

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**ESTUDOS DAS PROTEÍNAS LIGANTES À DCRA E
DSCR1 (ENVOLVIDAS COM A SÍNDROME DE DOWN)
UTILIZANDO A METODOLOGIA DO DUPLO-HÍBRIDO.**

Henrique César Santejo Silveira

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de pós-graduação em Genética
e Evolução do Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde da Universidade
Federal de São Carlos, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Genética e Evolução, área de
concentração: Genética e Evolução.**

**São Carlos
2003**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**ESTUDOS DAS PROTEÍNAS LIGANTES À DCRA E
DSCR1 (ENVOLVIDAS COM A SÍNDROME DE DOWN)
UTILIZANDO A METODOLOGIA DO DUPLO-HÍBRIDO.**

Henrique César Santejo Silveira

**São Carlos
2003**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S587ep

Silveira, Henrique César Santejo.
Estudos das proteínas ligantes à DCRA e DSCR1
(envolvidas com a síndrome de Down) utilizando a
metodologia do duplo-híbrido / Henrique César Santejo
Silveira. -- São Carlos : UFSCar, 2003.
96 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2003.

1. Genética molecular. 2. Down, Síndrome de. 3. DSCR1.
4. Duplo-híbrido. 5. UXT. 6. APLP1. I. Título.

CDD: 574.87328 (20^a)

Dedico este trabalho a minha mãe Ana Maria, que
sempre se dedicou para os filhos

Orientador

Prof. Dr. Flávio Henrique Silva

Agradecimentos

Ao Prof. Flávio Henrique Silva, amigo e orientador, pela oportunidade e pelas idéias arrojadas no desenvolvimento deste trabalho no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos.

A toda equipe de pós-graduandos do Laboratório de Biologia Molecular, Andréia, Daniela e Elizete pelas dicas, ao amigo César Sommer pela ajuda no trabalho, aos amigos Wilson, Patrícia, Prof. Euclídes pela amizade. Ao aluno de iniciação científica Fernando na ajuda da amplificação da biblioteca de cDNA utilizada neste trabalho.

Ao programa de pós- graduação em Genética e Evolução pelo auxílio na realização do trabalho, as secretárias do programa Regiane, Tatiane e Rose.

Ao Departamento de Genética e Evolução pelo suporte e a secretária Leila pela atenção.

A meus irmãos Camila e Otávio pela união e incentivo e ao meu pai Afonso e ao meu avô Otávio pelo apoio. Em especial a minha mãe Ana Maria quem sempre me incentivou de maneira motivante e me deu força e conselhos nos momentos em que mais precisei.

A minha namorada Márcia pela atenção, companheirismo e amor durante todo este período.

SUMÁRIO

1.0-INTRODUÇÃO:	5
1.1- SÍNDROME DE DOWN.....	5
1.1.1- <i>Histórico</i>	5
1.1.2- AS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DA SÍNDROME DE DOWN	6
1.1.3- <i>A incidência da Síndrome de Down</i>	7
1.1.4- <i>Origens da Síndrome de Down</i>	9
1.2- O CROMOSSOMO 21	9
1.3 - REGIÃO CRÍTICA DA SÍNDROME DE DOWN (DSCR)	11
1.4 - O GENE DCRA	13
1.4.1- A PROTEÍNA DCRA.....	14
1.5- O GENE DSCR1	15
1.5.1- A PROTEÍNA DSCR1 E SUAS FORMAS VARIANTES	17
1.6- O MÉTODO DO DUPLO-HÍBRIDO	21
2.0- OBJETIVOS:	25
3.0- MATERIAL E MÉTODO:	26
3.1- AS CEPAS DE LEVEDURA UTILIZADAS E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	26
3.2- PLASMÍDEOS UTILIZADOS	28
3.2.1- PLASMÍDEOS UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE (ISCA)	29
3.2.2- PLASMÍDEOS UTILIZADOS PARA A CLONAGEM DA BIBLIOTECA DE CDNA OU POSSÍVEIS PROTEÍNAS LIGANTES COM A ISCA	30
3.2.3- PLASMÍDEOS CONTROLES COMPONENTES DO SISTEMA	33
3.2.4- PLASMÍDEOS UTILIZADOS COMO CONTROLES NEGATIVOS	36
3.3- MEIOS DE CULTURA.....	37
3.4- SOLUÇÕES.....	38
3.5- VERIFICAÇÃO FENOTÍPICA DAS CEPAS AH109, CG1945 E Y187	40
3.6- BIBLIOTECA DE CDNA DE CÉREBRO FETAL HUMANO.....	40
3.6.1- AMPLIFICAÇÃO DA BIBLIOTECA DE CDNA DE CÉREBRO FETAL HUMANO.....	41
3.7- OBTENÇÃO DOS INSERTOS DCRA E DSCR1, E SUB-CLONAGEM EM PLASMÍDEOS (DNA-BD)	41
3.8- TRANSFORMAÇÕES DOS PLASMÍDEOS PGBT9-DCRA E PGBKT7-DSCR1 EM CEPAS DE LEVEDURA.....	44
3.9-TESTE DE ATIVAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DAS PROTEÍNAS HÍBRIDAS DCRA E DSCR1 NAS CEPAS CG1945 E AH109.	45
3.10- VARREDURA (“SCREENING”) DA BIBLIOTECA DE CDNA DE CÉREBRO FETAL HUMANO COM O PLASMÍDEO PGBT9-DCRA (KIT MATHCMARKER TWO-HYBRID SYSTEM II)	46
3.10.1- <i>Análise dos clones positivos (busca de proteínas que interagem com a DCRA)</i>	49
3.10.2- <i>Extração de DNA plasmidial de levedura</i>	49
3.10.3- <i>Sequenciamento dos possíveis clones positivos</i>	50
3.10.4- <i>Verificação de similaridade</i>	51
3.10.5- <i>Cotransformação em cepa de levedura e verificação da ativação da transcrição</i>	51
3.12- VARREDURA (“SCREENING”) UTILIZANDO UMA BIBLIOTECA DE CDNA DE CÉREBRO FETAL NA BUSCA DE PROTEÍNAS LIGANTES COM A DSCR1 (KIT TWO- HYBRID SYSTEM III)	53
3.13- ANÁLISE DOS POSSÍVEIS CLONES POSITIVOS	55
3.13.1- <i>Reteste fenotípico</i>	55
3.13.2- <i>Sequenciamento dos possíveis clones positivos</i>	56
3.13.3- <i>Verificação da similaridade</i>	57
3.13.4- <i>Cotransformação em cepa de levedura dos clones selecionados</i>	57
3.14- ACASALAMENTO DE LEVEDURAS (“YEAST MATING”)	58
3.15- COIMUNOPRECIPITAÇÃO DAS PROTEÍNAS COM INTERAÇÃO	60
4.0- RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1- ATIVAÇÃO TRANSCRICIONAL DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE	66
4.2 - ANÁLISE DA BIBLIOTECA DE CDNA DE CÉREBRO FETAL UTILIZANDO COMO ISCA A PROTEÍNA DCRA	66
4.2.1- <i>Análise dos clones positivos obtidos com a DCRA</i>	67
4.2.2- <i>Análise dos possíveis ligantes a proteína DCRA</i>	68

4.3 - VARREDURA DA BIBLIOTECA DE cDNA DE CÉREBRO FETAL UTILIZANDO COMO ISCA A PROTEÍNA DSCR1	74
4.3.1 - A descoberta de um novo ligante para a proteína DSCR1	74
4.3.2- Cotransformação em cepa de levedura dos clones com possível interação	75
4.3.3- Características dos novos ligantes da proteína DSCR1	77
4.4 - ANÁLISE DA INTERAÇÃO <i>IN VIVO</i> DOS POSSÍVEIS LIGANTES A PROTEÍNA DSCR1 ATRAVÉS DE UM ACASALAMENTO DE LEVEDURAS (YEAST MATING)	78
4.5 -INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i> ENTRE AS RECOMBINANTES DSCR1 E UXT	81
4.6 - QUE PAPEL A PROTEÍNA DSCR1 POSSIVELMENTE DEVE ESTAR REALIZANDO?	83
5.0- CONCLUSÕES GERAIS	87
6.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

Resumo

Os genes DCRA e DSCR1 estão localizados no cromossomo 21 mais especificamente na Região Crítica da Síndrome de Down que, em triplicata é responsável por alguns fenótipos da Síndrome. Neste projeto, visando encontrar proteínas que interagem com as proteínas DCRA e DSCR1, foi empregado o método do Duplo- Híbrido que utiliza as propriedades da proteína GAL 4 de levedura *Saccharomyces Cerevisiae*.

Com esta finalidade fez-se a sub-clonagem das ORFs DCRA e DSCR1 em plasmídeos que contém um domínio de ligação ao DNA da proteína GAL 4. Estas construções foram utilizadas para analisar possíveis interações proteicas utilizando uma biblioteca de cérebro fetal construída em um plasmídeo em fase com o domínio de ativação da transcrição da proteína GAL 4.

Nas análises com a proteína DCRA não foi possível confirmar nenhuma interação, porém possibilitou o estabelecimento de vários falso positivos dentro da técnica. Por outro lado, identificação de novos ligantes a proteína DSCR1, que são as proteínas UXT e APLP1, revela um novo papel da DSCR1 dentro da célula, provavelmente relacionado à regulação gênica.

Abstract

The genes DCRA and DSCR1 are located in the “Down Syndrome Critical Region”, a specific portion of human chromosome 21 responsible for the main traits of the disease. In the present work we have used the two-hybrid system as an approach to find proteins that interact with DCRA and DSCR1. This method is based on the properties of the yeast GAL4 protein, which consists of separable domains responsible for DNA-binding and transcriptional activation.

The open reading frames of DCRA and DSCR1 were cloned in frame with the GAL4 DNA-binding domain. These constructions were used to analyse protein interactions using a human foetal brain cDNA library, cloned in frame with the GAL4 transcriptional activation domain.

No DCRA protein partners were found in any of the screenings performed; nevertheless, the analysis allowed the detection of several false positive clones.

In the analysis of DSCR1 we identified two proteins, UXT (ubiquitously expressed transcript) and APLP1 (amyloid precursor-like protein 1). These results may help elucidate a new function for DSCR1 in the nucleus, probably related to gene expression.

1.0-Introdução:

1.1- Síndrome de Down

1.1.1- Histórico

A primeira descrição desta anomalia genética foi publicada pelo médico Jonh Langdon Down em 1866, no artigo intitulado “Observation on the Ethnic Classification of Idiots” (DOWN, 1866). Esta era uma das anomalias dos pacientes, classificados pelo autor, como idiotas do tipo mongoliano (devido às semelhanças fisionômicas aos habitantes da Mongólia). Acreditava-se que os diferentes tipos de condições destes pacientes, se originavam devido à influências étnicas não europeias, um reflexo do preconceito da época.

A primeira característica neuropatológica foi descrita por (FRASER e MITCHELL., 1876) até então não haviam relacionado estas características com a trissomia do cromossomo 21. Em 1932 Waardenbreg sugeriu que anomalia era consequência de anormalidade cromossomal.

Em 1959 Lejune em Paris e Jacobs na Escócia, simultaneamente utilizaram-se de novas técnicas citogenéticas e descreveram a presença de um cromossomo extra ao complemento do cariótipo normal (trissomia do 21). Só então a anomalia foi chamada de Síndrome de Down em homenagem ao médico Jonh Down.

Depois de 41 anos da descrição como trissomia do cromossomo 21 o próximo passo histórico para os pesquisadores dessa síndrome foi o sequenciamento completo do cromossomo 21 realizado por (HATTORI et al., 2000).

1.1.2- As principais características da Síndrome de Down

A Síndrome de Down é resultante da trissomia do cromossomo 21. É uma complexa condição com um conjunto de aproximadamente 30 características, as quais manifestam-se em frequências diferentes entre os indivíduos afetados.

Dessas características, algumas são marcantes como: cabelo liso e fino, olhos com linha ascendente e dobras de pele nos cantos internos, orelha com implantação baixa, nariz pequeno e “achatado”, pescoço curto e grosso, flacidez muscular, mãos pequenas com dedos curtos, prega palmar única, mãos e pés pequenos com dedos curtos e espaçados, pele seca e rosácea (Figura 1).

Além das características físicas comuns os portadores da Síndrome de Down, sofrem alterações fisiológica de origem morfológica e metabólica como, defeitos congênitos do coração, anomalias gastrointestinais (EPSTEIN, 1986), anormalidades neuromuscular, retardamento mental e modificações neuropatológicas. As últimas duas características, são mais frequentes com uma incidência de cerca de 100% dos indivíduos com SD, as alterações neuropatológicas ocorrem somente após 35 anos de idade, com riscos a desenvolver o mal de Alzheimer devido ao quadro neurodegenerativo (WISNIEWSKI et al., 1985).

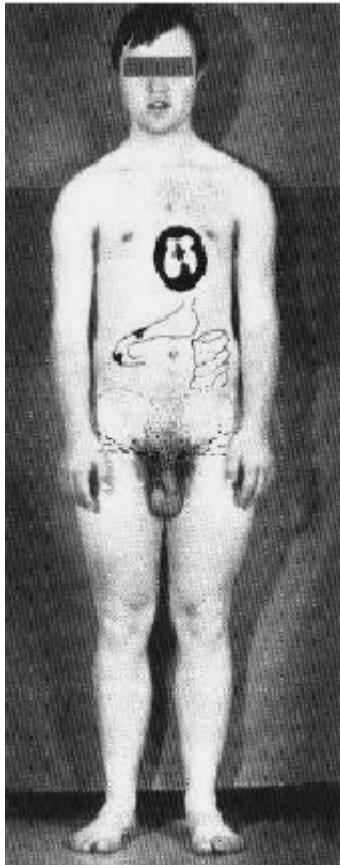


Figura 1: Principais fenótipos apresentados na Síndrome de Down . Os órgãos em desenhos esquemáticos são os principais afetados com a Síndrome como estômago, intestino e genitália. Figura extraída de Vogel e Motulsky (1997).

Uma intrincada relação entre o cromossomo 21 e câncer é marcante pelo fato de pacientes com SD ter um risco aumentado de desenvolver leucemia principalmente na infância (KRIVIT, 1957; FONG e BRODEUR, 1987; ROBINSON, 1992).

Devido ao fato de pacientes com SD poderem desenvolver todas essas doenças relacionadas é fundamental relatarmos a incidência dessa Síndrome.

1.1.3- A incidência da Síndrome de Down

A Síndrome de Down é uma desordem cromossômica que tem incidência de 1 caso a cada 700 nascimentos (HOOK, 1982; HASSOLD e

JACOBS, 1984). Considerando os dados nascem cerca de 8 mil crianças com Síndrome de Down por ano no país.

Todas as pessoas estão sujeitas a ter um filho com SD, independente da “raça” ou condição sócio-econômica pois sua ocorrência é igual entre as diferentes raças (CHRISTIANSON, 1996). Quando as etnias são analisadas sem levar em consideração as idades maternas, nota-se uma maior incidência de casos de SD nos povos de “raça” branca. No entanto isto mostra apenas a diferença na média da idade materna destas raças.

O risco de se ter uma criança com SD aumenta quando a idade materna é elevada (PENROSE, 1933). Quando a mãe ultrapassa a idade de 35 anos, a incidência é de 1 caso a cada 370 nascimentos. Por outro lado, mães com 20 anos de idade apresentam 1 caso a cada 1600 nascimentos (HOOK et al., 1983). A tabela abaixo (Tabela 1) mostra números relacionados às idades maternas (LEJUNE, TURPIN e GAUTIER, 1959).

TABELA 1- Incidência do número de nascimentos de crianças com Síndrome de Down em relação a idade materna.

Idade Materna	Casos de Síndrome de Down em nascimentos
Até 35 anos	1 em 2000
De 35 a 45 anos	1 em 250
De 45 anos em diante	1 em 50

1.1.4- Origens da Síndrome de Down

A Síndrome de Down frequentemente resulta da trissomia completa do cromossomo 21, devido a não disjunção durante a formação gamética. Em aproximadamente 95% dos casos de trissomia, a não disjunção é de origem materna (ANTONARAKIS, 1991), e ocorre ao acaso durante a meiose. Raramente ela pode ocorrer depois da fertilização completa (não disjunção mitótica), resultando em duas linhagens celulares diferentes, sendo esta condição denominada como mosaicismo (MIKKELSEN, 1977).

Um pequeno número de casos resulta de translocações completas ou parciais que ocorrem entre cromossomo 14 e 21 ou entre o próprio cromossomo 21 (MIKKELSEN, 1977). Contudo, 90% a 95% dos casos resultam de trissomia completa do cromossomo 21; 2% a 4% dos casos resultam de translocações e 2% a 4% são resultados de mosaicismo (MIKKELSEN, 1977 e HOOK, 1982).

1.2- O cromossomo 21

O cromossomo 21 (Figura 2) teve sua sequência de DNA totalmente desvendada por (HATTORI et al., 2000). Seu sequenciamento foi fruto de um trabalho liderado por pesquisadores do Japão e Alemanha, mas foi também a conclusão de um trabalho de vários pesquisadores que investigavam este cromossomo há mais de 15 anos.

A rápida identificação de todos os genes do cromossomo 21 pode antecipar e acelerar as descobertas dos mecanismos das doenças causadas pela trissomia do 21.

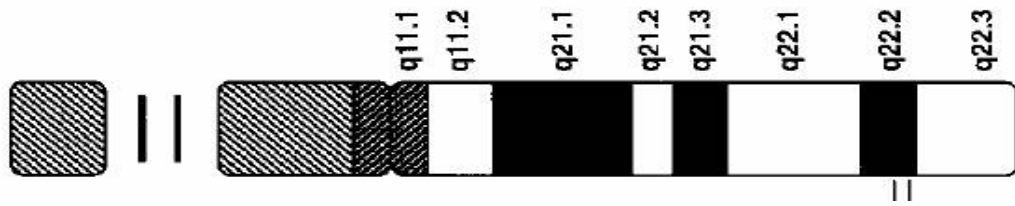


Figura 2 : Ideograma do cromossomo 21. Esquema representado com padrão de bandas citogenéticas

Cerca de aproximadamente 33,8 milhões de pares de bases de DNA compõem o cromossomo 21. Foram realizadas comparações, entre DNA total e parcial com cDNAs e ESTs (“Expression sequence tags”) de todas as espécies, utilizando softwares de predição de exons. Estas análises revelaram 127 genes conhecidos, 98 genes preditos (13 similares para proteínas conhecidas), 17 ORFs (“open reading frame”). Também, foram caracterizados domínios já conhecidos e 68 unidades de transcrição que não têm similaridade com proteínas conhecidas, além de 59 pseudogenes (genes que são incapazes de codificar para uma proteína funcional) num total de 228 genes (ANTONARAKIS et al., 2001).

A anotação desses genes no cromossomo 21 foi organizada utilizando-se vários critérios; na categoria 1 foram selecionados genes que continham identidade ou alta homologia com genes conhecidos; na categoria 2 foram separados os novos genes que continham similaridade com cDNAs e ORFs (open reading frames) de outros organismos; na categoria 3 estão as seqüências de aminoácidos preditas que contêm similaridade para um domínio ou região de uma proteína; a categoria 4, para novos genes somente por predição de éxons utilizando softwares especializados ou por ESTs, mas sem éxons reconhecidos.

No cromossomo 21, seguindo-se a anotação estabelecida, aproximadamente 35% dos genes são homólogos para genes em *Drosophila melanogaster*, 35% para genes em *C. elegans* e 18% para genes em *Saccharomyces cerevisiae* (HATTORI et al., 2000).

Apesar de todos esses dados a descrição precisa ser completada, dados como as variantes de “splicing” de todos genes, como a distribuição do padrão de expressão dos genes em seus respectivos tecidos. Agora com genes já pré-estabelecidos após o sequenciamento, o caminho está aberto para a procura de quais deles estão realmente envolvidos com a Síndrome de Down.

1.3 - Região Crítica da Síndrome de Down (DSCR)

Estudos recentes têm relatado pacientes com características fenotípicas de SD, porém com trissomia parcial do cromossomo 21. Análises moleculares dessa pequena região ou regiões em triplicata, são de fundamental importância a fim de se limitar o número de genes no cromossomo 21 envolvidos na SD.

Primeiramente a verificação dessas trissomias parciais era feita por mapeamento da região cromossomal que se apresentava em triplicata. Vários casos de SD não eram detectados devido ao tamanho muito pequeno das regiões duplicadas.

O uso de marcadores moleculares em amostras de DNA de indivíduos com características fenotípicas da SD, que apresentavam trissomia parcial do cromossomo 21 (RAHMANI et al., 1989; McCORNICK et al., 1989; KORENBERG et al., 1990; DELABAR et al., 1993; KORENBERG., 1993), permitiu a identificação de uma área de aproximadamente 4 Mb entre os

marcadores D21S17 e ETS2. Esta região foi associada com as principais características da SD como retardo mental e algumas da características faciais recebendo o nome de “Região Crítica da Síndrome Down” ou DSCR (Figura 3) (FUENTES et al., 1995, 1997; EPSTEIN et al.,1991 e KORENBERG et al., 1988). Em alguns pacientes ela é aparentemente determinante de retardamento mental, doença congênita do coração e estenose duodenal (KORENBERG et al., 1992).



Figura 3: Representação esquemática (ideograma) do cromossomo 21. Em destaque a delimitação da Região Crítica da Síndrome de Down entre os marcadores D21S17 e ETS2, na região distal do braço longo.

Outra região tem sido identificada: uma sub-região que inclui D21S55 e MX1, identificada na banda 21q22.3, tem sido associada a características dermatológicas da SD e foi nomeada como Região Crítica da Síndrome de Down 2 (DELABAR, 1993).

Na Região Crítica da Síndrome de Down já foram isolados vários genes, o papel desses no fenótipo da SD ainda é desconhecido. Podemos citar alguns deles como o SIM2, um homólogo do *Drosophila* single-minded gene, que é um dos reguladores do sistema nervoso de *Drosophila*. Três cópias do SIM2 podem contribuir para alguns fenótipos da SD (CHEN et al., 1995; FAN et al., 1996; YAMAKI et al., 1996; CHRAST et al., 1997). O gene para a

holocarboxilase synthase (HCS), uma enzima que catalisa a incorporação da biotina em várias carboxilases, está envolvido com catabolismo de aminoácido (SUZUKI et al., 1994). O gene ERG que é relatado para uma família de oncogenes (RAO et al., 1988). Também o GIRK2 envolvido em vias de sinalização (PATIL et al., 1995). Outros como o DCRR1(EKI et al., 1997) e o TPRD (TSUKAHARA, F. et al, 1998) também são localizados na DSCR.

Em nosso laboratório alguns genes da Região Crítica da Síndrome de Down estão sendo estudados, entre eles o DCRB, também denominado *dscr-4* (NAKAMURA, A. , HATTORI, M. , SAKAKI, Y. 1997 a), os genes *dscr-5* e *dscr-6* (SHIBUYA et. al., 2000).

No presente trabalho, os genes alvos são o DCRA também denominado de *dscr-3* (NAKAMURA, A. , HATTORI, M. , SAKAKI, Y. 1997 b) e o gene DSCR1 (FUENTES et al., 1995) sendo este o gene mais estudado entre os relacionados dentro da DSCR.

