

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**NOVO SISTEMA *TWO-HYBRID* BACTERIANO BASEADO  
NA MANIPULAÇÃO DA DEGRADAÇÃO PROTEICA**

**SORAIA RAFAELA SANTIAGO DE OLIVEIRA**

MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA

2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**NOVO SISTEMA *TWO-HYBRID* BACTERIANO BASEADO  
NA MANIPULAÇÃO DA DEGRADAÇÃO PROTEICA**

**SORAIA RAFAELA SANTIAGO DE OLIVEIRA**

DISSERTAÇÃO ORIENTADA PELO PROF. DOUTOR JOÃO GONÇALVES (FACULDADE  
DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA) E PELA PROF. DOUTORA MARIA DO  
CÉU CORREIA (FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DE LISBOA)

**MESTRADO EM BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA**

2007

## ÍNDICE GERAL

Índice Geral	i
Índice de figuras	iii
Índice de tabelas	iv
Abreviaturas	v
Agradecimentos	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
1. Introdução	1
1.1 Introdução geral	1
1.2 Anticorpos	1
1.3 Estrutura e organização genética dos anticorpos	2
1.4 Produção de anticorpos policlonais, monoclonais e recombinantes	4
1.5 Fragmentos de anticorpos recombinantes	5
1.6 Anticorpos intracelulares	6
1.7 Técnicas para detectar as interacções entre duas proteínas	6
1.8 Objectivo do estudo	9
2. Materiais e Métodos	10
2.1 Bactérias, plasmídios e <i>primers</i>	10
2.2 Isolamento, manipulação de DNA e transformação de estirpes bacterianas	10
2.3 Soluções, meios e condições de cultura das estirpes bacterianas	10
2.4 Construção de plasmídios	11
2.5 Ensaio de avaliação em placa da resistência ao cloranfenicol	12
2.6 Ensaio de avaliação da actividade da $\beta$ -galactosidase	13
2.7 Ensaio de avaliação da expressão das proteínas após indução da Proteína SspB	14
3. Resultados	16
3.1 Construções plasmídicas	16
3.2 Optimização do novo sistema <i>two-hybrid</i> bacteriano	16
3.2.1 Colónias isoladas ou população total de bactérias transformadas	17
3.2.2 Concentração de IPTG antes e depois da diluição da cultura	18
3.2.3 Processo de adição de antibióticos e IPTG após a transformação	18
3.2.4 Temperatura de crescimento após a diluição da cultura	19
3.2.5 Concentração de arabinose usada para induzir o promotor P <sub>BAD</sub>	19
3.2.6 Tempo de incubação até plaqueamento, após indução com arabinose	20

3.2.7 Concentração de cloranfenicol e presença de arabinose nas placas LB-agar	20
3.3 Avaliação da resistência ao cloranfenicol por ensaio em placa	21
3.4 Avaliação da actividade da $\beta$ -galactosidase	22
3.5 Verificação da degradação das proteínas após indução da proteína SspB	24
4. Discussão e Conclusões	26
5. Perspectivas futuras	28
6. Bibliografia	29
7. Anexos-figuras	31
8. Anexos-tabelas	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Diagrama esquemático de um anticorpo (IgG)	3
Figura 1.2 – Esquema representativo da engenharia de anticorpos	5
Figura 1.3 – Formatos de anticorpos recombinantes	5
Figura 1.4 – Modelo de degradação para detectar interacções entre anticorpo e antigénio	9
Figura 2.1 – Representação esquemática do procedimento dos ensaios em placa	13
Figura 2.2 – Representação esquemática do procedimento para os ensaios da avaliação da $\beta$ -galactosidase	14
Figura 2.3 – Representação esquemática do procedimento para os ensaios de expressão	15
Figura 3.1 – Representação dos plasmídios utilizados na optimização do novo sistema <i>two-hybrid</i>	16
Figura 3.2 – Avaliação da resistência ao cloranfenicol em placa LB-agar	21
Figura 3.3 – Avaliação da actividade da $\beta$ -galactosidase	23
Figura 3.4 – Avaliação da degradação das proteínas por ensaio de expressão	24
Figura 7.1 – Organização dos segmentos génicos da linha germinal das imunoglobulinas de ratinho	31
Figura 7.2 – Ciclo de <i>phage display</i> para identificar fagos que apresentam à superfície anticorpos que se ligam com afinidade ao antigénio	31
Figura 7.3 – Esquema representativo da degradação de proteínas com o sinal DAS+4	31

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 – Resultados esperados	17
Tabela 3.2 – Resultados obtidos para as diferentes concentrações de IPTG antes e depois do crescimento a 25°C	18
Tabela 3.3 – Resultados obtidos para as temperaturas de 30 e 37°C, após a diluição da cultura	19
Tabela 3.4 – Resultados obtidos para as diferentes percentagens de arabinose testadas	19
Tabela 3.5 – Resultados obtidos no ensaio para determinar qual o melhor tempo de incubação, após indução com arabinose e antes de plaquear	20
Tabela 3.6 – Resultados obtidos para as diferentes concentrações de cloranfenicol em presença e ausência de arabinose	21
Tabela 8.1 – Vantagens e desvantagens dos métodos para estudar interações proteína-proteína	32
Tabela 8.2 – Enzimas de restrição utilizadas neste trabalho	33
Tabela 8.3 – Estirpes bacterianas e plasmídios utilizados neste trabalho	33
Tabela 8.4 – <i>Primers</i> utilizados neste trabalho	34
Tabela 8.5 – Anticorpos utilizados nos <i>Western blots</i>	34

## ABREVIATURAS

Abs	absorvância
Amp	ampicilina
Ac	anticorpo
Ag	antígeno
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
CDR	regiões determinantes de complementaridade
C <sub>H</sub>	região constante da cadeia pesada do anticorpo
C <sub>L</sub>	região constante da cadeia leve do anticorpo
Clo	cloranfenicol
DNA	ácido desoxirribonucleico
D.O.	densidade óptica
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fab	fracção de ligação ao antígeno
F <sub>C</sub>	fragmento constante
Fig.	figura
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
Fv	fracção variável do anticorpo
H	cadeia pesada do anticorpo
Ig	imunoglobulina
IPTG	isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
Kan	canamicina
kDa	kiloDalton
L	cadeia leve do anticorpo
LB-agar	meio sólido LB com 1,2% de Bacto Agar
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
mL	mililitro
nM	nano-Molar
p	plasmídio
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação de polimerização em cadeia
RNA	ácido ribonucleico
RBS	local de ligação ao ribossoma
scFV	fragmento variável de cadeia simples do anticorpo
SDS-PAGE	electroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SspB	<i>stringent starvation protein B</i>
TBS-T	0.1% de Tween-20 em TBS
Tet	tetraciclina
V	região variável do anticorpo
V <sub>H</sub>	região variável da cadeia pesada do anticorpo
VIH-1	vírus da imunodeficiência humana do tipo 1
μg	micrograma
μL	microlitro

#### Aminoácidos

A	aminoácido alanina
D	aminoácido aspartato
E	aminoácido glutamato
N	aminoácido asparagina
S	aminoácido serina
Y	aminoácido triptofano

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer ao Professor Doutor João Gonçalves por ter aceite ser meu orientador e por me ter dado a oportunidade de realizar este trabalho, à Professora Doutora Maria do Céu Correia por ter aceite ser minha orientadora interna e ao Professor Doutor José Moniz Pereira por permitir que realizasse este trabalho na URIA-CPM da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

Agradeço ao Fred, à Sara e à Sylvie pelas discussões e trocas de ideias e pela força que me deram nos momentos mais difíceis deste trabalho, bem como aos restantes colegas do laboratório do Professor Doutor João Gonçalves, da Professora Doutora Madalena Pimentel e da Professora Doutora Cecília.

Agradeço também aos meus amigos, pelo apoio incondicional.

Aos meus pais e irmão o meu agradecimento muito especial. Obrigada pelo apoio, paciência, amizade, força, incentivo e compreensão demonstrados.

Sem todos estes colegas, amigos e familiares, este trabalho teria sido mais difícil de concretizar!

## RESUMO

A expressão de anticorpos intracelulares em eucariotas apresenta um enorme potencial na genómica funcional e na terapia génica. Métodos como o *phage display* e os sistemas *two-hybrid* permitem a selecção de anticorpos intracelulares com elevada afinidade e especificidade contra um dado antigénio. Contudo, nestes métodos a orientação espacial do anticorpo face ao antigénio encontra-se comprometida, dado que o anticorpo se encontra em fusão com uma outra proteína. Assim, torna-se importante desenvolver um novo método, em que o anticorpo possa ser expresso sem estar ligado a outra proteína, ou seja, um método que permita a selecção de anticorpos específicos contra um antigénio, sem que haja interferência da orientação espacial do anticorpo. Nesta dissertação de mestrado é apresentado um novo sistema *two-hybrid*, em que a via de degradação ClpXP é manipulada, no sentido de ser possível detectar fortes interacções proteína-proteína (como por exemplo, interacções entre anticorpo e antigénio). Neste sistema, o antigénio é expresso em fusão com um repressor (proteína Arc do fago P22) e o anticorpo em fusão com um sinal de degradação (DAS+4). Também é assegurada a expressão simultânea da proteína SspB (*stringent starvation protein B*) por indução com arabinose. Se ocorrer interacção entre o anticorpo e o antigénio, a proteína SspB reconhece o sinal e encaminha o complexo Arc-antigénio-anticorpo-DAS+4 para degradação. Como resultado, o repressor Arc, em fusão com o antigénio, deixa de reprimir um promotor que regula a resistência ao cloranfenicol e a bactéria, onde essa interacção ocorreu, torna-se resistente ao cloranfenicol. O trabalho experimental realizado permitiu confirmar esta interacção e o método apresentado pode ser considerado como um bom sistema para isolar anticorpos intracelulares com elevada afinidade, especificidade e estabilidade.

**Palavras-chave:** interacção entre antigénio e anticorpo; sistema *two-hybrid*; sistema de degradação ClpXP; repressor Arc; proteína SspB.

## **ABSTRACT**

The expression of intrabodies [intracellular antibodies (Ab)] in eukaryotes presents an enormous potential in functional genomics and therapeutics. Methods as *phage display* and *two-hybrid* systems allow us to select intrabodies with great affinity and specificity against an antigen (Ag). However, in these methods the spatial orientation of the Ab facing an Ag is compromised, since the Ab is fused to another protein. Thus, it is essential to develop a new method where the Ab can be expressed without being attached to a protein, one that allows the selection of good binders against an Ag without the interference of the Ab spatial orientation. Here, we present a novel bacterial *two-hybrid* system where the degradation pathway ClpXP is manipulated in order to detect strong protein-protein interactions (eg. Ab-Ag). In this system, we express an Ag in fusion with a repressor (Arc of P22 Phage) and an Ab with a degradation tag (DAS+4). At the same time we induce (with arabinose) the expression of the SspB protein (stringent starvation protein B). If there is an interaction between the Ab and Ag, then SspB recognizes the signal and leads the complex Ab-Ag for degradation. As a result, the Ag-trans-inhibitor protein no longer represses the promoter that regulates the resistance to chloramphenicol and the bacteria where the Ab-Ag interaction occurred becomes resistant to the chloramphenicol. In our experiments we have confirmed this interaction and we can envision this method as a potent system to isolate intrabodies with high affinity, specificity and stability.

**Key-words:** antibody-antigen interaction; *two-hybrid* system; ClpXP degradation system; Arc repressor; SspB protein.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Introdução Geral**

A genómica funcional, especialmente o estudo das interacções específicas entre proteínas, tem despertado grande interesse junto da comunidade científica, dado que estas interacções apresentam um papel central em quase todos os processos biológicos (por exemplo, replicação e transcrição de DNA, síntese proteica e respostas imunes) [1].

As interacções proteína-proteína podem ser estudadas, quer por meio de ensaios genéticos, quer bioquímicos. Estes últimos, incluem técnicas como separação cromatográfica, co-immunoprecipitação e cromatografia por afinidade. Nos ensaios genéticos, as interacções são detectadas com base na diferença entre as propriedades das proteínas individualmente e, após a mistura destas. Neste tipo de ensaio é utilizada, por exemplo, a técnica FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) [2].

Em 1989, Fields e Song revolucionaram o modo de estudar interacções proteína-proteína, através do desenvolvimento de uma técnica genética que permite detectar interacções entre dois polipéptidos, *in vivo*, em leveduras [3]. Esta técnica designa-se por sistema *two-hybrid* e consiste na co-expressão, numa dada célula, de duas proteínas híbridas que, após interacção, restauram um dado fenótipo nessa mesma célula [1, 3]. Após este trabalho pioneiro, este método tem sido melhorado, sendo diversas as suas aplicações, desde a identificação de parceiros de algumas proteínas a mapeamento de regiões de interacção entre proteínas conhecidas [1]. O sucesso desta técnica estimulou o desenvolvimento de outras técnicas semelhantes, como os sistemas *two-hybrid* em bactérias. As aplicações destes novos sistemas bacterianos são idênticas às dos sistemas em levedura. No entanto, os sistemas em bactérias (nomeadamente em *Escherichia coli*) representam um modo mais simples e rápido de estabelecer e estudar interacções *in vivo* entre duas proteínas ou moléculas [1].

Uma das aplicações destes sistemas poderá ser ao nível da terapia génica, através da detecção e estudo das interacções entre antigénios e anticorpos, sendo esta aplicação de grande interesse para a Unidade de Retrovírus e Infecções Associadas (URIA) do Centro de Patogénese Molecular (CPM) da Faculdade de Farmácia de Lisboa. Nesta dissertação, será apresentado e discutido um novo sistema *two-hybrid* bacteriano para a selecção de anticorpos intracelulares capazes de reconhecer antigénios citoplasmáticos.

