil, pois a interação é selecionada de forma randômica e assim as presas que interagem com a isca são pouco conhecidas, o que acaba por dificultar o planejamento dos testes iniciais que poderiam aumentar a confiabilidade dos ensaios. Nestes casos, outra abordagem é utilizada para tentar eliminar os falsos positivos, a biologia computacional. Neste sistema, são estabelecidos valores de confiança que podem avaliar a significância biológica e probabilidade de ocorrência de uma dada interação. Uma possibilidade de utilização é relacionar os resultados encontrados na seleção a valores conhecidos de níveis de expressão de RNA na célula (Brukner *et al.*, 2009). Esses métodos podem até criar valores de alta confiança, mas são fortemente limitados pelo número de dados existentes.

Uma vez que a interação proteína-proteína foi identificada e validada, então pode ser testado o seu papel fisiológico em sistemas biológicos, o que pode ser feito, por exemplo, através de culturas celulares submetidas a diferentes condições, de análises em diferentes momentos do ciclo celular e mudanças das moléculas envolvidas na interação ou mesmo o bloqueio da interação *in vivo*.

2.7. APLICAÇÕES DO Y2H E SUAS VARIANTES

O sistema de Y2H representou um marco importante no estudo de redes de interações protéicas e assim, apesar de apresentar algumas limitações, o número de trabalhos publicados utilizando esta técnica, ou ainda variações desta, tem crescido cada vez mais (Ratushny e Golemis, 2008). A seguir, são descritos neste trabalho alguns exemplos de aplicações do sistema de duplo-híbrido que podem demonstrar a versatilidade e importância desta abordagem molecular.

2.7.1. O Y2H no estudo de patologias e drogas

O duplo híbrido tem sido amplamente utilizado no estudo de proteínas e mutantes envolvidas em processos patológicos como, por exemplo, em doenças neurodegenerativas como a doença de Huntington (Giorgini e Mucowski, 2005) e

também no estudo das agentes causadores de doenças como é o caso do estudo realizado por Razanskas e Sasnauskas (2009) que utilizaram o sistema de duplo-híbrido em leveduras para investigar proteínas mutantes do vírus da hepatite B (HBV). Neste estudo, foi descoberta uma nova proteína humana de função não conhecida, a FLJ20850, que interage especificamente com a forma mutante da proteína do HBV, mas não interage com a forma selvagem. Na busca por proteínas humanas que possivelmente estivessem envolvidas na patogenicidade da forma mutada, Razanskas e Sasnauskas realizaram uma varredura de uma biblioteca de cDNA de hepatócitos humanos, na qual eles buscaram proteínas que interagissem com a forma mutante mas não com a forma normal da proteína viral. A importância deste estudo é baseada no fato de que as doenças hepáticas normalmente são mediadas principalmente pela resposta imune do hospedeiro, entretanto, pacientes imunossuprimidos, submetidos a transplantes renais, infectados com o HBV podem desenvolver cirrose e até mesmo o estágio final da doença hepática, mas nestes casos os mecanismos mediadores da imunidade não são significantes, o que mostra que a progressão da doença do fígado nestes pacientes é associada com o acúmulo de variantes do HBV e, portanto, é importante investigar melhor a natureza destas formas variantes e das proteínas envolvidas no processo patogênico desta doença.

Outro exemplo do uso do Y2H no estudo de patologia pode ser demonstrado pelo trabalho realizado por Mearini e seus companheiros (2009), que estudaram mutações no gene da proteína C ligante de miosina cardíaca (“cMyBP-C”) que podem resultar em truncamentos no domínio C-terminal da proteína, fato este associado a várias cardiomiopatias hipertróficas familiares (CHF). Através do sistema de duplo-híbrido eles identificaram a forma normal da cMyBP-C (“WT- cMyBP-C”) como um par de interação da MuRF1 (“muscle-ring finger protein-1”) e, com base nisto e em outros dados obtidos na pesquisa, eles sugeriram que a MuRF1 pode regular os níveis exógenos de cMyBP-C nos miócitos cardíacos, mas não pode regular a forma mutante da cMyBP-C (“M7t-cMyBP-C”), a qual está relacionada às CHF.

Além do uso no estudo de patologias, o Y2H também tem se mostrado promissor no estudo de possíveis drogas para tratamento de patologias variadas. Muitas das adaptações do Y2H desenvolvidas são passíveis de utilização no estudo de novas drogas, mas as variantes mais utilizadas na análise entre pequenas moléculas e proteínas em configurações fisiológicas são o sistema Y2H reverso e o triplo híbrido (Suter *et al.*, 2008). No Y2H, comumente o gene URA3 da levedura é utilizado como um marcador

de seleção contrária, pois o seu produto converte o ácido 5-fluorótico (5-FOA) em um metabólito tóxico que leva a célula a morte. Assim, ele pode ser utilizado no estudo de drogas que inibam a interação entre isca e presa e conseqüentemente mantenham a viabilidade celular mesmo na presença do metabólito tóxico (Chautard *et al.*, 2009). Mas além destes, outro sistema que também vem chamando a atenção de alguns pesquisadores é o sistema de recrutamento Ras (RRS), que apresenta um potencial no estudo de drogas antitumorais, pois a Ras é um oncogene envolvido em numerosos tumores humanos e, além disto, sua localização no RRS é de fácil acesso (Macdonald, 2001).

Desta maneira pode-se demonstrar a grande importância que o sistema de duplo-híbrido e suas variantes representam na pesquisa médica. Mas a importância do duplo-híbrido não fica restrita somente a isto, pois estes sistemas também podem ser utilizados em diversas outras áreas, como será demonstrado nas aplicações a seguir.

2.7.2. O Y2H no mapeamento de vias de sinalização

Além da aplicação como uma estratégia base nas investigações individuais das propriedades de interação de proteínas alvo, o sistema Y2H é cada vez mais aplicado em metodologias de larga-escala destinadas ao mapeamento em escala genômica de interações protéicas em modelos orgânicos, como muitos vírus e bactérias, *Plasmodium falciparum*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e, mais recentemente, em humanos (Ratushny e Golemis, 2008).

Aliás, a utilização dos sistemas de Y2H tem revelado certo destaque nesta área de análise em larga escala de interações protéicas em células humanas. Figeys publicou em 2008 uma revisão sobre o mapeamento do interactoma de proteínas humanas, onde ele aponta o Y2H e a purificação de afinidade / espectrometria de massa como as estratégias mais viáveis nas análises em larga escala e que o uso destas duas abordagens juntas pode trazer resultados significantes no mapeamento de interactomas das proteínas humanas.

2.7.3. O Y2H na descoberta de ligantes e suas funções

A utilização do sistema de duplo-híbrido no estudo de ligantes de proteínas específicas abriu caminho para a descoberta de proteínas não conhecidas, como no exemplo anteriormente mostrado da proteína que interage com a mutante do HBV, e

também de proteínas conhecidas que possuem relações fisiológicas ainda não conhecidas. Esse é o caso, por exemplo, do estudo feito por Yoshida *et al.* (2009), que identificaram através do sistema de duplo híbrido a β -tubulina tipo II como um ligante da proteína ZNRF1, que foi identificada como uma molécula crucial na neuro-regeneração, sugerindo assim que o ZNRF1 media a regulação da neuritogênese via interação com a tubulina.

Outro exemplo da utilização de adaptações do Y2H na descoberta de ligantes e possíveis funções destas interações é descrito por Joshi *et al.* (2007) que utilizou o sistema transativador reprimido (o RTA) na validação *in vivo* de ligantes que inibem a interação entre a imunofilina FKBP12 e a região C-terminal do receptor de fator transformante de crescimento β (TGF β -R). Também foi discutido neste trabalho que alguns dos inibidores da interação TGF β -R-FKBP12 descobertos podem potencialmente inibir as sinalizações calcineurina- e NFAT-dependentes. Joshi ressalta ainda a possibilidade de utilização deste sistema na descoberta de drogas que inibam interações patológicas.

Além destes breves exemplos citados, há milhares de outros estudos utilizando o duplo-híbrido clássico e suas adaptações buscando descobrir novas proteínas e contextos fisiológicos celulares ainda desconhecidos. E assim pode-se perceber mais uma área de relevância de aplicação do sistema de duplo-híbrido.

2.7.4. O Y2H no estudo de homologias

O duplo-híbrido também tem sido utilizado por alguns pesquisadores na avaliação de homologias entre proteínas de espécies diferentes como é o caso, por exemplo, do trabalho descrito por Schulze e seus companheiros (Schulze *et al.*, 2009), que realizaram um estudo comparativo de laminas tipo-A expressas em humanos e moscas do gênero *Drosophila*. As laminas são proteínas que constituem os filamentos intermediários nucleares, e são classificadas nos tipos A ou B de acordo com sua estrutura e padrão de expressão. Neste estudo comparativo, Schulze e seus companheiros demonstraram que a localização de laminas do tipo A e as interações protéicas relacionadas a esta proteína são conservadas entre a *Drosophila* e a espécie humana, além de também mostrar que a perda da lamina tipo A gera defeitos nucleares e que o tecido muscular é sensível à expressão de formas mutantes de lamina A, assim como nas laminopatias humanas. Schulze ainda aponta em seu trabalho que estes

estudos vão abrir caminho para novas descobertas na função das laminas na biologia nuclear e ainda podem dar suporte para a utilização da *Drosophila* como um modelo nos estudos das laminopatias humanas envolvendo disfunções musculares.

Concluindo assim esta primeira parte da presente monografia, pode-se perceber através desta revisão bibliográfica a grande importância que o sistema de duplo-híbrido em leveduras representou e representa até hoje na investigação de interações protéicas e de funções de proteínas recém-descobertas. Pode-se perceber também que apesar de apresentar algumas limitações, o sistema Y2H mostra-se como uma técnica promissora, que estimula muitos pesquisadores a desenvolverem adaptações que contornam estas limitações e permitem a exploração das vantagens proporcionadas por esta técnica. E assim, as várias adaptações do sistema Y2H descritas desde a publicação da primeira proposta, desenvolvida por Fields e Song em 1989, aumentam cada vez mais a versatilidade de aplicação desta estratégia molecular no estudo de interactomas variados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

- Revisão bibliográfica da técnica clássica do duplo-híbrido em leveduras e as técnicas variantes desenvolvidas com base neste sistema.
- Realização de práticas experimentais envolvendo o sistema clássico de duplo-híbrido em leveduras.
- Implementação do sistema de duplo-híbrido em leveduras no Departamento de Patologia Básica – UFPR para o estudo da proteína priônica PrP^c através de uma varredura com uma biblioteca previamente construída e caracterizada.