1.4 - O gene DCRA

O gene no qual temos interesse, o DCRA (Down Syndrome Critical Region Gene A –GENBANK NM_006052) (FIGURA 4), foi clonado da região 21q22.2. Este gene possui o tamanho 3.252 pb, consiste de 8 exons e é expresso na maioria dos tecidos, incluindo cérebro fetal e adulto, coração, pulmão, fígado, rins, placenta e músculo esquelético (NAKAMURA, A. , HATTORI, M. , SAKAKI, Y. 1997 b).

Análises via *Northen blot* revelaram que, além do transcrito de 3.3 Kb, o músculo esquelético adulto revelou um transcrito de 4 Kb. Fato semelhante ocorreu com o *dcra* de camundongo (esse gene possui 92% de identidade com

o DCRA humano) no qual um transcrito de 2,2 Kb foi detectado em tecidos embrionários e adultos (quando foi utilizada uma sonda humana) e um transcrito menor de 1,4 Kb foi detectado em todos os demais tecidos testados. Estes diferentes transcritos poderiam ser resultantes de um processamento alternativo ou diferentes inícios de transcrição.

O DCRA exibe similaridade com o gene Hbeta58 de camundongo (NAKAMURA, A., HATTORI, M., SAKAKI, Y., 1997b). O Hbeta58 está relacionado com o desenvolvimento embrionário de camundongo e esse fato reforça a hipótese de que o DCRA poderia estar relacionado com o desenvolvimento de características da SD.

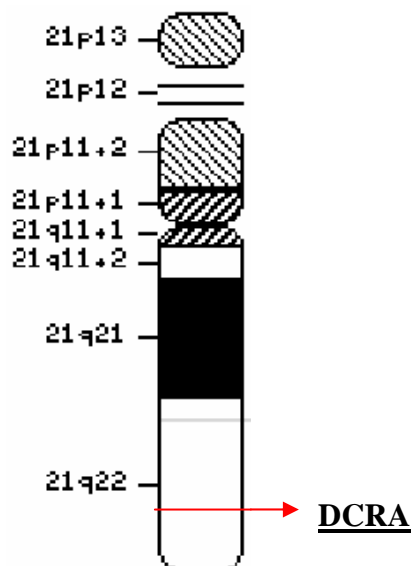


Figura 4: Ideograma do cromossomo 21. Em destaque com a posição gênômica aproximada do gene DCRA.

1.4.1- A proteína DCRA

A ORF DCRA codifica 297 resíduos de aminoácidos contendo um peso molecular de 33KDa (acesso NP_006043.1). A proteína DCRA possui identidade com a DCRA de camundongo. Sua fase aberta de leitura também

apresenta similaridade com a Hbeta58 envolvida na embriogênese deste animal (NAKAMURA, A., HATTORI, M., SAKAKI., Y., 1997b). A PEP8, que é homóloga da Hbeta58 em levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e de um EST de *Arabidopsis thaliana*, esta similaridade sugere que a DCRA tem alguma importante função conservada durante o curso da evolução (análises *in silico*).

Além de estabelecida a sequência predita da proteína, é importante a predição da função. A proteína DCRA foi submetida a análise *in silico* para visualização de domínios pré-determinados utilizando o Portal Curagen (<http://portal.curagen.com/cgi-bin/curatools/startCuraTools.pl>). Nesta análise foram estabelecidos motivos conhecidos, como sítio de glicosilação, sítio de fosforilação para proteína Kinase C e um motivo ligante de ATP/GTP. Também foi utilizado o programa pSORT II na busca da predição da localização celular da proteína, obtendo os resultados de localização no citoplasma com probabilidade de 52.2%, 17.4% para localização mitocondrial, 13% nuclear, 8.7% peroxisomal, 4.3% vacuolar e 4.3% retículo endoplasmático.

1.5- O gene DSCR1

O gene DSCR1 (Figura 5) encontra-se na Região Crítica da Síndrome de Down, na posição 21q22.1- q22.2 (FUENTES et al., 1995). Possui um tamanho de aproximadamente 45Kb ao longo do DNA genômico e contém 7 éxons e 6 íntrons (Figura 6). Análises de cDNAs de diferentes tecidos, utilizando a técnica de RACE-PCR, revelaram que os quatro primeiros éxons são alternativos originando 3 proteínas diferentes (1-5, 3-5, 4-5), correspondentes às isoformas 1, 3 e 4 respectivamente. Os exons 5, 6 e 7 são compartilhados em todas as

isoformas (Figura 6). O exon 2 não codifica para nenhuma forma alternativa devido à ausência do códon iniciador metionina (FUENTES et al., 1997).

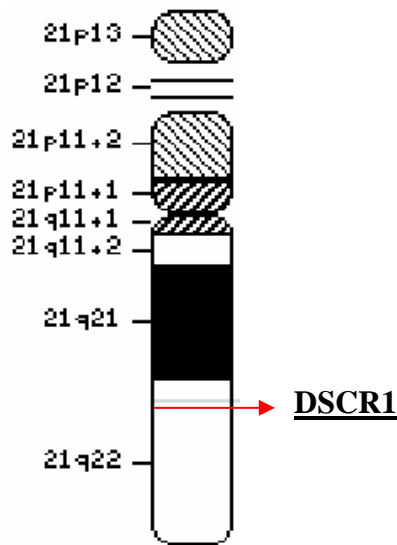


Figura 5: Representação esquemática do cromossomo 21 (ideograma) com a aproximada localização do gene DSCR1.

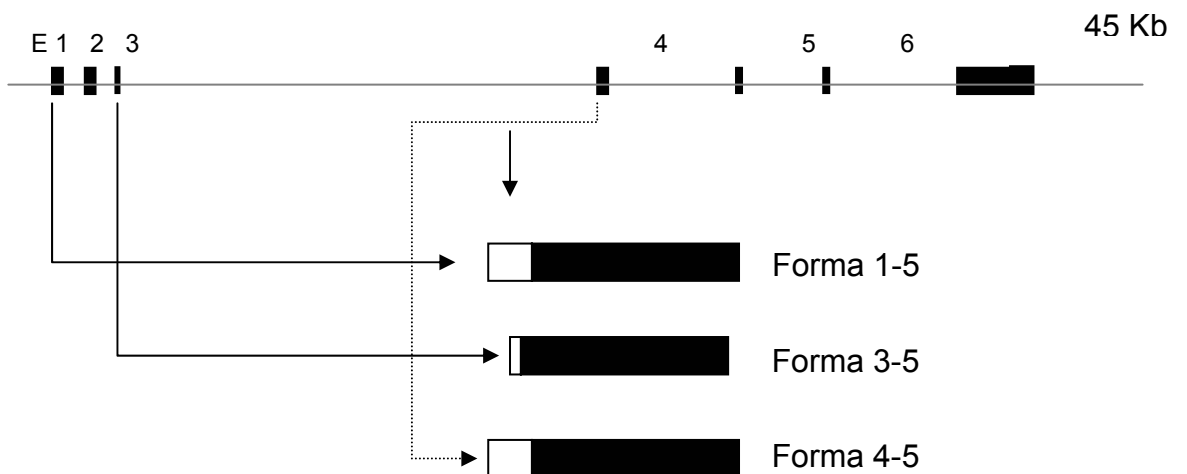


Figura 6: Representação esquemática do comprimento do gene DSCR1 com os respectivos exons e introns, e as formas produto de splicing alternativo.

Análises por Northern Blot utilizando como sonda os éxons 1 e 4 revelaram a presença de um transcrito de aproximadamente 2,2 Kb em vários tecidos humanos, principalmente em cérebro fetal, coração, músculo estriado e placenta (FUENTES et al., 1997). Posteriormente o RNA total de cérebros de pacientes com Síndrome de Down, e sem a Síndrome foram hibridizados via Northern Blot com uma sonda de cDNA do DSCR1. Nestes estudos foi verificada a alta expressão do gene DSCR1 em pacientes com a Síndrome (FUENTES et al., 2000), constatando o possível envolvimento deste gene com alguns fenótipos da anomalia, principalmente doenças congênitas do coração e retardamento mental.

1.5.1- A proteína DSCR1 e suas formas variantes

A forma 1-5 (171 aminoácidos) ou isoforma 1 apresenta na porção N-terminal uma região (EEVDLED) rica em ácido glutâmico e aspártico, que pode ser mais uma região de ativação da transcrição. Já a forma 4-5 (197 aminoácidos) ou isoforma 4 apresenta uma sequência alvo para mitocôndria (FRNFNY) na extremidade N-terminal (CRAWFORD et al., 1997).

Na região C-terminal comum entre as duas isoformas, existem alguns domínios importantes já encontrados em outras proteínas (Figura 7). Dentre estes estão os domínios ligantes de SH2 (PEYTPI) (SOGYANG et al., 1993) e de SH3 (HLAPPNPK) (FENG et al., 1994; YU et al., 1994) sendo o primeiro encontrado em proteínas que são ativadas via fosforilação por tirosina quinase, relacionadas com processos de sinalização celular (KOCH et al., 1991), e o segundo um domínio encontrado em proteínas citoesqueléticas e também

relacionado a sinalização via tirosina quinase (KOCH et al., 1991). Outra região comum, rica em aminoácidos básicos (RRPKPK), funcionaria como sinal de localização nuclear (NLS).

Existe outro domínio rico em prolina e serina (SPPASPP) que parece ser de fundamental importância na função da DSCR1. Esse domínio é também presente no fator de transcrição E2F-1 (SPPPSSPPSS) no qual os resíduos de serinas são fosforiláveis, facilitando a interação com outras proteínas e direcionando a transcrição de genes controlados por E2F (HELIN et al., 1993a; HELIN et al., 1993b; HARDY e SHENK, 1989; FAGAN et al., 1994). O fator de transcrição NFAT (“nuclear factor of activated T-cells”) também apresenta domínios similares (LIU et al., 1999; STRIPPOLI et al., 2000a). A presença desse sítio indica uma provável regulação por quinases e fosfatases (PELECH e SANGHERA, 1992a; PELECH e SANGHERA, 1992b; FUENTES et al., 1995).

MHFRNFNYSFSSLIACVANS DIFSESETRAKFESLFR TYDKDITF
QYFKSFKRVRINFSNPFSAADARLQLHKTEFLGKEMKLYFAQ
TLHIGSSHLAPPNPDKQFLISPPASPPVGWKQVEDATPVINYD
LLYAISKLGPGKEYELHAATD'TTPSVVVHVCESDQEKEEEEE
MERMRRPKPKIIQTRRPEYTPIHLS

SPPASPP- Repetições SPs

RRPKPK- Suposto sinal de localização nuclear- NLS

PEYTPI- Suposto domínio ligante SH2

HLAPPNPDK- Suposto domínio ligante SH3

Figura 7: Sequência de aminoácidos da forma 4-5. Representados em colorido no esquema os domínios presentes na região comum entre as isoformas.

A DSCR-1, também chamada MCIP1 (myocyte- enriched calcineurin-interacting protein 1), faz parte de uma família de proteínas ligantes a calcineurina as quais interagem fisicamente e funcionalmente com calcineurina A, a subunidade catalítica da fosfatase dependente de Ca^{2+} / calmodulina. A região ligante da DSCR-1 na calcineurina A é localizada em um linker entre o domínio catalítico de calcineurina A e o domínio de ligação de calcineurina B, fora de domínios previamente estabelecidos em calcineurina A (FUENTES et al., 2000).

Faz parte dessa família proteínas que são conservadas evolutivamente a proteína de levedura Rcn1p, esta proteína impede a defosforilação do fator de transcrição citoplasmático Tcn1p (também chamado Crz1p e Hal8p) o qual se acumula no núcleo e induz a expressão de ATPases de cálcio Pmc1p e Pmr1p (KINGSBURY e CUNNINGHAM et al., 2000). A CBP1 do fungo patogênico *Cryptococcus neoformans* (GORLACH et al., 2000) também é um ligante de calcineurina. Outras proteínas da família são as humanas ZAKI4 (Thyreoid Hormone- Responsive Gene ZAKI-4) também chamada MCIP2, isolada de células de fibroblastos humanos (MYAZAKI et al., 1996) e a DSCR1L2 (Down Syndrome Region Gene 1- Like 2) (STRIPPOLI et al., 2000b).

Todas as proteínas da família incluindo a DSCR1, de fungos até as humanas, possuem um domínio em comum que são dois resíduos de serinas conservados na seqüência SPPxSPP. Essa região é importante porque sugere similaridade para ligação com calcineurina. Essa família de proteínas ligantes a

calcineurina são chamadas de calcipressinas, sendo a DSCR1 designada como calcipressina 1 (FUENTES et al., 2000).

A proteína DSCR-1 tem um importante papel e é alvo de estudo devido a sua interação com calcineurina. Essa serina treonina fosfatase tem maior expressão intracelular quando os níveis de cálcio estão elevados, e sua atividade fosfatase é ativada para a defosforilação das proteínas citoplasmáticas da família NFAT que translocam para o núcleo e ativam a transcrição de vários genes alvos (BEALS et al., 1997 e TIMMERMAN et al., 1997), participando de vários processos celulares.

Essa expressão é suprimida pelas drogas FK506 e ciclosporina A sendo inibidores exógenos de calcineurina. Sendo assim, a DSCR-1 tem um importante papel na sinalização de calcineurina devido ao fato de ser um inibidor endógeno da enzima impedindo a translocação de NFAT para o núcleo (FUENTES et al., 2000).

Estudos recentes descreveram que a DSCR-1 é substrato para atividade fosfatase de calcineurina. Outros dois discretos domínios dessa proteína são capazes de inibir calcineurina *in vivo* na ausência das repetições SP, e são suficientes para bloquear NF-AT *in vitro* (VEGA et al., 2002). Também é relevante que a fosforilação da DSCR1 pode controlar a estabilidade da proteína e influenciar na ligação de outras proteínas que não calcineurina dentro da célula (VEGA et al., 2002). Esses achados foram determinantes no encorajamento de se procurar outras proteínas diferentes da calcineurina que pudessem também interagir com a proteína DSCR1.

Com relação a DCRA, apesar da possível localização citoplasmática predita, a função ou localização celular da proteína não é capaz de provar o

verdadeiro papel desta na célula. E diante das novas descobertas da proteína DSCR1 que possivelmente desempenha outro papel dentro da célula provavelmente no núcleo, é necessário saber a qual processo biológico essas proteínas podem estar envolvidas. Isto implica na necessidade da realização de análises tanto estruturais como funcionais.

Apesar de análises estruturais serem importantes no sentido de se entender as funções das proteínas, interações específicas entre proteínas são o centro para entendimentos de grandes processos biológicos como funções celulares importantes e semelhantes como replicação do DNA, transcrição gênica, síntese de proteínas e processos mais especializados como sinalização celular, respostas imunes e endereçamento de proteínas. Identificação dessas interações e caracterização de suas significâncias fisiológicas constituem um dos muitos objetivos dos diferentes campos de pesquisas na área biológica. Como o gene DCRA tem função desconhecida, e diante das evidências de que o gene DSCR1 pode estar associado a outros processos celulares, e que ambos podem estar participando de vários fenótipos da SD é importante saber a qual proteína a DCRA interage e qual outra proteína a DSCR1 pode se ligar. Para esta finalidade, existem uma série de técnicas se encontram à disposição, possibilitando o estudo direto (e *“in vivo”*) das funções, bem como das possíveis interações da proteína de interesse uma delas é o método do Duplo-Híbrido que foi utilizado neste projeto

1.6- O método do Duplo-Híbrido

O método de Duplo-Híbrido é uma técnica já estabelecida a mais de dez anos atrás por Stanley Fields e colaboradores (FIELDS, S & SONG, O, 1989;

CHIEN et al., 1991; GUARENTE, 1993; BARTEL et al., 1993). Tem sua importância por verificar interações proteína-proteína, sendo usada atualmente com algumas variações em larga escala para caracterizar redes de interações entre produtos de ORFs encontradas em genomas, como o estudo feito com *Saccharomyces cerevisiae* (UETZ et al., 2000).

Este método permite estudos *in vivo* de interações de proteínas sendo usado com sucesso tanto para interações nucleares, citoplasmáticas, mitocondriais e membranas associadas a proteínas. O Duplo-Híbrido é um sistema genético que utiliza as propriedades da proteína GAL4 da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta proteína é um ativador transcricional necessário para a expressão de genes que codificam enzimas que utilizam a galactose (JOHNSTON, M., 1987). Estes ativadores possuem dois domínios separáveis e funcionais: um domínio na parte N-terminal de ligação ao DNA (DNA “binding domain”-DNA-BD) que em levedura se liga a seqüências promotoras específicas do DNA (UAS_G, “Upstream Activating Sequence of Gal4”); e um domínio C-terminal de ativação da transcrição (“activation domain” DNA-AD) que contém regiões ácidas que ativam a transcrição do gene “downstream” da UAS através do direcionamento do complexo da RNA-polimerase-II (KEEGAN, GILL e PTASHNE, 1986; MA e PTASHNE, 1987).

Ambos os domínios DNA-BD e AD são requeridos para ativar a transcrição, no caso da proteína GAL4 nativa de levedura os dois domínios são partes da mesma proteína. No caso dos domínios estarem separados o domínio C-terminal contém as regiões ativadoras mas não pode ativar a transcrição porque não se liga a UAS_G (BRENT e PTASHNE, 1985). Por outro

lado, o domínio N-terminal (DNA-BD) se liga ao DNA especificamente mas não ativa a transcrição.

Este sistema contém duas proteínas híbridas que são clonadas em domínios de GAL4 (DNA-BD e AD), tendo dois vetores de clonagem diferentes usados para gerar fusões entre esses domínios e proteínas que provavelmente interajam uma com a outra. Uma dessas proteínas, sendo denominada de proteína "X" está fundida ao domínio ligante de DNA (DNA-BD) da GAL4 e outra sendo denominada como uma proteína "Y" é fundida ao domínio ativador transcricional (DNA-AD) de GAL4. Se uma cepa hospedeira é cotransformada com os clones de fusão (DNA-BD-X e Y-AD) e as proteínas X e Y podem formar um complexo proteína-proteína, reconstituindo a proximidade dos domínios de GAL4 e então ocorre a transcrição dos genes repórter regulados por UAS_G e assim, pode-se identificar a colônia através do seu crescimento. A técnica do Duplo- Híbrido pode ser visualizada, esquematicamente na Figura 8.

A obtenção de proteínas que interajam com a DCRA, e novos ligantes a proteína DSCR1, foi realizada utilizando uma biblioteca (no caso, cérebro fetal humano) fundida em fase com o domínio ativador de GAL4. A proteína deste tecido que interagir com a proteína do gene DCRA ou DSCR1 pode ser identificada e propagada e relacionar a importância dessas proteínas para a célula.

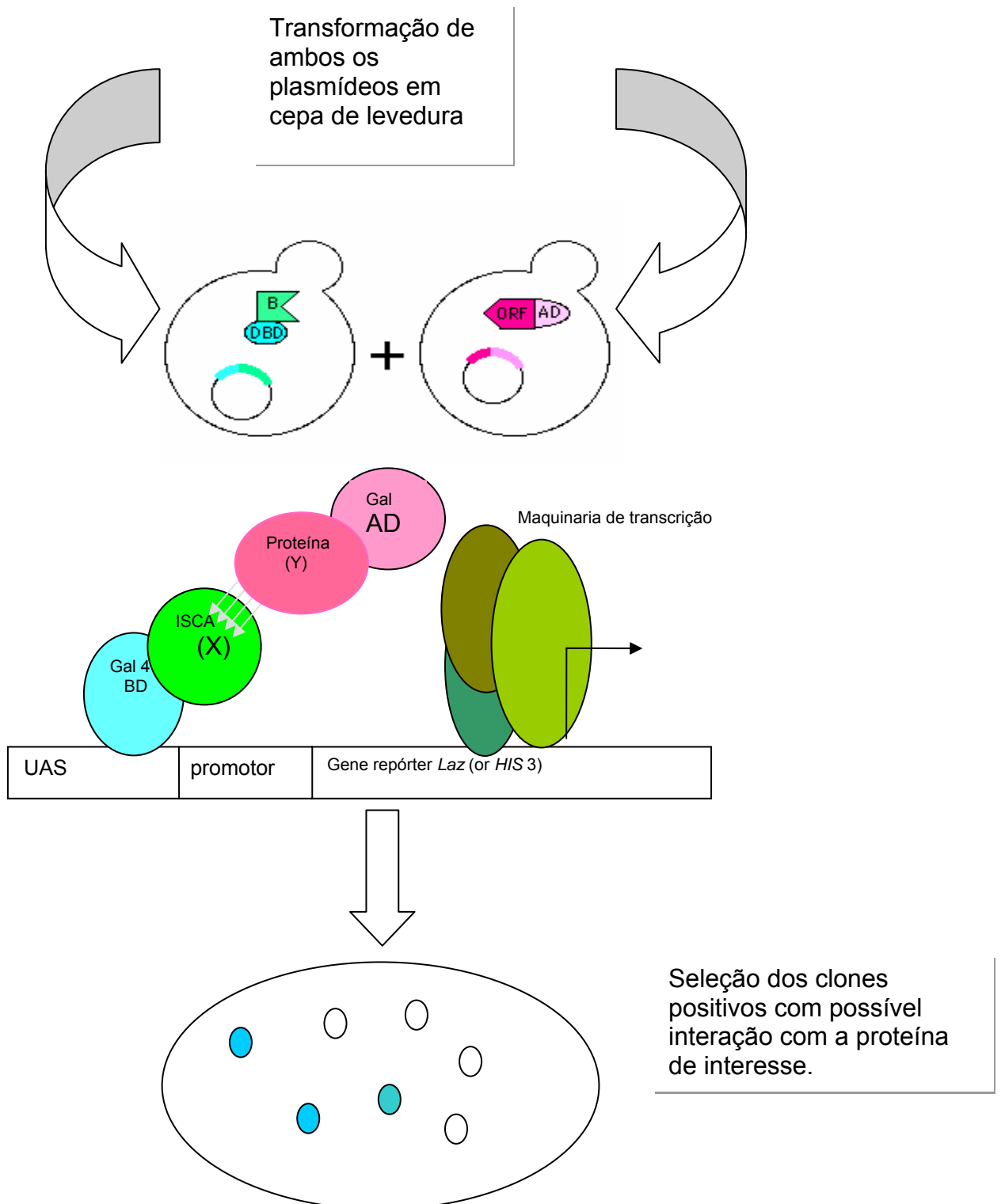


Figura 8: Esquema representativo do sistema Duplo-Híbrido.

2.0- Objetivos:

Considerando a alta incidência da Síndrome de Down na população humana mundial, o estudo de genes relacionados à síndrome torna-se muito importante. Assim, os objetivos deste trabalho foram:

→ Verificar uma possível interação da proteína DCRA com outras proteínas, assim como a busca de uma nova interação para a proteína DSCR1. Para isto é necessário: a sub-clonagem das ORFs DCRA e DSCR1, em fase com a seqüência codificante para o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL4 nos plasmídeos de fusão (CLONTECH, MATCHMAKER) e varredura da biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano construída em fusão com o domínio ativador da transcrição de GAL4.

→ Propagação e caracterização do clone contendo a proteína com interação.

→ Realização de um acasalamento de leveduras (“yeast mating”) para a verificação de interação das proteínas híbridas.