### **1.2 Anticorpos**

Os anticorpos (Ac) são glicoproteínas da família das imunoglobulinas, produzidos pelos

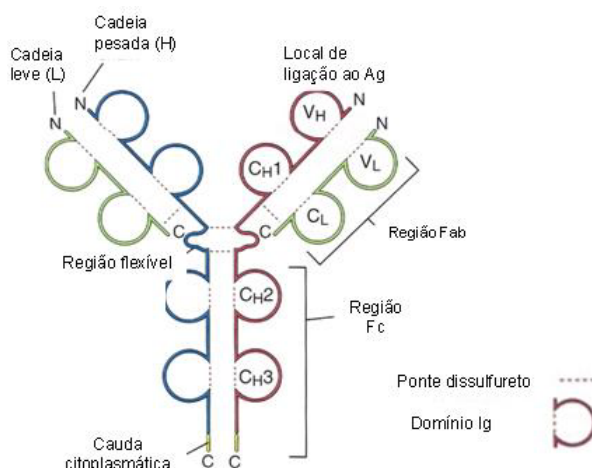
linfócitos B durante a resposta imunitária humoral. Estas moléculas têm um papel crucial no sistema imunitário e a sua principal função consiste em reconhecer especificamente antigénios (moléculas ou corpos reconhecidos como estranhos, ao entrarem em contacto com o organismo), ligando-se a estes com elevada afinidade. Os Ac podem ser secretados ou expressos à superfície dos linfócitos B. Assim, os Ac que ficam associados à membrana funcionam como receptores que medeiam a activação dos linfócitos B, e os que são secretados para o sangue ou secreções mucosas funcionam como mediadores da imunidade humoral por desencadear diversos mecanismos efectores (activação do sistema complemento, activação dos linfócitos T auxiliares, ou indução da fagocitose por macrófagos, entre outros), proporcionando assim a eliminação do antigénio (Ag) que reconheceram [4-7].

Os Ac são as moléculas da imunidade humoral que reconhecem maior número de estruturas antigénicas diferentes, conseguindo inclusivamente distinguir Ag proteicos que diferem em apenas um aminoácido [4]. Todas estas características, juntamente com o facto de serem moléculas altamente estáveis e facilmente manipuláveis por engenharia genética, fazem dos anticorpos uma opção muito atractiva, no sentido de poderem ser utilizados em diversas aplicações terapêuticas e de diagnóstico [6, 8].

### **1.3 Estrutura e organização genética dos anticorpos**

A produção e a manipulação de Ac têm-se desenvolvido como consequência de um conhecimento mais profundo da sua funcionalidade estrutural e organização genética.

Um anticorpo típico (Fig. 1.1) consiste em dois fragmentos de ligação ao Ag (Fab), que incluem a região variável (Fv – fragmento variável) que determina a especificidade do anticorpo, ligados por uma região flexível a um fragmento constante (Fc) que determina a função efectora do anticorpo [5, 9]. Esta estrutura de anticorpo compreende quatro cadeias polipeptídicas, ou seja, duas cadeias leves (L de *light*) iguais e de baixo peso molecular (24 kDa), que se encontram presentes na forma  $\lambda$  ou  $\kappa$ , e duas cadeias pesadas (H de *heavy*) iguais de elevado peso molecular (55-70 kDa) que existem nas formas  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , consoante a classe a que o anticorpo pertence [4, 10]. A ligação entre a cadeia L e a cadeia H é feita por uma ponte dissulfureto e as duas cadeias H também se ligam entre si por, pelo menos, uma ponte dissulfureto [4]. Cada forma, ou isotipo, da cadeia L pode combinar-se com qualquer isotipo da cadeia H. Deste modo, cada cadeia leve associa-se com a região amino-terminal da cadeia pesada, formando uma unidade Fab. As regiões terminais carboxilo, de ambas as cadeias pesadas, constituem a unidade Fc [4, 5].



**Fig. 1.1 – Diagrama esquemático de um anticorpo (IgG).** Abreviaturas: C, região carboxi-terminal;  $C_H$ , região constante da cadeia pesada do anticorpo;  $C_L$ , região constante da cadeia leve do anticorpo; Fab, fracção de ligação ao antigénio; Fc, fragmento constante; Ig, imunoglobulina; N, região amino-terminal;  $V_H$ , região variável da cadeia pesada do anticorpo;  $V_L$ , região variável da cadeia leve do anticorpo. Adaptado de [4].

As cadeias L, tal como as cadeias H encontram-se divididas em domínios proteicos de cerca de 110 aminoácidos, sendo as cadeias leves constituídas por dois domínios, um amino-terminal variável ( $V_L$ ) e um constante ( $C_L$ ) e as cadeias pesadas por quatro, um domínio amino-terminal variável ( $V_H$ ) e três domínios constantes ( $C_H1$ ,  $C_H2$ ,  $C_H3$ ). Os termos, variável e constante, referem-se à variação da sequência de aminoácidos entre Ac de diferentes especificidades [4, 5].

A fracção variável do anticorpo (Fv) não apresenta uma variabilidade homogénea, dado que existem três segmentos, designados por regiões determinantes de complementaridade (CDR), que apresentam maior variabilidade que a restante fracção variável. As CDRs são segmentos que conferem maior grau de diversidade e que definem a especificidade de ligação do Ac ao Ag. Estas regiões encontram-se, por sua vez, intercaladas por quatro segmentos muito conservados (denominados regiões *framework*) [4].

Uma peculiaridade do sistema imunitário consiste na sua capacidade de gerar uma enorme diversidade genética de imunoglobulinas. Estima-se que um só indivíduo, em toda a sua vida, possa produzir entre 10 a 300 milhões de Ac diferentes. Esta capacidade do sistema imunitário tem sido estudada e os principais mecanismos responsáveis por essa enorme variabilidade genética são: a existência de múltiplos segmentos de genes nas células germinais (Fig. 7.1 em anexo), a recombinação aleatória V-(D)-J, a flexibilidade de junção dos segmentos, a adição de nucleótidos P e N, a hipermutação somática e a associação recombinatória das cadeias leves e pesadas [4, 5, 11].

### **1.4 Produção de anticorpos policlonais, monoclonais e recombinantes**

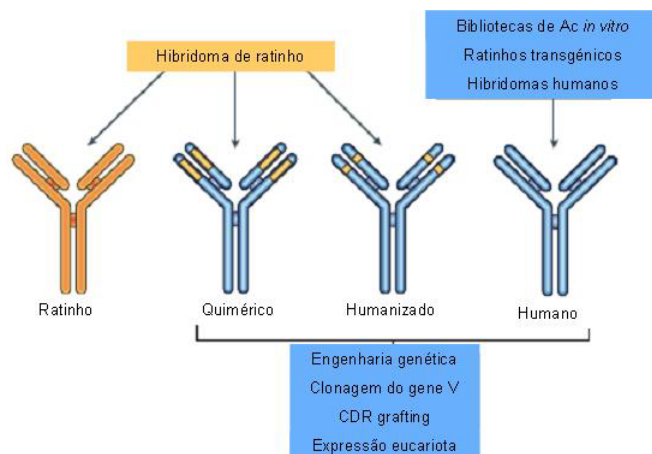
Tendo em vista a utilização dos anticorpos como uma terapêutica dirigida, altamente específica e com baixa citotoxicidade, novos métodos de obtenção e produção de anticorpos com especificidades pré-definidas têm vindo a ser desenvolvidos [9].

A maioria dos Ag possui diversos epitopos, o que faz com que no interior de um organismo, estes induzam a proliferação e a diferenciação de vários clones de linfócitos B, cada um com origem num linfócito B que reconhece um epitopo particular e produz Ac específicos para esse epitopo. Deste modo, o conjunto de Ac resultante da selecção clonal de vários linfócitos B origina um soro policlonal que é constituído por uma variedade de Ac específicos para diferentes epitopos do mesmo antigénio [5].

No entanto, para utilizações em terapia, diagnóstico e investigação este soro policlonal não traz muitas vantagens, dado que apresenta uma mistura pouco definida e pouco homogénea de Ac. Estas desvantagens são ultrapassadas com a utilização de Ac monoclonais. Estes Ac são específicos para um epitopo de um Ag e são produzidos por um só linfócito B [4, 10].

Um passo importante para o aparecimento da terapia com Ac monoclonais surgiu com a tecnologia de hibridomas em ratinho, desenvolvida em 1975 por Köhler e Milstein [9]. O método consiste na fusão entre um linfócito B imunizado e uma célula de mieloma imortal. A célula híbrida resultante possui as propriedades de crescimento da célula mielóide (imortalidade) e a capacidade de secretar o Ac que era produzido pelo linfócito B [10].

Os anticorpos monoclonais obtidos por esta via apresentaram limitações ao nível terapêutico, devido aos reduzidos tempos de permanência no soro, à incapacidade de activarem as funções efectoras humanas e à produção de Ac humanos anti-ratinho [9]. De modo a ultrapassar estas barreiras, e como consequência do desenvolvimento das tecnologias de DNA recombinante, geraram-se Ac quiméricos (constituídos por regiões Fc humanas e regiões Fv de ratinho), Ac humanizados (Ac humanos em que as CDRs são de ratinho) e Ac completamente humanos. Estes últimos, podem ser gerados por selecção de fragmentos de Ac humanos a partir de bibliotecas *in vitro*, por meio de ratinhos transgénicos ou por selecção a partir de hibridomas humanos (Fig. 1.2, na página seguinte) [9, 10]. Toda esta evolução permitiu o começo de uma nova fase de produção de anticorpos monoclonais, designada por tecnologia de anticorpos recombinantes.

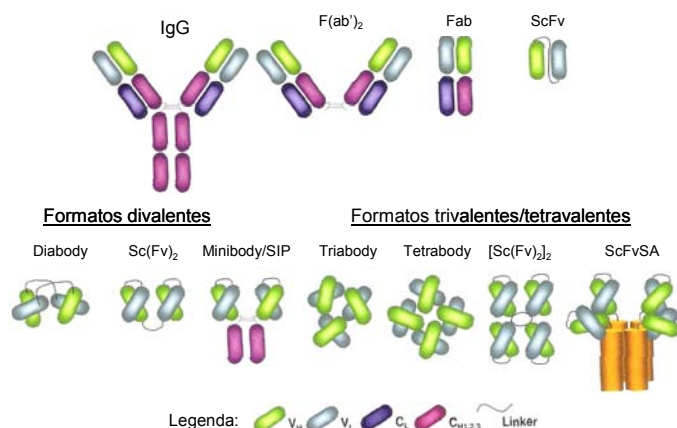


**Fig. 1.2 – Esquema representativo da engenharia de anticorpos.** Neste esquema estão referidas diversas técnicas para gerar Ac de ratinho (a laranja), Ac quiméricos em que a região Fc é humana (azul) e a região Fv é de ratinho (laranja), Ac humanizados (Ac humanos (azul) com CDR de ratinho (laranja)) e Ac completamente humanos (azul). Abreviaturas: Ac, anticorpo; CDR, região determinante de complementaridade; V, região variável do anticorpo. Adaptado de [9].

### 1.5 Fragmentos de anticorpos recombinantes

Até ao aparecimento da tecnologia de Ac recombinantes, as terapêuticas baseadas em Ac não avançaram muito. Mas, após o advento desta tecnologia, teoricamente, qualquer Ac com as características desejadas poderia ser produzido por engenharia genética, podendo-se alterar o tamanho do Ac, a sua afinidade e avidéz (propriedade relacionada com a força de interacção Ag-Ac). Estas duas últimas propriedades podem influenciar a fármaco-cinética e a fármaco-dinâmica do Ac, no entanto as propriedades de ligação ao Ag mantêm-se [10].

Os fragmentos de Ac recombinantes mais utilizados são os Fab (60kDa) e os scFv (fragmento variável de cadeia simples, 30kDa). Os scFv são compostos por regiões  $V_H$  e  $V_L$  dos fragmentos Fv, ligados por um péptido hidrofílico e flexível. Estes fragmentos scFv podem também ser melhorados em relação à avidéz, associando-se duas ou mais moléculas de scFv (Fig. 1.3) [10, 12].



**Fig. 1.3 – Formatos de anticorpos recombinantes.** Abreviaturas:  $C_H$ , região constante da cadeia pesada do anticorpo;  $C_L$ , região constante da cadeia leve do anticorpo;  $V_H$ , região variável da cadeia

pesada do anticorpo;  $V_L$ , região variável da cadeia leve do anticorpo. Adaptado de [10].

Os fragmentos Fab e scFv apresentam algumas vantagens em relação às imunoglobulinas, como por exemplo, a taxa de penetração nos tecidos é superior, não são produzidos os efeitos mediados pelo Fc, facto que minimiza a imunogenicidade do fragmento recombinante, e os Ac Fab ou scFv podem ser produzidos rapidamente em procariontes, inclusivamente em *E. coli*. Uma desvantagem relaciona-se com o tempo curto de meia-vida *in vivo*, destes fragmentos, aquando em circulação no sangue [12].

### **1.6 Anticorpos intracelulares**

Os anticorpos intracelulares (na sua maioria scFv) são Ac expressos no interior da célula [11, 13, 14]. São normalmente desenvolvidos a partir de bibliotecas de genes de Ac, que foram expostas a um determinado antígeno celular. Ao serem expressos, estes Ac apresentam a capacidade de neutralizar o Ag intracelular e/ou interferir com determinadas interacções proteína-proteína [11, 14]. Estas propriedades tornam os Ac intracelulares muito promissores nas áreas da genómica e proteómica funcional [11, 14, 15]. Na área da terapia génica, alguns investigadores já apresentaram resultados promissores de Ac intracelulares com capacidades terapêuticas em doenças infecciosas e cancerígenas [16-21].