3.2. Objetivos específicos

- Reconhecimento dos critérios a serem levados em consideração na escolha da técnica baseada no sistema de duplo-híbrido mais adequada a cada tipo de proteína envolvida na interação a que se pretende avaliar;
- Acompanhamento e auxílio em experimentos de:
 - Construção da isca de PrP^c;
 - Desenho de iniciadores para amplificação por PCR da proteína príon celular (PrP^c) ;
 - Amplificação e digestão do inserto;
 - Ligação dos insertos no vetor pGilda para construção da isca;
- Implementação e padronização do sistema de duplo-híbrido no laboratório de neurobiologia.
- Varredura da biblioteca de cDNA de epitélio olfatório (já disponível) com uma isca previamente construída, correspondente ao domínio C-terminal do receptor olfatório ORM93.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Como foi comentado anteriormente, este projeto envolveu a busca de uma pequena revisão bibliográfica a cerca do método clássico de duplo-híbrido em leveduras e as variações desenvolvidas com base neste sistema. E, além disto, também foi realizada uma parte prática de acompanhamento e auxílio de atividades desenvolvidas no laboratório de Neurobiologia do Departamento de Patologia Básica da UFPR. A técnica de duplo-híbrido em leveduras está sendo padronizada por dois alunos de pós-graduação que estão desenvolvendo, sob orientação da prof^a. Adriana F. Mercadante, projetos de mestrado que utilizam o sistema Y2H clássico. Um destes projetos é desenvolvido pelo mestrando Celso Fávoro Jr., que pretende investigar a interação de iscas de Semaforinas de classe cinco dos tipos A e B contra presas codificadas por uma biblioteca de cDNA de cérebro de camundongo. E o outro projeto é desenvolvido pelo mestrando Breno Castello Branco Beirão, que pretende investigar a interação de iscas contendo a PrP^c contra presas codificadas por uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório, sendo este o projeto acompanhado durante a realização experimental deste trabalho de monografia.

No presente trabalho são descritos dois experimentos gerais: a) um ensaio de padronização do sistema de duplo-híbrido através da varredura de uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório utilizando o sistema Y2H clássico com uma isca já disponível (domínio C-terminal de um receptor olfatório); b) construção da isca correspondente à proteína PrP^c.

A seguir serão descritos alguns dos materiais e metodologias utilizados na parte experimental desta monografia.

4.1. Linhagens celulares e vetores utilizados

Nesse trabalho foram utilizadas cepas de levedura e vetores fornecidos no "kit" "DupLex-A™ - Yeast Two-Hybrid System" (OriGene Technologies, Inc.) e também uma biblioteca de cDNA de epitélio olfatório previamente construída e caracterizada pela orientadora deste projeto. Os vetores fornecidos no kit permitem a clonagem de genes que codificam proteínas capazes de interagir entre si e a co-expressão destas nas células de levedura em fusão com os domínios de ligação ao DNA (DNA-BD) e de ativação da transcrição (AD) separadamente. Nesse sistema, o DNA-BD vem como

parte da proteína LexA de procariontes e o AD é o peptídeo de 88 resíduos (B42) que ativa a transcrição em levedura. A interação entre uma proteína isca (que é expressa em fusão com o DNA-BD) e uma outra proteína codificada por um gene presente em uma biblioteca de cDNA (expressa em fusão com o AD) cria um novo ativador transcricional capaz de ativar genes-repórteres regulados por operadores LexA. O produto gerado pela expressão destes genes-repórteres torna possível que a interação entre duas proteínas seja detectada fenotipicamente (AUSUBEL *et al.*, 1999).

Esse sistema já foi amplamente utilizado pela coordenadora deste projeto (VON DANNECKER *et al.*, 2005) e o kit utilizado foi cedido pela Profa. Dra. Bettina Malnic, IQ-USP (colaboradora). A seguir são relatadas algumas informações sobre as linhagens de leveduras e os vetores contidos no kit.

4.1.1. Linhagens de leveduras:

- EGY48 - MAT α trp1 his3 ura3 leu2:: 6 LexAop-LEU2

Essa cepa possui o gene repórter LEU2 integrado ao cromossomo, controlado por 6 operadores LexA. Quando esse gene é expresso, essa levedura é capaz de crescer em meio sem leucina. A biblioteca de cDNA de epitélio olfatório utilizada já havia sido previamente transformada utilizando esta cepa.

- RFY206 - MAT α trp1 Δ ::hisG his3 Δ 200 ura3-52 lys2 Δ 201 leu2-3

Nessa cepa serão inseridos os vetores das iscas e o vetor contendo o gene repórter lacZ. As cepas foram escolhidas com base na capacidade das cepas RFY206 (tipo **a**) e a EGY48 (tipo **α**) de realizar cruzamentos e formar células diplóides.

4.1.2. Vetores:

- **Para a construção das iscas:**
- pGilda - HIS3, CEN, Ap^R (possui o promotor GAL1 que permite a expressão da proteína de fusão LexA-isca apenas quando a única fonte de carbono for a galactose. A sequência CEN-centromêro- mantém o plasmídeo em uma única cópia por célula). A grande vantagem desse plasmídeo é que ele possui o promotor GAL1 induzível por galactose, o que permite a expressão da isca por tempos limitados durante a varredura da biblioteca, reduzindo a exposição das leveduras às iscas tóxicas;

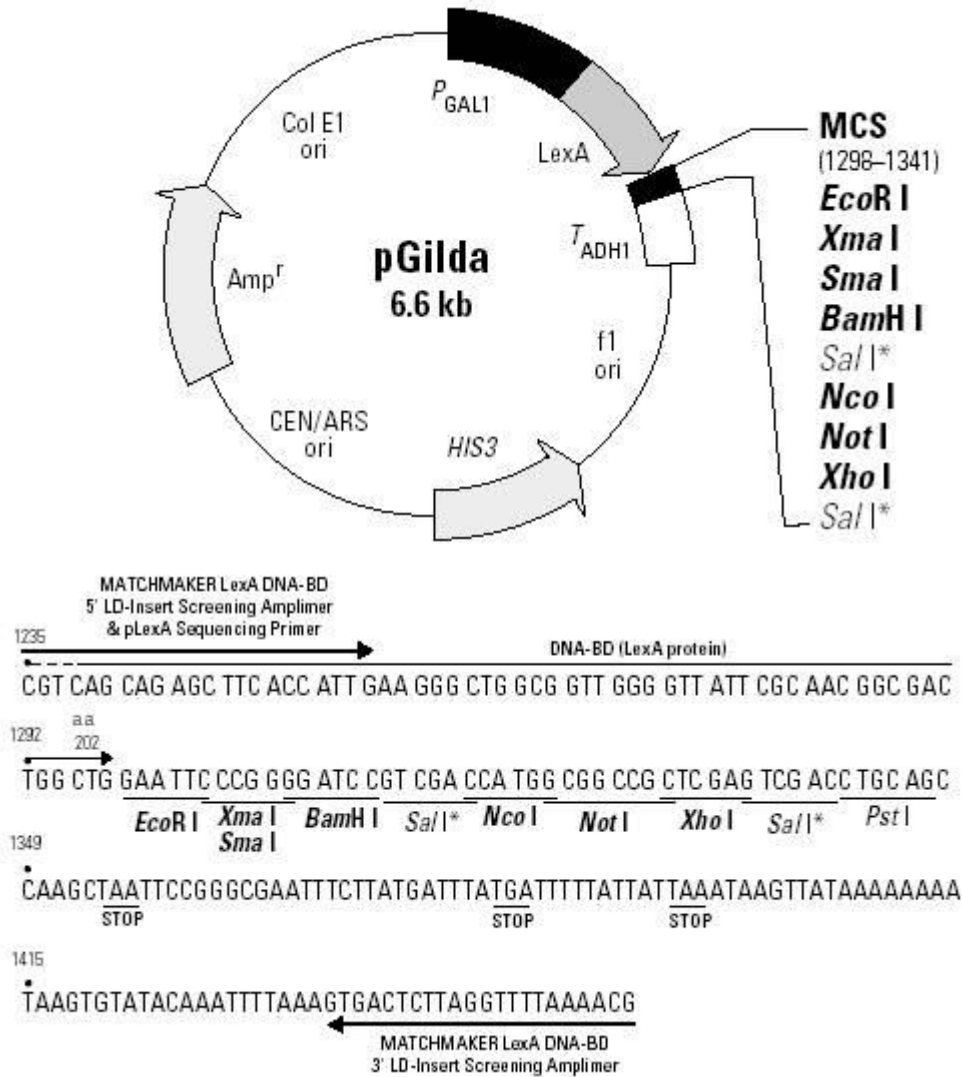


FIGURA 5: MAPA DE RESTRIÇÃO E SÍTIO MÚLTIPLO DE CLONAGEM (MCS) DO PLASMÍDEO pGILDA. Os sítios Sal I(*) podem ser utilizados como sítios únicos para clonagem. O pGilda é um vetor de clonagem utilizado para gerar fusões de proteínas iscas com o resíduo-202 da proteína LexA, o qual pode atuar como um domínio de ligação ao DNA. A proteína híbrida é expressa em células de levedura regulado pelo promotor GAL1, cuja expressão é regulada por galactose. O plasmídeo também carrega o gene HIS3 para seleção em linhagens de leveduras His-auxotróficas. Região CEN/ARS para replicação em leveduras com manutenção de uma cópia por célula; Gene Amp^r que confere resistência ao antibiótico Ampicilina; ori E1 para replicação em *E. coli*.