→ Realização de Coimunoprecipitação para confirmação das interações *in vitro*.

3.0- Material e Método:

Para este projeto foi utilizado o Kit MATCHMAKER Two-Hybrid System II e o Kit MATCHMAKER Two- Hybrid System III (CLONTECH). Ambos os Kits são sistemas de Duplo-híbrido baseado na proteína Gal 4, um ativador transcricional no qual possibilita a detecção de interação proteína-proteína *in vivo* em levedura.

Estes sistemas podem ser usados tanto para a análise utilizando uma biblioteca, de interação de novas proteínas com uma proteína já conhecida sendo esta uma proteína isca, ou para testar a interação de duas proteínas previamente conhecidas. Um gene conhecido utilizado como isca é expresso em fusão com o domínio de ligação ao DNA (DNA “binding domain”) de GAL 4 ou (DNA-BD), e o outro cDNA podendo ser uma biblioteca que é expressa em fusão com o domínio de ativação da transcrição (DNA “activation domain”) de GAL4 (DNA-AD). Quando a proteína isca (DNA-BD) e alguma proteína da biblioteca (DNA-AD) interage torna-se próximo o DNA-BD e o AD ativando a transcrição de genes repórteres.

Para a busca dos novos ligantes das proteínas DCRA e DSCR1 foi utilizado uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano (CLONTECH MATCHMAKER Libraries).

3.1- As cepas de levedura utilizadas e suas características

As cepas utilizadas no trabalho são todas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e possuem modificações que possibilitam o funcionamento do teste. As regiões promotoras e cis-regulatórias tem um papel crucial nos sistemas baseados na ativação transcricional como o Duplo- Híbrido.

CG1945

A cepa **CG1945** (genótipo MAT α , ura3- 52, his3- 200, ade2- 101, lys2- 801, trp1- 901, leu2- 3, 112, gal4-542, gal80-538, cyhr2, LYS2 : : GAL1UAS - GAL1TATA -HIS3, URA3 : : GAL4 17-mers(x3) -CYC1TATA -lacZ) utilizada no Kit Two- Hybrid System II, possui o gene reporter *HIS3* com controle da região UAS_e do gene GAL1 intacta obtendo altos níveis de expressão e também o gene repórter *lacZ*, só que este sob controle do fraco promotor MEL1 (UAS) não contando com uma alta expressão para testes com substratos cromogênicos, é usada para transformação da proteína isca com a biblioteca de cDNA a fim de se procurar proteínas que interajam. (FEILOTTER et al., 1994).

Y187

A cepa **Y187** (genótipo MAT α , ura3- 52, his3- 200, ade2- 101, trp1- 901, leu2- 3, 112, gal4 Δ , met⁻, gal80 Δ , URA3 : : GAL1_{UAS} -GAL1_{TATA} -lacZ) componente tanto do Kit Two- Hybrid System II e Two- Hybrid System III é utilizada para testes entre proteínas conhecidas usando somente o gene repórter *lacZ* sob o controle do GAL1 (UAS) o qual é ativado pela GAL 4 nativa e exibe altos níveis de expressão da *β -galactosidase*, esta cepa é MAT α podendo também ser utilizada em acasalamentos (“mating”) para verificação das interações (HARPER et al., 1993).

AH109

A cepa **AH109** (genótipo MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2 : : GAL1_{UAS} -GAL1_{TATA} -HIS3, GAL2_{UAS} -GAL2_{TATA} -

$ADE2, URA3 :: MEL1_{UAS} -MEL1_{TATA} -lacZ$) virtualmente elimina falso positivos contendo três genes repórteres *ADE2*, *HIS3* e *MEL1* (ou *lacZ*) sob o controle da distinta Gal 4, de sequências “upstream activation sequences” (UASs) e TATA boxes. Esses promotores são fortemente específicos nas respostas para Gal 4, como resultado, as duas maiores classes de falso positivos são eliminadas: os que interagem diretamente com as sequências flangeadoras do sítio ligante da Gal 4 e os que interagem com fatores de transcrição ligantes em específicos TATA boxes.

O gene repórter *ADE2* sozinho beneficia uma alta seleção nutricional. A seleção usando *HIS3* reduz a incidência de falso positivos e permite o controle de exstringência de seleção (JAMES et al., 1996), além disso, tem-se a opção do uso de outros dois genes reporters *MEL1* ou *lacZ*, os quais codificam α -galactosidase e β -galactosidase, respectivamente.

3.2- Plasmídeos utilizados

Os plasmídeos utilizados nos dois Kits possuem os específicos domínios da GAL4 o domínio de ligação ao DNA (“DNA binding domain”) e o domínio ativador da GAL 4 (“activation domain”) cada domínio separados em diferentes plasmídeos. É contido um promotor constitutivo *ADH1* (P_{adh1}) para a expressão da proteína híbrida em levedura, um sítio de múltipla clonagem e um terminador da transcrição.

Também possuem um gene para seleção em levedura *LEU2* ou *TRP1*, para a seleção em bactéria são marcados com o gene resistência ao antibiótico ampicilina (amp^r) nos plasmídeos do Kit MATHMAKER System II, nos plasmídeos do Kit MATHMAKER System III alguns dos plasmídeos são selecionados com

antibiótico Kanamicina porque possuem o gene (*Kan^r*), sendo uma das vantagens do Kit Two- Hybrid System III sobre o Kit Two-Hybrid System II.

Abaixo plasmídeos utilizados no projeto:

3.2.1- Plasmídeos utilizados para a clonagem das proteínas de interesse (isca)

O plasmídeo pGBT9 é um vetor de clonagem usado no kit Two-Hybrid System II para gerar fusões com o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL4 com a proteína isca de interesse (Figura 9). O pGBT9 contém o gene *TRP1* para seleção auxotrófica em cepas de levedura (BARTEL et al., 1993b).

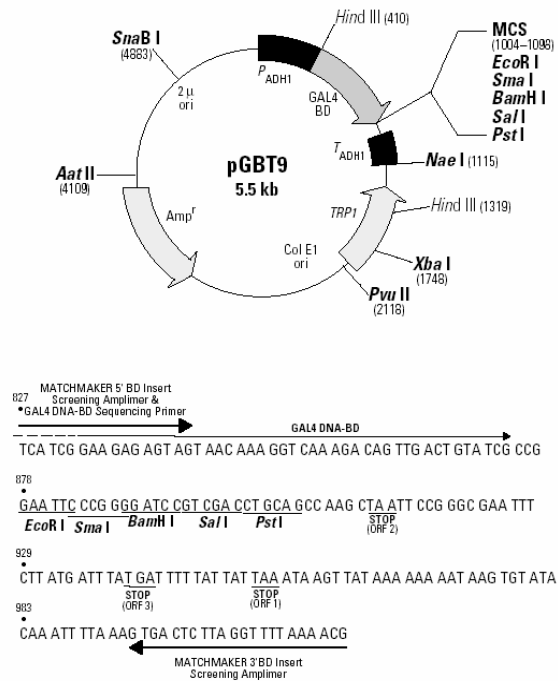


Figura 9: Mapa e sítio de clonagem do plasmídeo pGBT9.

O plasmídeo pGBKT7 componente do Kit Two-Hybrid System III utilizado (Figura 10) contém um sítio de múltipla clonagem com únicos sítios de restrição em fase com o final 3' do domínio de ligação ao DNA da proteína Gal4

para a construção de proteínas de fusão da proteína isca. O pGBKT7 também contém um T7 promoter este é usado para a expressão da proteína isca *in vitro*, um epitopo c-Myc que é expresso juntamente com a proteína de fusão (isca) na qual as proteínas podem ser identificadas sendo comum para este epitopo, possui resistência para Kanamicina para *E.coli* e o gene *TRP1* é o marcador nutricional para seleção em levedura.

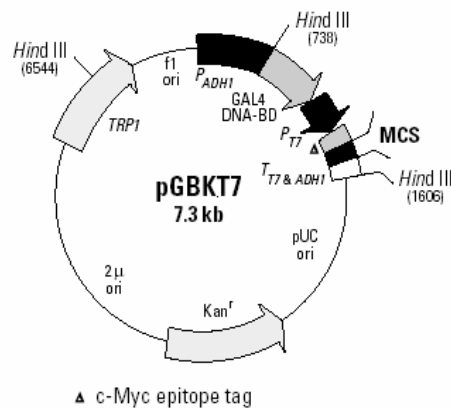


Figura 10: Mapa e sítio de múltipla clonagem do plasmídeo pGBKT7.

3.2.2- Plasmídeos utilizados para a clonagem da biblioteca de cDNA ou possíveis proteínas ligantes com a isca

O plasmídeo pACT2 foi utilizado na construção da biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano utilizada no projeto e adquirida na CLONTECH. Este plasmídeo possui uma região codante para o domínio ativador da transcrição da proteína GAL 4 (DNA- AD) e um epitopo HA (hemaglutinina) (DURFEE et al., 1993). Este vetor é utilizado para a clonagem da possível ligante a proteína de interesse ou para uma biblioteca de cDNA (Figura 11).

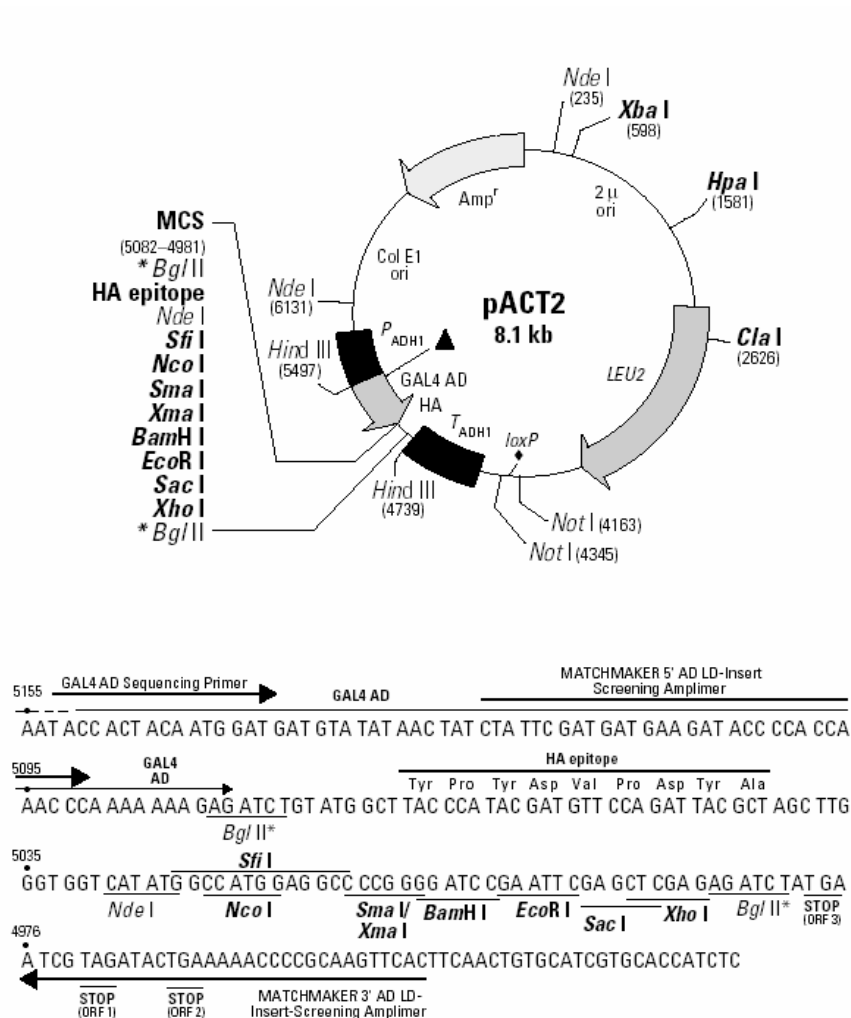


Figura 11: Mapa do plasmídeo e sítio de clonagem do plasmídeo pACT2.

O plasmídeo pGADT7 (Figura 12) componente do Kit MATCHMAKER Two-Hybrid System III é o vetor que contém uma região codante para o

domínio ativador da transcrição da proteína GAL 4 (DNA-AD), utilizado para construção da biblioteca de cDNA ou para clonagem da proteína com possível interação com a proteína de interesse. O pGADT7 contém um epítipo de hemaglutinina com isso a proteína de fusão pode ser identificada sendo comum para esse epítipo. O promotor T7 é usado em testes *in vitro* para confirmação das possíveis interações. Para sua seleção em bactéria o plasmídeo possui resistência a ampicilina e em levedura contém o gene *LEU2* para seleção nutricional, tem alta cópia tanto em levedura como em bactéria.

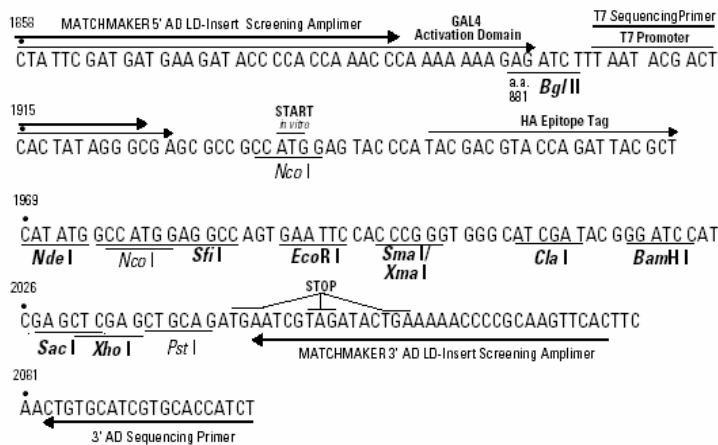
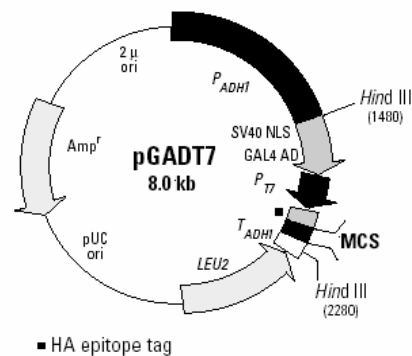


Figura 12: Mapa e sítio de clonagem do plasmídeo pGADT7.

Ambos plasmídeos pGADT7 e pGBKT7 são selecionados com antibióticos distintos em bactéria, sendo fácil propagação dos clones

encontrados com possível interação essa é uma das características marcantes do Kit MATCHMAKER Two-Hybrid System III.

3.2.3- Plasmídeos controles componentes do sistema

Plasmídeos utilizados como controles positivos

O plasmídeo pCL1 possui uma região codante para a proteína GAL 4 selvagem (Figura 13) e o gene LEU2 para a seleção em levedura (FIELDS e SONG, 1989). Faz parte do kit Two – Hybrid System II e Two- Hybrid System III.

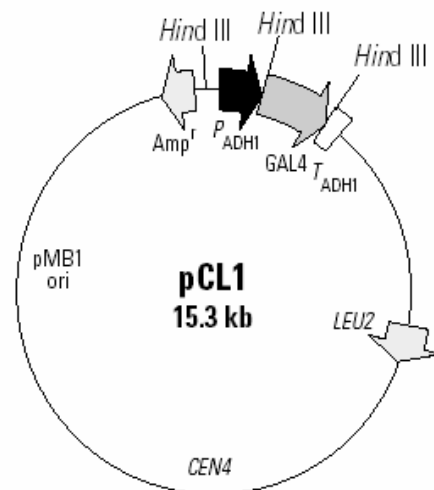


Figura 13: Mapa do plasmídeo pCL1.

Os plasmídeos pVA3 e pTD1 que fazem parte do kit Two- Hybrid System II. O pVA3 (LI e FIELDS, 1993;CHIEN et al.,1991), possui uma região codante do domínio de ligação ao DNA de GAL 4 em fusão com a proteína p53 de camundongo (Figura 14). E o plasmídeo pTD1 (IWABUCHI et al., 1993), possui uma região codante em fusão com o domínio de ativação de transcrição e o antígeno T (SV40) de camundongo (Figura 14). Ambos plasmídeos pVA3 e

pTD1 possuem o gene *TRP1* e *LEU2* respectivamente para seleção em levedura.

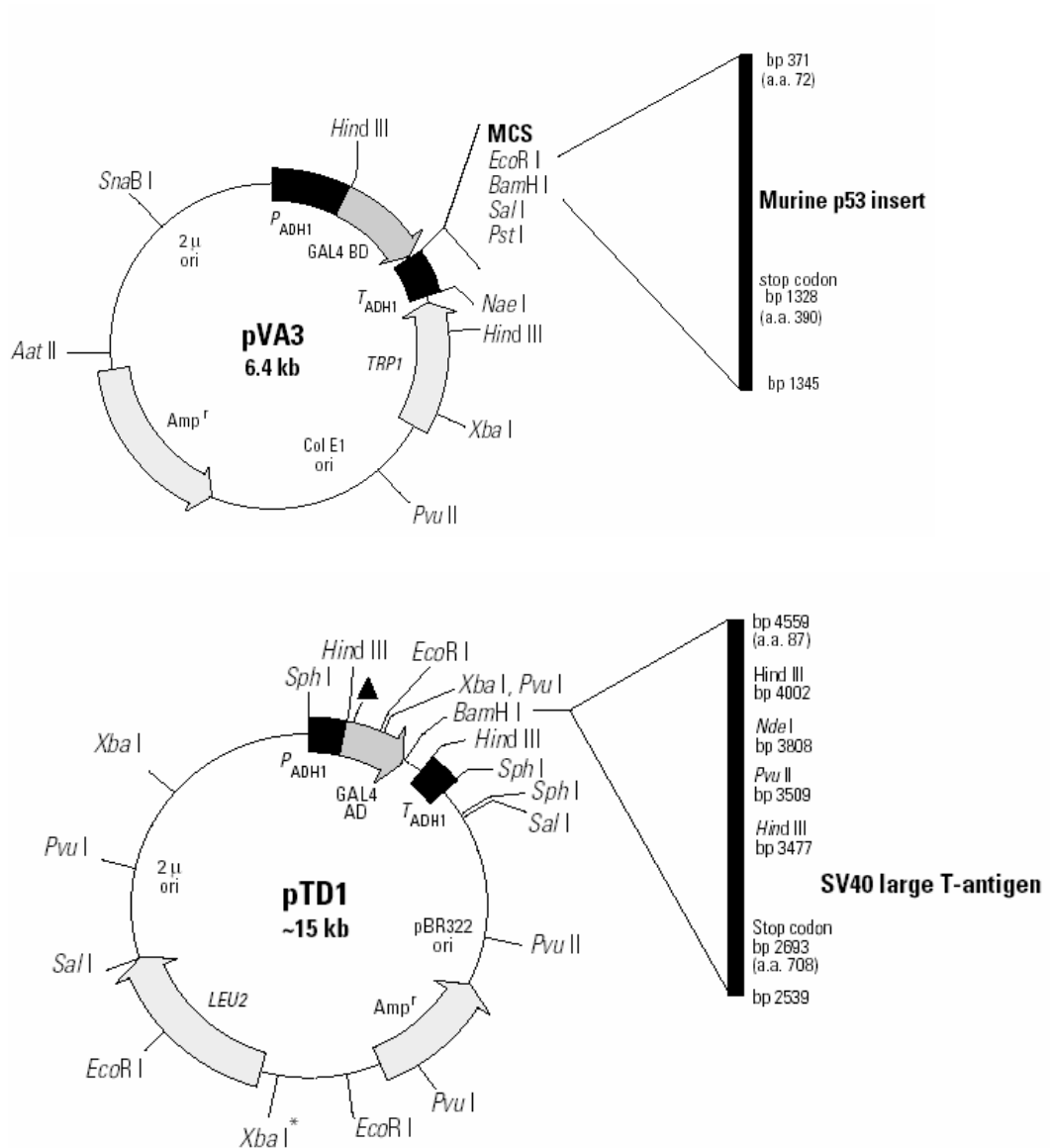


Figura 14 : Mapas dos plasmídeos pVA3 e pTD1.

Também utilizados como controles positivos, mas do kit MATCHMAKER Two- Hybrid System III são os plasmídeos pGBKT7-53 (Figura 15) e pGADT7-T (Figura 15) originários dos plasmídeos pGBKT7 e pGADT7 já descritos anteriormente. Possuem as mesmas proteínas clonadas em fase com os

domínios da GAL 4 que os plasmídeos pVA3 e pTD1 respectivamente. Ambos os plasmídeos tem a mesma finalidade porque a proteína p53 e o antígeno T SV40 interagem no sistema de Duplo- Híbrido (LI e FIELDS, 1993; IWABUCHI et al., 1993)

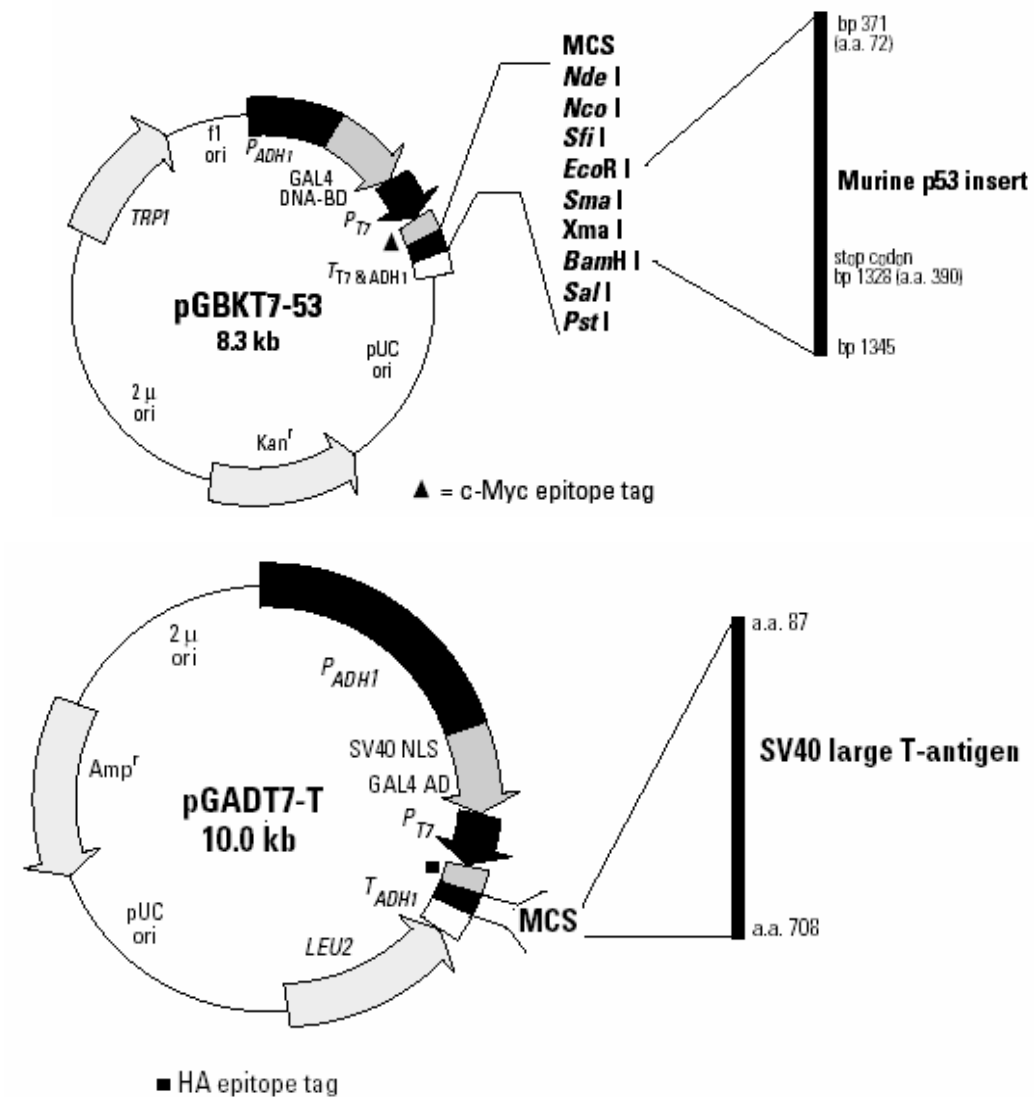


Figura 15: Mapas dos plasmídeos pGBKT7-53 e pGADT7-T.