Um dos problemas dos anticorpos intracelulares é o ambiente redutor do citoplasma das células animais [11]. O citoplasma constitui um ambiente “agressivo” para o Ac, pois num ambiente redutor as ligações dissulfureto dos domínios  $V_H$  e  $V_L$  do Ac não se formam [11, 14, 22, 23]. Consequentemente, o Ac pode ter dificuldade em adquirir a configuração correcta e, a solubilidade, a expressão e o tempo de meia-vida dos Ac podem diminuir [14]. Estes problemas podem impedir a utilização destes Ac em terapia génica, dado que também poderão afectar a capacidade de neutralizar o Ag [11]. Para ultrapassar estas limitações, investigadores e empresas de biotecnologia têm desenvolvido esforços para implementar novas estratégias que permitam seleccionar Ac cada vez mais pequenos, robustos e com propriedades neutralizantes em ambiente redutor.

### **1.7 Técnicas para detectar as interacções entre duas proteínas**

Desde 1985 e 1989, com o aparecimento de técnicas como o *phage display* e o sistema *two-hybrid*, respectivamente, as interacções entre proteínas têm vindo a ser muito estudadas e têm surgido novas técnicas para o estudo destas interacções. Estas técnicas têm utilidade ao nível da selecção de anticorpos, dado que, as interacções entre Ac e Ag são somente uma variação das interacções proteína-proteína.

As técnicas utilizadas no estudo das interações entre proteínas podem ser realizadas totalmente *in vitro* ou apresentarem pelo menos um passo *in vivo* (Tabela 7.1 em anexo). No primeiro grupo incluem-se técnicas como o *ribosome display* [24-26], o RNA *display* [24-26] e o DNA *display* [27]. Do último grupo, fazem parte técnicas como o *phage display* [19, 28, 29], os sistemas *two-hybrid* (em levedura [3, 30] ou em bactéria [31]), o *cell display* [32, 33] e os ensaios de complementação proteica (PCA) [34, 35]. Porém, as técnicas mais utilizadas para a selecção de anticorpos, face a um dado Ag, são o *phage display* e os sistemas *two-hybrid*, onde o genótipo (gene do Ac) e o fenótipo (Ac expresso) se encontram interligados.

Na técnica de *phage display* [29] (Fig. 7.2 em anexo), o DNA que codifica o Ac (normalmente scFv) é clonado num fagemídio, em fusão com o gene que codifica a proteína pIII do bacteriófago M13. Após a expressão, a proteína de fusão é incorporada em novas partículas fágicas que se vão formando no interior da bactéria. Essas novas partículas fágicas, que apresentam a proteína de fusão à superfície, contêm o material genético que a codifica. Esta ligação entre genótipo e fenótipo permite um enriquecimento de fagos específicos. Para enriquecer essa população de fagos realizam-se ciclos de selecção, em que o Ag se encontra imobilizado numa superfície e os fagos são posteriormente aí adicionados. Assim, fagos que apresentem à superfície Ac relevantes ficarão retidos, enquanto que os restantes serão removidos por lavagem. Os fagos que se ligaram podem ser recuperados e utilizados para re-infectar bactérias de modo a poderem multiplicar-se para posteriores selecções de enriquecimento [9, 36].

O sistema *two-hybrid* é uma técnica que consiste na co-expressão, numa dada célula, de duas proteínas híbridas que, se interagirem, restauram um fenótipo e/ou uma marca de selecção. Stanley e Fields (1989) introduziram esta técnica [3], baseando-se nas propriedades da proteína GAL4 de levedura. Esta proteína pode ser separada em dois domínios, um responsável pela ligação ao DNA e o outro pela activação da transcrição. Assim, plasmídios que codifiquem duas proteínas híbridas, uma constituída pelo domínio de ligação ao DNA GAL4 em fusão com uma proteína “X”, e outra constituída pelo domínio de activação da transcrição GAL4 em fusão com uma proteína “Y”, podem ser construídos e introduzidos nas células de levedura. Se houver interacção entre as proteínas “X” e “Y”, os dois domínios da proteína GAL4 interagem e ocorre a activação da transcrição de um gene repórter que contém um local de ligação que é reconhecido pela proteína GAL4 [1, 3, 37]. O sistema foi inicialmente pensado para ser utilizado em levedura, no entanto, para superar algumas desvantagens (Tabela 7.1 em anexo), muitos autores começaram a utilizar este tipo de sistema em bactérias, nomeadamente em *E.coli* [38-45]. Os sistemas *two-hybrid* realizados em bactérias são mais simples, dado que estes organismos não têm compartimentos celulares e as suas proteínas não apresentam homologia suficiente para interferirem com as proteínas em estudo. Por outro lado, a eficiência de transformação do

DNA é superior à verificada em levedura [38].

Desde 1995 que os sistemas *two-hybrid* em bactérias se têm multiplicado. Esses sistemas são baseados em repressores transcricionais híbridos [46], na formação de ansas de DNA [47], no recrutamento da RNA polimerase [48], nos activadores ToxR híbridos [49] e na reconstituição da cascata de sinalização do cAMP [43].

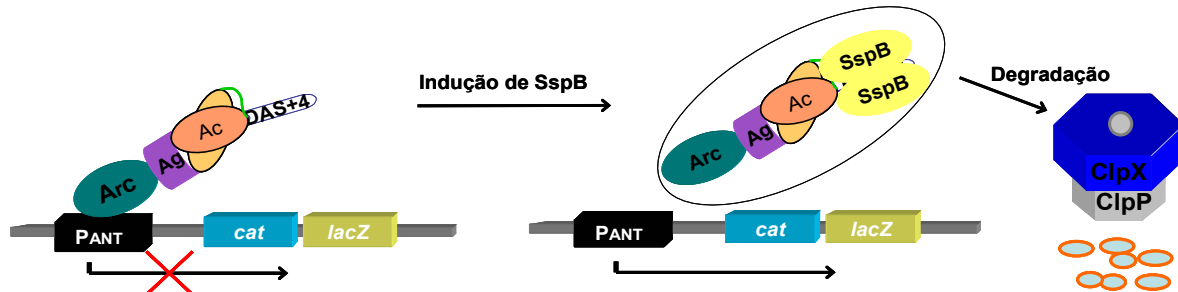
No entanto, quer na técnica de *phage display*, quer nos sistemas *two-hybrid* referidos, a orientação espacial do Ac face ao Ag encontra-se comprometida, dado que o Ac se encontra em fusão com outra proteína. Neste sentido, seria ideal desenvolver um novo método em que o Ac pudesse ser expresso sem que estivesse ligado a uma proteína, de modo a que a selecção do Ac contra um dado Ag não fosse afectada pela orientação espacial do Ac.

Tendo em consideração a informação contida nos parágrafos anteriores e o artigo de McGinness *et al.* (2006) [50], surgiu a ideia de desenvolver um novo sistema *two-hybrid* bacteriano, baseado na manipulação da via de degradação ClpXP, de modo a ser possível detectar fortes interacções entre duas proteínas.

McGinness *et al.* (2006) [50], demonstraram que é possível controlar o processo de degradação, pelo sistema ClpXP, de proteínas com o sinal *ssrA*. Ou seja, estes autores, por técnicas de biologia molecular, introduziram várias modificações no sinal *ssrA*, de modo a descobrirem qual a sequência que tornava o processo de degradação de uma proteína mais dependente do facto de esse sinal ser reconhecido por uma proteína adaptadora (neste caso, a proteína SspB - *stringent starvation protein B*) [50]. No entanto, verificaram que o sinal mais eficaz foi o DAS+4, cuja sequência proteica é AANDENYSENYADAS e que tem dois locais de reconhecimento, um para a proteína SspB (AANDENY) e outro para o sistema de degradação ClpXP (DAS). Para comprovar que este processo ocorre (Fig. 7.3 em anexo), estes investigadores utilizaram a bactéria X90 *sspB::kan*, o plasmídeo pTrc99A, que após indução com IPTG (isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) expressa o repressor Arc (proteína do fago P22) em fusão com a sequência DAS+4 e o plasmídeo pCH410-SspB-SD1, que após indução com arabinose expressa a proteína SspB. Esta bactéria foi transduzida com o prófago  $\lambda$ AC201 que tem na sua constituição o promotor  $P_{ANT}$ , que regula a expressão dos genes de resistência ao cloranfenicol e da  $\beta$ -galactosidase e, é reprimível pelo repressor Arc. Assim, verificou-se que se a proteína Arc-DAS+4 existir na presença da proteína SspB, esta reconhece o sinal DAS+4 e direcciona a proteína Arc-DAS+4 para degradação, pelo sistema ClpXP. Deste modo, o repressor Arc deixa de exercer a sua função sob o promotor  $P_{ANT}$ , e consecutivamente a bactéria adquire resistência ao cloranfenicol e há actividade da  $\beta$ -galactosidase [50].

Tendo estes dados em consideração, pensou-se então na construção de um sistema *two-hybrid* com possível aplicação na selecção de anticorpos intracelulares específicos para um dado antígeno. Nesse sentido (Fig. 1.4), no plasmídeo pTrc99A teríamos o repressor Arc

em fusão com o Ag e o Ac em fusão com a sequência DAS+4. Ambas as proteínas seriam expressas de um modo bicistrónico a partir do promotor  $P_{Trc}$ , após a indução com IPTG. Se houvesse interacção entre o Ag e o Ac e se a proteína SspB estivesse a ser expressa, então o complexo de interacção iria para degradação e a bactéria adquiriria resistência ao cloranfenicol e haveria actividade da  $\beta$ -galactosidase.



**Fig. 1.4 – Modelo da degradação para detectar interações entre anticorpo e antígeno.** Neste sistema, o Ag é expresso em fusão com o repressor Arc e o Ac em fusão com o sinal de degradação DAS+4. Se existir interacção entre o Ac e o Ag na presença da proteína SspB, esta liga-se ao sinal e desloca o complexo Arc-Ag-AcDAS+4 do promotor  $P_{ANT}$ . Logo, todo o complexo é levado para o sistema de degradação ClpXP e a transcrição a partir do promotor  $P_{ANT}$  pode ocorrer, pelo que a bactéria se torna resistente ao cloranfenicol. Abreviaturas: Ac, anticorpo; Ag, antígeno; *cat*, gene de resistência ao cloranfenicol; *lacZ*, gene que codifica a  $\beta$ -galactosidase.

Para validar este sistema utilizaram-se proteínas que já se sabia que interagiam. Deste modo, estudaram-se interações entre *leucine zippers* (Zip) [40], e entre o anticorpo intracelular scFv 4BL e a proteína Vif do VIH-1 [19]. As interações entre proteínas Zip foram utilizadas como controlo positivo para validar o novo sistema, dado que se sabe [40, 51] que estas proteínas interagem com elevada afinidade e que, por essa razão, já foram usadas noutros sistemas de interacção proteína-proteína como controlos positivos.

O Ac scFv 4BL foi isolado de uma biblioteca genómica de scFv, construída a partir da medula óssea de coelhos imunizados com a proteína Vif (proteína do VIH-1, essencial para a completa síntese de DNA pró-viral, após a entrada do vírus na célula) [19]. Sabe-se que este scFv apresenta uma afinidade de ligação à proteína Vif na ordem dos nM (dados não publicados do laboratório do Prof. Doutor João Gonçalves), sendo, por isso, particularmente relevante o estudo desta interacção, no contexto do sistema proposto nesta dissertação.

### 1.8 Objectivo do estudo

O objectivo da presente dissertação de Mestrado consiste no desenvolvimento de um sistema de interacção proteína-proteína, em ambiente redutor (citoplasma bacteriano), com aplicação na selecção de anticorpos intracelulares capazes de reconhecer antígenos citoplasmáticos. Esse sistema será baseado na manipulação da via de degradação proteica ClpXP.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Bactérias, plasmídios e primers**

A estirpe de *E.coli* TOP10F' foi utilizada para confirmar se as construções plasmídicas estavam correctas. A estirpe de *E.coli* X90 sspB::Kan foi utilizada para testar e validar o novo sistema *two-hybrid*. As características das estirpes bacterianas e dos plasmídios utilizados neste trabalho encontram-se na Tabela 8.3, em anexo. Os *primers* que foram utilizados para construir os plasmídios referidos na Tabela 8.3 encontram-se descritos na Tabela 8.4, em anexo.

### **2.2 Isolamento, manipulação de DNA e transformação de estirpes bacterianas**

O DNA plasmídico foi extraído de *E.coli*, utilizando o *Jetquick Plasmid Miniprep Spin Kit* (Genomed). As digestões enzimáticas, as ligações de DNA com a enzima T4 DNA ligase e as amplificações por reacção de polimerização em cadeia (PCR) com a enzima *Taq* DNA polimerase, foram realizadas de acordo com as condições recomendadas pelos respectivos fornecedores (Tabela 8.2 em anexo). Os fragmentos resultantes das diferentes digestões enzimáticas foram separados por electroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão (Bioron), extraídos e purificados com o *Jetquick Gel Extraction Spin Kit* (Genomed). A introdução do DNA plasmídico nas diferentes estirpes de *E.coli* foi efectuada por electroporação. O DNA a electroporar foi misturado com 40 $\mu$ L de células competentes de *E.coli*, em cuvetes com 0,1cm de distância entre os eléctrodos. O electroporador (*Gene Pulse-Biorad*) foi regulado para uma voltagem de 1,8 kV e 200 $\Omega$  de resistência paralela. Após a descarga do respectivo impulso, adicionaram-se 500 $\mu$ L de meio SOC à cuvette, retiraram-se as células e estas foram incubadas a 37°C, durante 1 hora. Em seguida, as células foram plaqueadas em meio de cultura selectivo.