- **Vetor utilizado na construção da biblioteca (previamente preparada):**
 - pJG4-5 - TRP1, 2µm, (expressa o domínio de ativação B42, seguido do epítipo HA, em fusão com proteínas da biblioteca de cDNA. Essa expressão está sob a regulação do promotor GAL1, induzível por galactose). Contém o marcador seletivo para leveduras TRP1, 2µm de origem de replicação para alto número de cópias em leveduras, terminador ADH com códons de parada

em todas as três fases abertas de leitura, sítios EcoRI e BamHI para subclonagem do gene alvo. Esse plasmídeo possui, logo após a sequência codificadora do domínio de ativação, o sítio múltiplo de clonagem, no qual são inseridos os cDNAs do tecido em questão.

- **Repórter**

- pSH18-34 - URA3, 2 μ m, Ap^R, 8ops.-lacZ (expressa o gene repórter lacZ).

4.2. Varredura da Biblioteca de Epitélio Olfatório

O processo de padronização da construção de iscas pode levar algum tempo e, por isto, quando as iscas são construídas, é importante que o cuidado com as leveduras transformadas seja redobrado para evitar desperdícios. Visando a familiarização com a técnica de duplo-híbrido, a primeira atividade realizada no laboratório, relacionado à técnica, foi a realização de um ensaio de varredura de uma biblioteca de epitélio olfatório de camundongo utilizando uma isca correspondente ao domínio carboxi-terminal do receptor olfatório M93 (CT-ORM93), clonado a partir de DNA genômico de camundongo.

Essa biblioteca de cDNA utilizada possui cerca de 10⁶ clones independentes, com insertos de tamanho de 400-4000 pares de bases (média de 0,7 Kb). Em uma descrição breve, epitélios olfatórios de camundongos foram isolados e os mRNAs poli (A)+ desse tecido foram obtidos com a ajuda do "kit" "Poly A Quick Kit" (Stratagene). A síntese do cDNA foi feita usando-se oligonucleotídeos dT ("kit" "Superscript Choice System for cDNA Synthesis"-Gibco/BRL). Adaptadores permitiram a inserção dos cDNAs nos sítios Eco RI e Xho I do vetor pJG4-5. Os passos seguintes de transformação da biblioteca em bactéria e depois em levedura foram feitos como descrito em Ausubel et al., 1999.

A varredura desta biblioteca foi realizada através de cruzamento da cepa de levedura que expressa a isca com a cepa pré-transformada com a biblioteca de cDNA. Para a realização deste cruzamento, a biblioteca de cDNA é transformada na cepa de levedura que contém o repórter LEU2 (que neste caso corresponde a EGY48). Esse gene, quando expresso, permite o crescimento das células em meio sem leucina. Essa biblioteca pré-transformada pode ser congelada em várias alíquotas e usada em varreduras individuais, com diferentes iscas, como foi o caso da varredura realizada no presente trabalho. As iscas são expressas em outra cepa, de tipo de cruzamento oposto

ao da pré-transformada com a biblioteca (a RFY206) que também contém o plasmídeo repórter lacZ (pSH18-34). A varredura então é feita misturando-se as duas cepas para que haja a formação de diplóides. Estes são então induzidos para a expressão das proteínas da biblioteca (com galactose) e plaqueados em meio adequado para avaliar a atividade dos genes repórteres e, conseqüentemente, identificar as prováveis interações.

Antes de realizar a varredura da biblioteca foi necessário titular as linhagens de leveduras contendo os vetores da biblioteca e o controle (EGY 48 contendo o vetor vazio), para verificar a viabilidade celular e eficiência de plaqueamento. Todo o processo de titulação e varredura foi realizado de acordo com o protocolo “Interaction Trap/ Two-Hybrid System-current protocols” (Golemis *et al.* 1999).

Depois de realizadas as titulações, deu-se início a preparação do ensaio de cruzamento das leveduras. O objetivo deste cruzamento é permitir que as linhagens EGY48 contendo os plasmídeos da biblioteca e o vetor controle cruzem com a linhagem RFY206 contendo a isca. As linhagens EGY48 e RFY206 são tipos opostos, α e a respectivamente, e por isto podem realizar um cruzamento e produzir células diplóides.

Para o ensaio de cruzamento, foram preparados dois eppendorfs® de 1,5 ml, um contendo uma mistura de 200 μ l da linhagem isca (RFY206+pGilda com cerca de 2 a 4×10^{-7} células/ml) e 200 μ l de uma alíquota descongelada da linhagem controle transformada (EGY48+pJG4-5 vazio); e, no outro tubo, 200 μ l da linhagem isca com cerca de 10^8 cfu da linhagem da biblioteca (EGY48+pJG4-5 com a biblioteca de cDNA subclonada). Cada uma destas misturas celulares foi plaqueada em placas contendo meio YPD e ágar, e incubadas por 12 a 15 horas a 30°C.

Depois desta incubação, as células foram transferidas para frascos contendo 100ml de um meio seletivo contendo galactose, rafnose e meio completo + leucina (Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp). O meio completo (CM) um meio que contém todos os elementos essenciais necessários às leveduras com exceção de alguns aminoácidos restritivos – leucina, triptofano, histidina e uracila – que precisam ser adicionados posteriormente. As células foram então incubadas, sob agitação, por 6 horas a temperatura ambiente para induzir o promotor GAL1, o qual dirige a expressão da biblioteca de cDNA. O meio -Ura,-His,-Trp é seletivo porque não permite o crescimento das células haplóides, pois somente aquelas células que realizaram o cruzamento possuem os genes necessários na biossíntese destes aminoácidos ausentes no meio.

Estas suspensões celulares (isca+biblioteca e isca+controle) foram centrifugadas, lavadas com água estéril e a suspensão foi diluída até a concentração de cerca de 10^8 células/ml (o número de células foi estimado em Câmara de Neubauer) . A partir disto, em cada cruzamento (biblioteca e controle) foram feitas séries de 1/10 diluições em água estéril, 200 μ l cada, para cobrir 10^6 faixas de níveis de concentração. Então, 100 μ l de cada tubo (não diluído, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} diluições) foram plaqueados em 14 placas (7 para a biblioteca e 7 para o controle) contendo meio Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu. Além destes, também foram plaqueados 100 μ l das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} (da biblioteca e do controle) em meio Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp. Todas estas placas foram então incubadas a 30°C e o número de colônias foi contado depois de 3 dias. Depois as placas foram analisadas e o número de colônias transativantes nas placas controle foi estimado.

Depois disto, para realizar a varredura da biblioteca de cDNA contra as iscas, foram preparados 3ml adicionais da diluição 10^{-1} do cruzamento entre a linhagem contendo a isca e a linhagem contendo a biblioteca e 100 μ l destes foram plaqueados em vinte placas contendo meio Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu. Também foram plaqueados 100 μ l das células não diluídas em outras vinte placas contendo Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu. Todas foram incubadas a 30°C.

Após 3 dias, foram coletadas cinco colônias Leu⁺ de cada uma das vinte placas da diluição 10^{-1} do cruzamento com a biblioteca e estas foram caracterizadas em duas placas mestres com meio Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu, marcadas com uma divisão de 100 quadrantes. Cada colônia foi estricada em um quadrante (50 colônias em cada placa) e devidamente numerada. Estas placas mestres foram então incubadas por dois dias sob as mesmas condições de incubação descritas anteriormente. Posteriormente, estas placas foram utilizadas na verificação do repórter Lac-Z e dependência de galactose nas colônias que cresceram em meio seletivo indutor sem leucina (possíveis candidatas a apresentarem interações entre a isca e alguma proteína da biblioteca). Para isto, as colônias foram repassadas para placas contendo meio seletivo (-ura -his -trp) com glicose e com leucina e após 40h, essas leveduras foram replicadas para as seguintes placas:

- glicose -ura -his -trp -leu
- galactose/rafinose -ura -his -trp -leu
- glicose -ura -his -trp + X-gal

- galactose/rafinose -ura -his -trp + X-gal

E então, após 3 dias a 30°C, o crescimento e o desenvolvimento da cor azul destas colônias foram monitorados.

4.3. Construção da Isca PrP^c

4.3.1. Obtenção do Inseto

Para obtenção do material gênico utilizado na construção das iscas, foi realizada uma amplificação do fragmento de DNA correspondente a fase aberta de leitura (ORF) do PrP^c de camundongo, a partir de um vetor contendo como inseto a sequência codificadora para PrP^c (gentilmente cedido pelo laboratório da Dra. Vilma Regina Martins – Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer).

- Iniciadores:

mPRPC_Eco_F - 5'AGA GAA TTC AAA AAG CGG CCA AAG CCT GG 3'

Iniciador Forward para a PrP^c, possui um sítio de restrição para a enzima de corte EcoRI na região 5' (sublinhado) usado para a digestão do inseto. 29 mer; Tm: 63,2°C; CG= 48,2%.

mPRPC_Bam_R - 5'GAG GGA TCC TCA GCT GGA TCT TCT CCC GTC G 3'

Iniciador Reverse para sequência da PrP^c, possui um sítio de restrição para a enzima de corte BamHI na região 5' (sublinhado) usado para a digestão do inseto. 31 mer; Tm: 66,6°C; CG= 61,2%.

Para a reação de PCR deste trabalho, foi utilizada a enzima DNA-polimerase *Pfu*, uma enzima encontrada no organismo hipertermófilo *Pyrococcus furiosus*. Esta enzima possui a vantagem de ter a menor taxa de erro conhecida na amplificação por PCR, devido a sua capacidade de efetuar atividade 3'-5' exonuclease, o que torna sua taxa de erro (inferior a $2,6 \times 10^{-6}$ por nucleotídeo em cada ciclo) cerca de 7 a 10 vezes menor do que a da Taq polimerase, que não é capaz de efetuar este processo (LU and ERICKSON, 1997).

As reações de PCR foram realizadas com: enzima e tampão da Pfu Polimerase da marca Fermentas® (2,5U/μl), dNTPs (0,5 mM Promega®), iniciadores encomendados da IDT® a partir do desenho desenvolvido, termociclador da sala multi usuários da FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) modelo Mastercycler® da

Eppendorf®, tubos de polipropileno de 200 µl. Como moldes, foi utilizado o plasmídeo portador da sequência para a PrP^c já sequenciado, disponível no laboratório.