3.2.4- Plasmídeos utilizados como controles negativos

Como controle negativo esta técnica utiliza o plasmídeo pGBKT7-Lam (Figura 16) que codifica uma proteína de fusão do domínio de ligação ao DNA da proteína GAL 4 (DNA-BD) com a laminina C humana servindo como controle, verificando se a proteína encontrada na biblioteca de cDNA possui interação específica ou não com proteína isca (BARTEL et al., 1993b e YE & WORMAN., 1995). Este plasmídeo é componente do kit Two – Hybrid System III.

No kit Two- Hybrid System II também tem como componente um plasmídeo que contém uma fusão do domínio de ligação ao DNA (DNA- BD) com a proteína laminina C sendo chamado de pLam5' (Bartel et al.,1993b) (Figura 17) tendo a mesma função que o pGBKT7-Lam.

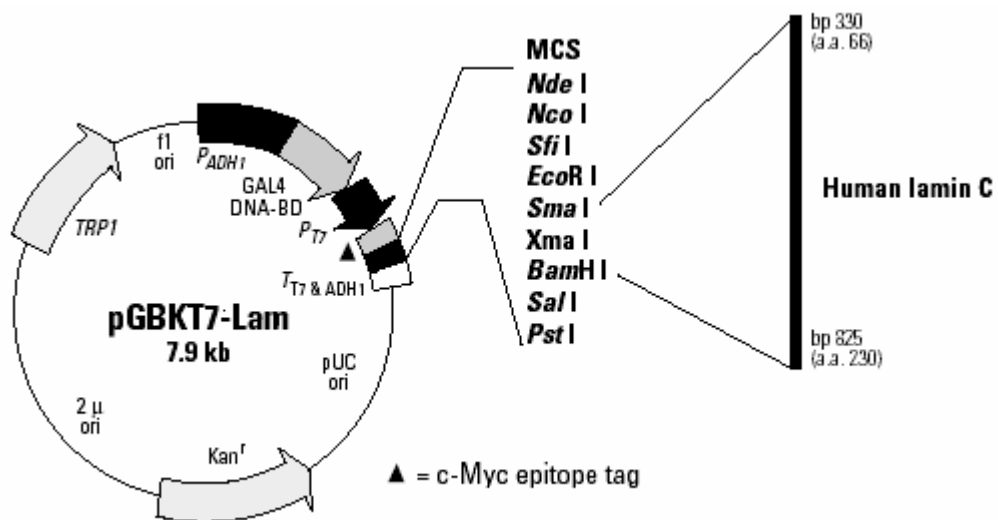


Figura 16: Mapa do plasmídeo pGBKT7-Lam.

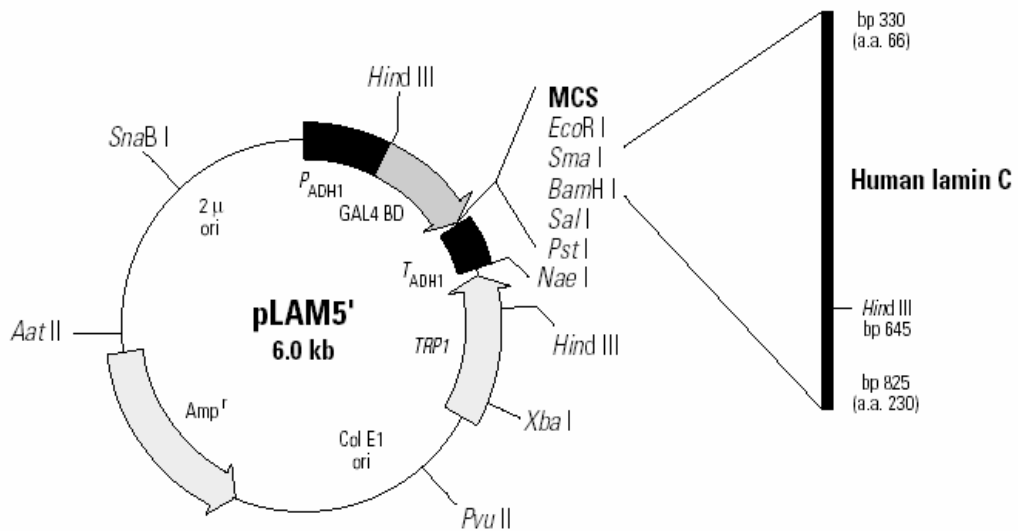


Figura 17: Mapa do plasmídeo pLAM5'.

3.3- Meios de cultura

Os meios utilizados foram adquiridos do fabricante do Kit (CLONTECH) os meios YPD (meio completo) como meios mínimos completos (meio mínimo completo menos o aminoácido correspondente). Tendo como mistura básica os seguintes componentes abaixo:

O YPD

Para 1L

10g de Extrato de Levedura (Bacto Yeast extract, Sigma # Y-0375)

20g de Peptona (Bacto Peptone, Sigma # P-7750)

20g de Glicose (Sigma # G-5400)

H₂O mili-q para 1L

pH 5.8

Autoclavado por 15 minutos a 100° C.

Os meios mínimos completos (seletivos)

Para 1L

6.7g de Base Nitrogenada de Levedura (YNB w/ (NH₄)₂SO₄, Difco #0919-15-3)

20g de Glicose (Sigma # G-5400)

100ml da solução DO (suplemento) 10X contendo os aminoácidos necessários

H₂O mili-q para 1L

pH 5.8

Autoclavado por 15 minutos a 100° C.

O suplemento de aminoácidos é usado conforme a seleção desejada.

Será composto com todos aminoácidos necessários omitindo-se os aminoácidos desejados.

Quando o meio é sólido adiciona-se 20g/l de ágar tanto para o meio completo YPD como para os meios mínimos completos.

Para a seleção dos plasmídeos em bactéria foi utilizada o meio LB broth:

10g/l de Bacto- tryptone

5g/l Bacto-yeast extract

5g/l NaCl

pH 7.0 (sendo ajustado com NaOH 5N)

3.4- Soluções

Transformações em Levedura

Acetato de Lítio 1M

Para 100ml

10.2g de LiAc (Sigma # L-6883)

H₂O mili-q volume para 100 ml

Autoclavado por 15 minutos a 100° C.

Extração de DNA plasmidial de levedura

Solução de Lise

Para 10 ml

1ml de SDS 10% (Sigma # L-4390)

0.2ml de NaCl 5M

0.1ml de Tris HCl 1M pH 8 (Sigma # T-3038)

20ml de EDTA 0.5M (Sigma # E-7889)

0.2ml de Triton X-100 (Sigma # T-8787)

8.48ml de H₂O milli-q

PEG (3350 50%)

Fenol-Clorofôrmio- Álcool Isoamilico (Sigma # P-2069)

Pérolas de Vidro:

Ac-wach glassbeads 425-600mm (Sigma # G-8772)

“Screening”

Teste α - galactosidase em placas de Petri contendo meios mínimos completos

Solução estoque de X- α - GAL

Para 1ml

20mg de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranoside (X- α - GAL)
(CLONTECH)

1ml de N,N-dimethylformamide (MERCK)

Coimunoprecipitação:

Solução de fixação:

7% de metanol

7% de ácido acético

1% glicerol

Tampão de ligação:

50mM TRIS-BASE

150mM NaCl

1mM EDTA

1% Nonidet P-40

10% Glicerol

pH: 7,4

PBS:

1mM KH_2PO_4

10mM Na_2HPO_4

137mM NaCl

2,7mM KCl, pH: 7,4

3.5- Verificação fenotípica das cepas AH109, CG1945 e Y187

As cepas foram retiradas do estoque e uma alíquota de 50ul foi plaqueada em meio completo YPD e estocadas à 30°C por 3 a 4 dias, somente colônias isoladas foram escolhidas e estriadas em meio mínimo completo menos -TRP, meio mínimo completo -LEU e meio mínimo completo menos - HIS e colocadas à 30°C por 4 a 6 dias e, sendo assim não aconteceu o crescimento das cepas nos meios mínimos completos, havendo somente um crescimento basal que era esperado. Não poderia haver um crescimento superior ao basal porque as cepas necessitam dos aminoácidos que faltavam ao meio para crescimento então pode-se verificar o fenótipo correto das cepas dos Kits e estas foram estocadas a 4°C.

3.6- Biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano

Neste projeto foi utilizada uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano adquirida juntamente a CLONTECH a qual teve como fonte de RNA mensageiro um pool de nove fetos caucasianos que foram abortados espontaneamente com idade entre 20 à 25 semanas, sendo pré-transformada e construída com o vetor de clonagem pACT2 utilizando os sítios de restrição para as enzimas *Xho* I e *EcoR* I. Esta biblioteca de cDNA possui um título maior ou igual 10^8 cfu (unidades formadoras de colônia), sendo este confirmado em nosso laboratório segundo as especificações do fabricante, possui um número de 3.5×10^6 de clones independentes contendo cDNAs com tamanhos de 0.5Kb a 4.0Kb.

3.6.1- Amplificação da biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano

Para amplificação da biblioteca pré-transformada foi utilizado o protocolo segundo o fabricante (CLONTECH) onde o número de placas utilizadas depende do número de clones independentes. Nesta amplificação foram utilizadas 500 placas de petri de 150 mm, contendo meio LB broth ágar afim de se obter um número de 2 a 3 vezes o número de clones independentes na biblioteca, sendo plaqueadas em cada placa de petri aproximadamente 20.000 à 40.000 cfu.

Essas placas foram colocadas na estufa à temperatura de 30° C por 36-48 hs até atingir confluência, então foram raspadas colocando 5ml de meio LB em cada placa e ressuspendidas em um frasco de 2L. Uma terça parte foi aliquoteada para a utilização imediata sendo extraído seu DNA plasmidial utilizando o Kit Maxiprep (GIBCO-Life Technologies). O restante foi aliquoteado em frascos de 50ml e estocados em freezer -70°C para usos posteriores.

3.7- Obtenção dos insertos DCRA e DSCR1, e sub-clonagem em plasmídeos (DNA-BD)

Clonagem do inserto DCRA no plasmídeo pGBT9

A clonagem do inserto no plasmídeo foi realizado seguindo protocolo por (SAMBROOK et al., 1989). Isolado a partir do plasmídeo pBluescript DCRA, estes foram construídos em nosso laboratório através da amplificação do cDNA da biblioteca Super-Script™ Fetal Brain (Life Technologies Gibco-BRL). O inserto do gene DCRA foi inserido no plasmídeo pBluescript pela clivagem do plasmídeo que contém o sítio de *EcoR* V. O inserto contém sítios de restrição *EcoR* I e *BamH* I já inseridos em suas extremidades, os sítios de restrição

destas enzimas foram inseridos através dos primers. Estas mesmas enzimas foram utilizadas para a obtenção do inserto que foi isolado em gel de agarose (1%) e purificado utilizando o Kit Nucleospin Extract, possibilitando a reação de ligação (overnight à 16°C) do inserto ao pGBT9 (clivado com *EcoR* I e *Bam* HI) em fase com a seqüência do domínio de ligação ao DNA da proteína GAL 4 (DNA-BD) utilizando na reação a enzima T4 ligase e seu tampão contendo ATP (Figura 18). Os plasmídios obtidos foram então utilizados para transformação de bactérias DH5 α utilizando o método de eletroporação (Currents protocols, 1994) com eletroporador Bio Raid pulser (Bio Raid). No intuito de selecionar os plasmídios recombinantes após a transformação foram realizados PCRs de colônia utilizando primers do inserto (DCRA), foi verificado a obtenção de clones recombinantes. Desta maneira obtivemos os plasmídios (nomeados como pGBT9-DCRA) para expressão da proteína híbrida nas cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

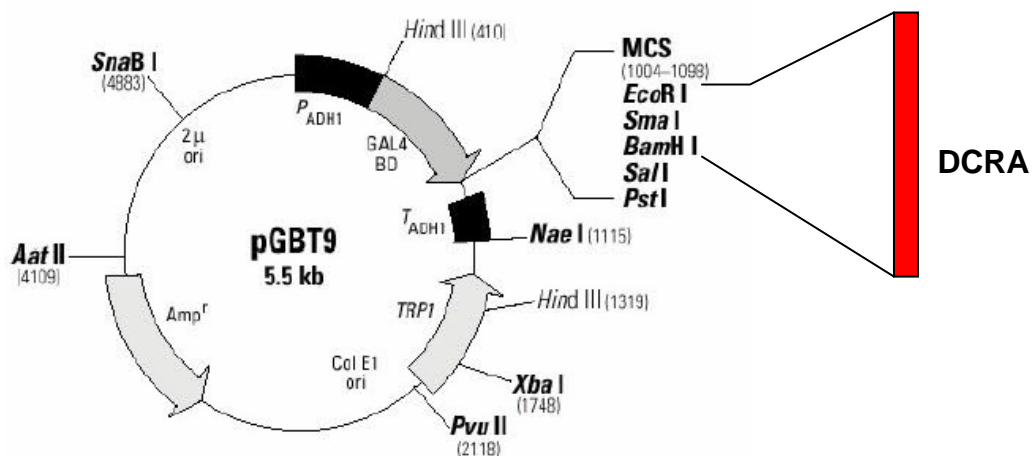


Figura 18: Esquema ilustrativo da clonagem do inserto DCRA utilizando as enzimas *EcoR* I e *Bam* HI no plasmídeo pGBT9 em fase com o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL 4 (GAL 4-BD).

Clonagem do inserto DSCR1 no plasmídeo pGBKT7

Para a clonagem da fase aberta de leitura correspondente a isoforma 4 da DSCR1 no plasmídeo pGBKT7 foi seguido protocolo conforme (SAMBROOK et al., 1989). Também o DSCR1 encontrava-se clonado no plasmídeo pBluescript isolado da biblioteca Super-Script™ Fetal Brain (Life Technologies Gibco-BRL). O inserto foi amplificado e inserido em suas extremidades sítios para a enzima de restrição *Nde* I na extremidade 5' e *Bam*H I na extremidade 3' através dos primers. Estas mesmas enzimas foram utilizadas para a obtenção do inserto que foi isolado em gel de agarose (1%) e purificado utilizando o Kit Nucleospin Extract, possibilitando a reação de ligação (overnight à 16°C) do inserto ao pGBKT7 (clivado com *Nde* I e *Bam* HI) em fase com a seqüência do domínio de ligação da proteína GAL 4 (DNA-BD) e o epitopo c-Myc (Figura 19).

Os plasmídeos obtidos foram transformados em bactéria DH5 α e selecionados por PCR de colônia. Encontrados os recombinantes, estes plasmídeos foram nomeados como pGBKT7-DSCR1, para expressão da proteína híbrida em cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Ambos os plasmídeos construídos foram sequenciados para verificar a inserção do DCRA e DSCR1 em fase com o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL4 (DNA-BD) e para avaliar se não haveria inserções como deleções na seqüência de interesse.

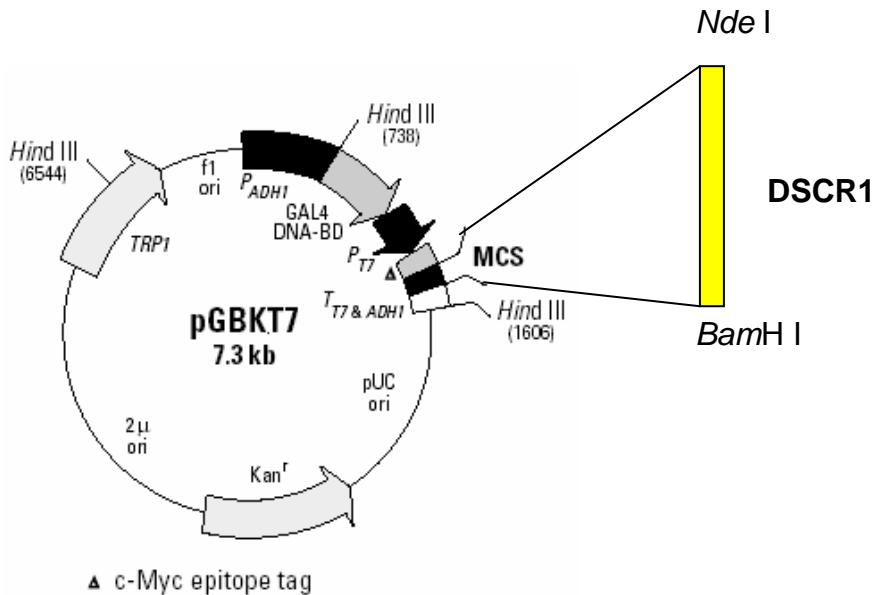


Figura 19: Representação esquemática da clonagem do inserto DSCR1 no plasmídeo pGBKT7 de acordo com as enzimas *Nde I* e *BamH I*

3.8- Transformações dos plasmídeos pGBT9-DCRA e pGBKT7-DSCR1 em cepas de levedura.

Com os clones recombinantes o próximo passo foi a propagação destes em bactéria DH5 α , depois a transformação do plasmídeo pGBT9-DCRA na cepa de levedura CG1945 para a realização da varredura (“screening”) da biblioteca de cDNA de cérebro fetal com utilização do Kit MATHCMAKER System II. Já o plasmídeo pGBKT7-DSCR1 foi transformado na cepa de levedura AH109 componente do Kit MATHCMAKER System III, também para o “screening” da biblioteca de cDNA de cérebro fetal.

A transformação foi feita utilizando o método químico por acetato de lítio, este protocolo segue o método de Ronald Agatep (AGATEP *et al.*, 1998) disponível “online” no endereço <http://tto.trends.com> ou em <http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/unts/biochem/gietz/method.html>.

Seguindo o protocolo um inóculo é preparado com cepa AH109 ou CG1945 cepas em uso, em meio completo YPD e colocado overnight à 30°C em rotação de 200 rpm, depois a centrifugação das células a 13.000 rpm onde

há formação do pellet de aproximadamente 25ul. Este é lavado com água estéril deixando assim as células em estado de competência para serem transformadas, são ressuspensas com 500ul de acetato de lítio 100mM e centrifugada novamente. Este novo pellet formado recebe nesta ordem PEG (polietileno glicol) 50% 3350 (SIGMA), acetato de lítio 1.0 M , o DNA carreador de salmão (SIGMA), a quantidade de DNA plasmidial necessária neste caso foi utilizado 300ng do plasmídeo pGBT9-DCRA e também 300ng do plasmídeo pGBKT7-DSCR1 e um volume aproximado de água estéril. Após a solução foram submetidas ao vortex por 1 minuto, e incubadas à 42°C por 20 minutos sendo centrifugadas novamente foram ressuspensas em água e plaqueadas em meio mínimo completo –TRP (pois pGBKT7 e pGBT9 possuem o gene *TRP1*), havendo o crescimento das colônias transformantes entre 2 a 3 dias, utilizados na análise com a biblioteca de cDNA cérebro fetal humano.

3.9-Teste de ativação da transcrição das Proteínas híbridas DCRA e DSCR1 nas cepas CG1945 e AH109.

Utilizando o método químico de transformação por acetato de lítio como descrito acima o plasmídeo pGBT9-DCRA foi transformado na cepa CG1945 e o plasmídeo pGBKT7-DSCR1 transformado na cepa AH109 e selecionados em meio mínimos completos –TRP, foram testados se nos sistemas de Duplo-Híbrido ativam a transcrição dos genes repórteres das cepas. Este teste é preliminar à análise da biblioteca e de fundamental importância já que a realização do “screening” depende da não ativação da transcrição da proteína isca em fusão com domínio de ligação ao DNA.

Ambas as cepas contendo os plasmídeos recombinantes foram estriadas em meio seletivo mínimo completo menos –TRP-HIS (para ambas as cepas) e em meio mínimo completo –TRP-HIS-ADE somente para o plasmídeo pGBKT7-DSCR1 que foi transformado na cepa AH109, e colocadas a 30°C no período de 3 a 4 dias, não havendo crescimento em nenhum dos meios estriados. Também ambos os plasmídeos foram transformados nas cepas com o plasmídeo pACT2 contendo somente o domínio de ativação da proteína GAL 4 e estriadas nos mesmos meios seletivos não havendo crescimento.

Tirou-se a conclusão de que as proteínas DCRA e DSCR1 fundida com o domínio de ligação ao DNA da GAL4 não ativam a transcrição dos respectivos genes repórteres das cepas CG1945 e AH109. Este teste foi realizado confirmando as predições das proteínas, podendo ser utilizado para transformação com a biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano. Um controle positivo foi feito no teste à transformação do plasmídeo pCL1 nas respectivas cepas, este plasmídeo codifica a proteína GAL 4 nativa que ativa a transcrição dos genes repórteres como descrito anteriormente.

3.10- Varredura (“screening”) da Biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano com o plasmídeo pGBT9-DCRA (Kit MATHCMaker Two-Hybrid System II)

Para a busca das proteínas que interagem com a DCRA foi utilizado uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal (CLONTECH).

O plasmídeo pGBT9-DCRA foi introduzido na cepa CG1945 como descrito anteriormente. A cepa CG1945 apresenta uma expressão basal do gene *HIS3* o que pode resultar em um maior número de falso positivo.

O protocolo utilizado para transformação é uma modificação do método de Ronald Agatep (AGATEP et al., 1998) disponível “online” no endereço <http://tto.trends.com> ou em <http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/units/biochem/gietz/method.html>.

Protocolo de transformação:

Para a realização do “screening”, a cepa CG1945 foi transformada com o plasmídeo pGBT9-DCRA, sendo então utilizada para a preparação de um inóculo, crescido “overnight” a 30°C em meio seletivo mínimo completo–TRP. O inóculo foi então titulado pela contagem de células em um hematocitômetro. A quantidade de inóculo necessária para obtenção de 5×10^8 células foi centrifugada a 3000xg por 5 minutos, e as células coletadas foram ressuspensas em 100ml de meio completo YPD, resultando numa concentração de 5×10^6 cels/ml.

As células foram incubadas em agitador a 200 RPM, 30° C, por 4 horas, o suficiente para duas divisões, atingindo uma concentração de 2×10^7 cels/ml. As células foram novamente coletadas por centrifugação, para retirada de sais, sendo ressuspensas em 50ml H₂O mili-q estéril, coletadas novamente por centrifugação e finalmente ressuspensas com 1.8ml de H₂O mili-q estéril.