### **2.3 Soluções, meios e condições de cultura das estirpes bacterianas**

A composição das soluções PBS e TBS e dos meios LB e SOC encontra-se descrita no manual de laboratório “Molecular Cloning”, de Sambrook e Russell (2001) [52].

Para a selecção de transformantes, as bactérias TOP10F' foram cultivadas a 37°C, com agitação, em meio LB. Nos ensaios referentes à validação do sistema em estudo, o meio de cultura utilizado para o crescimento das bactérias X90 sspB::Kan foi também o meio LB. Para o isolamento das estirpes, as células bacterianas foram plaqueadas em meio sólido LB com 1,2% de Bacto Agar (LB-agar). Aos meios de cultura foram adicionados os antibióticos

específicos para a selecção das estirpes e das construções desejadas (descritos na Tabela 8.1 em anexo).

## 2.4 Construção de plasmídios

A base deste trabalho é o plasmídio pTrc99A (Arc-Das), dado que, foi a partir deste plasmídio que foram feitas todas as outras construções plasmídicas, necessárias para validar o sistema em estudo.

Para a construção do plasmídio Arc-Vif utilizaram-se os *primers* R1-Arc-F, Arc-R, Vif-F-Fusão-Arc e Vif-Myc-xho-R (Tabela 8.3). O primeiro par de *primers*, acima referido, foi usado para amplificar o fragmento Arc, a partir do plasmídio Arc-Das, e o segundo par foi usado para amplificar o fragmento Vif, a partir do DNA do VIH-1. Estas amplificações foram feitas de acordo com o seguinte programa: 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos, seguido de 30 ciclos incluindo desnaturação a 94°C durante 15 segundos, hibridação a 60°C (Arc) ou 58°C (Vif) durante 30 segundos e extensão das cadeias a 72°C durante 90 segundos e ainda 1 ciclo de extensão prolongada a 72°C durante 10 minutos. Os fragmentos obtidos foram purificados e utilizados para a realização de um PCR *overlap* em que os *primers* utilizados foram R1-Arc-F e Vif-Myc-xho-R. Esta técnica de PCR *overlap* foi possível, dado que estes *primers* têm uma região de complementaridade entre si. Para a realização do PCR *overlap*, preparou-se uma mistura de todos os componentes necessários à amplificação por PCR, exceptuando os *primers*. Assim, primeiro fez-se a amplificação por PCR, utilizando o programa que inclui 1 ciclo a 94°C durante 2 minutos, seguido de 8 ciclos de desnaturação durante 15 segundos, hibridação a 60°C durante 30 segundos e extensão das cadeias a 72°C durante 90 segundos. Após esta etapa, adicionaram-se os *primers* e utilizou-se o mesmo programa, embora se realizassem 30 ciclos, após o primeiro ciclo a 94°C, e a temperatura de hibridação tenha sido de 58°C. Depois de purificado, o fragmento Arc-Vif e o vector Arc-Das foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *XhoI*. A digestão com estas enzimas retirou do vector a sequência Arc-Das. Após a digestão e purificação, o fragmento e o vector foram ligados pela enzima T4 DNA ligase.

Na construção do plasmídio Arc-Vif-4BLDas utilizaram-se os *primers* 4BL-Das-F-xho e 4BL-R-Das (Tabela 8.3). Este último tem a sequência sinal DAS+4. O programa de PCR utilizado na amplificação do scFv 4BLDas, a partir do pCDNA3.1-4BL, foi igual ao da amplificação do fragmento Arc, com uma única diferença a nível da temperatura de hibridação, que foi de 56°C. O fragmento depois de purificado e digerido com as enzimas *XhoI* e *KpnI*, foi clonado no plasmídio Arc-Vif, também digerido com as mesmas enzimas.

Na construção do plasmídio Arc-Vif-4BL, os *primers* utilizados foram o 4BL-Das-F-xho e o 4BL-R-Kpn (Tabela 8.3). Este último não tem a sequência do sinal DAS+4. O scFv 4BL foi

também amplificado a partir do pCDNA3.1-4BL. O programa utilizado para esta amplificação foi o referido para a amplificação do gene da proteína Arc. Após purificação, este fragmento foi digerido com as enzimas *XhoI* e *KpnI* e clonado no plasmídio Arc-Vif, também digerido por estas enzimas.

Para a construção do plasmídio Arc-Zip-ZipApobecDas, amplificou-se primeiro o gene que codifica a proteína ZipApobec com os *primers* Zip-Sfi-F e R-Ap-Sfi (Tabela 8.3). O programa de PCR utilizado foi o descrito para a amplificação do gene da proteína Vif. Este fragmento depois de purificado e digerido pela enzima *SfiI* foi clonado no plasmídio Arc-Vif-4BLDas, também digerido com esta enzima. O fragmento Arc-Zip foi obtido por realização de PCR *overlap*, de modo semelhante ao realizado para o fragmento Arc-Vif, embora as temperaturas de hibridação tenham sido diferentes. Para a amplificação do fragmento Arc, com os *primers* R1-Arc-F e Arc-R-Zip, a temperatura foi de 58°C e para o fragmento Zip, envolvendo os *primers* Zip-Arc-F e Zip-R-Cla, foi de 60°C. Para a realização de PCR *overlap* Arc-Zip a temperatura de hibridação utilizada durante os 8 e os 30 ciclos foi de 60°C. Após a purificação do fragmento Arc-Zip, este foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *ClaI* e foi clonado no plasmídio Arc-Vif-ZipApobecDas, que também foi digerido por estas enzimas, obtendo-se então o plasmídio Arc-Zip-ZipApobecDas.

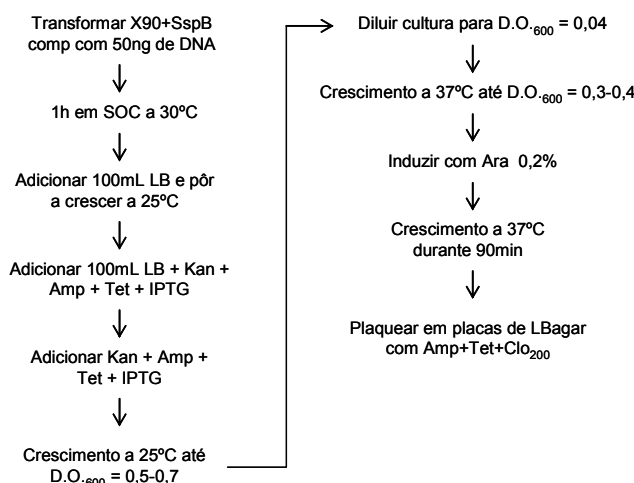
### **2.5 Ensaio de avaliação em placa da resistência ao cloranfenicol**

As bactérias utilizadas para validar este sistema *two-hybrid*, *E.coli* X90 sspB::Kan, foram transformadas com o plasmídio CH410-SspB-SD1, passando a designar-se X90+SspB.

Os procedimentos apresentados neste capítulo são relativos aos métodos já otimizados.

Para os ensaios em placa, as bactérias X90+SspB foram transformadas com 50ng de DNA plasmídico. Após a transformação, adicionaram-se à cubete de electroporação 500µL de meio SOC, retiraram-se as células e estas foram incubadas 1 hora, a 30°C com agitação. Em seguida, adicionaram-se 100mL de meio LB e as bactérias foram incubadas, por mais 1 hora, a 25°C. Após a adição de 100mL de meio LB com 50µg/mL de canamicina (Kan), 100µg/mL de ampicilina (Amp), 20µg/mL de tetraciclina (Tet) e 50µg/mL de IPTG, incubaram-se, de novo, as bactérias a 25°C durante 1 hora. Depois, adicionaram-se os restantes volumes dos antibióticos já adicionados, de modo a que a sua concentração final no meio fosse de 50µg/mL de Kan, 100µg/mL de Amp, 20µg/mL de Tet e 50µg/mL de IPTG. As bactérias foram depois incubadas a 25°C, até a cultura em crescimento atingir uma densidade óptica (D.O.) de 0,5-0,7. Nessa altura, diluiu-se a cultura em 10mL de meio LB,

com os mesmos antibióticos e IPTG, nas concentrações já referidas, de modo a ficar com uma D.O. de 0,04. Depois, incubou-se a cultura a 37°C até se atingir um crescimento com uma D.O. de 0,3-0,4. Em seguida, dividiu-se a cultura em duas partes iguais e uma foi induzida com arabinose (Ara) a 0,2%. Ambas foram então incubadas a 37°C, durante 90 minutos. Posteriormente, fizeram-se diluições destas culturas e plaquearam-se 100µL destas diluições em placas de LB-agar com 100µg/mL de Amp, 20µg/mL de Tet e 200µg/mL de cloranfenicol (Clo). Essas placas foram incubadas a 37°C durante 16 horas. A Fig. 2.1 resume o procedimento acima descrito.



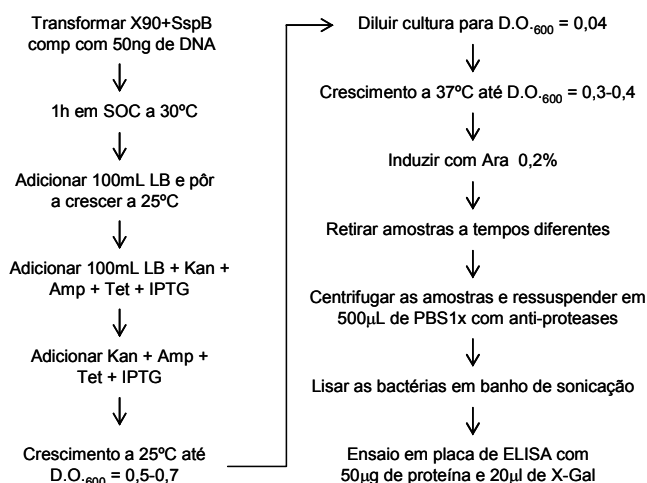
**Fig. 2.1 – Representação esquemática do procedimento dos ensaios em placa.** Abreviaturas: Amp, ampicilina; Ara, arabinose; Clo, cloranfenicol; comp, competentes; D.O., densidade óptica; IPTG, isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo; Kan, canamicina; Tet, tetraciclina.

## 2.6 Ensaio de avaliação da actividade da β-galactosidase

O procedimento para a realização deste ensaio foi análogo ao descrito para o ensaio em placa mas, após a indução com arabinose, foram retiradas em tempos diferentes, amostras de 2,5mL de cultura, que foram centrifugadas a 4000rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspendido em 500µL de PBS (1x) com anti-proteases (Roche). As amostras foram congeladas a -80°C, até serem usadas. Posteriormente, foram colocadas num banho de sonicação durante 30 minutos, de modo a lisar as bactérias. Depois centrifugaram-se a 4000rpm durante 30 minutos e o sobrenadante (lisado) foi guardado.

Para verificar a actividade da β-galactosidase, a quantidade de proteínas no lisado foi quantificada, utilizando o método de Bradford (Biorad), e fez-se reagir, numa placa de ELISA de 96 poços, 50µg de proteína total com 40µg/mL de substrato X-Gal (Q-Biogene). Se a β-galactosidase estiver activa, degrada o substrato X-Gal, e a reacção é registada, fazendo-se leituras regulares da absorvância a um comprimento de onda de 405nm. Cada amostra foi

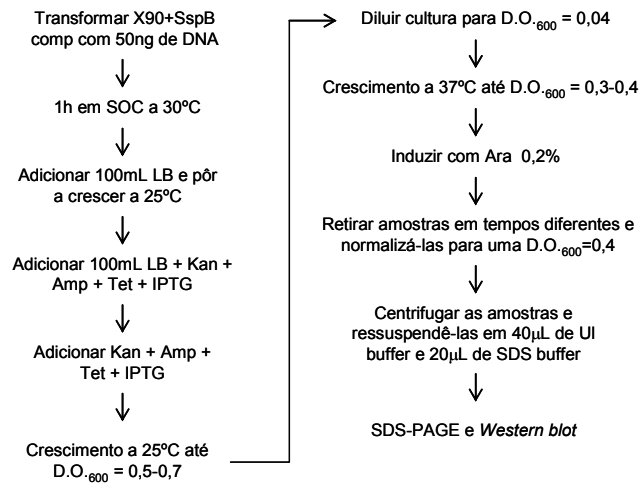
feita em triplicado na placa. A Fig. 2.2 resume todo este procedimento.



**Fig. 2.2 – Representação esquemática do procedimento para os ensaios de avaliação da actividade da  $\beta$ -galactosidase.** Abreviaturas: Amp, ampicilina; Ara, arabinose; Clo, cloranfenicol; comp, competentes; D.O., densidade óptica; IPTG, isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido; Kan, canamicina; Tet, tetraciclina.

### **2.7 Ensaio de avaliação da expressão das proteínas após indução da proteína *SspB***

Os ensaios de avaliação da expressão permitem-nos analisar a degradação das proteínas, por SDS-PAGE e *Western Blot*. O procedimento para estes ensaios é semelhante ao descrito para o ensaio de avaliação da actividade da  $\beta$ -galactosidase, no entanto, após a indução com arabinose foram retiradas, em tempos diferentes, amostras de 1mL de cultura. Estas, foram normalizadas para uma D.O. de 0,4 e centrifugadas a 4000rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspensionado em 40 $\mu$ L de tampão UL [50] e 20 $\mu$ L de tampão SDS [50]. A Fig. 2.3, na página seguinte, resume este procedimento. As amostras foram depois congeladas a -80°C, e antes de serem utilizadas para análise por SDS-PAGE e *Western Blot* foram fervidas a 95°C durante 5 minutos [50]. As técnicas de SDS-PAGE e *Western Blot* foram realizadas de acordo com protocolos já descritos [52]. Após a transferência das proteínas, as membranas foram lavadas com 0,1% de Tween-20 em TBS (TBS-T) e depois bloqueadas, com 5% de leite diluído em TBS-T, durante 1 hora com agitação e à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas, com TBS-T, e adicionaram-se os respectivos anticorpos, anti-HA e anti-c-myc (Tabela 8.5 em anexo). Depois de incubadas durante 1 hora, com agitação, à temperatura ambiente, as membranas foram lavadas, de novo, com TBS-T. As proteínas foram detectadas utilizando os reagentes ECL (Amersham Biosciences) ou Femto (Pierce) e os filmes da Amersham Biosciences.