Foram realizadas 5 PCRs (reações de 25µl) com o DNA e uma reação do controle negativo. Para cada reação de PCR de amplificação da sequência PrP^c foram 2,5µl tampão para Pfu (-MgSO₄), 3µl do co-fator MgSO₄ (1mM), 0,5µl de uma solução mix de dNTP (0,6 mM), 1,25µl do iniciador F para PrP^c (3,5 nM) e 1,25 µl do iniciador R (3,5 nM), 0,3µl da enzima Pfu Polimerase (0,75 U), 1µl do DNA molde (20ng do plasmídeo contendo o inserto correspondente à região codificadora de PrP^c), e H₂O para um volume final de 25µl. Na reação controle foram utilizados os mesmos reagentes exceto o DNA molde. Utilizando-se o termociclador, as reações foram submetidas inicialmente à 95°C por 3 min (desnaturação inicial), então a 35 ciclos a 95°C/45s (desnaturação efetiva), 57°C/ 45s (anelamento dos iniciadores) e 72°C/ 2 min (extensão), finalmente a reação foi finalizada a 72°C/10min (extensão final). Então as reações de PCR foram submetidas a corrida em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídio (5µg/mL) juntamente com 0,5µg do marcador de pares de base O'GeneRuller 100bp da Fermentas®, as bandas foram extraídas e purificadas segundo o kit de gel extração Perfectprep Gel Cleanup da Eppendorf®.

4.3.2. Digestão do Inserto e do pGilda

As amostras purificadas foram submetidas à digestão com endonucleases de restrição para posterior ligação. Foram utilizadas as enzimas da marca Fermentas® EcoRI, que reconhece e cliva a sequência 5'-GAATTC-3', e a BamHI, que reconhece e cliva a sequência 5'-GGATCC-3'.

O inserto purificado do gel foi então digerido com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI. Para estas digestões foram usadas 5-10 unidades das enzimas. As reações ocorreram por 16h, a 37°C, em um volume final de 120µl. Usando estas mesmas enzimas de restrição, foi feita a clivagem de 8µg do vetor pGilda para a clonagem do inserto desejado. As digestões foram realizadas em um volume final de 40 µl, com 10 unidades de cada enzima (Fermentas), durante 16 horas, a 37°C.

Após as digestões, ambas as amostras foram submetidas a uma nova corrida eletroforética em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL, juntamente com 0,5µg do marcador de pares de base Lambda DNA/HindIII Marker 2 da Fermentas® e 0,5µg do marcador de pares de base O'GeneRuller 100bp da

Fermentas®, para retirar as enzimas e os sais presentes nas digestões, o que poderia interferir na próxima etapa (reação de ligação), e a uma nova extração em gel. As amostras foram armazenadas no freezer a -20°C até o uso.

4.3.3. Quantificação da PrP^c e do Vetor

Para a ligação, é necessário haver uma relação de 1:3 a 1:5 entre a quantidade de moléculas de plasmídeos e de insertos, partindo-se de 50ng de plasmídeo. Para determinar esta concentração, amostras de insertos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% contendo 5µg/mL de brometo de etídio, usando-se indicadores de pesos moleculares com concentrações conhecidas. Então as intensidades das bandas são comparadas visualmente obtendo-se valores relativos de ng/µl de cada amostra, e conhecendo-se o volume aplicado e a diferença entre o tamanho do vetor e dos insertos, é possível determinar o volume de cada solução que obedeça aos parâmetros para a reação de ligação. Foi corrida uma amostra de 3µl do inserto obtido depois da digestão e extração em gel.

A amostra do plasmídeo pGilda foi quantificada no aparelho NANODROP do Departamento de Bioquímica da UFPR, através da absorbância da amostra obtida em 260 nm.

4.3.4. Inserção do PrP^c no Vetor

Inserto e vetor foram unidos por reação de ligação na proporção de cinco moléculas de inserto para cada molécula do vetor, partindo-se de 50ng de plasmídeo e 25ng de inserto. Duzentas unidades da enzima T₄ DNA ligase (New England BioLabs) foram utilizadas para a reação de ligação (volume final de 10µl), a qual ocorreu durante 16 horas, a 16°C. Paralelamente, também foi preparada uma solução teste contendo apenas o vetor.

4.3.5. Transformação das Bactérias

Através de um protocolo de Transformação, o DNA plasmidial é incorporado por bactérias competentes que então realizam a replicação do plasmídeo. Foram utilizadas bactérias eletrocompetentes DH5α, uma linhagem de *Escherichia coli*, com 1 µl da reação de ligação (ver item anterior) em ~40 µl de bactérias congeladas. As bactérias foram transformadas utilizando-se o método de eletroporação, um método que

permite a inserção de grandes moléculas circulares de DNA através de pulsos elétricos que mudam as propriedades elétricas das células.

A preparação das células de *E. coli* eletrocompetentes e a eletroporação foram preparados com base em um protocolo de eletroporação já estabelecido, disponível no laboratório em questão e amplamente utilizado pelos integrantes deste laboratório.

Depois de preparadas de acordo com o protocolo, as bactérias eletrocompetentes foram submetidas ao eletroporador. No eletroporador a amostra foi submetida a um pulso elétrico de 25 μ F de capacitância, 2,5kV de tensão e 200 Ω de resistência, que dura cerca de ~5mseg. Durante este pulso elétrico, são formados poros aquosos na membrana, permitindo assim que macromoléculas, como um plasmídeo, migrem através destes poros e entrem na célula.

Depois de eletroporadas, as células foram recuperadas em 1 ml de meio LB (10g/l de tripton; 5g/l de extrato de levedura; 10 g/l de NaCl), por uma hora a 37°C, sob agitação. Após esta recuperação, as células foram plaqueadas em meio sólido (LB + Agar) contendo ampicilina (100 μ g/ml): inicialmente 100 μ l foram esgotados com o auxílio da alça de Drigalsky, então o restante foi transferido para um Eppendorf® de 1,5 ml e centrifugado a 3.500 rpm por 2 min em uma centrífuga mini-spin da Eppendorf®. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensão, aproximadamente 100 μ l foram esgotados em outra placa. As placas ficaram por 16 horas em estufa a 37°C e, após este período, algumas colônias foram escolhidas para verificação da presença dos insertos. Cada uma destas colônias foi inoculada em 1ml de LB + Amp e usadas como molde para a reação de PCR de colônia.

4.3.6. PCR de Colônia

No PCR de colônia, foram escolhidas 22 colônias transformadas e cada uma delas foi inoculada em 50 μ l de caldo LB com ampicilina e, posteriormente, 1 μ l destas suspensões de células foi utilizado como molde em reações de PCR (volume final de 10 μ l) com iniciadores específicos para o inserto. No controle positivo o plasmídeo contendo a sequência codificadora da PrP^c foi utilizado como DNA molde para a reação, e no controle negativo, colônias transformadas apenas com o pGILDA duplamente digerido e religado foram utilizadas como molde.

As reações foram realizadas utilizando-se 22 colônias e 0,1 μ l da enzima Tac DNA Polimerase, sob as mesmas condições de reação descritas anteriormente na PCR

de amplificação. Depois as amostras obtidas nas reações de PCR foram submetidas a uma nova corrida eletroforética gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL, juntamente com 0,5µg do marcador de pares de base Lambda DNA/HindIII Marker 2 da Fermentas® e 0,5µg do marcador de pares de base O'GeneRuller 100bp da Fermentas®.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Varredura da Biblioteca de cDNA de Epitélio Olfatório

No primeiro experimento realizado durante a prática experimental desta monografia, o sistema duplo-híbrido em leveduras (Y2H) foi utilizado para identificar proteínas que interagem com a porção carboxi-terminal de um determinado receptor olfatório (CT-ORM93), de acordo com o protocolo descrito em detalhes por Golemis e colegas no livro de métodos *Current Protocols in Molecular Biology* (1999).

Vale lembrar que este sistema de Y2H clássico utilizado é baseado na reconstituição de fatores de transcrição (TFs), onde há dois domínios modulares: um que se liga ao DNA numa sequência promotora específica e um domínio ativador que direciona o complexo da RNA polimerase II para transcrever o gene da sequência promotora do DNA. A utilização desta estrutura bi-modular no estudo de interações entre proteínas está baseada no fato de que proteínas determinadas, expressas em vetores, são fusionadas aos domínios de ligação ao DNA e de ativação de um determinado TF e, assim, a reconstituição do TF depende da interação entre as proteínas expressas nos vetores, a qual aproxima os dois domínios do TF e inicia a transcrição dos genes repórteres.

A ativação da transcrição dos genes repórteres é controlada por um promotor mínimo contendo sítios de ligação para *lexA*. Este gene repórter – que pode ser um gene nutricional necessário para o crescimento da levedura como o *LEU2* utilizado no ensaio realizado neste trabalho – permite selecionar as leveduras nas quais ocorreram a interação entre as duas proteínas. Além disto, um segundo gene repórter, também expresso em resposta à interação entre as duas proteínas, é utilizado como uma segunda estratégia de confirmação da interação. Neste trabalho, o segundo repórter utilizado foi o gene *lacZ*, cuja ativação leva à expressão da enzima β -galactosidase, a qual pode converter *x-gal* em um substrato colorimétrico que torna as colônias azuis.

Como foi citado anteriormente, a realização deste experimento exige a presença de cepas de leveduras de tipos de cruzamento diferentes transformadas com vetores contendo iscas e presas. A isca utilizada neste ensaio foi construída de modo que a porção carboxi-terminal do receptor olfatório M93, que foi subclonada no vetor *pGilda*, é expressa em fusão com o domínio de ligação ao DNA de *lexA*, um fator de transcrição bacteriano. E a biblioteca, por sua vez, está subclonada no vetor *pJG4-5*, de forma que

estas proteínas codificadas pelos diferentes cDNAs são expressas em fusão com um domínio de ativação.

As proteínas iscas fusionadas ao DBD do LexA foram transformadas, juntamente com o plasmídeo repórter pSH18-34, na linhagem RFY206, uma linhagem de leveduras haplóides seletivas do tipo *MATa*, e as proteínas da biblioteca fusionadas ao domínio de ativação foram transformadas na linhagem EGY48, uma linhagem haplóide de tipo oposto ao da RFY206, i. e., *MAT α* . E assim, a análise de interações protéicas entre as iscas e as presas da biblioteca de cDNA foi realizada através de séries de cruzamentos, onde formaram-se células diplóides que possuíam as duas construções, isca e presa, possibilitando desta maneira a ocorrência de interação entre estas. O processo de construção da isca e das bibliotecas e também de transformação dos vetores em bactéria e depois em levedura foram realizados pela orientadora deste projeto durante sua pós graduação, de acordo com os passos descritos em Ausubel et al., 1999.