A suspensão foi dividida em partes iguais em 2 tubos de 1,5ml, sendo centrifugados a 13.000 RPM por 1 minuto. O “pellet” foi então ressuspendido com LiAc (Acetato de Lítio) 0,1M até um volume de 1ml, e incubado por 10 minutos a 30°C. Enquanto isso, 2 alíquotas de DNA carreador (1ml) foram denaturados por 5 minutos a 100°C e a mistura de transformação foi preparada consistindo de: 4,8ml de PEG 3350 50%, 720ml de LiAc 1M, 1ml de DNA carreador, 20mg de plasmídios da biblioteca (66ul) e 614ml de H₂O mili-q

estéril, totalizando 7,2ml. A mistura foi homogenizada por agitação de 3 a 4 minutos em vortex.

Passados os 10 minutos, referentes à incubação das células, a suspensão de células foi dividida em 10 tubos de 1,5ml (200ml por tubo, 2×10^8 células), que foram centrifugados por 1 minuto a 13.000 RPM, tendo o sobrenadante descartado.

Da mistura de transformação, 720ul foram adicionados a cada tubo, ressuspensando o “pellet” de células totalmente por vortexação (1 a 2 minutos aproximadamente). Os tubos foram incubados a 30°C por 30 minutos sendo então transferidos para um banho a 42°C por 30 minutos, para o choque térmico. Os tubos foram em seguida centrifugados por 1 minuto a 13.000 RPM, tendo o sobrenadante descartado, e o “pellet” ressuspensado com H₂O mili-q esteril até um volume de 1ml para plaqueamento.

De cada tubo, 500ul de transformação foram plaqueados em placas de 150 mm, cada uma com 50ml de meio seletivo –TRP–LEU–HIS, totalizando 20 placas que foram então incubadas a 30°C. Antes do plaqueamento, 5ul foram retirados de 2 tubos de transformação para realização dos controles. Estas duas alíquotas foram juntamente diluídas até 1ml e alíquotas de 100ul da diluição (correspondendo a 1ml da reação de transformação) foram plaqueadas em 2 placas –TRP–LEU, 2 placas –LEU e 1 placa –TRP, que foram então incubadas a 30°C. Após 3 dias de incubação, as placas de controle tiveram as colônias contadas para o cálculo do número de transformantes analisados.

Cerca de 6 varreduras (“screenings”) foram realizadas com a DCRA na busca de interações com esta proteína. Aproximadamente $2,0 \times 10^7$ clones independentes foram testados da biblioteca o que, mais de três vezes o

número de clones, mais do que o necessário segundo as especificações do fabricante.

3.10.1- Análise dos clones positivos (busca de proteínas que interagem com a DCRA)

As colônias que apresentavam crescimento até 8 dias após o plaqueamento foram coletadas e colocadas para o crescimento em meio mínimo completo menos -LEU- TRP- HIS cultura líquida e crescidas a 30°C até a saturação e extraídos seu DNA plasmidial.

3.10.2- Extração de DNA plasmidial de levedura

A extração do DNA plasmidial de leveduras é um protocolo mais complicado que as preparações de bactéria devido à robusta parede celular e ao baixo número de cópias dos plasmídios (aproximadamente 50 cópias por célula). Neste projeto foi realizado um rápido protocolo estabelecido por (HOFFMAN e WINSTON, 1987).

As células em cultura líquida foram coletadas por uma breve centrifugação de 15 segundos, tendo o sobrenatante descartado. As células eram então ressuspensas em 200ul da solução de lise por vortexação, adicionando-se em seguida 400ul de PCI e 0,2g de pérolas de vidro. Após vortexar a mistura por 2 minutos, esta era centrifugada por 5 minutos a 13.000 RPM, tendo a fase aquosa (superior) coletada. Em seguida, 1/10 do volume de Acetato de Sódio e 2,5 o volume de etanol absoluto eram adicionados para precipitação do DNA. O precipitado era obtido após 10 minutos de incubação em freezer, e centrifugação por 10 minutos a 13.000 RPM. O “pellet” de DNA

era lavado com etanol 70%, por centrifugação por 5 minutos a 13.000 RPM, sendo então seco e ressuspendido em 10ul de H₂O mili-q estéril.

Da preparação plasmidial foram utilizados 5ul para a transformação por eletroporação de *E coli DH5 α* , plaqueadas em meio LB-amp para seleção. A eletroporação é necessária frente à pequena quantidade de DNA plasmidial obtida a partir de leveduras. O DNA plasmidial obtido compreende os plasmídios isca e o (os) plasmídio (s) da biblioteca.

O fato dos plasmídios de fusão da biblioteca (pACT2) e do plasmídio contendo a isca (pGBT9) componentes do Kit MATHCMAKER System II portarem os mesmos genes de resistência (*Amp^r*) resulta em colônias transformantes em bactéria portando ambos os plasmídios. Como somente interessavam os plasmídios da biblioteca, os transformantes obtidos foram submetidos a PCRs de colônia, para determinação das colônias portando tais plasmídeos.

Utilizando primers do inserto (DCRA) os PCRs de colônia eram realizados e visualizados em gel de agarose 1%. Todos as reações nas quais não eram detectadas amplificações foram submetidas ao sequenciamento.

3.10.3- Sequenciamento dos possíveis clones positivos

No sequenciamento dos clones foram obtidas todas as correspondentes fases abertas de leitura dos cDNAs contidos nos plasmídeos da biblioteca que poderiam ser possíveis ligantes a proteína DCRA.

Todos os clones foram sequenciados em um aparelho automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems) sendo utilizado o Kit "ET-Dye" (Pharmacia)

para a preparação das sequências e também um primer de anelamento ao domínio ativador da proteína GAL 4. Então os clones foram submetidos à verificação da fase correta com o domínio ativador da transcrição da proteína GAL 4 (DNA-AD) no plasmídeo pACT2, através da seqüência adaptadora da Biblioteca de cDNA de cérebro fetal que tem a seguinte seqüência 5'AATTCGGGCCGCGTCGAC 3' e que se localiza entre o DNA-AD e a seqüência de cDNA.

3.10.4- Verificação de similaridade

Obtendo-se a seqüência dos clones e a verificação da fase, estes foram submetidos a estudos de similaridade com outras proteínas já conhecidas disponíveis no banco de dados GENBANK no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov. Para este estudo foram utilizados os programas BLASTX e BLASTP (ALTSCHUL et al., 1997), somente os clones que apresentavam uma fase aberta de leitura correspondente a outras proteínas no banco de dados foram utilizados para os testes posteriores. Os clones da biblioteca que primeiramente constavam da fase aberta de leitura fora de fase foram descartados, muitos dos clones codificavam para pequenos peptídeos e também foram descartados. Sendo assim, uma porção grande dos clones pescados no “screening” foi de falso positivos, descartados já nessa análise.

3.10.5- Cotransformação em cepa de levedura e verificação da ativação da transcrição

Para se confirmar que os clones encontrados poderiam estar interagindo com a DCRA ou se poderia estabelecer como falso positivos, os clones

isolados de bactéria foram cotransformados em levedura juntamente com o plasmídeo pGBT9-DCRA e alguns plasmídeos controles.

Para este teste de validação da interação utilizamos a cepa CG1945 a qual possui o gene repórter *HIS3*, que somente poderia crescer nos meios seletivos havendo constituição dos domínios da proteína GAL 4.

Os clones encontrados na biblioteca, os quais se encontravam em fase com o domínio ativador da transcrição (DNA-AD, pACT2) foram submetidos a cotransformação em levedura juntamente com o plasmídeo pGBT9 - DCRA. Paralelamente, os clones foram co-transformados com os plasmídios pGBT9 e pLam5' para verificar se os clones encontrados no "screening" codificavam proteínas que estariam interagindo especificamente com a proteína DCRA, ou se elas poderiam interagir inespecificamente com outra proteína (como a laminina C, pLam5') ou com o próprio domínio de ligação de DNA de GAL 4 (DNA-BD, pGBT9). Transformações controles de interação positiva foram feitas utilizando os plasmídeos pTD1 e pVA3 , e negativa utilizando os plasmídeos pTD1 e pLAM5', afim de verificar falhas experimentais.

Todas as transformações foram plaqueadas em meio seletivo mínimo completo –LEU –TRP para selecionar ambos os plasmídeos e depois estriados em meio seletivo mínimo completo –LEU –TRP –HIS para verificar a ativação da transcrição.

3.12- Varredura (“screening”) utilizando uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal na busca de proteínas ligantes a DSCR1 (Kit Two- Hybrid System III)

Para a análise utilizando a proteína DSCR1 foi também utilizada uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal (CLONTECH).

No experimento foi utilizada a cepa AH109 que é uma das vantagens do Kit Two- Hybrid System III porque elimina virtualmente uma grande parte dos falsos positivos devido à presença de três genes repórteres (*ADE2*, *HIS3* e *MEL1* ou *lacZ*) sob o controle da proteína GAL 4.

O protocolo utilizado para a transformação com a biblioteca de cDNA de cérebro fetal foi seguido de acordo com as especificações do fabricante (CLONTECH). Foi utilizado um método sequencial de transformação onde primeiramente o plasmídeo contendo a proteína isca (DSCR1) em fusão com o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL 4 (DNA-BD) foi introduzido na cepa de levedura e selecionados os transformantes. Estes foram colocados para crescer e transformados com a biblioteca que tem fusão com o domínio ativador da proteína GAL 4.

Protocolo de transformação

Para realização do “screening” o plasmídeo pGBKT7-DSCR1 foi transformado na cepa de levedura AH109 utilizando o protocolo de transformação em pequena escala por acetato de lítio segundo Ronald Agatep (AGATEP et al., 1998), os transformantes selecionados foram utilizados para a preparação de um inóculo com meio seletivo mínimo completo –TRP e crescido “overnight” de 16 à 18 horas à 30°C em um shaker com rotação de 250 rpm, o inóculo foi retirado com uma $DO_{600} > 1,5$. A cultura foi transferida para um frasco contendo 300ml de meio completo YPD e incubada a 30°C por 3 horas

até atingir a DO_{600} 0,5 a 0,6, no shaker com rotação de 250 rpm. As células crescidas no meio YPD foram aliqüotadas em tubos de 50ml e centrifugadas a 1000g por 5 minutos a temperatura ambiente. Descartado o sobrenadante as células foram ressuspendidas por vortexação com um volume de 25ml de H_2O milli- q estéril. O pool de células foi centrifugado a 1000g por 5 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante foi decantado. O pellet de células foi novamente ressuspendido com 1,5ml de uma solução estéril de 1XTE/LiAc.

Paralelamente foi preparada 10ml de solução estéril PEG/LiAc. Uma mistura contendo 50ug de DNA da biblioteca de cDNA de cérebro fetal, 2mg de DNA carreador de esperma de Salmon, 6ml da solução estéril PEG/LiAc e 1ml das células ressuspendidas com solução 1xTE/LiAc foi agitada por vortex em alta rotação e incubada por 30 minutos a 30°C no shaker a 200 rpm. Um volume de 700ul de DMSO foi adicionado na mistura e aderido por inversão.

A mistura foi transferida para um banho a 42°C por 15 minutos para o choque térmico e depois colocada por 2 minutos no gelo. As células foram centrifugadas a 1000g por 5 minutos e ressuspendidas em 10ml de meio completo YPD.

Dos 10ml finais da transformação, alíquotas de 200ul foram plaqueadas em 50 placas de Petri de 150mm contendo meio seletivo mínimo completo – LEU –TRP –HIS sendo esta uma análise de média extrigência para o sistema mas que ajuda na captura de interações fracas e de pouca especificidade.

Alíquotas também foram retiradas para a realização de controles sendo feitas diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 e plaqueadas cerca de 100ul em meio mínimo completo –LEU-TRP para o cálculo da eficiência de cotransformação e o número de clones independentes da biblioteca foi analisado.

Utilizando o Kit Two- Hybrid System III e o protocolo da CLONTECH somente em um “screening” obtiveram uma cobertura de $3,0 \times 10^7$ o número de clones independentes analisados, que corresponde mais de três vezes o número de clones independentes da biblioteca.

3.13- Análise dos possíveis clones positivos

3.13.1-Reteste fenotípico

As colônias que tiveram crescimento em até 10 dias foram coletadas e estriadas em meio seletivo mínimo completo –LEU-TRP contendo o substrato cromogênico X- α -GAL. As colônias podem conter mais que um plasmídeo da biblioteca o qual pode complicar a análise do provável clone positivo, sendo assim essas colônias foram estriadas em meio seletivo mantendo seleção de ambos os plasmídeos DNA-BD e DNA-AD incubadas 30°C por 4 a 6 dias.

O próximo passo foi o estriamento das colônias azuis em meio seletivo mínimo completo –TRP-LEU-HIS-ADE contendo X- α -GAL para verificar se os plasmídeos segregados mantêm o mesmo fenótipo. As colônias que apresentaram cor azul foram coletadas e estriadas em meio mínimo completo –LEU-TRP-HIS-ADE para estoque a 4°C.

Com a seleção fenotípica e obtenção dos possíveis clones que poderiam estar interagindo com a proteína DSCR1 esses foram submetidos a extração do DNA plasmidial de levedura seguindo o método de (HOFFMAN e WINSTON, 1987) como descrito anteriormente. Os plasmídeos foram transformados por eletroporação em bactéria DH5 α . Como no Kit Two- Hybrid System III o plasmídeo pGBKT7 possui o gene *Kan^r* para resistência ao antibiótico

kanamicina, utilizando um meio LB broth contendo ampicilina foram selecionados na transformação apenas os plasmídeos da biblioteca de cDNA (resistentes a ampicilina) sendo descartadas os plasmídeos que continham a proteína isca (DSCR1). Isto facilitou a análise dos clones da biblioteca não havendo a necessidade de fazer reações de PCRs de colônia, tornando fácil a seleção dos plasmídeos da biblioteca encontrados em bactéria. Todos os plasmídeos transformados em bactéria foram submetidos ao sequenciamento.

3.13.2- Sequenciamento dos possíveis clones positivos

Os clones encontrados foram submetidos ao sequenciamento, conforme feito com os clones na análise com a DCRA. Foram seqüenciados e observados se a fase aberta de leitura dos cDNAs encontrados estavam em fase e orientação correta com o domínio ativador da transcrição da proteína GAL 4 (DNA-AD), no plasmídeo pACT2, através da seqüência adaptadora 5'AATTCGGGCCGCGTCGAC 3' presente na posição 5' em relação a seqüência do cDNA.

Na reação de sequenciamento foi utilizado um primer 5' o qual possuía anelamento ao domínio ativador da transcrição (DNA-AD), e também um primer 3' que tinha anelamento à seqüência do plasmídeo após o sítio da enzima *Xho* I uma das enzimas de clonagem da biblioteca, podendo assim obter as seqüências inteiras e corretas das fases abertas de leitura dos clones encontrados no "screening".

3.13.3- Verificação da similaridade

Com o sequenciamento dos clones e a verificação da fase e orientação, estes foram submetidos a estudos de similaridade com outras proteínas já conhecidas disponíveis no banco de dados GENBANK no endereço eletrônico www.ncbi.nlm.nih.gov. Para este estudo foram utilizados os programas BLASTX e BLASTP (ALTSCHUL et al., 1997), como já estabelecido também aos clones encontrados com a proteína DCRA. Somente os clones que apresentavam uma fase aberta de leitura correspondente a outras proteínas no banco de dados foram utilizados para os testes posteriores. Os clones da biblioteca que primeiramente continham uma fase aberta de leitura fora de fase com o domínio ativador da transcrição foram descartados, muitos dos clones codificavam para pequenos peptídeos e também foram descartados, não sendo comum os mesmos peptídios e não estabelecido nenhum domínio comum em sua seqüência dos já estabelecidos em banco de dados. Sendo assim, uma parte dos clones pescados no “screening” foi de falso positivos.

3.13.4- Cotransformação em cepa de levedura dos clones selecionados

Todos os clones selecionados foram cotransformados em cepa de levedura novamente para a verificação da interação com a proteína DSCR1, como no experimento realizado com a proteína DCRA.

Para isto clones foram transformados com o plasmídeo pGBKT7-DSCR1 e também com alguns plasmídeos controles, afim de constatar se as interações eram específicas ou inespecíficas.

Para este teste de validação da interação utilizamos a cepa AH109 a qual possui os genes repórteres *ADE*, *HIS3*, *MEL1* que somente poderia crescer nos meios seletivos havendo constituição dos domínios da proteína GAL 4.

Os clones da biblioteca foram transformados isoladamente seguindo o protocolo em pequena escala modificado por Ronald Agatep (AGATEP et al., 1998) com o plasmídeo pGBKT7-DSCR1. Paralelamente, os clones foram cotransformados com os plasmídios pGBKT7 e pGBKT7-Lam para verificar se os clones encontrados no “screening” codificavam proteínas que seriam ligantes específicos da proteína DSCR1, ou se elas poderiam interagir inespecificamente com outra proteína (como a laminina C, pGBKT7-Lam) ou com o próprio domínio de ligação do DNA de GAL 4 (DNA-BD, pGBKT7). Transformações controles de interação positiva foram feitas utilizando os plasmídeos pGBKT7-53 e pGADT7-T , e negativa utilizando os plasmídeos pGADT7 e pGBKT7, a fim de analisar a integridade dos experimentos.

Todas as transformações foram plaqueadas em meio seletivo mínimo completo –LEU –TRP e colocados a 30°C por 2 a 3 dias, para selecionar ambos os plasmídeos e depois estriados em meio seletivo mínimo completo – LEU –TRP –HIS –ADE contendo X- α -GAL para verificar a ativação da transcrição e isolar o(s) clone(s) que contêm o novo ligante a proteína DSCR1.

3.14- Acasalamento de leveduras (“Yeast Mating”)

O método do Duplo- Híbrido foi utilizado para a descoberta de novos ligantes a proteína utilizada como isca, este método verifica as interações *in vivo*. A fim de confirmar os resultados obtidos, outro método *in vivo* foi

escolhido o acasalamento de leveduras (“yeast mating”). Este método é conveniente para a introdução de dois plasmídeos diferentes dentro de uma mesma célula hospedeira (Figura 20) (FINLEY e BRENT, 1994; HARPER et al., 1993).

Utilizando cepas MAT α (AH109) e MAT α (Y187) que diferem quanto ao tipo de acasalamento (sexo). O plasmídeo pGADT7 e os plasmídeos obtidos da biblioteca foram transformados na cepa AH109 (MAT α) e as células foram selecionadas no meio seletivo mínimo completo –LEU.

A cepa Y187 (MAT α) foi transformada com os plasmídeos pGBKT7-DSCR1, pGBKT7 e pGBKT7- Lam (CLONTECH) e selecionados em meio mínimo completo –TRP. O acasalamento foi feito somente com os plasmídeos da biblioteca que obtiveram resultado positivo na cotransformação em levedura.

Os clones selecionados na cepa AH109 foram colocados para crescer de 20 a 24 horas em 0,5ml de meio completo YPD, em tubos de 1,5ml juntamente com os controles transformados na cepa Y187. Alíquotas de 100ul dessa cultura foram plaqueadas em meio mínimo completo –LEU -TRP e colocados para crescer a 30°C por 2 dias, para a seleção de ambos os plasmídeos. Após o crescimento as colônias foram estriadas em meio mínimo completo –LEU –TRP –HIS –ADE contendo X- α -GAL para a seleção das células diplóides, onde a interação *in vivo* foi verificada.

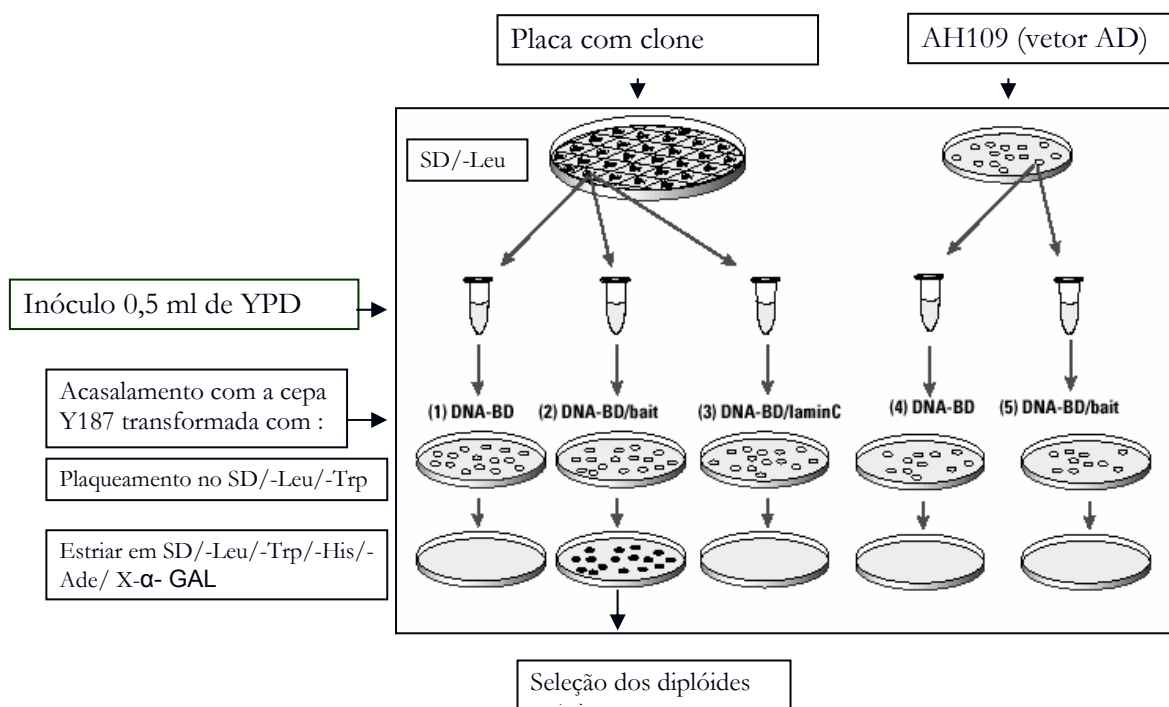


Figura 20: O método de acasalamento de leveduras (“yeast mating”) para verificação de interação proteína- proteína *in vivo*.

3.15- Coimunoprecipitação das proteínas com interação

Para a confirmação da interação há necessidade não só de testes *in vivo*, mas também de testes bioquímicos *in vitro* confirmando as interações físicas entre as proteínas. O método escolhido para a verificação da interação *in vitro* foi a coimunoprecipitação (Figura 22).

Para este experimento primeiramente as proteínas foram marcadas radioativamente, sendo usado o Kit TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) onde as proteínas são traduzidas *in vitro* e incorporadas na sequência os aminoácidos metionina marcados com ^{35}S radioativo.

Primeiramente o clone da biblioteca encontrado com interação a proteína isca, sua respectiva seqüência de cDNA foi retirada do plasmídeo pACT2 da biblioteca e subclonado no plasmídeo pGADT7 em fase com o epitopo de hemaglutinina sob o controle do promotor T7 para a transcrição da proteína.