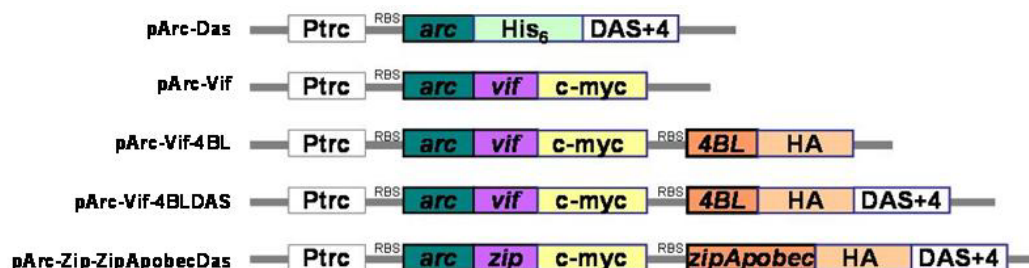


**Fig. 2.3 – Representação esquemática do procedimento para os ensaios de avaliação da expressão.** Abreviaturas: Amp, ampicilina; Ara, arabinose; Clo, cloranfenicol; comp, competentes; D.O., densidade óptica; IPTG, isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido; Kan, canamicina; Tet, tetraciclina.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Construções plasmídicas

Para a realização deste trabalho foram construídos plasmídios (p) derivados do plasmídio pTrc99A (Tabela 7.3 em anexo), tal como descrito no capítulo de materiais e métodos. Estes plasmídios estão representados esquematicamente na Fig. 3.1.



**Fig. 3.1 – Representação dos plasmídios utilizados na otimização do novo sistema *two-hybrid*.** No pArc-Das, o repressor Arc está em fusão com o sinal 6 histidinas e o sinal DAS+4; no pArc-Vif o repressor Arc está em fusão com a proteína Vif que tem o sinal c-myc; no pArc-Vif-4BL, o repressor Arc está em fusão com a proteína Vif e o scFv 4BL em fusão com o sinal HA; no pArc-Vif-4BLDAS o repressor Arc encontra-se em fusão com a proteína Vif e o scFv para além de estar em fusão com o sinal HA também está em fusão com o sinal DAS+4; no pArc-Zip-ZipApobecDas, o repressor Arc está em fusão com a proteína Zip com o sinal c-myc e a proteína ZipApobec em fusão com os sinais HA e DAS+4. Abreviaturas: P<sub>trc</sub>, promotor trc; RBS, local de ligação do ribossoma.

#### 3.2 Otimização do novo sistema *two-hybrid* bacteriano

A otimização deste novo sistema *two-hybrid* foi realizada tendo em consideração dados já conhecidos sobre as interações entre o scFv 4BL e a proteína Vif do VIH-1 [19], e as interações entre as proteínas Zip (*leucine zippers*) [40, 51]. Atendendo aos resultados descritos por McGuinness *et al.* (2006) [50], seria de esperar, que no ensaio em placa, obtivéssemos colónias resistentes ao cloranfenicol nas bactérias transformadas com os plasmídios Arc-Das, Arc-Vif-4BLDas e Arc-Zip-ZipApobecDas. As bactérias transformadas com os plasmídios Arc-Vif e Arc-Vif-4BL não deveriam crescer em placas de LB-agar com cloranfenicol. Nos ensaios para avaliar a actividade da  $\beta$ -galactosidase, deveríamos obter valores mais elevados nas bactérias que foram transformadas com os plasmídios Arc-Das, Arc-Vif-4BLDas e Arc-Zip-ZipApobecDas. Nos ensaios de avaliação da expressão deveríamos detectar por *Western blot* a degradação das proteínas, quando os plasmídios utilizados fossem Arc-Das, Arc-Vif-4BLDas e Arc-Zip-ZipApobecDas. Sendo assim, a construção Arc-Das funcionaria como controlo positivo do sistema de degradação (resultado já verificado por McGuinness *et al.*(2006) [50]); a construção Arc-Zip-ZipApobecDas como controlo positivo do sistema de interacção proteína-proteína; a construção Arc-Vif como controlo negativo do sistema de degradação, dado que não apresenta a sequência DAS+4;

a construção Arc-Vif-4BL como controlo negativo do sistema de interacção proteína-proteína; e, a construção Arc-Vif-4BLDas seria a construção em estudo no sistema de interacção proteína-proteína. Os resultados esperados encontram-se referidos na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1 – Resultados esperados**

	CAT <sup>R</sup>	Actividade da $\beta$ -Gal	Degradação
pArc-Das	+	+	+
pArc-Vif	-	-	-
pArc-Vif- 4BLDas	+	+	+
pArc-Vif- 4BL	-	-	-
pArc-Zip-ZipApobecDas	+	+	+

O ensaio em placa é avaliado pela resistência ao cloranfenicol (CAT<sup>R</sup>) em que “+” significa que crescem colónias de bactérias em placas LB-agar com cloranfenicol e “-” significa que não crescem colónias. Na avaliação da actividade da  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) “+” significa que há actividade desta enzima e “-” que a actividade enzimática é baixa. Nos ensaios de avaliação da expressão (degradação), “+” significa que, por *Western Blot*, se detecta a degradação das proteínas pelo seu desaparecimento, “-” significa que não se detecta a degradação das proteínas.

Assim, para otimizar o sistema, várias experiências foram realizadas no sentido de se obter os resultados esperados. É de referir que, nem todos os plasmídios foram usados nos diferentes passos de optimização do sistema.

Tendo em consideração o procedimento descrito por McGuinness *et al.* (2006) [50], para as experiências em meio líquido, os passos que foram optimizados nos três tipos de ensaios descritos no capítulo de materiais e métodos, estão relacionados com:

- o começo dos ensaios, a partir de colónias de bactérias isoladas ou do total de bactérias transformadas;
- a concentração de IPTG, antes e depois da diluição da cultura;
- o processo de adição dos antibióticos, após a transformação das bactérias;
- a temperatura de crescimento utilizada após a diluição da cultura;
- a percentagem de arabinose usada para induzir a expressão da proteína SspB;
- o tempo de incubação até plaqueamento, após indução com arabinose;
- a concentração de cloranfenicol e a presença de arabinose nas placas de meio LB-agar.

### 3.2.1 Colónias isoladas ou população total de bactérias transformadas

Como o objectivo de desenvolver este sistema se prendia com a sua posterior utilização para a selecção de Ac a partir de bibliotecas de Ac, optou-se por utilizar toda a população de bactérias transformadas, caso contrário teria de se repicar cada colónia que crescesse em placa e realizar todos os ensaios (placa, SDS-PAGE, *Western blot* e validação da actividade

da  $\beta$ -galactosidase) para cada colônia individualmente. Assim, a transformação dos 40 $\mu$ L de bactéria X90+SspB com 50ng de DNA plasmídico e a utilização de toda essa população nos ensaios subsequentes tornou o processo de selecção mais rápido.

### 3.2.2 Concentração de IPTG antes e depois da diluição da cultura

No artigo em que nos baseámos [50], a concentração de IPTG usada, antes e após a diluição, foi de 50 $\mu$ g/mL mas, no sentido de tentarmos obter melhores resultados, testaram-se outras concentrações de IPTG. Os resultados referentes a esses testes encontram-se na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2 – Resultados obtidos para as diferentes concentrações de IPTG antes e depois do crescimento a 25°C**

[IPTG] antes da diluição ( $\mu$ g/mL)	0	10	25	50	100	150
[IPTG] após diluição ( $\mu$ g/mL)	50	50	25	50	100	150
pArc-Das	151-350	151-350	151-350	151-350	51-150	51-150
pArc-Vif	151-350	1-50	n.t.	1-50	n.t.	n.t.
pArc-Vif-4BLDas	151-350	51-150	n.t.	151-350	n.t.	n.t.
pArc-Vif-4BL	151-350	51-150	n.t.	51-150	n.t.	n.t.

Os resultados referem-se ao número de colônias bacterianas que cresceram em placas de LB-agar com cloranfenicol. “n.t.” significa que essas construções não foram testadas.

Pela análise da tabela e tendo em consideração os resultados esperados (Tabela 3.1), concluiu-se que a melhor concentração de IPTG a usar, antes e após o crescimento das bactérias a 25°C, era de 50 $\mu$ g/mL.

### 3.2.3 Processo de adição de antibióticos e IPTG após a transformação

No estudo de McGuinness *et al.* (2006) [50], os antibióticos e o IPTG são adicionados logo no início da experiência. No entanto, verificou-se que, no nosso caso, a capacidade de crescimento das bactérias X90+SspB, quando transformadas com plasmídios utilizados neste estudo, diminuía quando adicionávamos os antibióticos e o IPTG logo após a incubação de 1 hora a 30°C em meio SOC. Então, optou-se por adicionar o meio, os antibióticos e o IPTG de um modo gradual, um procedimento semelhante ao utilizado na técnica de *phage display* [29].

Assim, após a incubação inicial adicionaram-se 100mL de meio LB, seguindo-se uma hora de incubação a 25°C, ao fim da qual se adicionaram 100mL de meio LB com 50 $\mu$ g/mL de Kan, 100 $\mu$ g/mL de Amp, 20 $\mu$ g/mL de Tet e 50 $\mu$ g/mL de IPTG. Incubou-se então por mais

1 hora a 25°C e depois adicionaram-se os restantes volumes de antibióticos e IPTG, de modo a que os 200mL de volume final de cultura tivessem 50µg/mL de Kan, 100µg/mL de Amp, 20µg/mL de Tet e 50µg/mL de IPTG. A cultura foi depois incubada a 25°C até atingir a uma D.O.<sub>600</sub> = 0,5-0,7.

### 3.2.4 Temperatura de crescimento após a diluição da cultura

A temperatura utilizada por McGuinness *et al.* (2006) [50] para o crescimento da cultura após a diluição foi de 37°C. No entanto, como o sistema em estudo apresenta fusões entre duas proteínas e está dependente da existência ou não de uma interacção, é necessário ter em atenção que as proteínas podem não adquirir a sua conformação ideal a 37°C. Nesse sentido, o sistema foi também testado a 30°C. Os resultados encontram-se na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3 – Resultados obtidos para as temperaturas de 30 e 37°C, após a diluição da cultura**

Temperatura (°C)	30	37
pArc-Das	51-150	>350
pArc-Vif	1-50	1-50
pArc-Vif-4BLDas	151-350	151-350

Os resultados referem-se ao número de colónias bacterianas que cresceram em placas de LB-agar com cloranfenicol.

Analisando a Tabela 3.3, verifica-se que os melhores resultados são obtidos quando a cultura é crescida a 37°C, após a diluição.

### 3.2.5 Concentração de arabinose usada para induzir o promotor P<sub>BAD</sub>

A proteína SspB, no sistema em estudo, é expressa a partir do promotor P<sub>BAD</sub>. Sendo este promotor indutível por arabinose foi também testada a melhor concentração (em percentagem) de arabinose a utilizar neste estudo. As concentrações estudadas foram de 0,05%, 0,1% e 0,2% e os resultados encontram-se discriminados na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4 – Resultados obtidos para as diferentes percentagens de arabinose testadas**

Arabinose (%)	0,05	0,1	0,2
pArc-Das	51-150	51-150	151-350
pArc-Vif	1-50	1-50	1-50

Os resultados referem-se ao número de colónias bacterianas que cresceram em placas de LB-agar com cloranfenicol.

Com base nestes resultados, pode-se afirmar que a melhor percentagem de arabinose a usar é de 0,2%, a mesma descrita por McGuinness *et al.* (2006) [50].

### 3.2.6 Tempo de incubação até plaqueamento, após indução com arabinose

Nas experiências em meio líquido os autores do artigo de McGuinness *et al.* (2006) [50], não fazem referência ao tempo de incubação da cultura, após a indução com arabinose e antes de ser plaqueada. Contudo, pelos ensaios de avaliação da expressão proteica e de avaliação da actividade da  $\beta$ -galactosidase, foi possível inferir que 90 minutos seria o tempo ideal. No entanto, foram testados diferentes tempos de incubação da cultura antes do plaqueamento. Os tempos testados foram de 0, 60 e 90 minutos logo após a indução com arabinose. Os resultados encontram-se na Tabela 3.5.

**Tabela 3.5 – Resultados obtidos no ensaio para determinar qual o melhor tempo de incubação, após indução com arabinose e antes de plaquear**

<b>Tempo (minutos)</b>	<b>0</b>	<b>60</b>	<b>90</b>
pArc-Das	51-150	151-350	>350
pArc-Vif	1-50	1-50	51-150
pArc-Vif-4BLDas	1-50	151-350	>350

Os resultados referem-se ao número de colónias bacterianas que cresceram em placas de LB-agar com cloranfenicol.

Como se pode verificar, os melhores resultados em termos de número de colónias em placa foram obtidos incubando a cultura durante 90 minutos, após indução com arabinose.