Como já citado anteriormente, este sistema de duplo-híbrido em leveduras foi utilizado no presente projeto de monografia para identificar proteínas que interagem com a porção carboxi-terminal de um determinado receptor olfatório (CT-ORM93), de acordo com o protocolo descrito em detalhes por Golemis e colegas no livro de métodos *Current Protocols in Molecular Biology* (1999).

A seguir serão discutidos os passos realizados durante o experimento de varredura, bem como os resultados obtidos. Inicialmente, pode-se descrever de modo geral este experimento de acordo com os seguintes passos:

- Titulação das linhagens controle (contendo o vetor vazio) e da biblioteca (contendo a biblioteca de cDNA de epitélio olfatório);
- Cruzamentos entre as linhagens da isca e do controle e da isca e da biblioteca, e indução da expressão das proteínas contidas nos vetores;
- Diluições das suspensões celulares obtidas dos cruzamentos e estimativa potencial de transativação da própria isca de acordo com o número de colônias obtidas no cruzamento controle;
- Escolha de algumas colônias resultantes do cruzamento entre a isca e a biblioteca para comporem a placa mestre onde foi realizada a varredura da biblioteca;
- Avaliação da coloração das colônias como repórter da interação entre isca e componente da biblioteca;

As titulações das linhagens da biblioteca e controle foram realizadas com propósito de testar a viabilidade destas colônias, as quais haviam sido previamente preparadas e estavam congeladas. Assim como o esperado, durante o ensaio de titulação as linhagens testadas cresceram de forma eficiente (10^9 u.f.c/100 μ l no controle e $1,6 \times 10^8$ u.f.c/100 μ l na biblioteca).

Uma vez comprovada a viabilidade das colônias, foi iniciada a preparação dos cruzamentos. As preparações de cada cruzamento, isca+controle e isca+biblioteca, foram incubadas em meio YPD durante a noite resultando na fusão das duas linhagens e formação de células diplóides. As misturas provenientes desta incubação continham células haplóides, menores e mais esféricas, que não realizaram o cruzamento e células diplóides, maiores e mais alongadas, resultantes de cruzamentos.

Então as suspensões celulares resultantes destes cruzamentos foram transferidas para um meio contendo galactose (Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp) para induzir a expressão das proteínas contidas nos plasmídeos. A escolha desta abordagem se deve ao fato de que a expressão destas proteínas contidas nos vetores (tanto pGILDA quanto pJG4-5) está sob o controle do promotor *GALI*, ou seja, estas proteínas são expressas somente na presença de galactose (Gal), mas não na presença de glucose (Glu) (Golemis *et al.*, 1999). Esta expressão condicional tem a vantagem de eliminar os falsos positivos que não apresentam fenótipo GAL-dependente e também evitar que certas proteínas tóxicas prejudiquem o crescimento das leveduras. Além disto, o meio -Ura,-His,-Trp é seletivo para aquelas células haplóides que não realizaram o cruzamento, pois cada vetor utilizado (o pGilda e o pJG4-5) contém um gene que codifica uma enzima necessária na biossíntese dos aminoácidos uracila, histidina e triptofano (ausentes neste meio), desta forma, as células haplóides conseguem realizar a biossíntese de um aminoácido ou de outro, mas não dos três juntos, ao contrário das células diplóides que vão conter todos os vetores e assim podem realizar a biossíntese de todos os três aminoácidos ausentes no meio, e assim apenas as células diplóides podem crescer neste meio.

Após a indução pela galactose, as suspensões celulares contendo a isca + controle e a isca + biblioteca foram diluídas a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} e plaqueados em 14 placas (7 para a biblioteca e 7 para o controle) contendo meio Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu. Além destes, também foram plaqueados 100 μ l das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} (da biblioteca e do controle) em meio Gal/Raff/CM -Ura,-His,-

Trp. Esta série de diluições foi plaqueada em meio sem leucina para restringir o número de colônias que cresceriam em cada diluição, e o segundo plaqueamento das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} em meio contendo leucina teve o objetivo de obter o número total de unidades formadoras de colônia. Além disto, também foram preparados 3ml adicionais da diluição 10^{-1} do cruzamento entre a linhagem contendo a isca e a linhagem contendo a biblioteca e 100µl destes foram plaqueados em vinte placas contendo meio Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu. Também foram plaqueados 100µl das células não diluídas em outras vinte placas contendo Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu. Todas estas placas 10^{-1} e não diluídas foram incubadas a 30°C. Estas placas não diluídas foram preparadas para garantir que caso não fosse visualizado o crescimento de colônias nas placas 10^{-1} , um número maior de células poderia contornar este problema.

As diluições do cruzamento isca + biblioteca serviram apenas para verificar se este cruzamento seria viável para a realização da varredura, realizada numa etapa posterior, sendo assim, logo após a visualização do crescimento das colônias contendo isca+biblioteca estas placas foram descartadas e o experimento foi levado a diante. As diluições do cruzamento isca+controle, por sua vez, tinham um papel mais significativo nesta etapa, pois o número de colônias obtidas (Tabela 2) no cruzamento controle foi utilizado na estimativa do potencial de transativação da isca.

TABELA 2: NÚMERO DE COLÔNIAS OBTIDAS NO CRUZAMENTO CONTROLE. A tabela mostra o número de colônias obtidas no cruzamento controle nas diluições de 10^{-1} a 10^{-6} e não diluído que cresceram em meio seletivo sem adição de leucina e nas diluições 10^{-4} a 10^{-6} que cresceram em meio seletivo com adição de leucina.

Controle		
	Meio Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu	Meio Gal/Raff/CM -Ura, -His,-Trp, Leu+
10^{-6}	0	0
10^{-5}	0	5
10^{-4}	0	33
10^{-3}	0	-
10^{-2}	1	-
10^{-1}	4	-
Não diluído	38	-

Espera-se que o gene repórter seja ativado somente quando ocorra a interação entre isca e presa, e assim, apenas colônias que apresentam as proteínas isca e presa

poderiam crescer em um meio sem leucina. Entretanto, também pode ocorrer expressão do gene repórter nas linhagens controle, i. e., nas linhagens que não expressam a presa, devido a transativação da própria isca. Esta habilidade de transativação da isca pode ser estimada calculando-se o potencial de transativação da proteína isca, o qual é expresso como o número de colônias Leu^+ que cresceram no meio sem leucina pelo número de unidades formadoras de colônias (Leu^+/cfu) disponíveis no cruzamento da linhagem isca com a linhagem controle, i. e., o número de colônias que cresceram no meio com leucina (Golemis *et al.*,1999).

Este cálculo do potencial de transativação é importante para se estabelecer o número de colônias (isca+biblioteca) necessárias para garantir que todos da biblioteca pré-transformada tenham sido incluídos na varredura realizada nas placas mestres. Desta forma, é possível estimar quantos resultados positivos da varredura são falsos, ou seja, gerados pela transativação da própria isca. Isto ajuda a evitar problemas como, por exemplo, quando são escolhidas poucas colônias para a realização da varredura e são utilizadas iscas que possuem um alto potencial de ativação, o que resultaria em uma varredura onde a maior parte dos resultados positivos é falsa e não corrobora a interação entre isca e presa.

O cálculo do potencial de transativação da isca CT-ORM93, utilizada na varredura deste trabalho, foi realizado da seguinte forma: primeiro, foi estimado o número de colônias totais provenientes do cruzamento isca+biblioteca através da absorbância da amostra a 600 nm (Abs_{600} obtida igual a 8; 1 Abs_{600} corresponde a cerca de 2×10^7 células por ml, logo, a amostra em questão corresponde a $8 \times 2 \times 10^7$, que é igual a $1,6 \times 10^7$ células/100 μ l); depois, foi estimado o potencial de transativação através da razão entre as colônias da amostra não diluída que de fato cresceram em um meio sem leucina, i. e. as colônias Leu^+ , e o número de cfu totais (38 colônias $Leu^+ / 1,6 \times 10^7 \sim 2 \times 10^{-6}$ colônias Leu^+/cfu);

Uma vez reconhecido o potencial de transativação, foi possível estabelecer quantas colônias deveriam ser coletadas de cada uma das vinte placas de diluição 10^{-1} do cruzamento isca+biblioteca. De acordo com o protocolo descrito por Golemis *et al.* (1999), uma isca sem potencial de transativação produz menos de cerca de 10^{-6} Leu^+/cfu , e para que a isca possa ser utilizada em uma busca de interação ela não pode ultrapassar um valor maior que 10^{-4} Leu^+/cfu . Se uma isca sem potencial de transativação, onde quase todos os resultados positivos das colônias que compõe a varredura estarão reportando a interação isca-presa de fato, produz menos de cerca de

10^{-6} Leu⁺/cfu, então em uma varredura cuja isca tem um potencial de transativação igual a 2×10^{-6} Leu⁺/cfu, como é o caso da nossa isca CT-ORM93, nós teremos duas vezes mais falsos positivos do que o ideal indicado no protocolo, sendo assim, deve-se escolher duas vezes mais colônias de cada uma das vinte placas, i.e., 40 colônias ao todo, para compensar este potencial de transativação da isca. No entanto, optou-se por escolher cinco colônias de cada uma das placas para compor a placa mestre afim de garantir um bom resultado na varredura, resultando assim em um total de cem colônias distribuídas nas duas placas mestres.

As placas mestres são as placas onde é realizada a varredura da biblioteca de fato, que neste caso é constituída de cDNA de componentes de epitélio olfatório de camundongo. Então, na varredura realizada neste trabalho, as cem colônias coletadas nas vinte placas do cruzamento isca+biblioteca foram distribuídas em duas placas mestres, com cinquenta colônias cada, para diminuir as chances de contaminação.

Estas placas mestres foram incubadas em meio Glicose -Ura,-His,-Trp durante dois dias. Após crescimento, as colônias foram testadas em diferentes meios para checar a ativação do outro gene repórter (Lac-Z) e a dependência da interação por galactose. A checagem da ativação do gene repórter (Lac-Z) é monitorada através da atividade da enzima β -galactosidase. Esta enzima converte a x-gal (80 μ g/ml) fornecida às colônias em um produto colorimétrico que produz uma coloração azul.