Clonagem do inserto com possível interação no plasmídeo pGADT7

Para a clonagem do inserto correspondente a proteína UXT (Ubiquitously Expressed Transcript) no plasmídeo pGADT7 foram utilizadas as enzimas *BamH I* e *Xho I* na preparação do plasmídeo. O cDNA correspondente à proteína UXT foi retirado do plasmídeo pACT2 com as mesmas enzimas (*BamH I* e *Xho I*), sendo assim, o inserto tratado em suas extremidades com as mesmas enzimas que o plasmídeo pGADT7, foram submetidos à reação de ligação e transformados em bactéria DH5 α (Figura 21). Os plasmídeos recombinantes foram selecionados por PCRs de colônia utilizando primers, um que possui anelamento ao T7 promotor do plasmídeo 5' ao inserto e outro primer que tem anelamento na região 3' do plasmídeo logo após o sitio de múltipla clonagem. A verificação do tamanho das bandas identificava os novos plasmídeos recombinantes pGADT7-UXT.

Obtidos os plasmídeos recombinantes o próximo passo foi à expressão das proteínas HA-UXT e c-Myc-DSCR1 no Kit TNT T7 Reticolocyte Lysate System para isso foi utilizado um protocolo seguindo as instruções do fabricante.

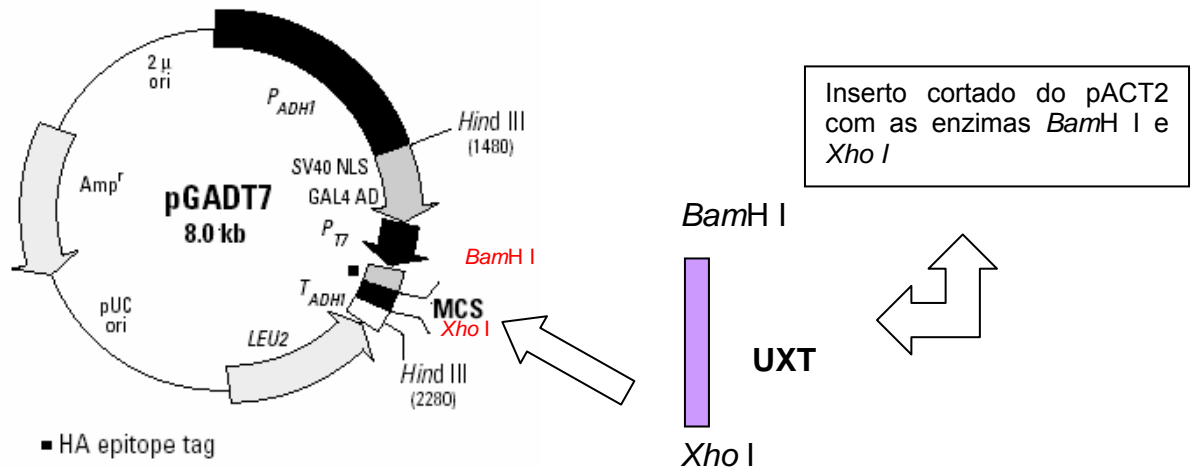


Figura 21: Estratégia de subclonagem do inserto UXT, a partir do plasmídeo pACT2 e clonado no plasmídeo pGADT7.

Protocolo do Kit

Aproximadamente 1,5 ug de DNA dos plasmídeos pGADT7-UXT e pGBKT7-DSCR1 foram utilizados na reação. Isoladamente o DNA plasmidial de cada plasmídeo foi colocado em um tubo de 1,5 ml que continha uma mistura de: 25 ul de lisado de reticulócito, 2 ul de tampão de reação (Promega), 1 ul de T7 RNA polimerase, 1 ul de uma mistura de aminoácidos menos metionina, [³⁵S] metionina (> 1,000Ci/mmol a 10mCi/ml – Amersham Biosciences), 1 ul do inibidor de ribonuclease e um volume de água milli-q estéril sendo ajustado para 50 ul a reação final. Esta mistura foi incubada a 30°C por 90 minutos, todos os componentes da mistura citados foram adquiridos juntamente com o Kit (Promega).

Os resultados da tradução foram analisados por gel desnaturante SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) apenas uma alíquota de 5 ul da mistura de 50 ul foi aplicada em gel. Após a eletroforese o gel foi submetido à secagem e

exposição para visualização das bandas correspondentes as proteínas radioativamente marcadas HA-UXT e c-Myc-DSCR1. Para isso, o gel foi lavado com uma solução de fixação por 5 minutos para impedir que o gel quebrasse durante a secagem. Assim o gel foi colocado em sistema de secagem a vácuo a uma temperatura de 80°C por 90 minutos. Em seguida foi exposto em um filme de raio X (Kodak) e colocado no freezer - 70°C overnight, o filme foi revelado e as bandas correspondentes às proteínas HA-UXT e c-Myc-DSCR1 foram verificadas de acordo com o tamanho.

Obtidas as proteínas radioativamente marcadas, o próximo passo foi à realização do protocolo de coimunoprecipitação.

Protocolo de coimunoprecipitação

Na coimunoprecipitação, depois da verificação de que as proteínas foram expressas e marcadas com radioativo, alíquotas das proteínas HA-UXT e c-Myc-DSCR1 foram colocadas juntas em tubos de 1,5 ml e mixadas com a pipeta bem devagar e colocadas por 1 hora à temperatura ambiente para a formação dos complexos protéicos.

Para cada tubo contendo as proteínas foram adicionados cerca de 5 ug de anticorpo correspondente o tubo que continham ambas proteínas foi adicionado o anticorpo anti-c-Myc. Paralelamente foram realizados controles, o tubo de 1,5 ml que continha a proteína HA-UXT e o outro que continha a proteína c-Myc-DSCR1 foram adicionados os anticorpos anti-HA (SIGMA) e anti-c-Myc (SIGMA) respectivamente. As misturas contendo anticorpo foram colocadas a 4°C em um shaker orbital com rotação mínima por 1 hora.

Após 1 hora foram aderidas às misturas beads de proteína A sepharose (Amersham Biosciences) que foram preparados contendo 50% de beads de

proteína A e 50% do tampão de ligação, dessa preparação 50 μ l foram aderidas as misturas.

As misturas contendo os beads de proteína A foram então centrifugadas a 14000 rpm por 30 segundos, o sobrenadante foi descartado e adicionados 1 ml de tampão de ligação para a lavagem dos beads, essa lavagem foi repetida por 4 vezes. Depois os beads de proteína A foram lavados 1 vez com PBS.

As amostras foram então após as lavagens ressuspensas com o tampão da amostra 2x concentrado, as misturas contendo os beads e as proteínas foram denaturadas por 5 minutos a 95°C, e centrifugadas por 30 segundos a 14000 rpm, o sobrenadante foi aplicado em gel SDS-PAGE 15% para resolução das proteínas.

Após eletroforese o gel fixado com solução de fixação e submetido a secagem em um sistema de secagem a vácuo a uma temperatura de 80°C por 90 minutos. O gel foi exposto em um filme de raio X (Kodak) e os complexos de proteínas foram revelados por autoradiografia.

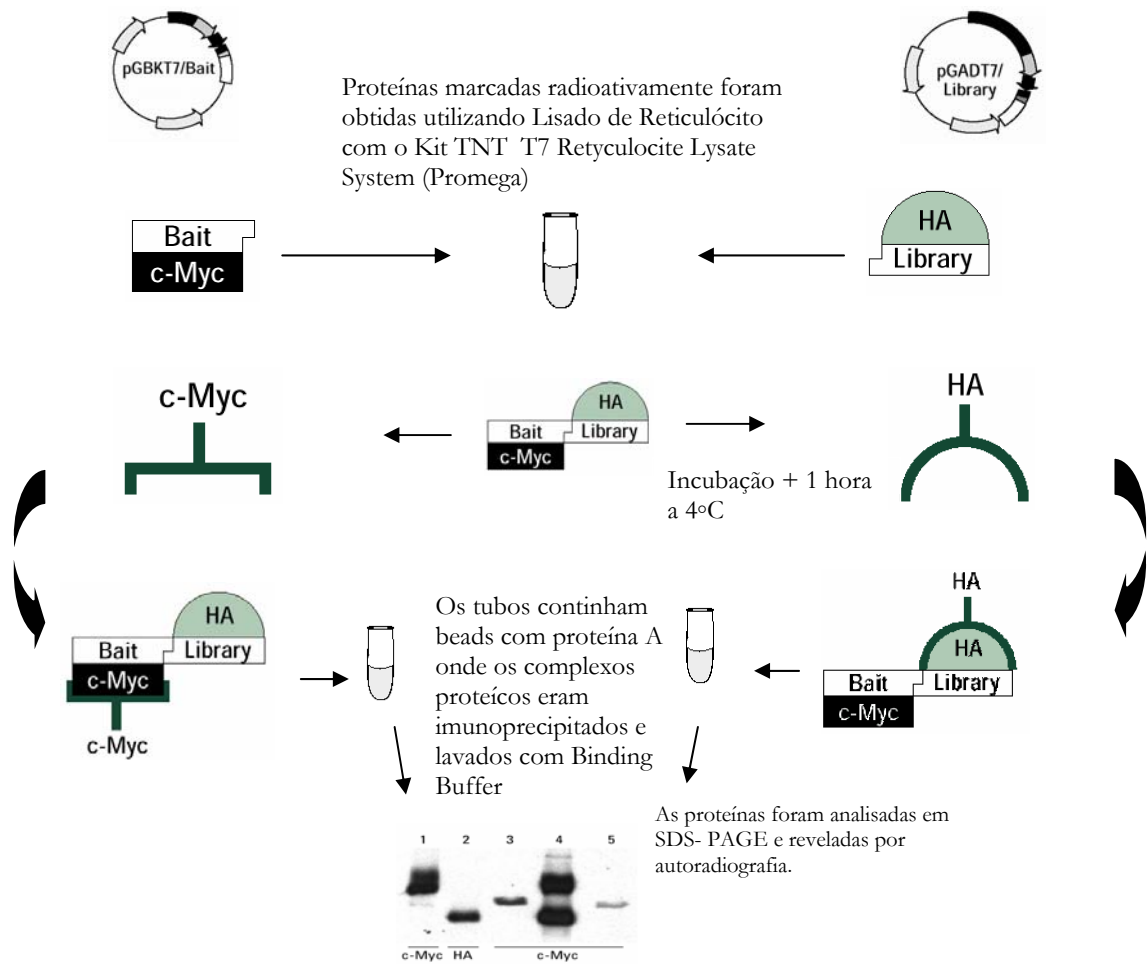


Figura 22 : O método de coimunoprecipitação utilizado para a verificação da interação das proteínas *in vitro*.

4.0- Resultados e Discussão

4.1- Ativação transcricional das proteínas de interesse

Sobre a hipótese das proteínas DSCR1 e DCRA ativarem a transcrição em fusão com o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL 4 no sistema de Duplo-Híbrido esta pode ser descartada porque nenhuma das proteínas ativaram a transcrição em cepa de levedura. Para estes testes os plasmídeos pGBT9-DCRA e pGBKT7-DSCR1 foram utilizados para transformação em cepas de levedura CG1945 e AH109, respectivamente. Caso alguma destas proteínas ativasse a transcrição as cepas cresceriam em meio seletivo, que descartaria a possibilidade do uso no sistema do Duplo-Híbrido. A proteína DSCR1 (foi utilizada a forma 4-5), contem em sua seqüência de aminoácidos alguns prováveis ativadores transcricionais o que poderia ocasionar a ativação da transcrição. Como isso não ocorreu, nem com a DCRA nem com a DSCR1 ficou estabelecido que as duas proteínas poderiam ser utilizadas na varredura da biblioteca no sistema do Duplo-Híbrido.

4.2 - Análise da biblioteca de cDNA de cérebro fetal utilizando como isca a proteína DCRA

Para análise e procura de interações para a proteína DCRA foram realizados várias transformações com a biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano, num total de 6 análises obtendo-se uma cobertura mais três vezes o número de clones independentes da biblioteca, o que é recomendado quando se busca interações proteína-proteína utilizando a metodologia do Duplo-Híbrido. Nas análises foram calculados os números de eficiência de

cotransformação e o número aproximado de clones independentes que foram analisados em cada experimento, como podemos observar na tabela 2.

Foram obtidos bons índices de transformações utilizando o Kit Two-Hybrid System II juntamente com a biblioteca de cDNA de cérebro fetal, que ajudou na procura de novos ligantes a DCRA devido a boa representatividade da biblioteca nas transformações.

TABELA 2 - Eficiência de transformação de cada análise e o número de clones representados da biblioteca.

Número de análises (“screenings”)	Eficiência de cotransformação	Número de clones da biblioteca analisados
1 screening	$4,3 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$
2 screening	$6,6 \times 10^5$	$6,0 \times 10^6$
3 screening	$3,7 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$
4 screening	$4,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$
5 screening	$1,7 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$
6 screening	$2,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$

4.2.1- Análise dos clones positivos obtidos com a DCRA

Em todas as análises realizadas as colônias de levedura que cresciam nos primeiros oito dias foram coletadas. Delas foram extraídos os seus DNAs plasmidiais para análises da sequência de cDNA contidas nos plasmídeos da biblioteca.

Com o DNA plasmidial extraído destas colônias, as transformações em *E. coli* foram realizadas. Para cada colônia de levedura que continha

plasmídeos da biblioteca e que foram transformados em bactéria, cerca de 20 colônias transformantes de *E. coli* foram analisados por PCR de colônia para a identificação das portadoras do plasmídeo da biblioteca (pACT2+cDNA), devido ao fato de conter o mesmo gene de resistência para seleção em bactéria, que o plasmídeo isca (pGBT9+DCRA). Todas as colônias portando plasmídeos da biblioteca foram seqüenciados. Isto foi realizado pelo fato de mais de um plasmídeo da biblioteca poder entrar em uma mesma célula de levedura na transformação, mesmo as colônias de levedura coletadas terem sido cultivadas em meio líquido seletivo -LEU-TRP-HIS, para que apenas os plasmídeos responsáveis pela interação fossem preservados.

Contabilizando as seis análises feitas com a biblioteca de cDNA de cérebro fetal cerca de 700 plasmídeos foram seqüenciados. Destes, uma parte correspondia a seqüências fora de fase, plasmídeos fechados sem inserto, com “linkers” da biblioteca, ou insertos de tamanhos reduzidos que correspondiam a pequenos peptídeos.

Dentre os plasmídeos com seqüências que correspondiam a proteínas conhecidas e em fase com o domínio ativador da GAL 4, foram submetidos a um teste de especificidade de interação.

4.2.2- Análise dos possíveis ligantes a proteína DCRA

Para verificar se há especificidade de interação dos clones encontrados com a proteína DCRA no sistema de Duplo-Híbrido. Todos os clones seqüenciados e com homologia a proteínas conhecidas foram submetidos a uma nova cotransformação em levedura na cepa CG1945, juntamente com a proteína DCRA.

Paralelamente, cotransformações dos clones encontrados foram feitas juntamente com plasmídeo expressando somente o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL 4 (pGBT9) e com plasmídeo expressando uma proteína diferente da proteína isca em fusão com o domínio de ligação ao DNA. Neste caso a proteína de fusão foi a laminina C inserida no plasmídeo controle pLam 5'. Nas cotransformações na cepa de levedura CG1945 foram analisados se os clones positivos ativavam a transcrição do gene repórter somente na presença da proteína DCRA. Na análise utilizando os plasmídeos pGBT9 e pLam 5' foi observado se os clones obtidos também ativavam a transcrição, com a presença do domínio de ligação ao DNA ou com outra proteína exceto a DCRA.

Os resultados obtidos de especificidade de interação provaram que todos os clones encontrados nas análises são pertencentes a classe de clones falso positivos. Não obtivemos nenhuma interação específica com a proteína DCRA. Todos os clones suspeitos quando cotransformados com outra proteína ou somente com o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL 4 ativava a transcrição.

Interessante salientar que vários clones se repetiam nas diferentes análises, talvez pela representatividade na biblioteca, o que aumentava nossa suspeita da ligação com a proteína DCRA. Alguns desses clones por exemplo, apresentavam similaridades com a uma serina/threonina fosfatase tipo 1 alpha, uma isoforma da PP1 (serina/ treonina fosfatase). Essas fosfatases têm a função de defosforilação de resíduos de serina e treonina em extratos celulares (LABIB, 1993), estão distribuídas na célula e envolvidas em muitos processos celulares incluindo a regulação da transcrição e mitose (SHENOLIKAR, 1994).

Também obtivemos falsas interações com a proteína SNAPIN, que está associada ao complexo das SNARES proteínas associadas a membrana responsáveis pelo tráfico vesicular dentro da célula (ROTHMAN, 1994), e a proteína RAB 14 que faz parte da família das GTP- “binding proteins” que são proteínas que podem também participar do processo de tráfico vesicular, crescimento e diferenciação celular dentro da célula eucariótica (HALL 1990, CHARDIN, 1991, LAZAR et al., 1997, HALL, 1998). Todos esses clones, quando transformados com os controles não mantinham especificidade de ligação com a proteína DCRA sendo classificados como falso positivos.

O método do Duplo- Híbrido é eficiente na busca de interações de proteínas, mas apresenta o aparecimento de muitos falsos positivos, principalmente quando se tem um número elevado de transformantes. O clone é considerado positivo somente quando a ativação do gene repórter se dá com a combinação do plasmídeo contendo a proteína isca específica.

Classes de falso positivos foram estabelecidas por (PARCHALIUK et al., 1999) e eles são divididos em três categorias: A primeira categoria é de plasmídeos da biblioteca que contém o domínio ativador da proteína GAL 4 que não requer a presença de um domínio de ligação ao DNA em fusão com uma proteína isca para ativar os genes repórteres. A segunda categoria são os plasmídeos da biblioteca que ativam a transcrição dos genes repórteres na presença da proteína isca de interesse, mas também apresenta ativação na presença de outras proteínas iscas. A terceira categoria é de plasmídeos da biblioteca que apresentam a ativação dos genes repórteres na presença somente do vetor contendo o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL 4.

Nas análises realizadas com a proteína DCRA os falsos positivos capturados se caracterizam como sendo de segunda e terceira classe. Uma lista de falso positivos no método do Duplo- Híbrido pode ser encontrada no endereço <http://www.fcc.edu.research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html>. Em nosso laboratório foi possível estabelecer uma lista (TABELA 3) de falso positivos devido ao número de análises (“screening”) com a biblioteca de cDNA de cérebro fetal.

TABELA 3 – Falsos positivos encontrados nas análises da biblioteca de cDNA de cérebro fetal utilizando como isca a DCRA. Em destaque (*) clones também citados em <http://www.fcc.edu.research/labs/golemis/InteractionTrapInWork.html>

Clones da biblioteca de cDNA de cérebro fetal estabelecidos como falso positivos no sistema de Duplo- Híbrido	Número de acesso no banco de dados de proteínas.
*Ring Finger protein 2	NP_009143.1
Similar to Cysteine desulfurase, mitochondrial	XP_047273.2
Lim domain only 4	NP_006760.1
2- phosphopyruvate- hydratase alpha- enolase; carbonate dehydratase	CAA59331.1
Exosome component Rrp 41; hypotetical protein	NP_061910.1
Unknown protein	AAC09363.1
Similar to SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily, member 3.	AAH02628.1
*Alpha 2 type I collagen preprotein, collagen I, alpha-2- polypeptide; collagen of skin, tendon and bone, alpha-2-chain	NP_000080.1
Ephrin A3, EHK1-L; eph- related receptor tyrosine kinase	NP_004943.1
Similar to hypotetical protein gene LOC127703	XP_059172
Serine/threonine protein phosphatase PP1-alpha 1 catalytic subunit (PP-1A)	P08129
SNARE associated protein snapin	NP_036569

TABELA 3 - Continuação

RAB14 protein	AAF00150
LdOrf-5 peptide	NP_047641.1
Similar to succinate dehydrogenase	XP_018205.1
LSM2- Human U6 snRNA-associated Sm-like protein LSm2	Q9Y333
Glial fibrillary acidic protein	XP_050159.2
Joined to JAZF1	AAH15704.1
*Elongation factor 2	AAA50388.1
dJ79416.2.1 solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter-like 1	CAB90170.4
DNA J protein Tid- 1	AAL35323.1
Unnamed protein product	BAB55320.1
FoxD4b	AAL73342.1
Cerebroside sulfate activator protein	AAA36595.1

O método do Duplo-Híbrido, tem sido considerado um poderoso sistema para a abordagem molecular na detecção de interações proteína-proteína (binárias), e contribuindo significativamente para o entendimento de muitas vias moleculares.

No caso da proteína DCRA não conseguimos estabelecer um novo ligante, fato que não significa que a proteína não esteja interagindo com nenhuma outra. A DCRA pode participar de complexos protéicos, tendo interações fracas com outras proteínas, podendo participar como ponte interagindo com duas proteínas que diretamente não interagem uma com a outra; pode estar estabilizando interações fracas entre duas proteínas ou funcionar como inibidor ou modificador de uma ou de algumas proteínas que participam de um complexo protéico. E também sofrer modificações pós-transducionais (como glicosilação) que são essenciais para as interações de algumas proteínas mamíferas o que seria impossível detectar no Duplo-Híbrido (sistema binário). Embora a técnica apresente sucesso na busca de interações de proteínas, o método pode apresentar em alguns casos falhas para encontrar interações que participam de grandes complexos protéicos, tais como os da holoenzima da RNA polymerase II ou complexos TFIIH e TFIID (TIRODE et al., 1997). Como também as fusões das proteínas com o DNA-BD e AD em alguns casos pode ocultar o sítio de interação podendo interferir na ligação das proteínas (VAN AELST et al., 1993).

Outro método poderia talvez ser eficiente na procura de proteínas que interagem com a DCRA, como o Triplo-Híbrido (Three-Hybrid) (BRACHMANN et al., 1997) que também utiliza as propriedades da proteína GAL 4 e é um eficiente método para investigação de complexos protéicos, também sendo

utilizado em análises com uma biblioteca ou para verificação de complexos entre três proteínas.

4.3 - Varredura da biblioteca de cDNA de cérebro fetal utilizando como isca a proteína DSCR1

4.3.1 - A descoberta de um novo ligante para a proteína DSCR1

Em busca de proteínas que interagem com a DSCR1, leveduras expressando a forma 4-5 (isoforma 4) da proteína DSCR1 em fusão com o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL 4 foram transformadas com uma biblioteca de cDNA de cérebro fetal esta construída em fusão com o domínio de ativação da proteína GAL 4, como descrito anteriormente, que possui cerca de 1 milhão de clones independentes.

A transformação foi plaqueada em meio mínimo completo –Leu -Trp -His meio de média exigência para o sistema, o que possibilita a procura de interações fracas ou de pouca afinidade. A eficiência de transformação da análise foi de aproximadamente 3.0×10^7 cfu/ug DNA transformado, como dito anteriormente o que mais de três vezes o número de clones independentes da biblioteca.

Foram obtidas 404 colônias que foram submetidas ao reteste fenotípico em meio seletivo completo –LEU-TRP contendo o substrato cromogênico X- α -GAL o que manteve a seleção de ambos os plasmídeos DNA-BD e DNA-AD. As colônias podem conter mais que um plasmídeo da biblioteca, que pode complicar a análise do provável clone positivo, por isso foi usado a ativação de apenas um gene repórter da cepa AH109, o que leva a expressão de α -galactosidase, das colônias que contem o clone com provável interação a

proteína DSCR1, obtendo uma mistura de colônias brancas e azuis que indica segregação entre os plasmídeos.