### 3.2.7 Concentração de cloranfenicol e presença de arabinose nas placas LB-agar

No artigo em que se baseia este sistema [50], as bactérias são plaqueadas em placas de LB-agar com 100 $\mu$ g/mL de Amp, 20 $\mu$ g/mL de Tet, 100 $\mu$ g/mL de Clo e, por vezes, 0,2% de arabinose. No entanto, testaram-se diferentes concentrações de cloranfenicol e a presença ou ausência de arabinose, para verificar se o *background* de possíveis interações inespecíficas diminuía. As concentrações de cloranfenicol testadas foram de 100 $\mu$ g/mL, 200 $\mu$ g/mL, 300 $\mu$ g/mL e 400 $\mu$ g/mL. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.6 na página seguinte.

**Tabela 3.6 – Resultados obtidos para as diferentes concentrações de cloranfenicol em presença e ausência de arabinose**

Antibióticos	ATC <sub>100</sub>	ATC <sub>100</sub> Ara	ATC <sub>200</sub>	ATC <sub>200</sub> Ara	ATC <sub>300</sub>	ATC <sub>300</sub> Ara	ATC <sub>400</sub>	ATC <sub>400</sub> Ara
pArc-Das	151-350	151-350	151-350	151-350	151-350	151-350	0	0
pArc-Vif	151-350	151-350	1-50	1-50	n.t.	n.t.	0	0
pArc-Vif-4BLDas	151-350	151-350	151-350	151-350	n.t.	n.t.	0	0
pArc-Vif-4BL	151-350	151-350	51-150	1-50	n.t.	n.t.	0	0

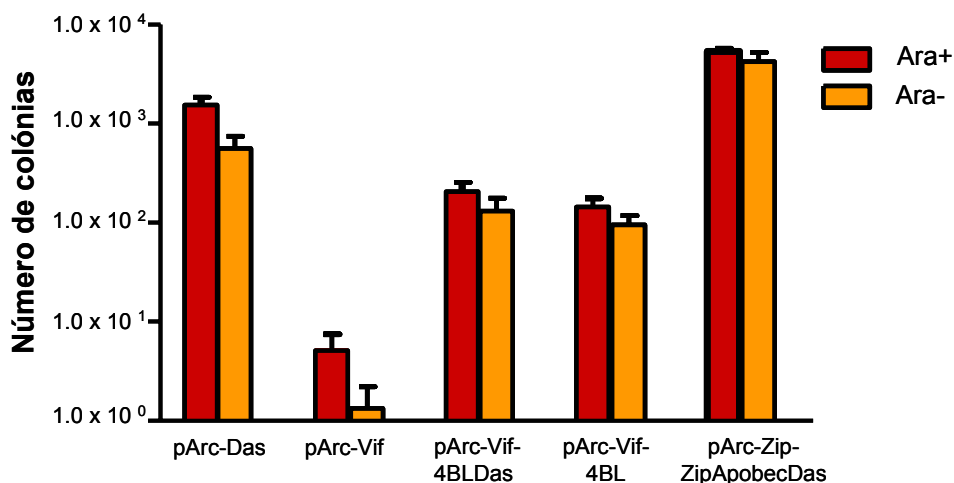
Os resultados referem-se ao número de colónias bacterianas que cresceram em placas de LB-agar com cloranfenicol. “n.t.” significa que essas construções não foram testadas. “A” significa ampicilina; “T” tetraciclina; “C” cloranfenicol; “Ara” arabinose; e “n.t.” que essas construções não foram testadas.

Analisando os resultados desta tabela juntamente com os da Tabela 3.1, verifica-se que a melhor concentração de cloranfenicol a usar em placa, é de 200µg/mL. Em relação à presença ou ausência de arabinose parece não haver qualquer tipo de diferença, assim, optou-se por não utilizar arabinose nas placas.

Após estas optimizações, realizaram-se então os diferentes ensaios descritos no capítulo de materiais e métodos, no sentido de validar o sistema.

### 3.3 Avaliação da resistência ao cloranfenicol por ensaio em placa

Os resultados deste ensaio encontram-se representados no gráfico da Fig. 3.2.



**Fig. 3.2 – Avaliação da resistência ao cloranfenicol em placa LB-agar.** Estes resultados correspondem a três experiências realizadas independentemente, relativos à diluição 1:1000. “Ara+” significa que as bactérias foram induzidas com arabinose e “Ara-” que não foram induzidas.

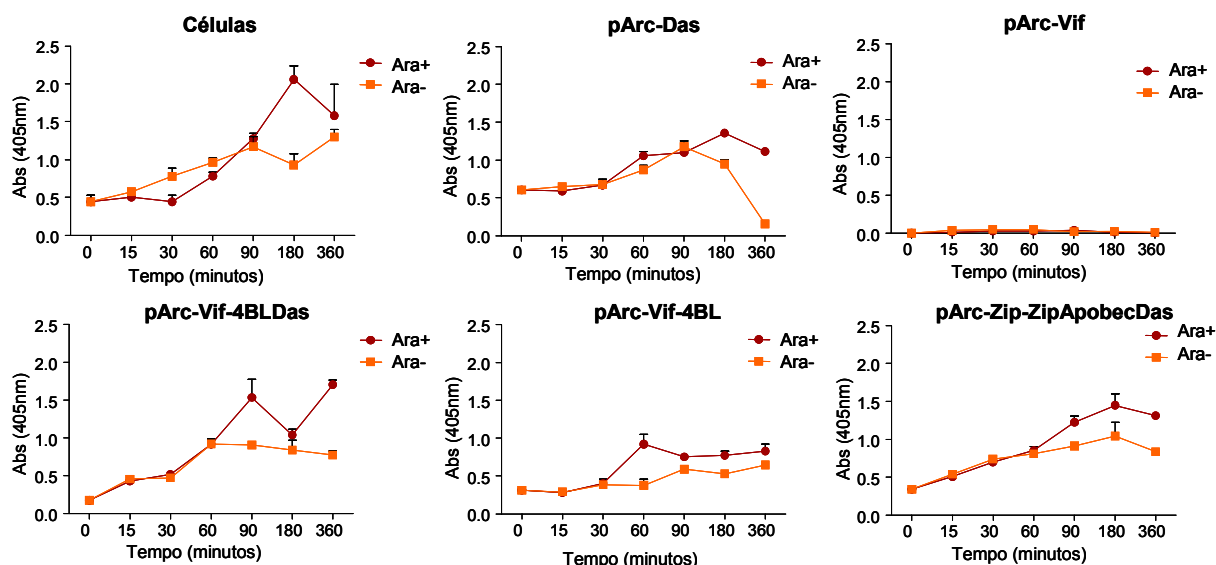
A análise deste gráfico revela que o sistema *two-hybrid* baseado na manipulação da degradação proteica permite avaliar interacções entre anticorpo e antigénio e entre proteínas Zip. O plasmídeo pArc-Vif funciona como um bom controlo negativo da

degradação, o que seria de esperar, dado que esta proteína Arc-Vif, não apresenta o sinal DAS+4 e, por isso, não pode ser reconhecida pela proteína SspB e conduzida para o sistema de degradação. Assim, o repressor Arc reprime o promotor  $P_{ANT}$  e as bactérias não adquirem resistência ao cloranfenicol. O plasmídeo pArc-Das, como se pôde verificar pelos resultados apresentados no gráfico parece funcionar bem como controlo positivo do sistema de degradação, confirmando o descrito por McGuinness *et al.* (2006) [50]. O plasmídeo pArc-Zip-ZipApobecDas é um bom controlo positivo para interacções fortes proteína-proteína. Da literatura [40] já se sabia que as interacções entre proteínas *leucine zippers* eram muito fortes, logo o resultado que estaríamos à espera para esta construção seria o aparecimento de bastantes colónias resistentes ao cloranfenicol aquando da indução com arabinose, facto que se veio a confirmar com uma diferença de quase três *logs* em relação ao controlo negativo. Em relação ao plasmídeo pArc-Vif-4BLDas, sabíamos à partida que iriam surgir colónias resistentes ao cloranfenicol, dado que o scFv 4BL reconhece especificamente a proteína Vif [19], só não sabíamos se iriam crescer muitas ou poucas colónias resistentes ao cloranfenicol. Acabou por se verificar que a interacção entre estas duas proteínas é mais fraca que a verificada para a interacção entre as proteínas *leucine zippers*, dado que o número de colónias resistentes ao cloranfenicol é menor (havendo diferença de pelo menos um *log*). O plasmídeo pArc-Vif-4BL foi construído para verificar se o sistema dependia ou não da sequência DAS+4. Pelos resultados obtidos nestes ensaios em placa, parece que o sistema é independente da sequência DAS+4, dado que o número obtido de colónias resistentes ao cloranfenicol em bactérias transformadas com os plasmídios pArc-Vif-4BLDas e pArc-Vif-4BL foi semelhante. É de referir, também, que não se verificaram muitas diferenças, em termos de número de colónias resistentes ao cloranfenicol, entre culturas induzidas ou não com arabinose.

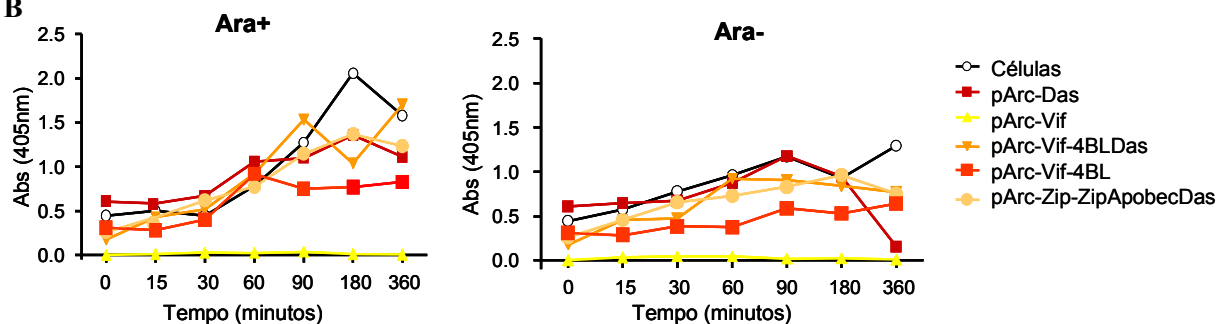
### **3.4 Avaliação da actividade da $\beta$ -galactosidase**

Este ensaio permite-nos avaliar o grau de repressão que a proteína Arc exerce sob o promotor  $P_{ANT}$ . Tal como é descrito por McGuinness *et al.* (2006) [50], níveis baixos de actividade de  $\beta$ -galactosidase mostram a existência de um elevado nível de repressão do promotor  $P_{ANT}$  por parte da proteína Arc e elevados níveis indicam desrepressão do promotor  $P_{ANT}$ , quando a proteína SspB é induzida. Os resultados obtidos neste ensaio, encontram-se na Fig. 3.3. Na figura 3.3A encontram-se os gráficos de avaliação da actividade da  $\beta$ -galactosidase individualmente em cada plasmídeo, de modo a permitir verificar os efeitos da adição ou não adição da arabinose. Os gráficos da Fig. 3.3B permitem comparar o efeito na actividade da  $\beta$ -galactosidase em todas as construções, ao mesmo tempo.

A



B



**Fig. 3.3 – Avaliação da actividade da  $\beta$ -galactosidase.** **A)** Avaliação da actividade da  $\beta$ -galactosidase em cada plasmídeo; **B)** Avaliação da actividade da  $\beta$ -galactosidase em todas as construções simultaneamente. Estes resultados de absorvância foram obtidos aos 60 minutos após a adição do substrato X-Gal. “Ara+” significa que foi adicionada arabinose à cultura e “Ara-” que não foi adicionada arabinose à cultura. Abreviatura: Abs, absorvância.

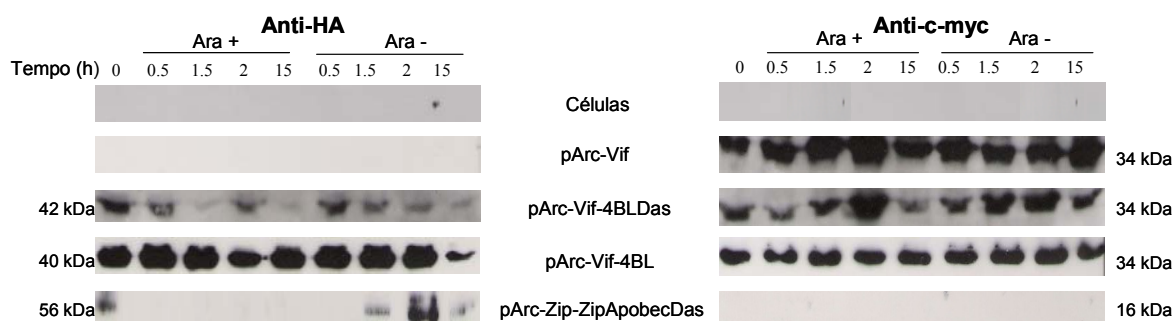
Com base na observação da figura 3.3A pode-se referir que, com este ensaio se verificou que as células X90+SspB (Células, no gráfico) apresentavam actividade de  $\beta$ -galactosidase, tal como era esperado dado que essas células não foram transformadas com nenhum plasmídeo que codificasse a proteína Arc. Quando estas células (X90+SspB) foram transformadas com o plasmídeo pArc-Vif, não se detectaram níveis de actividade de  $\beta$ -galactosidase, o que indica que o promotor  $P_{ANT}$  está continuamente a ser reprimido pela proteína Arc. Quando as células X90+SspB foram transformadas com o plasmídeo pArc-Zip-ZipApobecDas, detectaram-se níveis elevados de  $\beta$ -galactosidase, o que permite afirmar que o complexo proteico Arc-Zip-ZipApobecDas que interagiu, foi levado para degradação, quando a proteína SspB foi induzida por arabinose, deixando assim o repressor Arc de reprimir o promotor  $P_{ANT}$ . O mesmo resultado também se verificou nas células transformadas com os plasmídios pArc-Das e o pArc-Vif-4BLDas. As células transformadas com o plasmídeo pArc-Vif-4BL não apresentaram níveis tão elevados de actividade de  $\beta$ -

galactosidase, resultado um pouco estranho, dado que se estaria à espera que os níveis de actividade da  $\beta$ -galactosidase para este plasmídio, estivessem mais próximos dos registados para o plasmídio pArc-Vif-4BLDas, atendendo aos resultados obtidos no ensaio em placa. Da análise destes gráficos verifica-se ainda que, de um modo geral, a indução de SspB por arabinose parece ter algum efeito na degradação das proteínas. No entanto, também se verifica actividade da  $\beta$ -galactosidase quando a proteína SspB não é induzida o que dá mais relevância ao já referido, de que o sistema parece ser independente da sequência DAS+4. Da observação da figura 3.3B, verifica-se que o sistema parece começar a desregular após as 2 horas pós-indução com arabinose.