A figura 6 mostra esse ensaio de ativação dos genes repórteres para algumas colônias, sendo que muitas destas colônias Leu⁺ obtidas apresentaram a ativação dos dois genes repórteres analisados dependente de galactose. Além disto, a intensidade da cor azul observada na placa gal/raf (x-gal) -ura, -his, -trp variou muito nas diferentes colônias indicando assim que provavelmente haviam diferentes intensidades de interação.

Após a identificação dos clones positivos para interação (positivos para ativação dos dois genes repórteres: Leu e Lac-Z), os próximos passos seriam os testes de dependência de leucina e galactose, a avaliação de todos estes clones e isolamento do vetor pJG4-5, com posterior sequenciamento dos insertos e análise das sequências em bancos de dados para identificação da natureza das proteínas da biblioteca que interagiram com a isca. Porém, como o objetivo deste experimento foi apenas o treinamento dos colaboradores envolvidos no projeto, os passos seguintes à preparação da varredura não foram levados a diante, pois a partir de então foi iniciada a construção das iscas de PrP^c que serão posteriormente utilizadas em varreduras de uma biblioteca

de epitélio olfatório para buscar possíveis proteínas que interagem com a nossa proteína alvo.

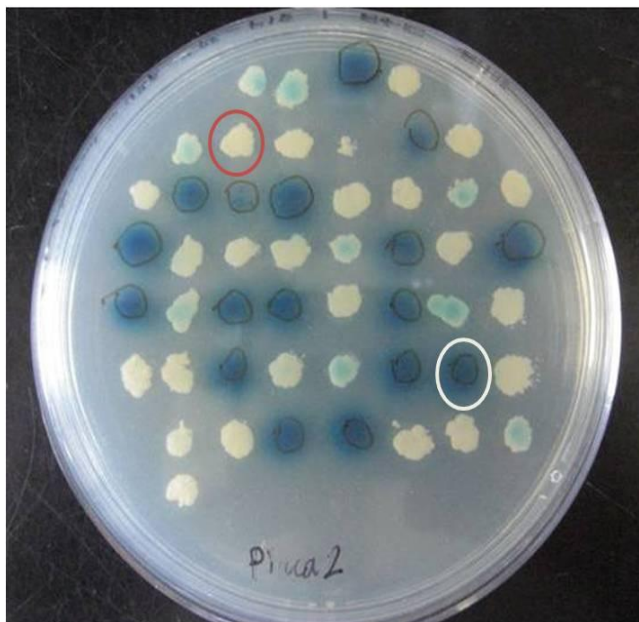


FIGURA 6: PLACA DE TESTES. Esta é uma das placas onde foi testada a atividade do gene repórter Lac-Z. A coloração azulada é resultante da atividade do gene repórter Lac-Z. A colônia destacada em vermelho é um exemplo típico de falso-positivo e foi descartada, pois ela cresce em meio indutor (galactose/rafinose), seletivo para os diplóides (-ura,-his,-trp) e seletivo para interações (meio sem leucina). Porém ela também cresceu (dado não mostrado neste trabalho) no mesmo meio contendo glicose ao invés de galactose como fonte de açúcar, ou seja, o seu crescimento no meio sem leucina não é dependente da expressão da isca e nem da proteína da biblioteca (ambas só são expressas na presença de galactose). Além disto, essa mesma colônia também ficou branca nesta placa gal/raf -ura, -his -trp (com x-gal), indicando que o gene repórter lac-z não está sendo ativado. Já a colônia assinalada em vermelho provavelmente indica um possível candidato a verdadeiro ligante da isca em questão, pois esta colônia cresceu em meio indutor (com galactose) sem leucina; não cresceu nesse mesmo meio com glicose (dado não mostrado neste trabalho) e só ficou azul quando o meio contendo x-gal continha também galactose e não glicose.

5.2. Construção da Isca de PrP^c

O projeto que pretende investigar a PrP^c tem como objetivo principal identificar, através do sistema de duplo-híbrido em leveduras, proteínas expressas no epitélio olfatório de camundongo que se ligam à proteína príon celular. Assim, para a utilização do sistema de duplo-híbrido, o primeiro passo necessário foi a construção de uma isca

contendo a proteína alvo. A seguir serão discutidos os resultados referentes ao processo de construção da isca de PrP^c.

5.2.1. O desenho dos iniciadores

Para realizar a construção destes iniciadores, são necessárias sequências de DNA que codificam a proteína alvo, as quais são subclonadas em plasmídeos específicos que são inseridos em bactérias e depois em leveduras. Sendo assim, a primeira etapa desta construção é a amplificação do fragmento de DNA correspondente a fase aberta de leitura (ORF) do PrP^c de camundongo, para que assim sejam obtidas quantidades suficientes de insertos. Tal amplificação é feita através de reações de PCR, as quais precisam de um iniciador que direcione a atividade da DNA Polimerase, desta forma, foram necessários desenhos de iniciadores que direcionassem a transcrição da proteína de interesse.

Os iniciadores foram desenhados de maneira que as porções N-terminal (que compõe um peptídeo sinal) e a C-terminal (que compõe um domínio envolvido na ligação à ancora de GPI na membrana plasmática) fossem excluídos do transcrito da PrP^c. Além disto, foi levada em consideração a necessidade de colocação de sequências reconhecidas por enzimas de corte (sítios de restrição) diferentes para cada iniciador *forward* (F) e *reverse* (R) para que houvesse uma inserção direcionada no plasmídeo.

Outra coisa também levada em conta durante o desenho dos iniciadores foi a manutenção da fase aberta de leitura dos insertos, pois os insertos são clonados no sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pGilda, localizado logo após uma sequência gênica que codifica o domínio de ligação ao DNA LexA. Desta forma, quando esta isca for expressa na levedura, ela produzirá a proteína de interesse com a região N-terminal fusionada a um domínio de ligação LexA.

5.2.2. Obtenção de insertos

A partir destes iniciadores encomendados, foram realizadas cinco reações de PCR para amplificação da sequência de DNA correspondente a PrP^c, utilizando como molde o plasmídeo contendo a sequência codificadora da PrP^c que continha a sequência gênica da nossa proteína alvo. Após as reações, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel agarose 1% contendo brometo de etídio (2,5µl/50ml de gel), juntamente com o marcador de pares de base O'GeneRuller 100bp da Fermentas®.

Nesta corrida eletroforética foi obtida uma banda para cada reação de amplificação. Todas estas bandas ficaram situadas na linha entre as bandas de 600pb e 700pb do marcador de peso molecular, e assim pode-se estimar que seus produtos apresentam cerca de 650pb, o mesmo peso molecular da PrP^C, indicando assim a correta amplificação desta proteína como pode ser observado na figura 7.

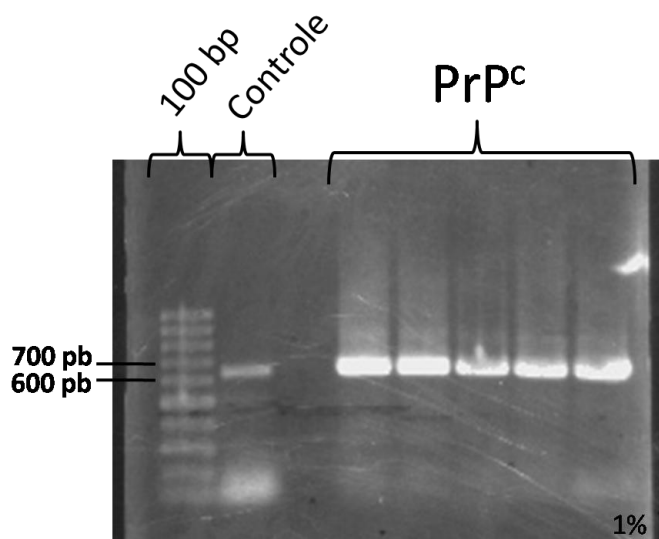


FIGURA 7: PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA SEQUENCIA DE PrP^C. PCR para produção de insertos para PrP^C contendo sítios de restrição para *Bam*HI e *Xho*I. Controle: controle negativo sem moldes para replicação; PrP^C: produtos da amplificação da sequencia PrP^C por PCR; 100 bp: Marcador de massa de 100bp.

O objetivo da reação controle negativa foi servir de base para uma comparação com as bandas obtidas a partir do produto das reações de amplificação da PrP^C. Era esperado que não houvesse nenhum produto de amplificação neste controle e conseqüentemente nenhuma banda fosse encontrada, proporcionando assim uma garantia de que o produto das reações positivas de amplificação fora obtido a partir de seqüências de PrP^C e não de outros elementos contaminantes. Mas infelizmente foi encontrada uma banda fraca na canaleta correspondente à reação controle, o que indica que houve uma pequena contaminação desta reação. Mas como a banda encontrada tem o mesmo peso da PrP^C, a contaminação provavelmente foi causada por alguma partícula de PrP^C que foi introduzida na reação controle durante a sua preparação. Como esta reação controle ainda indica que não houve amplificação de nenhum outro elemento além da PrP^C, ela ainda pode ser considerada válida como fonte de comparação e garantia de que o produto obtido nas reações de amplificação é constituído apenas de seqüências de PrP^C.

Depois de corrido o gel, as bandas de interesse foram extraídas do gel e purificadas com o kit PerfectPrep Gel CleanUp da Eppendorf®. Depois de purificados, o inserto foi submetido a digestão com as endonucleases de restrição EcoRI e BamHI, as quais também foram utilizadas na digestão do vetor, o plasmídeo pGilda, para que assim houvesse uma inserção de forma direcionada, isto é, a orientação 5'-3' correta para a síntese protéica da PrP^c fosse mantida no momento em que houvesse a ligação dos insertos ao vetor.

5.2.3. Digestão, quantificação, ligação e transformação

Como foi descrito anteriormente, o plasmídeo pGilda foi submetido a uma reação dupla de digestão realizada em duas reações distintas, devido à proximidade dos sítios de restrição presentes na região policlonal do pGilda, enquanto a digestão dupla do inserto foi realizada em apenas uma reação. Após a digestão do plasmídeo e do inserto, ambas as amostras foram submetidas a uma nova corrida eletroforética em gel de agarose a 1% visando a separação do DNA e das enzimas. Então os produtos destas digestões foram quantificados e utilizados no ensaio de ligação do plasmídeo e do inserto.