As colônias que possuíam coloração azul 170 colônias foram estriadas em meio seletivo –LEU –TRP –HIS –ADE contendo X- α - GAL para verificar se apresentavam a ativação de todos os genes repórteres da cepa de levedura AH109. Somente 52 colônias confirmaram crescimento no meio seletivo e apresentaram coloração azul.

Todas as 52 colônias que permaneceram azuis, tiveram seus plasmídeos isolados de levedura. Como o kit Two-Hybrid System III possui seleção em bactéria diferente nos plasmídeos DNA-AD e DNA-BD o que torna fácil a seleção em bactéria dos plasmídeos da biblioteca.

Transformados em bactéria *Escherichia coli*, os plasmídeos da biblioteca foram purificados e seqüenciados. Cerca de aproximadamente 300 clones foram seqüenciados, para cada representante nas colônias coletadas de levedura e transformados em bactéria foram submetidos ao sequenciamento cerca de 6 clones.

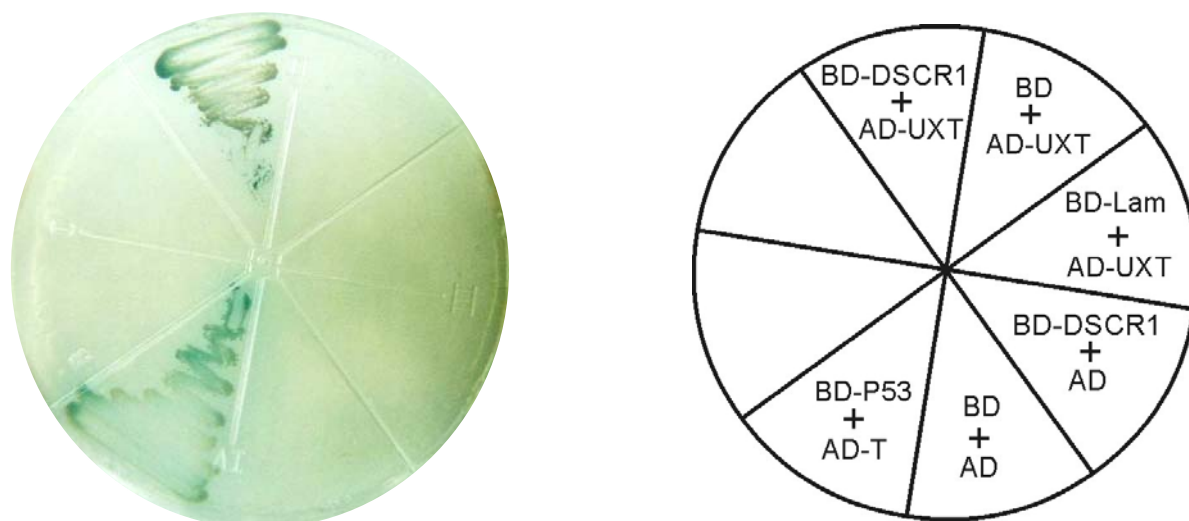
Todos os clones seqüenciados que apresentava a sequência de cDNA em fase com o domínio de ativação da proteína GAL 4, foram analisados no banco de dados (NCBI) no programa BLASTX e BLASTP (ALTSCHUL et al., 1997).

4.3.2- Cotransformação em cepa de levedura dos clones com possível interação

Todos os clones que estavam em fase com o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL 4 e que continham “ORFs” encontradas no banco de

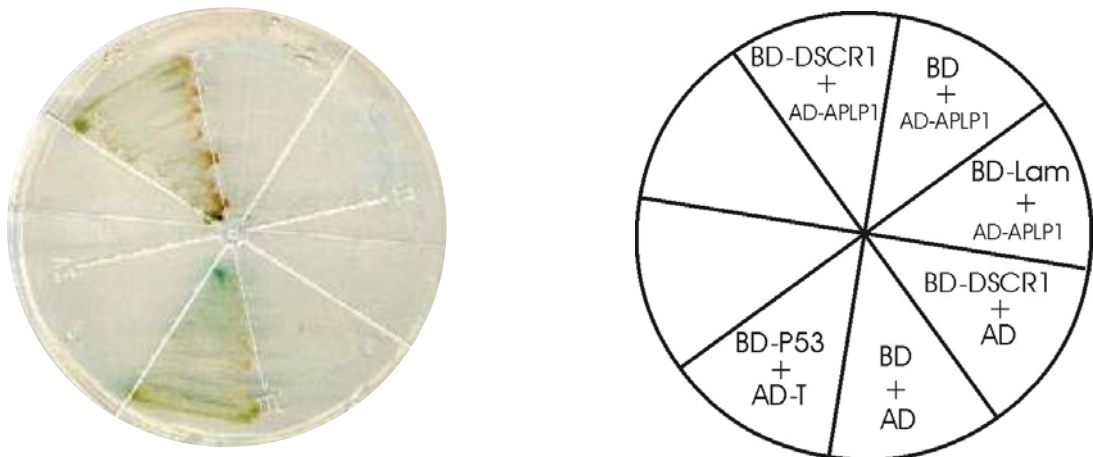
dados, foram introduzidos novamente em cepa de levedura juntamente com plasmídeos controles.

Os clones nomeados 5-2 e 23-3, 45-2 apresentaram ativação dos genes repórteres quando transformados com a BD-DSCR1 e estriados em meio seletivo contendo X- α -GAL (Figura 23). Os clones 5-2, 23-3 e 45-2 possuem uma seqüência de cDNA com identidade de 100% com a proteína UXT (“Ubiquitously expressed transcript”) (NP_705582). Também os clones nomeados como 3-1, 21-2 apresentaram ativação dos genes repórteres quando transformados com o BD-DSCR1 (Figura 24) e possuem uma seqüência de cDNA correspondente à proteína APLP1 (“Amyloid precursor-like protein 1”) (NP_005157).



SD -LEU -TRP -HIS -ADE/ X- α -GAL

Figura 23: Células de levedura da cepa AH109 foram cotransformadas com pAST2-UXT (AD-UXT) e com o plasmídeo pGBKT7-DSCR1 (BD-DSCR1). Controles negativos foram realizados cotransformando os plasmídeos pGBKT7 (BD) e pGBKT7- Lam, um controle positivo foi utilizado com a cotransformação dos plasmídeos pGBKT7-53 e pGADT7-T para verificação da integridade do experimento.



SD -LEU -TRP -HIS -ADE/ X- α -GAL

Figura 24: Na cepa de levedura AH109 foram cotransformadas com pAST2-APLP1 (AD-APLP1) e com o plasmídeo pGBKT7-DSCR1 (BD-DSCR1). Controles negativos foram realizados cotransformando os plasmídeos pGBKT7 (BD) e pGBKT7-Lam, um controle positivo foi utilizado com a cotransformação dos plasmídeos pGBKT7-53 e pGADT7-T para verificação da integridade do experimento.

4.3.3- Características dos novos ligantes da proteína DSCR1

O gene da proteína UXT tem localização no cromossomo X na posição Xp11.23-p11.22 e um tamanho de aproximadamente 7,35 Kb ao longo do DNA genômico, codifica uma seqüência de 157 aminoácidos com três sítios potenciais de fosforilação. Esta proteína possui uma homóloga em camundongo contendo 90% de identidade com todos os potenciais sítios de fosforilação conservados, indicando que esses sítios são funcionalmente importantes. Análises de expressão via “*Northern blot*” detectaram a presença da UXT em vários tecidos como coração, cérebro, placenta, fígado, rim, músculo estriados e pâncreas. A maioria dos ESTs que correspondem para UXT

são originários de tecidos tumorais o que sugere estar envolvida em tumorigênese (SCHROER et al., 1999).

A seqüência da proteína APLP1 (Amyloid precursor-like protein 1) foi isolada a partir de uma biblioteca de cDNA de cérebro de camundongo (WASCO et al., 1992). Codifica uma sequência de 653 aminoácidos que é 42% idêntica e 64% similar para a proteína beta amiloíde precursora (APP) que origina o fragmento amiloidogênico A β , que é o maior componente das placas amiloídes estabelecidas em cérebros de pacientes com o mal de Alzheimer, considerada a maior causa da doença. Análises com painéis de DNAs de células somáticas humanas determinaram que a APLP se localiza no cromossomo 19 na posição e 19q 13.1. (WASCO et al., 1993).

Estudos realizados revelaram a seqüência da APLP1 humana que possui um tamanho ao longo do DNA genômico de aproximadamente 11,8 Kb e contém 17 éxons (LENKKERI et al., 1998). A importância dessa proteína é de seu provável envolvimento com o mal de Alzheimer, já que faz parte da família APP, hoje foco de vários estudos (SISODIA e GEORGE – HYSLOP et al., 2002).

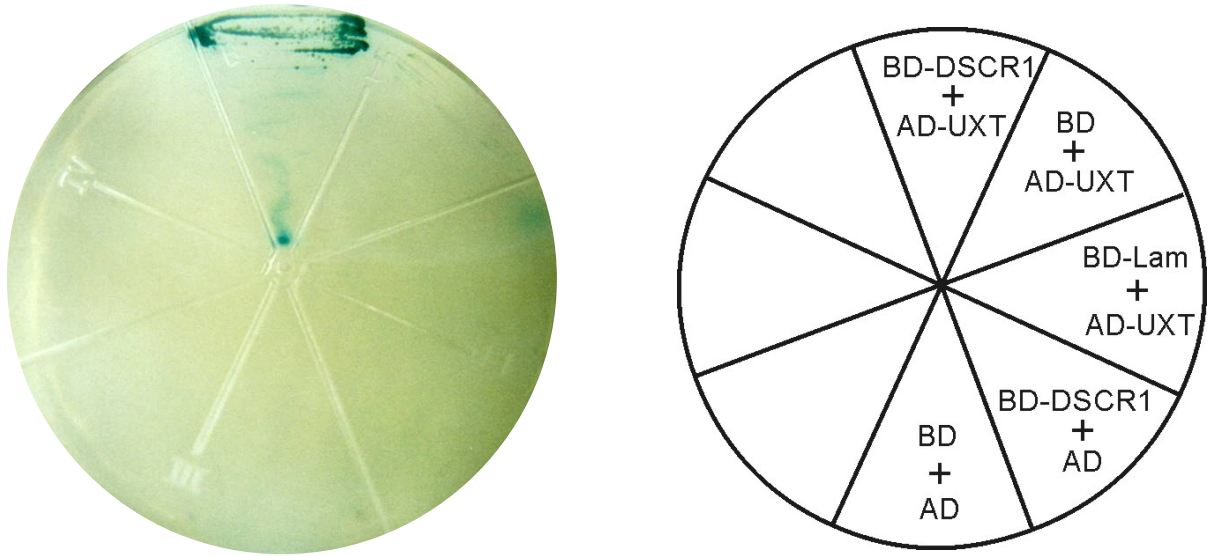
4.4 - Análise da interação *in vivo* dos possíveis ligantes a proteína DSCR1 através de um acasalamento de leveduras (yeast mating)

Este método de acasalamento de leveduras é um conveniente método para a introdução de dois plasmídeos em uma mesma célula hospedeira e amplamente utilizado na confirmação dos resultados obtidos na técnica do Duplo-Híbrido.

Neste teste só foram utilizados os clones que apresentavam as ORFs correspondentes as proteínas UXT (AD-UXT) e APLP1 (AD-APLP1) transformadas na cepa AH109 (MAT a), na mesma cepa foi também transformado o plasmídeo pGADT7. A cepa Y187 (MAT α) foi transformada com o vetor contendo BD-DSCR1 ou vetor pGBKT7. Ambas as cepas cresceram em meio completo YPD e foram plaqueadas em meio mínimo completo –LEU –TRP para seleção dos plasmídeos e estriadas em meio seletivo –LEU –TRP –HIS –ADE contendo X- α -GAL.

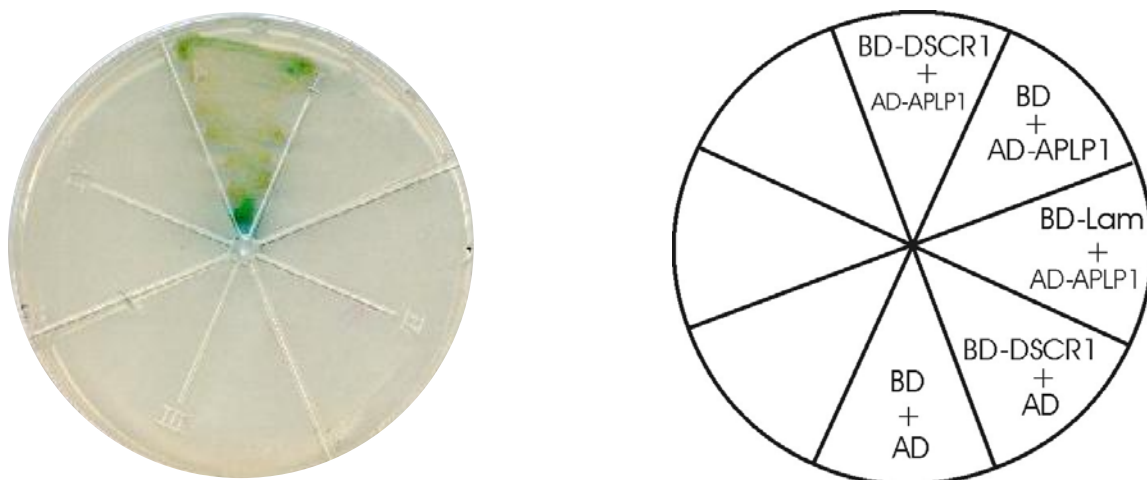
A cepa MAT a expressando AD- UXT foi acasalada com as células MAT α expressando o domínio de ligação ao DNA da proteína GAL 4 (BD- vetor pGBKT7) ou com as células MAT α contendo o pGBKT7-Lam (vetor pGBKT7 contendo a proteína laminina C como fusão). Não foi observado o crescimento de colônias depois do plaqueamento em meio seletivo (Figura 25, 26) o que era esperado. Similarmente, também não foi observado o crescimento de colônias quando a cepa MAT α expressando BD-DSCR1 foi acasalada com células MAT a expressando o domínio ativador da transcrição da GAL 4 (pGADT7) (Figura 25, 26).

Somente foi observado crescimento de colônias quando a MAT α expressando BD-DSCR1 foi acasalado com a cepa MAT a contendo AD-UXT (Figura 25) e AD-APLP1 (Figura 26), Estes resultados comprovaram que o crescimento de células diplóides no meio seletivo foi devido às específicas interações entre DSCR1 e UXT e DSCR1 e APLP1.



SD -LEU -TRP -HIS -ADE/ X- α -GAL

Figura 25: Leveduras diplóides foram obtidas por acasalamento da cepa AH109 transformada somente com o vetor pACT2- UXT com a cepa de levedura Y187 previamente transformada com o vetor pGBKT7- DSCR1. Células foram estriadas no meio seletivo -LEU -TRP -HIS -ADE contendo X- α -GAL para a seleção das células diplóides exibindo a expressão do gene repórter.



SD -LEU -TRP -HIS -ADE/ X- α -GAL

Figura 26: As células diplóides foram obtidas por acasalamento da cepa AH109 transformada somente com o vetor pACT2- APLP1 com a cepa de levedura Y187 previamente transformada com os vetores pGBKT7- DSCR1. Células foram estriadas no meio seletivo -LEU -TRP -HIS -ADE contendo X- α -GAL para a seleção das células diplóides exibindo a expressão do gene repórter.

4.5 -Interação *in vitro* entre as recombinantes DSCR1 e UXT

O fato de se ter comprovado as interações *in vivo* é importante a comprovação das interações físicas para se validar a interação de interesse. O teste bioquímico para a comprovação das interações entre as proteínas *in vitro* foi a coimunoprecipitação. Esta técnica se baseia no uso de um anticorpo específico para a proteína estudada (ou para uma proteína ou epítopo em fusão com ela), para realizar a imunoprecipitação da proteína em conjunto com outra proteína. A(s) proteína(s) encontradas no co-precipitado podem ser resolvidas em gel.

A coimunoprecipitação foi realizada somente com a proteína UXT devido ao prazo previsto para o mestrado, testes com a proteína APLP1 são de grande interesse para o estabelecimento da nova função da proteína DSCR1 dentro da célula por isso estão em andamento.

Primeiramente foram geradas as proteínas DSCR1 e UXT marcadas com ^{35}S no aminoácido metionina, em fusão com os epitopos c-myc e hemaglutinina específicos para os anticorpos anti c-myc e anti- HA respectivamente. A proteína DSCR1 foi imunoprecipitada com o anticorpo monoclonal anti-c- myc (Figura 27) e a proteína UXT foi imunoprecipitada utilizando o anticorpo anti- HA (Figura 27) como controle positivo. Nas reações que continham as duas proteínas apenas um dos anticorpos foi utilizado para imunoprecipitação do complexo entre as duas proteínas. Utilizando o anticorpo anti-c-Myc foi possível detectar o complexo de interação entre as proteínas UXT-HA e DSCR1- c-Myc confirmando assim os resultados obtidos com Duplo-Híbrido (Figura 27).

O fato de se provar a interação *in vivo* e *in vitro* da proteína DSCR1 com a UXT e o resultado da interação *in vivo* com a proteína APLP1, estabelece um novo e provável papel da proteína DSCR1 no interior da célula ainda não desvendado.

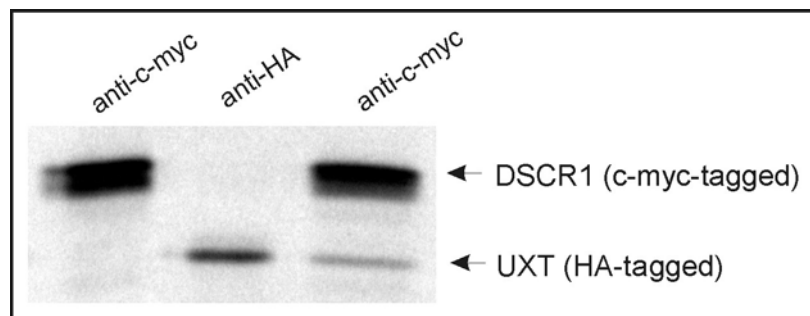


Figura 27: Interação das proteínas DSCR1 e UXT em um ensaio de coimunoprecipitação. Os cDNAs codificando c-Myc-DSCR1 e HA-UXT foram traduzidos e simultaneamente marcados com metionina [³⁵S] usando lisado de reticulócito e verificada para sua capacidade para interagir e visualizada por autoradiografia. Coimunoprecipitação foi realizada como descrita nos materiais e métodos, as proteínas c-Myc- DSCR1 e HA- UXT foram imunoprecipitadas usando o anticorpo anti -c-Myc.

4.6 - Que papel a proteína DSCR1 possivelmente deve estar realizando?

A proteína DSCR1 é de relevante importância, principalmente por interagir fisicamente com calcineurina (CASAS et al., 2001; ERMAK et al., 2001; ROTHERMEL et al., 2001; YANG et al., 2000). Calcineurina liga e defosforila os resíduos de serinas contidas nos boxes SPs presentes em várias proteínas, incluindo NFAT (três boxes) e DSCR1 (dois boxes) (ROTHERMEL et al., 2000; CABTREE 1999; CABTREE 2001).

Na DSCR1, os resíduos de serinas do motivo conservado SPPASPP são fosforilados por MAPK (“mitogen- activated protein kinase”) e GSK-3 (“glycogen syntase kinase-3”). Contudo, uma serina específica é fosforilada por GSK-3 e

pode ser defosforilada por calcineurina *in vitro* (VEGA et al., 2002). A proteína CBP1 homóloga da DSCR1 no fungo patogênico *Cryptococcus neoformans* é também fosforilada *in vivo* e serve como substrato para a calcineurina (GORLACH et al., 2000). A atividade inibitória da DSCR1 é independente do estado de fosforilação das serinas dos boxes SP. Dentro da sequência de aminoácidos da proteína DSCR1 tem outras três regiões que contribuem para inibição de calcineurina *in vivo* e *in vitro* (VEGA et al., 2002)

Recentes estudos sugerem que a localização celular da proteína DSCR1 é dependente de fosforilação. Linhagens de células de camundongo C2C12 transfectadas com a proteína DSCR1 em fusão com “green fluorescence protein” (GFP) mostraram uma localização nuclear da proteína de fusão. Também foi analisado que a proteína era retida no citoplasma quando as serinas dos boxes SP foram mutadas por alaninas (ROTHERMEL et al., 2000; PFISTER et al., 2002).

Desde que a DSCR1 é um substrato para calcineurina e proteína quinases que provavelmente regulam a sua localização celular, nós nos encorajamos na busca de novas interações para a proteína DSCR1, como primeiro passo na elucidação de uma provável função desta proteína no núcleo. Usando o método de Duplo- Híbrido como já descrito anteriormente, nós identificamos dois novos ligantes da proteína DSCR1, a proteína UXT comprovada a interação *in vivo* e *in vitro* e a proteína APLP1 onde confirmamos a interação *in vivo*.

O primeiro novo ligante identificado, a proteína UXT, também interage com o domínio SEC 1 localizado na porção C- terminal da proteína LRPPRC (número de acesso M92439), um receptor de fator de crescimento presente em

fibroblastos de fígado. O domínio SEC 1 é usualmente envolvido em processos de transporte celular através de compartimentos da célula, semelhantes como a transmissão sináptica, exocitose vesicular e secreções gerais (LIU e McKEEHAM., 2002).

Análises de predição da sequência de aminoácidos da proteína UXT mostraram uma homologia da região helical da UXT para o “DNA-binding helix-loop-helix domain” (bHLH-ZIP) do fator de transcrição SREBP1. Também foi observado que o arranjo das hélices preditas da UXT é homólogo para as três últimas hélices das quatro hélices da proteína STAT (“signal transducers and activators of transcription”) 3b (BECKER; GRONER; MULLER., 1998)

Ambas as proteínas SREBP1 e STAT3b são fatores de transcrição móveis que translocam para o núcleo para regular a transcrição de genes específicos. Juntando essas similaridades estruturais foi sugerido que a UXT poderia agir como ponte entre LRPPRC, estruturas celulares e prováveis fatores de transcrição (LIU e McKEEHAM., 2002). Com isso, a UXT poderia mediar a resposta celular induzida pela atividade do receptor LRPPRC.

Outro aspecto é de fundamental importância e se refere a proteína APLP1 encontrada como o outro ligante da proteína DSCR1. Estudos recentes realizados por (MEIR et al., 2002) revelaram que a proteína APLP1 é clivada por γ - secretase como acontece com a proteína APP originando o fragmento A β . Sugerindo que os peptídeos liberados após a clivagem e que recebem o nome de ALID podem entrar no núcleo e ativar a transcrição de genes específicos (PASSER et al., 2002). Descobrir quais genes são regulados pela família dessas proteínas contribuiria para o entendimento dos diferentes fenótipos do mal de Alzheimer.

O fato da interação *in vivo* entre a proteína DSCR1 e APLP1 pode reforçar a idéia de que a proteína DSCR1 pode estar relacionada com transcrição.

Essas observações juntamente com os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a DSCR1 e UXT e também DSCR1 e APLP1 podem estar interagindo em complexos de transcrição. A possibilidade que a DSCR1 pode ligar em RNA ou DNA e regular a transcrição de genes específicos tem sido previamente sugerida (ERMAK; HARRIS e DAVIES., 2002). Outros estudos podem mostrar a comprovação dessas hipóteses.