De um modo geral, pode-se voltar a reforçar que o sistema parece funcionar, com resultados positivos relativamente aos controlos. No entanto, é de referir que este ensaio só foi realizado uma vez, sendo necessário repeti-lo, pelo menos mais duas vezes, para confirmar a reprodutibilidade dos dados obtidos.

### 3.5 Verificação da degradação das proteínas após indução da proteína SspB

Com este ensaio, pretendia-se analisar, pela técnica de *Western Blot*, se as duas proteínas que interagem eram levadas para degradação, após a indução da proteína SspB. Os resultados obtidos encontram-se na Fig. 3.4.



**Fig. 3.4 – Avaliação da degradação das proteínas por ensaio de expressão.** “Ara+” significa que foi adicionada arabinose à cultura e “Ara-” que não foi adicionada arabinose à cultura.

Pela análise dos *Western blots* da Fig. 3.4, verifica-se que as bactérias X90+SspB transformadas com o plasmídio pArc-Vif, expressam a proteína Arc-Vif (*Western blot* revelado com anticorpo anti-c-myc) que não é degradada aquando da indução da proteína SspB por adição da arabinose. As bactérias transformadas com o plasmídio pArc-Vif-4BLDas expressam, tanto a proteína Arc-Vif (*Western blot* revelado com anticorpo anti-c-myc) como a proteína 4BLDas (*Western blot* revelado com anticorpo anti-HA). Ao longo do ensaio, verifica-se que as proteínas 4BLDas e Arc-Vif são degradadas com mais eficiência

quando se adiciona arabinose, ou seja, quando a proteína SspB é induzida. Tal facto indica que as proteínas Vif e 4BL interactivam e que a proteína SspB, quando expressa, reconhece a sequência DAS+4 que está em fusão com o scFv 4BL encaminhando todo o complexo Arc-Vif-4BL para degradação. No caso das bactérias transformadas com o plasmídeo pArc-Vif-4BL, verifica-se que as proteínas Arc-Vif (*Western blot* revelado com anticorpo anti-c-myc) e 4BL (*Western blot* revelado com anticorpo anti-HA) são expressas. Duas horas após a indução com arabinose, os níveis de expressão das proteínas Arc-Vif e 4BL parecem diminuir ligeiramente, o que sugere que, de algum modo este complexo Arc-Vif-4BL está a ser degradado. Assim, pode-se inferir que o sistema é independente da sequência DAS+4. Em relação ao plasmídeo pArc-Zip-ZipApobecDas, as bactérias transformadas com esta construção expressam eficientemente a proteína ZipApobecDas (*Western blot* revelado com anticorpo anti-HA), que é rapidamente degradada após a adição da arabinose à cultura, apesar de tal também se verificar (embora não tão eficientemente) quando não se adiciona arabinose. Esta evidência seria um indício de que, embora o sistema pareça ser independente da sequência DAS+4, quando a proteína SspB é induzida a degradação é um pouco mais eficaz. A proteína Arc-Zip, devido ao seu baixo peso molecular ou instabilidade ainda não foi detectada pela técnica de *Western blot*. Torna-se então necessário optimizar a sua expressão.

#### **4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**

O estudo das interações entre proteínas tem evoluído muito desde a descoberta de técnicas como o *phage display*, em 1985 [28] e o sistema *two-hybrid*, em levedura, em 1989 [3]. Esta última técnica tem sido melhorada [30, 53] e várias vertentes deste sistema têm surgido, como por exemplo os sistemas *two-hybrid* em bactéria [38, 40, 42, 45-47] que apresentam algumas vantagens, face aos seus homólogos em levedura. O crescimento das bactérias é mais rápido, a eficiência de transformação com DNA também é mais elevada, o número de falsos positivos que podem surgir no sistema são em menor número e proteínas que sejam tóxicas para as leveduras podem ser estudadas em bactérias [1, 31]. Uma das grandes aplicações destes sistemas é ao nível da terapia génica nomeadamente, na selecção de anticorpos contra um dado antigénio. De facto, já existem bons métodos descritos para seleccionar anticorpos, como o *phage display* [29], o *ribosome display* [24] ou o *cell display* [32]. No entanto, nestes métodos, o anticorpo não é livre de adquirir a sua conformação final, dado que se encontra em fusão com outra proteína e, nem sempre é fácil de seleccionar um anticorpo intracelular estável e que reconheça com elevada afinidade o antigénio. Um outro problema associado a estas técnicas é que não permitem uma selecção de anticorpos em ambiente redutor. Estas técnicas não serão, por isso, as mais adequadas se quisermos seleccionar um anticorpo contra um antigénio citoplasmático porque, ao não serem realizadas em ambiente redutor, o anticorpo que se seleccionar pode não conseguir, nesse tipo de ambiente, adquirir a sua conformação final e ligar-se ao antigénio. Assim, para tentar colmatar estas desvantagens, foi apresentado nesta dissertação o desenvolvimento de um novo sistema *two-hybrid* em bactéria, cujo intuito final é a sua posterior aplicação na selecção de anticorpos intracelulares, a partir de bibliotecas de anticorpos.

Este novo sistema *two-hybrid* baseia-se na manipulação da via de degradação do sistema ClpXP de *E.coli*, que avalia as interações proteína-proteína através da detecção da degradação proteica na presença da proteína SspB.

As experiências descritas nesta dissertação mostram, em primeiro lugar, que o plasmídeo pArc-Zip-ZipApobecDas é um bom controlo positivo para fortes interações proteína-proteína e que os plasmídios pArc-Das e pArc-Vif são, respectivamente, bons controlos positivos e negativos para o sistema de degradação ClpXP. Em segundo lugar, os resultados mostram que a interacção entre o Ac scFv 4BL e a proteína Vif do HIV-1 é mais fraca que a registada entre as proteínas Zip, dado que quer o número de colónias resistentes ao cloranfenicol quer os níveis de actividade da  $\beta$ -galactosidase foram inferiores aos registados para a interacção entre as proteínas Zip.

No entanto, os resultados dessas mesmas experiências levantam algumas questões pertinentes. Em relação ao aparecimento de colónias resistentes ao cloranfenicol, quando se

transforma as bactérias com o plasmídeo pArc-Vif-4BL, poderia pensar-se que existiria um outro sistema de degradação a funcionar para além do sistema ClpXP, dado que é conhecida a existência de outros sistemas de degradação de proteínas em bactéria [54]. Esta questão poderia ser resolvida realizando estes mesmos ensaios numa bactéria mutada para o sistema ClpXP. Mas, poderíamos perguntar porque não acontece o mesmo com a construção Arc-Vif. Tal pode não acontecer porque a proteína Arc-Vif pode apresentar maior estabilidade que o complexo proteico Arc-Vif-4BL que, ao ser menos estável, pode ser facilmente mais degradado por outros sistemas de degradação. Outro ponto relevante consiste em saber se a degradação de substratos, no nosso caso complexos proteicos, com o sinal DAS+4 é realmente dependente do reconhecimento por parte da proteína SspB. McGuinness *et al.* (2006) [50] defende que proteínas com o sinal DAS+4 são substratos pobres para o sistema ClpXP, a não ser que a proteína SspB esteja presente [50] e que as propriedades de degradação existentes no sinal (ou seja as sequências de reconhecimento) e o número de interações que se podem estabelecer entre a proteína SspB e a proteína ClpX seriam os principais factores que determinam a formação do complexo de degradação e, consecutivamente, a degradação da proteína com o referido sinal [55]. Porém, é relevante colocar a questão se a degradação depende da sequência DAS+4, porque no nosso caso, ocorrem interações entre proteínas, ou seja, não é apenas uma proteína que é levada para degradação, mas sim várias. Esta questão vai assim de encontro a um dos pontos já referidos acerca da existência ou não de outros sistemas de degradação a actuar sobre estas proteínas.

Os resultados obtidos nas experiências de avaliação da actividade da  $\beta$ -galactosidase, sugerem que o sistema parece desregular-se duas horas após a adição da arabinose. No entanto, é de referir que este ensaio necessita de ser repetido.

Em conclusão, este novo sistema permite detectar interações fortes proteína-proteína. No entanto, não parece ser adequado para seleccionar anticorpos a partir de uma biblioteca de anticorpos que ainda não tenha sido alvo de selecção prévia (por *phage display*, por exemplo), dado que somente com interações fortes como as das proteínas Zip é que conseguimos registar elevado número de colónias resistentes ao cloranfenicol e elevada actividade da  $\beta$ -galactosidase. Assim, este sistema será ideal para a maturação da afinidade de anticorpos já previamente seleccionados. Convém salientar que este sistema tem a vantagem de permitir interações entre proteínas, sem haver o problema da conformação espacial destas e de ocorrerem num ambiente redutor, o que é um factor ideal para seleccionar anticorpos contra antigénios citoplasmáticos. É de referir que anticorpos intracelulares podem também ser usados como extracelulares, dado que se são estáveis em ambiente redutor, de certo também o serão em ambiente oxidativo.

## **5. PERSPECTIVAS FUTURAS**

O próximo passo a realizar consistirá em otimizar a distância, em aminoácidos, que fica entre o repressor Arc e a proteína Vif, de modo a tentar estabilizar ao máximo o repressor Arc para que, por exemplo, o número de colónias, transformadas com o plasmídeo pArc-Vif, resistentes ao cloranfenicol seja praticamente nulo.

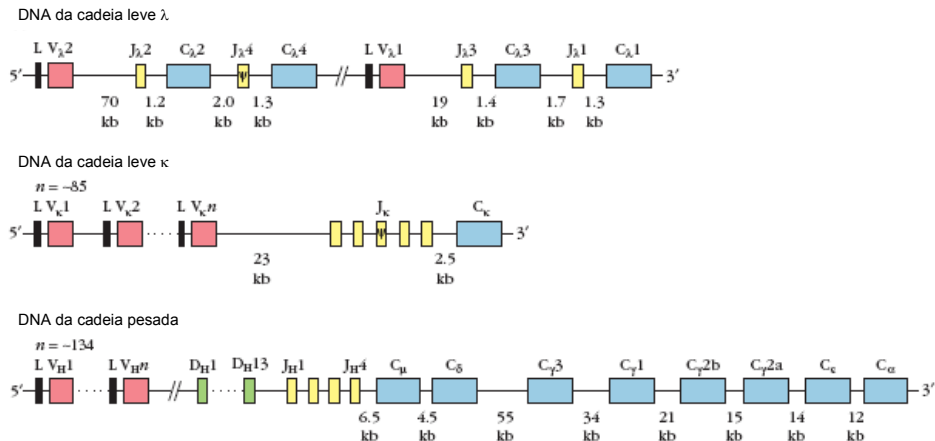
Após esta optimização, o passo necessário para validar este sistema como um bom método de selecção de anticorpos de elevada afinidade consistirá em aplicá-lo a uma biblioteca de anticorpos. Para concretizar esse objectivo, clonar-se-ia na construção Arc-Vif-4BL das uma biblioteca de anticorpos, previamente seleccionada, por exemplo por *phage display*, substituindo o anticorpo scFv 4BL, e também o antígeno correspondente, por substituição da proteína Vif. Após a selecção dos possíveis anticorpos, a sua afinidade e a sua estabilidade seriam estudadas mais pormenorizadamente.