O plasmídeo pGilda foi quantificado pelo aparelho NANODROP do Departamento de Bioquímica da UFPR, cuja concentração indicada foi de 104,5 ng/μl. E a quantificação da PrP^c foi feita comparando-se a intensidade da banda de PrP^c obtida em uma corrida eletroforética com uma escada de peso de 100 pb disponível no laboratório. A concentração encontrada foi equivalente a 5,8ng/μl.

Após a quantificação, deu-se início a preparação da reação de ligação do inserto e do vetor pGilda. Para a ligação, é necessário haver uma relação entre 1:3 a 1:5 para a quantidade de moléculas de plasmídeos e de insertos, partindo-se de 50ng de plasmídeo. Levando em conta que o pGilda tem cerca de 6.600 pb e o inserto PrP^c tem cerca de 650 pb, ou seja, o pGilda pesa dez vezes mais que o inserto PrP^c, se fossem utilizados 50ng do plasmídeo em uma relação 1:1, seriam necessários 5ng do inserto, mas como a relação ideal é de 1:5, foram necessários 50ng do vetor para 25ng do inserto.

Então, o produto desta reação de ligação foi utilizado na transformação de bactérias *E. coli* DH5α pelo método de eletroporação. A eficiência da transformação foi comprovada pelo crescimento de colônias transformadas em um meio contendo

ampicilina, o qual é seletivo para as células que não possuem o gene de resistência à esta droga, i. e., as colônias não transformadas.

5.2.4. PCR de colônia

Uma vez obtidas as colônias transformadas, a próxima etapa foi a realização do PCR de colônia para averiguar se estas colônias continham de fato o vetor e o inserto da proteína alvo, afinal, as colônias poderiam ter adquirido a resistência ao antibiótico por alguma outra via que não a da transformação. O resultado destas reações está representado na figura 8. Como pode ser visto, todas as colônias testadas indicaram um resultado positivo para a presença do inserto, sendo que aquelas cuja coloração foi mais forte foram selecionadas para a realização das etapas seguintes de caracterização da isca.

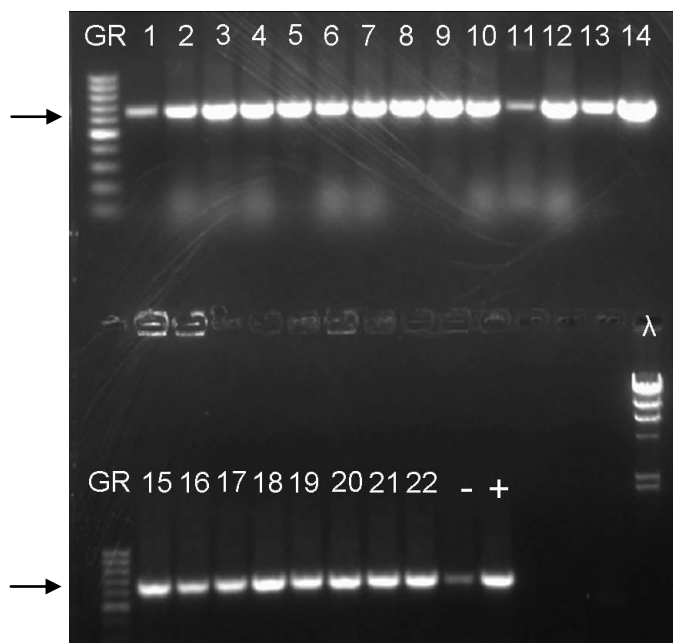


Figura 8: PCR DE COLÔNIAS: PrP^c 1-22: colônias contendo a construção pGi-PrP^c; GR: Marcador Gene Ruller 100pb; +: controle positivo contendo o plasmídeo utilizado na amplificação da sequência codificadora da PrP^c; -: controle negativo (possivelmente contaminado com colônias transformadas com a PrP^c); λ Hind: Marcador de peso molecular. As flechas indicam as bandas obtidas, com o peso molecular esperado (entre 600 e 700 pb).

Apesar da construção da isca de PrP^c não ter sido finalizada ainda – pois faltam muitos testes como a caracterização da isca, transformação do vetor na linhagem RFY206, testes de dependência, averiguação da varredura da biblioteca de epitélio olfatório e mais alguns testes de confirmação posteriores – até o presente momento este projeto tem funcionado de maneira eficiente. No entanto, ainda é cedo para concluir que

a isca de PrP^C é efetiva e vai funcionar como o esperado ao utilizar-se os meios do Y2H para realizar a varredura do epitélio olfatório. Desta forma, as expectativas de que isto aconteça são baseadas, principalmente, nos outros trabalhos que já foram publicados identificando várias substâncias candidatas a interagir com o PrP^C utilizando o sistema de duplo-híbrido (Chiesa e Harris, 2009).

Por outro lado, vale lembrar que a proteína PrP^C atua num contexto extracelular das células nervosas, e não nuclear, como ocorre no modelo de duplo-híbrido clássico. E como foi dito anteriormente neste trabalho, este tipo de proteína pode apresentar alguns problemas quando investigada através do duplo-híbrido clássico. Sendo assim, a PrP^C e alguns componentes da biblioteca de epitélio olfatório podem possivelmente apresentar alguns problemas ao serem investigados utilizando o Y2H clássico como, por exemplo, resultados falsos negativos proporcionados por mudanças da proteína isca ou da proteína constituinte da biblioteca, ou também falsos positivos gerados por superexpressão das proteínas resultando em interações inespecíficas, ou ainda por outras causas como aquelas descritas na revisão bibliográfica.

Uma forma de contornar estes possíveis problemas seria redobrar a atenção com as etapas de controle de expressão dos repórteres da interação isca-presa e, além disto, escolher com cuidado as técnicas a serem utilizadas para a validação das interações positivas encontradas na varredura da biblioteca de epitélio olfatório.

Contudo, outra maneira eficiente de contornar estes possíveis problemas seria recorrer a uma adaptação do sistema de duplo-híbrido em que o meio onde ocorresse a interação fosse semelhante ao meio natural onde ela ocorre. Como foi mostrado na revisão bibliográfica deste trabalho, inúmeras adaptações deste tipo já foram desenvolvidas, incluindo adaptações que permitem a investigação de proteínas extracelulares associadas à membrana, como é o caso da PrP^C. Talvez a utilização do sistema SCINEX-P descrito na revisão bibliográfica (aquele em que a interação ocorre no meio oxidativo do interior do retículo endoplasmático) possa ser uma metodologia baseada em duplo-híbrido mais adequada para o estudo da PrP^C, que neste caso, poderia realizar suas interações específicas sob condições de meio semelhantes às condições encontradas no meio natural de sua ocorrência.

Estas sugestões descritas poderiam incrementar o nível de confiabilidade dos resultados positivos encontrados, porém, eles não são sumariamente urgentes para o projeto realizado no laboratório, pois além do sistema de duplo-híbrido já ter sido utilizado por outros pesquisadores no estudo da PrP^C, e do fato de que o truncamento

desta não proporciona grandes modificações em sua conformação, o trabalho apresentado aqui ainda é relevante no sentido de identificar possíveis proteínas capazes de interagir com a PrP^c, as quais poderão posteriormente ser mais profundamente investigadas utilizando-se outras técnicas.

6. CONCLUSÃO

A partir de todo o trabalho realizado ao longo deste semestre em que a presente monografia foi desenvolvida, pode-se concluir que:

- A revisão bibliográfica realizada permitiu um maior conhecimento sobre a técnica de duplo-híbrido e suas variações, além de fornecer uma abordagem geral sobre os principais problemas e vantagens relacionados a estes sistemas, e com isso também foi possível reconhecer os critérios importantes para a escolha de qual técnica baseada nestes sistemas é mais adequada à cada tipo de proteína envolvida na interação a que se pretende avaliar;
- O acompanhamento dos ensaios de varredura e de construção de isca, além dos outros experimentos desenvolvidos no laboratório onde este projeto foi desenvolvido, foi importante para o entendimento prático de muitos dos conceitos estudados na revisão bibliográfica;
- A varredura da biblioteca de epitélio olfatório utilizando iscas de CT-ORM93 foi satisfatória e os resultados positivos encontrados podem ter um suporte no trabalho realizado anteriormente pela orientadora deste projeto;
- Apesar de alguns contratemplos ao longo do processo de construção da isca de PrP^c, o projeto tem seguido sem grandes problemas e até o momento presente a construção mostrou-se eficiente para a transformação em bactérias;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARONHEIM, A.; ZANDI, E.; HENNEMANN, H.; ELLEDGE, S. J.; KARIN, M.; Isolation of an AP-1 Repressor by a Novel Method for Detecting Protein-Protein Interactions. **Molecular and Cellular Biology**, n.6, v.17, p. 3094–3102, 1997. (a)

ARONHEIM, A. Improved efficiency sos recruitment system: expression of the mammalian GAP reduces isolation of Ras GTPase false positives. **Nucleic Acids Res.** 25(16):3373-4, 1997. (b)

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERSTS, K.; WALTER, P.; **Biologia Molecular da Célula**. 4. Ed. – Porto Alegre: Artmed, 2004.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology** (John Wiley & Sons, Inc.), vol.3, un. 20.1, 1999.

BECKER, F.; MURTHI, K.; SMITH, C.; COME, J.; COSTA-ROLDÁN, N.; KAUFMANN, C.; HANKE, U.; DEGENHART, C.; BAUMANN, S.; WALLNER, W.; HUBER, A.; DEDIER, S.; DILL, S.; KINSMAN, D.; HEDIGER, M.; BOCKOVICH, N.; MEIER-EWERT, S.; KLUGE, A. F.; KLEY, N.; A Three-Hybrid Approach to Scanning the Proteome for Targets of Small Molecule Kinase Inhibitors. **Chemistry & Biology**, Vol. 11, 211–223, 2004.

BENDHEIM, P.E.; BROWN, H.R.; RUDELLI, R.D.; SCALA, L.J.; GOLLER, N.L.; WEN, G.Y.; KASCSAK, R.J.; CASHMAN, N.R.; BOLTON, D.C. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. **Neurology**, n.1, v.42, p.149-156, 1992.