5.0- Conclusões Gerais

As proteínas DCRA e DSCR1 utilizadas na procura de novas interações funcionam no sistema de Duplo- Híbrido não ativando a transcrição dos genes repórteres em cepa de levedura.

Na análise da biblioteca de cDNA de cérebro fetal humano foi possível detectar a interação da proteína DSCR1 com dois novos ligantes (proteínas UXT e APLP1).

O fato de não se encontrar interações com a proteína DCRA, não foi positivo no aspecto de achar uma possível função da proteína, mas, estabelecemos um grupo de proteínas falso positivos quando pescadas no método do Duplo- Híbrido.

As proteínas UXT e APLP1 interagem *in vivo* com a proteína DSCR1, sendo que a UXT também interage *in vitro*, o que abre caminho para novos estudos da proteína DSCR1 provavelmente relacionado no processo de transcrição.

6.0- Referências Bibliográficas

AGATEP, R., R.D. KIRKPATRICK, D.L. PARCHALIUK, R.A. WOODS, and R.D. GIETZ. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol. Technical Tips Online (<http://tto.trends.com>). (1998)

ALTSCHUL, STEPHEN, F., THOMAS, L., MADDEN, ALEJANDRO, A., SCHÄFFER, JINGHUI ZHANG, ZHENG ZHANG, WEBB MILLER, and LIPMAN, D. J., "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* v.25, p. 3389-3402, (1997).

ANTONARAKIS, S, E. Chromosome 21: from sequence to applications. *Curr Opin Genet Dev* 11:241-246 (2001).

ANTONARAKIS, S. E. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. *N Engl. J. Med.* 324: 872-876 (1991).

BARTEL, P. L., CHIEN, C. T., STERNGLANZ, R. & FIELDS, S. Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, ed. Hartley, D.A. (Oxford University Press, Oxford) pp 153–179 (1993a).

BARTEL, P., CHIEN, C. T., STERNGLANZ, R., FIELDS, S. Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14:920-924 (1993b).

BEALS, C. R., SHERIDAN, CM., TURCK, C.W., GARDNER, P., CRABTREE, G. R. Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science.* v.28; 275(5308):1930-4 (1997).

BECKER, S., GRONER, B., AND MULLER, C. W. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* 394: 145–151 (1998).

BRACHMANN, R. K., BOEKE, J. D. Tag games in yeast: the two-hybrid system and beyond. *Curr Opin Biotechnol.* 8(5):561-8 (1997).

BRENT, R. & PTASHNE, M. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43:729–736 (1985).

CASAS, C., MARTINEZ, S., PRITCHARD, M. A., FUENTES, J. J., NADAL, M., CHARDIN, E. Small GTP- binding proteins of the RAS family: A conserved functional mechanism? *Cancer Cells* v.3, p. 117-104 (1991).

CHEN, H. M., CHRAST, R., ROSSIER, C., GOS, A., ANTONARAKIS, S. E., KUDOH, J., YAMAKI, A., SHINDOH, N., MEADA, H., MINOSHIMA, S., and SHIMIZU, N. Single minded and Down syndrome? *Nat.Genet.* v10, p. 9–10 (1995)

CHIEN, C. T., BARTEL, P. L., STERNGLANZ, R. & Fields, S. The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* v.88, p.9578–9582, (1991).

CHRAST, R., SCOTT, H. S., CHEN, H., KUDOH, J., ROSSIER, C., MINOSHIMA, S., WANG, Y., SHIMIZU, N., AND ANTONARAKIS, S. E. (1997). Cloning of two human homologues of the *Drosophila* neuro-developmental regulator single-minded (*sim*) gene, SIM1 on chromosome 6q and SIM2 on 21q within the Down syndrome chromosomal region. *Genome Res.* 7: 615–624 (1997).

CHRISTIANSON, A. L. Down Syndrome in sub-Saharan Africa. *J. Med. Genet.* v.33, p. 89-92 (1996).

CRABTREE GR: Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J Biol Chem* 2001, v.276(4), p. 2313-2316.

CRABTREE, G. R. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca²⁺, calcineurin, and NF-AT. *Cell* v.96(5), p.611-614, (1999).

CRAWFORD, D.R., LEAHY, K.P., ABRAMOVA, N., LAN, L., WANG, Y., DAVIES, K. J. HAMSTER *Adapt78* mRNA is a Down syndrome critical region homologue that is inducible by oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* v. 342, p.6-12, (1997).

DELABAR, J. M., THEOPHILE, D., RAHMANI, Z., BLOUIN, J. L., PRIEUR, M., NOEL, B., SINET, P., M: Molecular mapping of twenty four features of Down Syndrome on chromosome 21. *Europ. J. Hum. Genet.* v.1, p. 114-124, (1993).

DOWN, J. L. Observation on an ethnic classification of idiots. *London Hospital Reports*, v3, p. 259-262 (1866).

DURFEE, T., BECHERER, K., CHEN, P. L., YEH, S. H., YANG, Y., KILBURN, A. E., LEE, W. H. & ELLEDGE, S. J. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Devel.* v.7, p.555–569 (1993).

EKI, T., ABE, M., FURUYA, K., AHMAD, I., FUJISHIMA, N., KISHIDA, H., SHIRATORI, A., ONOZAKI, T., YOKOYAMA, K., LE PASLIER, D., COHEN, D., HANAOKA, F., AND MURAKAMI, Y. A long-range physical map of human chromosome 21q22.1 band from the YAC continuum. *Mamm. Genome* v.7, p. 303–311 (1996).

EPSTEIN, C. J. Developmental genetics. *Experientia* 42:1117-1128 (1986).

ERMAK, G., HARRIS, C. D., DAVIES, K. J. The DSCR1 (*Adapt78*) isoform 1 protein calcipressin 1 inhibits calcineurin and protects against acute calcium-mediated stress damage, including transient oxidative stress. *FASEB J.* v. 16(8), p.814-24, (2002).

ERMAK, G., MORGAN, T. E., DAVIES, K. J. Chronic overexpression of the calcineurin inhibitory gene DSCR1 (*ADAPT78*) is associated with Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 276(42), p. 38787-38794 (2001).

FAGAN, R., FLINT, K. J., JONES, N. Phosphorylation of E2F-1 modulates its interaction with the retinoblastoma gene product and the adenoviral E4 19 kDa protein. *Cell* v.78, 799-811 (1994).

FAN, C. M., KUWANA, E., BULFONE, A., FLETCHER, C. F., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., CREWS, S., MARTINEZ, S., PUELLES, L., RUBENSTEIN, J., and TESSIER-LAVIGNE, M. Expression patterns of two murine homologs of *Drosophila* single-minded suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome. *Mol. Cell. Neurosci.* V.7, p. 1–16 (1996).

FEILOTTER, H. E., HANNON, G. J., RUDELLE, C. J., BEACH, D. Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res* v.22, 1502-1503 (1994).

FIELDS, S. & SONG, O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* v. 340, 245–247 (1989).

FINLEY, J. R. & BRENT, R. Interaction mating reveals binary and ternary connections between *Drosophila* cell cycle regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 91, 12980–12984 (1994).

FONG, C. T., BRODEUR, G. M. Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genet. Cytogenet.* V.28, p. 55-76 (1987).

FRASER, M., MITCHELL, A. Kalmuc idiocy: Report of a case with autopsy with notes on sixty-two cases. *J Ment Sci* v.22, p. 169±179 (1876).

FUENTES, J. J., GENESCA, L., KINGSBURY, T. M., CUNNINGHAM, K. W., PEREZ-RIBA, M., ESTIVILL, X., LUNA, S. DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Human Molecular Genetics* 9,11; 1681-1690 (2000).

FUENTES, J. J., PRITCHARD, M. A. and ESTIVILL, X. Genomic Organization, Alternative Splicing and Expression Patterns of the *dscr1* (Down Syndrome Candidate Region 1) Gene. *Genomics*. V. 44, n.3, p. 358-361 (1997).

FUENTES, J. J., PRITCHARD, M. A., PLANAS, A. A., BOSCH, A., FERRER, I., ESTEVILL, X. A new Gene from the Down Syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart *Hum. Mol. Genet.* v.4, 1935-1944 (1995).

GORLACH, J., FOX, D. S., CUTLER, N. S., COX, G. M., PERFECT, J. R., HEITMAN, J. Identification and characterization of a highly conserved calcineurin binding protein, CBP1/calciressin, in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* v.19(14):3618-3629, (2000).

GORLACH, J., FOX, D. S., CUTLER, N. S., COX, G. M., PERFECT, J. R., HEITMAN, J. Identification and characterization of a highly conserved calcineurin binding protein, CBP1/calciressin, in *Cryptococcus neoformans*. *EMBO J* v. 19, p. 3618-3629 (2000).

GUARENTE, L. Strategies for the identification of interacting proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* v. 90, p. 1639-1641 (1993).

GUIMERA, J., ARBONES, M., FLOREZ, J., SORIANO, E., ESTIVILL, X., LCANTARA, S. DSCR1, a novel endogenous inhibitor of calcineurin signaling, is expressed in the primitive ventricle of the heart and during neurogenesis. *Mech Dev* 101(1-2):289-292 (2001).

HALL, A. Rho GTPases and actin cytoskeleton. *Science* v.279, p. 509-514 (1998).

HALL, A. The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* 249: 635-640 (1990).

HARDY, S., SHENK, T. E2F from adenovirus-infected cells binds cooperatively to DNA containing two properly oriented and spaced recognition sites. *Mol Cell Biol* v.9, p.4495-4506 (1989).

HARPER, J. W., ADAMI, G. R., WEI, N., KEYOMARSI, K., ELLEDGE, S. J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* v.75, p. 805-816 (1993).

HASSOLD, T. & JACOBS, P. Trisomy in Man. *Annu. Rev. Genet.* V. 18, p. 69-97 (1984).

HATTORI, M., FUJIYAMA, A., TAYLOR, T. D., WATANABE, H., YADA, T., PARK, H. S., TOYODA, A., ISHII, K., TOTOKI, Y., CHOI, D. K., SOEDA, E., OHKI, M., TAKAGI, T., SAKAKI, Y., TAUDIEN, S., BLECHSCHMIDT, K., POLLEY, A., MENZEL, U., DELABAR, J., KUMPF, K., LEHMANN, R., PATTERSON, D., REICHWALD, K., RUMP, A., SCHILLHABEL, M., SCHUDY, A., ZIMMERMANN, W., ROSENTHAL, A., KUDOH, J., SCHIBUYA, K., KAWASAKI, K., ASAKAWA, S., SHINTANI, A., SASAKI, T., NAGAMINE, K., MITSUYAMA, S., ANTONARAKIS, S. E., MINOSHIMA, S., SHIMIZU, N., NORDSIEK, G., HORNISCHER, K., BRANT, P., SCHARFE, M., SCHON, O., DESARIO, A., REICHELT, J., KAUER, G., BLOCKER, H., RAMSER, J., BECK, A., KLAGES, S., HENNIG, S., RIESSELMANN, L., DAGAND, E., HAAF, T., WEHRMEYER, S., BORZYM, K., GARDINER, K., NIZETIC, D., FRANCIS, F., LEHRACH, H., REINHARDT, R., YASPO ML. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*, v40, 5 p. 311-319 (2000).

HELIN, K., HARLOW, E., FATTAEY, A. Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 13:6501-6508 (1993a).

HELIN, K., WU, C. L., FATTAEY, A. R., LEES, J.A., DYNLACHT, B. D., NGWU, C., HARLOW, E. Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev* 7:1850-1861 (1993b).

HOOK, E. G. Epidemiology of Down syndrome. In, Pueschel, S. M. and Rynders, J. E. (eds.): *Down Syndrome. Advances in Biomedicine and the Behavioral Sciences.* Cambridge: Ware Press (1982).

HOOK, E. G.; CROSS, P. K. AND SCHREINEMACHERS Chromosomal abnormality rates at amniocentesis and in live-born infants. *J.A.M.A.* 249, D. M. 2034-2038, (1983).

IWABUCHI, K., LI, B., BARTEL, P. & FIELDS, S. Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8:1693–1696 (1993).

JACOBS, P., BAIKIE, W., COURT-BROWN, W., STRONG, J. The somatic chromosomes in mongolism. *Lancet*, p. 710-711 (1959).

JAMES, P., HALIADAY, J. & CRAIG, E. A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144:1425–1436 (1996).

JOHNSTON, M. A Model Fungal Gene Regulatory Mechanism - The Gal Genes of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiological Reviews* 51: (4) 458-476 (1987).

KEEGAN, L., GILL, G. & PTASHNE, M. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231:699–704 (1986).

KINGSBURY, T. J., CUNNINGHAM, K.W. A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev* 14:1595-1604 (2000).

KOCH, C. A., ANDERSON, D., MORAN, M. F., ELLIS, C., PAWSON, T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science* 252:668-674 (1991).

KORENBERG, J. R. Toward a molecular understanding of Down syndrome. In; EPSTEIN, C. J., *The Phenotypic Man*. *Prog. Clin. Biol. Res*; 384 87-115 (1993).

KORENBERG, J., KAWASHIMA, H., PULST, S., IKEUCHI, T., OGASAWARA, N., YAMAMOTO, K., SCHONBERG, S., KOJIS, T., ALLEN, L., MAGENIS, E., IKAWA, H., EPSTEON, C. Molecular definition of the region of chromosome 21 that causes features of the Down Syndrome phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 236-246 (1990).

KORENBERG, J., PULST, S., KAWASHIMA, H., IKEUCHI, T., YAMAMOTO, K., OGASAWARA, N., SCHONBERG, S., WEST, R., KOJIS, T. & EPSTEIN C. : Familial Down Syndrome With normal karyotype: definition of the region *Am. J. Hum. Genet.* 43, A110 (1988).

KRIVIT, W., GOOD, R. Simultaneous occurrence of mongolism in leukemia: report of a nationwide survey. *Am J Pediatr*, v. 94, p. 289-293 (1957).

LABIB, K., NURSE P; Bring on the phosphatases. *Curr. Biol.*; 3; 164-166 (1993).

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v.227, p. 680-685, (1970).

LAZAR, T., GOTTE, M., and GALLWITZ, D. Vesicular transport: how many Ypt/RAB- GTPases make a eucaryotic cell? Trends in Biochemical Sciences. 22: 468-472 (1997).

LEJEUNE J, TURPIN, R., GAUTIER M. : Le Mongolisme. Premier Exemple Daberration Autosomique Humaine. Annales de Genetique 1: (2) 41-49 (1959).

LENKKERI, U.; KESTILA, M.; LAMERDIN, J.; MCCREADY, P.; ADAMSON, A.; OLSEN, A.; TRYGGVASON, K. Structure of the human amyloid-precursor-like protein gene APLP1 at 19q13.1. Hum. Genet. 102: 192-196 (1998).

LI, B. & FIELDS, S. Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 T antigen by using the yeast two-hybrid system. FASEB J. 7:957-963 (1993).

LIU, J., MASUDA, E. S., TSURUTA, L., ARAI, N., ARAI, K. Two independent calcineurin-binding regions in the Nterminal domain of murine NF-ATx1 recruit calcineurin to murine NF-ATx1. J Immunol 162:4755-4761 (1999).

LIU, L. AND MCKEEHAN, W.L. Sequence Analysis of LRPPRC and Its SEC1 Domain Interaction Partners Suggests Roles in Cytoskeletal Organization, Vesicular Trafficking, Nucleocytosolic Shuttling, and Chromosome Activity. Genomics 79, 124-36 (2002).

MA, J.; PTASHNE, M. (1987) Deletion Analysis of GAL4 Defines 2 Transcriptional Activating Segments. Cell 48: (5) 847-853.

McCORNICK, M., SCHINZEL, A., PETERSEN, M., STTETTEN, G., DRISCOLL, D., CANTU, E., TRANEBJAERG, L., MIKKELSEN, M., WALTKINS, P., ANTONORAKIS, S. Molecular genetic approach to the characterization of the Down Syndrome region of chromosome 21. Genomics 5: 325-331, (1989).

MIKKELSEN, M. Down's syndrome cytogenetic epidemiology. Hereditas 86:45-59 (1977).

MIYAZAKI, T., KANOU, Y., MURATA, Y., OHMORI, S., NIWA, T., MAEDA, K., YAMAMURA, H., SEO, H. Molecular cloning of a novel thyroid hormone-responsive gene, ZAKI-4, in human skin fibroblasts. J Biol Chem 271:14567-14571 (1996).

NAKAMURA, A, HATTORI, M., SAKAKI, Y. Isolation of a novel human gene from Down syndrome critical region of chromosome 21q22.2. J. Biochem. (Tokio). 122 (4): 872-7, (1997b).

NAKAMURA, A. , HATTORI, M., SAKAKI, Y. A novel gene isolated from human placenta located in Down syndrome critical region on chromosome 21. DNA Res. 4 (5): 321-4, (1997a).

PASSER, B., PELLEGRINI, L., RUSSO, C., SIEGEL, R. M., LENARDO, M. J., SCHETTINI, G., BACHMANN, M., TABATON, M., AND D'ADAMIO, L. J. Alzheimers Dis. v.2, p.289-301, (2000).

PATIL, N., COX, D. R., BHAT, D., FAHAM, M., MYERS, R. M., AND PETERSON, A. S. A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nat. Genet.* 11: 126–129 (1995).

PELECH, S. L., SANGHERA, J. S. Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signaling. *Trends Biochem Sci* 17:233-238 (1992b).

PELECH, S. L., SANGHERA, J.S. MAP kinases: charting the regulatory pathways. *Science* 257:1355-1356 (1992a).

PFISTER S, MACHADO-SANTELLI G, WON HAN S, HENRIQUE-SILVA F. Mutational analyses of the signals involved in the subcellular location of dscr1. *BMC CELL BIOL.* 11;3(1):24 (2002).

RAHMANI, Z.; BLOUIN, J.L.; CRÉAU-GOLDBERG, N.; WATKINS, P.C.; MATTEI, J.F.; POSSONNIER, M., PRIEUR, M.; CHETTOUH, Z.; NICOLE, A.; SINET, P.M. 7 DELBAR, J.M. Critical role of the D21s55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 5958-5962 (1989).

RAO, V. N., MODI, W. S., DRABKIN, H. D., PATTERSON, D., O'BRIEN, S. J., PAPAS, T. S., AND REDDY, E. S.. The human *erg* gene maps to chromosome 21, band q22: Relationship to the 8;21 translocation of acute myelogenous leukemia. *Oncogene* 3: 497–500 (1988).

ROBINSON, L. L. Down syndrome and leukemia. *Leukemia* 6: 5-7 (1992).

ROTHERMEL BA, VEGA RB, YANG J, WU H, BASSEL-DUBY R, WILLIAMS RS: A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol Chem* 275(12):8719-8725 (2000).

ROTHMAN, J.E.(1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372: 55-63 (1994).

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. : “Molecular Cloning: A laboratory manual”, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)

SCHROER A, SCHNEIDER S, ROPERS H, NOTHWANG H. Cloning and Characterization of UXT, a Novel Gene in Human Xp11, which Is Widely and Abundantly Expressed in Tumor Tissue *Genomics* 56, 340-343 (1999).

SHENOLIKAR, S; Protein serine/threonine phosphatases- news avenues for cell regulation. *Ann. Rev. Cell. Biol.* 10; 55-86 (1994).

SISODIA, S. S., and ST GEORGE-HYSLOP, P. H. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 281-290 (2002).

SONGYANG, Z., SHOELSON, S. E., CHAUDHURI, M., GISH, G., PAWSON, T., HASER, W. G., KING, F., ROBERTS, T., RATNOFSKY, S., LECHLEIDER, R. J. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72:767-778 (1993).

STRIPPOLI, P., LENZI, L., PETRINI, M., CARINCI, P., ZANNOTTI, M. A new gene family including DSCR1 (Down Syndrome Candidate Region 1) and ZAKI-4: characterization from yeast to human and identification of DSCR1-like 2, a novel human member (DSCR1L2). *Genomics* 64:252-263 (2000a).

STRIPPOLI, P., PETRINI, M., LENZI, L., CARINCI, P., ZANNOTTI, M. The murine DSCR1-like (Down syndrome candidate region 1) gene family: conserved synteny with the human orthologous genes. *Gene* 257:223-232 (2000b).

SUZUKI, Y., AOKI, Y., ISHIDA, Y., CHIBA, Y., IWAMATSU A., KISHINO, T., NIIKAWA, N., MATSUBARA, Y., and NARISAWA, K. Isolation and characterization of mutations in the human holocarboxylase synthetase cDNA. *Nat. Genet.* 8: 122–128 (1994).

TIMMERMAN, L. A., CLIPSTONE, N. A., HO SN, NORTHROP, J. P., CRABTREE, G. R., Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca²⁺ signals and immunosuppression. *Nature*. Oct 31;383(6603):837-40 (1996).

TIRODE, F., MALAGUTI, C., ROMERO, F., ATTAR, R., CAMONIS, J., EGLY, J. M. A conditionally expressed third partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three-hybrid system. *J Biol Chem.* 12;272(37):22995-9 (1997).

TSUKAHARA F, URAKAWA I, HATTORI M, HIRAI M, OHBA K, YOSHIOKA T, SAKAKI Y, MURAKI T. Molecular characterization of the mouse mtpd gene, a homologue of human TPRD: unique gene expression suggesting its critical role in the pathophysiology of Down syndrome. *J Biochem (Tokyo)*. 123(6) p.1055-63 (1998).

UETZ P, GIOT L, CAGNEY G, MANSFIELD TA, JUDSON RS, KNIGHT JR, LOCKSHON D, NARAYAN V, SRINIVASAN M, POCHART P, QURESHI-EMILI A, LI Y, GODWIN B, CONOVER D, KALBFLEISCH T, VIJAYADAMODAR G, YANG M, JOHNSTON M, FIELDS S, ROTHBERG JM. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. Feb 10;403(6770):623-7 (2000).

VAN AELST, L., BARR, M., MARCUS, S., POLVERINO, A. & WIGLER, M. Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6213–6217(1993).

VEGA RB, YANG J, ROTHERMEL BA, BASSEL-DUBY R, WILLIAMS RS. Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. *J Biol Chem.* 16;277(33):30401-7 (2002).

VOGEL, F., MOTULSKY, A. G. *Human genetics : problems and approaches*. 3rd ed, Springer, p.851 (1996).

WASCO, W., BROOK, J. D.; TANZI, R. E. The amyloid precursor-like protein (APLP) gene maps to the long arm of human chromosome 19. *Genomics* 15: 237-239 (1993).

WASCO, W., BUPP, K., MAGENDANTZ, M., GUSELLA, J. F., TANZI, R. E., SOLOMON, F. Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer-associated amyloid beta-protein precursor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 10758-10762 (1992).

WISNIEWSKI, K. E., WISNIEWSKI, H. M., WEN, G. Y. Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann. Neurol.* 17: 278-282 (1985).

YAN, G. J., ROTHERMEL, B., VEGA, R. B., FREY, N., MCKINSEY, T. A., OLSON, E. N., BASSEL-DUBY, R., WILLIAMS, R. S. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MC1P1 and MC1P2 in striated muscles. *Circ Res* 87(12):E61-E68 (2000).

YE, Q., & WORMAN, H. J. Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Experimental Cell Res.* v.219, p. 292-298, (1995).