BOLTON, D.C.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER S.B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. **Science**, n.4579, v.218, p.1309-1311, 1982.

BRODER, Y. C.; KATZ, S.; ARONHEIM, A.; The Ras recruitment system, a novel approach to the study of protein–protein interactions. **Current Biology** 8:1121–1124, 1998.

BRÜKNER, A.; POLGE, C.; LENTZE, N.; AUERBACH, D.; SCHLATTNER, U. Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. **Int. J. Mol. Sci.** 10, 2763-2788, 2009.

BÜRKLIN, T.S.; ALAIN HIRSCHY, A.; WALLIMANN, T.; Brain-type creatine kinase BB-CK interacts with the Golgi Matrix Protein GM130 in early prophase. **Molecular and Cellular Biochemistry**. 297: 53–64, 2007.

CALIGIURI, M.; MOLZ, L.; LIU, Q.; KAPLAN, F.; XU, J. P.; MAJETI, J. Z.; RAMOS-KELSEY, R.; MURTHI, K.; LIEVENS, S.; TAVERNIER, J.; KLEY, N.; MASPIT: Three-Hybrid Trap for Quantitative Proteome Fingerprinting of Small

Molecule-Protein Interactions in Mammalian Cells. **Chemistry & Biology**. 13: 711–722, 2006.

CHAUTARD, E.; THIERRY-MIEG, N.; RICARD-BLUM, S.; Interaction networks: From protein functions to drug discovery. A review. **Pathologie Biologie**. 57: 324–333, 2009.

CHIESA, R.; HARRIS, D.A. Fishing for prion protein function. **Public Library of Science Biology**, n.3, v.7, p.439-443, 2009.

DYE, D.E.; KARLEN, S.; ROHRBACH, B.; STAUB, O.; BRAATHEN, L.R.; EIDNE, K.A.; COOMBE, D.R. hShroom1 links a membrane bound protein to the actin cytoskeleton. **Cell. Mol. Life Sci**. 66: 681-696, 2009.

EHRHARD, K.N. JACOBY, J. J.; FU, X.; JAHN, R.; DOHLMAN, H. G.; Use of G-protein fusions to monitor integral membrane protein–protein interactions in yeast. **Nature Biotechnology** 18, 1075 – 1079, 2000.

FELKL, M.; LEUBE, R.E. Interaction assays in yeast and cultured cells confirm known and identify novel partners of the synaptic vesicle protein synaptophysin. **Neuroscience** 156 : 344–352, 2008.

FETCHKO, M.; STAGLJAR, I. Application of the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system to investigate membrane protein interactions. **Methods** 32 : 349–362, 2004.

FIEBITZ, A.; NYARSIK, L.; HAENDLER, B.; HU, Y.; WAGNER, F.; THAMM, S.; LEHRACH, H.; JANITZ, M.; VANHECKE, D.; High-throughput mammalian two-hybrid screening for protein-protein interactions using transfected cell arrays. **BMC Genomics**, 9:68. 2008.

FIELDS, S.; SONG, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. **Nature**, 340, 245-246, 1989.

FIGEYS, D. Mapping the human protein interactome. **Cell Research** 18:716-724, 2008.

GOLEMIS, E. A.; SEREBRIISKII, I.; FINLEY, R. L.; KOLONIN M. G.; GYURIS, J.; BRENT R.; Interaction Trap/ Two-Hybrid System to Identify Interacting Proteins. **Current Protocols in Molecular Biology**. 20.1: 20.1.1-20.1.40, 1999.

GUAN, H. E KISS-TOTH, E. Advanced Technologies for Studies on Protein Interactomes. **Adv Biochem Engin/Biotechnol**, 110: 1–24, 2008.

GIORGINI, F.; MUCHOWSKI, P.J.; Connecting the dots in Huntington’s disease with protein interaction networks. **Genome Biology**. 6:210, 2005.

HIRST, M.; HO, C.; SABOURIN, L.; RUDNICKI, M.; PENN, L.; SADOWSKI, I. A two-hybrid system for transactivator bait proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98, 8726-8731, 2001.

HUANG, J. SCHREIBER, S.L.; A yeast genetic system for selecting small molecule inhibitors of protein–protein interactions in nanodroplets. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Vol. 94, pp. 13396–13401, 1997.

JACKSON, M.; SONG, W.; LIU, M.Y.; JIN, L.; DYKER-HOBERG, M.; LIN, C.I.; BOWERS, W.J.; FEDEROFF, H.J.; STERNWEIS, P.C.; ROTHSTEIN, J.D. Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins. **Nature**. 410: 89-93, 2001.

JOHANSSON, N.; VARSHAVSKY, A. Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91, 10340-10344, 1994.

JOSHI, P. B., HIRST, M., MALCOLM, T., PARENT, J., MITCHELL, D., LUND, K., SADOWSKI, I. Identification of protein interaction antagonists using the repressed transactivator two-hybrid system. **BioTechniques**, 42:635-644, 2007.

KIM, J.Y.; PARK, O.G.; LEE, J.W.; LEE, Y.C.; One- plus Two-hybrid System, a Novel Yeast Genetic Selection for Specific Missense Mutations Disrupting Protein/Protein Interactions. **Molecular & Cellular Proteomics**. 6:10,1727-1740, 2007.

LE PICHON, C.E.; FIRESTEIN, S. Expression and localization of the prion protein PrP(C) in the olfactory system of the mouse. **Journal of Comparative Neurology**, n.3, v.508, p.487-499, 2008.

LICITRA, E.J.; LIU, J.O. A three-hybrid system for detecting small ligand-protein receptor interactions. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, 93, 12817-12821, 1996.

LINDEN, R.; MARTINS, V.R.; PRADO, M.A.M.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. BRENTANI, R.R. Physiology of the prion protein. **Physiology Reviews**, v.88, p.673-728, 2008.

LU C.; ERICSON H. P.; Expression in Escherichia coli of the Thermostable DNA Polymerase from Pyrococcus furiosus; **Protein Expression and Purification**; 11, 179–184, 1997.

MACDONALD, P. N. Two-hybrid systems: methods and protocols. **Methods in molecular biology**TM; (Totowa, N.J.); v. 177, 2001.

MARSOLIER, M.C.; PRIOLEAU, M.N.; SENTENAC, A. A RNA polymerase III-based two-hybrid system to study RNA polymerase II transcriptional regulators. **J. Mol. Biol.**, 268, 243-249, 1997.

MEYER, R.F.; MCKINLEY, M.P.; BOWMAN, K.A.; BRAUNFELD, M.B.; BARRY, R.A.; PRUSINER, S.B. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.83, p.2310-2314, 1986.

RATUSHNY, V.; GOLEMIS, E.A.; Resolving the network of cell signaling pathways using the evolving yeast two-hybrid system. **BioTechniques**. 44:655-662, 2008.

RAZANSKAS, R.; SASNAUSKAS, K.; A novel human protein is able to interact with hepatitis B virus core deletion mutant but not with the wild-type protein. **Virus Research**. 146: 130–134, 2009.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Edition. Cold Spring Harbor, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SENGUPTA, D. J., ZHANG, B., KRAEMER, B., POCHART, P., FIELDS S., WICKENS, M. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 93, 8496-8501, 1996.

SEREBRIISKII, I.; KHASAK, V.; GOLEMIS E.A.; A Two-hybrid Dual Bait System to Discriminate Specificity of Protein Interactions. **The Journal of Biological Chemistry**.v.274, No. 24, pp. 17080–17087, 1999.

SCHULZE, S.R.; CURIO-PENNY, B.; SPEESE, S.; DIALYNAS, G.; CRYDERMAN, D.E.; ET AL. A Comparative Study of Drosophila and Human A-Type Lamins. **PLoS ONE**, 4(10): e7564, 2009.

STAGLJAR, I.; KOROSTENSKY, C.; JOHNSON, N.; TE HEESSEN, S. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 95. 5187–5192; 1998.

STAGLJAR, I.; FIELDS, S.; Analysis of membrane protein interactions using yeast-based Technologies. **TRENDS in Biochemical Sciences**. n.11. v.27. p559:563, 2002.

STAHL, N.; BORCHELT, D.R.; HSIAO, K.; PRUSINER, S.B. *Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid*. **Cell**, n.2, v.51, p.229-240, 1987.

SUTER, B.; KITTANAKOM, S.; STAGLIJAR, I.; Two-hybrid Technologies in Proteomics Research. **Current Opinion in Biotechnology**, 19: 316-323, 2008.

TANAKA, H.; KATOH, H.; NEGISHI, M.; Pragmin, a Novel Effector of Rnd2 GTPase, Stimulates RhoA Activity. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 281, N. 15, pp. 10355–10364, 2006.

URECH, D.M.; LICHTLEN, P.; BARBERIS, A. Cell growth selection system to detect extracellular and transmembrane protein interactions. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1622, 117-127, **2003**.

ULRICHTS, P.; TAVERNIER, J.; MAPPIT analysis of early Toll-like receptor signaling events. **Immunology Letters**. 116. 141-148, 2008.

VIDAL, M.; BRACHMANN, R.K.; FATRAEY1, A.; HARLOW, E.; BOEKE, E. D.; Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93, 10315-10320, 1996.

VOLLERT, C.S. & UETZ, P. The Two-hybrid System. **Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine (ERGPM), Springer Verlag**, Part 20: 1945-1949, 2006.

VON DANNECKER, L. E.; MERCADANTE, A. F. ; MALNIC, B . Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein Galphao1f. **J. Neurosci.**, **25**: 3793-3800, 2005.

WILSON, D.A.; NIXON, R.A. Sniffing out a function for prion proteins. **Nature Neuroscience**, n.1, v.12, p.7-8, 2009.

WU, Z.; ZHANG, X.; YANG, J.; WU, G.; ZHANG, Y.; YUAN, Y.; JIN, C.; CHANG, Z.; WANG, J.; YANG, X.; HE, F.; Nuclear protein I β -f inhibits the activity of STAT3. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 387: 348–352, 2009.

YOSHIDA, K.; WATANABE, M.; HATAKEYAMA, S.; ZNRF1 interacts with tubulin and regulates cell morphogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 389: 506–511, 2009.