**6. BIBLIOGRAFIA**

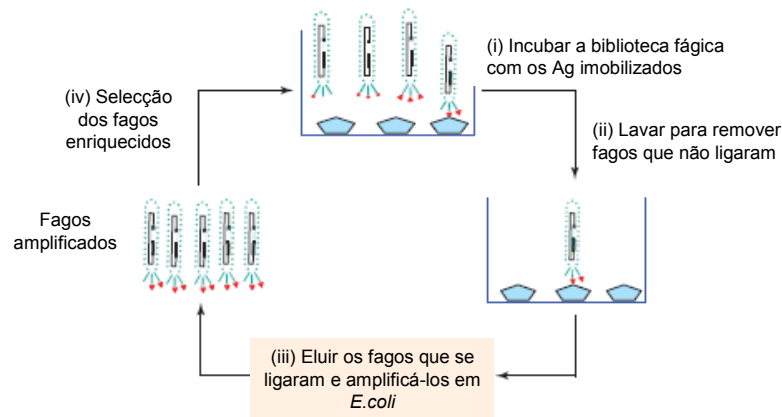
1. Ladant, D. and G. Karimova, *Genetic systems for analyzing protein-protein interactions in bacteria*. Res Microbiol, 2000. **151**(9): p. 711-20.
2. Hu, J.C., M.G. Kornacker, and A. Hochschild, *Escherichia coli one- and two-hybrid systems for the analysis and identification of protein-protein interactions*. Methods, 2000. **20**(1): p. 80-94.
3. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**(6230): p. 245-6.
4. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Cellular and molecular immunology*. 5th , updat ed. 2005, Philadelphia, PA: Saunders. 564.
5. Goldsby, R.A., *Immunology*. 5th ed. 2003, New York: Freeman. 1 v. (various pagings).
6. Lobato, M.N. and T.H. Rabbitts, *Intracellular antibodies and challenges facing their use as therapeutic agents*. Trends Mol Med, 2003. **9**(9): p. 390-6.
7. Berghman, L.R., et al., *Antibodies: an alternative for antibiotics?* Poult Sci, 2005. **84**(4): p. 660-6.
8. Kretzschmar, T. and T. von Ruden, *Antibody discovery: phage display*. Curr Opin Biotechnol, 2002. **13**(6): p. 598-602.
9. Brekke, O.H. and I. Sandlie, *Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(1): p. 52-62.
10. Dèubel, S., *Handbook of therapeutic antibodies*. 2007, Weinheim: Wiley-VCH. 3 v. (xxxiii, 1188 ).
11. Cattaneo, A. and S. Biocca, *Intracellular antibodies : development and applications*. Biotechnology intelligence unit. 1997, Berlin ; New York: Springer. 196.
12. Holliger, P. and P.J. Hudson, *Engineered antibody fragments and the rise of single domains*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(9): p. 1126-36.
13. Kontermann, R.E., *Intrabodies as therapeutic agents*. Methods, 2004. **34**(2): p. 163-70.
14. Auf der Maur, A., D. Escher, and A. Barberis, *Antigen-independent selection of stable intracellular single-chain antibodies*. FEBS Lett, 2001. **508**(3): p. 407-12.
15. Visintin, M., et al., *Intracellular antibodies for proteomics*. J Immunol Methods, 2004. **290**(1-2): p. 135-53.
16. Khoshnan, A., J. Ko, and P.H. Patterson, *Effects of intracellular expression of anti-huntingtin antibodies of various specificities on mutant huntingtin aggregation and toxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 1002-7.
17. Cohen, P.A., J.C. Mani, and D.P. Lane, *Characterization of a new intrabody directed against the N-terminal region of human p53*. Oncogene, 1998. **17**(19): p. 2445-56.
18. Tanaka, T. and T.H. Rabbitts, *Intrabodies based on intracellular capture frameworks that bind the RAS protein with high affinity and impair oncogenic transformation*. Embo J, 2003. **22**(5): p. 1025-35.
19. Goncalves, J., et al., *Functional neutralization of HIV-1 Vif protein by intracellular immunization inhibits reverse transcription and viral replication*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 32036-45.
20. Corte-Real, S., et al., *Intrabodies targeting the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus latency antigen inhibit viral persistence in lymphoma cells*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3797-802.
21. Mullen, L.M., et al., *Phage display in the study of infectious diseases*. Trends Microbiol, 2006. **14**(3): p. 141-7.
22. Stocks, M.R., *Intrabodies: production and promise*. Drug Discov Today, 2004. **9**(22): p. 960-6.
23. Aires da Silva, F., *Inibição da Replicação do Vírus da Imunodeficiência Humana por Anticorpos de Domínio Único VH Derivados de Coelho*. 2004, Universidade de Aveiro: Aveiro. p. 94.
24. He, M. and M.J. Taussig, *Ribosome display of antibodies: expression, specificity and recovery in a eukaryotic system*. J Immunol Methods, 2005. **297**(1-2): p. 73-82.
25. Schaffitzel, C., et al., *Ribosome display: an in vitro method for selection and evolution of antibodies from libraries*. J Immunol Methods, 1999. **231**(1-2): p. 119-35.
26. Hanes, J. and A. Pluckthun, *In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(10): p. 4937-42.
27. Bertschinger, J., D. Grabulovski, and D. Neri, *Selection of single domain binding proteins by covalent DNA display*. Protein Eng Des Sel, 2007. **20**(2): p. 57-68.
28. Smith, G.P., *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science, 1985. **228**(4705): p. 1315-7.
29. Barbas, C.F., III; Burton, D. R.; Scott, J.K., Silverman, G.J., *Phage Display: A Laboratory Manual*. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 736 pages.

30. Kim, J.Y., et al., *One- plus two-hybrid system, a novel yeast genetic selection for specific missense mutations disrupting protein/protein interactions*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(10): p. 1727-40.
31. Kuroda, K., et al., *Systems for the detection and analysis of protein-protein interactions*. Appl Microbiol Biotechnol, 2006. **71**(2): p. 127-36.
32. Feldhaus, M.J. and R.W. Siegel, *Yeast display of antibody fragments: a discovery and characterization platform*. J Immunol Methods, 2004. **290**(1-2): p. 69-80.
33. Maynard, J. and G. Georgiou, *Antibody engineering*. Annu Rev Biomed Eng, 2000. **2**: p. 339-76.
34. Turksen, K., *Embryonic stem cells : methods and protocols*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) ; v. 185. 2002, Totowa, N.J.: Humana Press. xvi, 499.
35. Galarneau, A., et al., *Beta-lactamase protein fragment complementation assays as in vivo and in vitro sensors of protein protein interactions*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(6): p. 619-22.
36. Hoogenboom, H.R., et al., *Antibody phage display technology and its applications*. Immunotechnology, 1998. **4**(1): p. 1-20.
37. Chien, C.T., et al., *The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(21): p. 9578-82.
38. Cairns, M.T., et al., *A novel bacterial vector system for monitoring protein-protein interactions in the cAMP-dependent protein kinase complex*. Gene, 1997. **185**(1): p. 5-9.
39. Clarke, P., P.O. Cuiv, and M. O'Connell, *Novel mobilizable prokaryotic two-hybrid system vectors for high-throughput protein interaction mapping in Escherichia coli by bacterial conjugation*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(2): p. e18.
40. Ding, Z., et al., *A novel cytology-based, two-hybrid screen for bacteria applied to protein-protein interaction studies of a type IV secretion system*. J Bacteriol, 2002. **184**(20): p. 5572-82.
41. Hays, L.B., Y.S. Chen, and J.C. Hu, *Two-hybrid system for characterization of protein-protein interactions in E. coli*. Biotechniques, 2000. **29**(2): p. 288-90, 292, 294 passim.
42. Joung, J.K., E.I. Ramm, and C.O. Pabo, *A bacterial two-hybrid selection system for studying protein-DNA and protein-protein interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7382-7.
43. Karimova, G., et al., *A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(10): p. 5752-6.
44. Jeong, K.J., et al., *APEX 2-hybrid, a quantitative protein-protein interaction assay for antibody discovery and engineering*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(20): p. 8247-52.
45. Strauch, E.M. and G. Georgiou, *A bacterial two-hybrid system based on the twin-arginine transporter pathway of E. coli*. Protein Sci, 2007. **16**(5): p. 1001-8.
46. Dmitrova, M., et al., *A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in Escherichia coli*. Mol Gen Genet, 1998. **257**(2): p. 205-12.
47. Kornacker, M.G., B. Reimsburg, and R. Menzel, *Gene activation by the AraC protein can be inhibited by DNA looping between AraC and a LexA repressor that interacts with AraC: possible applications as a two-hybrid system*. Mol Microbiol, 1998. **30**(3): p. 615-24.
48. Dove, S.L., J.K. Joung, and A. Hochschild, *Activation of prokaryotic transcription through arbitrary protein-protein contacts*. Nature, 1997. **386**(6625): p. 627-30.
49. Kolmar, H., et al., *Membrane insertion of the bacterial signal transduction protein ToxR and requirements of transcription activation studied by modular replacement of different protein substructures*. Embo J, 1995. **14**(16): p. 3895-904.
50. McGinness, K.E., T.A. Baker, and R.T. Sauer, *Engineering controllable protein degradation*. Mol Cell, 2006. **22**(5): p. 701-7.
51. Pelletier, J.N., F.X. Campbell-Valois, and S.W. Michnick, *Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(21): p. 12141-6.
52. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
53. Serebriiskii, I.G., et al., *Two-hybrid dual bait system to discriminate specificity of protein interactions in small GTPases*. Methods Enzymol, 2001. **332**: p. 277-300.
54. Gottesman, S., *Proteases and their targets in Escherichia coli*. Annu Rev Genet, 1996. **30**: p. 465-506.
55. McGinness, K.E., et al., *Altered tethering of the SspB adaptor to the ClpXP protease causes changes in substrate delivery*. J Biol Chem, 2007. **282**(15): p. 11465-73.

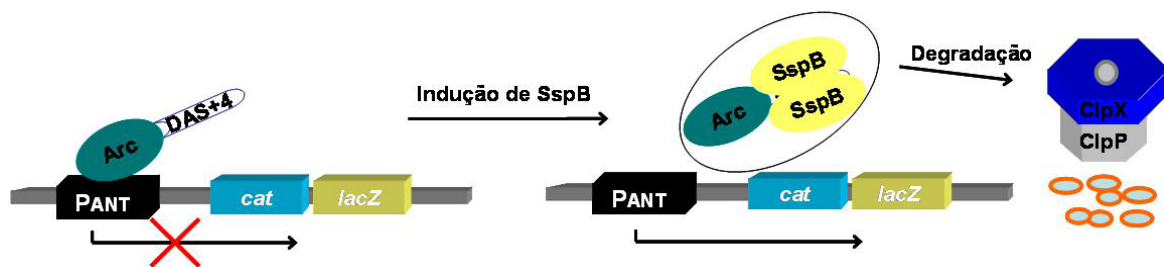
**7. ANEXOS – FIGURAS**



**Fig. 7.1 – Organização dos segmentos génicos da linha germinal das imunoglobulinas de ratinho (adaptado de [5]).**



**Fig. 7.2 – Ciclo de *phage display* para identificar fagos que apresentam à superfície anticorpos que se ligam com afinidade ao antígeno (adaptado de [21]).**



**Fig. 7.3 – Esquema representativo da degradação de proteínas com o sinal DAS+4. McGinness *et al.* [50] verificou que se a proteína Arc-DAS+4 existir na presença da proteína SspB, esta reconhece o sinal DAS+4 e direcciona a proteína Arc-DAS+4 para degradação pelo sistema ClpXP. Logo, a transcrição a partir do promotor P<sub>ANT</sub> pode ocorrer e a bactéria adquire resistência ao cloranfenicol e há actividade da β-galactosidase. Adaptado de [50].**

## 8. ANEXOS – TABELAS

**Tabela 8.1 – Vantagens e desvantagens dos métodos para estudar interacções proteína-proteína [24-35]**

Métodos	Vantagens	Desvantagens
<b><i>In vitro</i></b>		
<i>Ribosomal display</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bibliotecas com 10<sup>11</sup> Ac diferentes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Estável só sob certas condições (elevada concentração de sais, baixas temperaturas)</li> <li>▪ O Ac tem de adquirir a sua conformação enquanto ligado ao ribossoma</li> <li>▪ o ribossoma pode parar antes do final do mRNA</li> </ul>
<i>RNA display</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bibliotecas com 10<sup>13</sup> Ac diferentes</li> <li>▪ Interação entre mRNA e proteína é covalente</li> <li>▪ Maturação da afinidade dos Ac</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Estável só sob certas condições (elevada concentração de sais, baixas temperaturas)</li> <li>▪ O RNA é muito sensível a contaminações enzimáticas</li> </ul>
<i>DNA display</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bibliotecas com 10<sup>10</sup> Ac diferentes</li> <li>▪ 1 ciclo = 2 dias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Instabilidade das emulsões que contêm o DNA</li> </ul>
<b><i>In vivo</i></b>		
<i>Phage display</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bibliotecas com 10<sup>9</sup>-10<sup>11</sup> Ac diferentes</li> <li>▪ Bom para seleccionar Ac de grandes bibliotecas</li> <li>▪ Obtêm-se bons Ac que reconhecem com afinidade o Ag</li> <li>▪ Eficiente acoplamento entre genótipo e fenótipo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pode seleccionar-se Ac que não se reconhecem o Ag com elevada afinidade</li> </ul>
Sistema de dois híbridos em levedura	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ O Ag não necessita de ser purificado antes da selecção</li> <li>▪ Permite seleccionar Ac em ambiente redutor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Difícil de transformar</li> <li>▪ Falsos positivos e negativos</li> <li>▪ As proteínas em estudo têm de possuir um sequência de localização nuclear</li> </ul>
Sistema de dois híbridos em bactéria	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ O Ag não necessita de ser purificado antes da selecção</li> <li>▪ Eficiência de transformação do DNA elevada</li> <li>▪ Rapidez</li> <li>▪ Crescimento mais rápido</li> <li>▪ Usado para proteínas que possam ser tóxicas para levedura</li> <li>▪ Permite seleccionar Ac em ambiente redutor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Ambiente citoplasmático redutor, deste modo, alguns Ac podem não adquirir a conformação ideal</li> </ul>
<i>Cell display</i> em levedura	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bibliotecas com 10<sup>9</sup> Ac diferentes</li> <li>▪ Maquinaria de <i>folding</i> eucariota</li> <li>▪ Permite uma selecção fácil por citometria de fluxo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Difícil de transformar</li> <li>▪ A selecção por citometria de fluxo requer experiência</li> </ul>
<i>Cell display</i> em bactéria	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bibliotecas com 10<sup>10</sup> Ac diferentes</li> <li>▪ Eficiência de transformação de DNA elevada</li> <li>▪ Crescimento rápido</li> <li>▪ A engenharia de Ac não fica cara</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Algumas modificações pós-traducionais não se processam</li> <li>▪ O citoplasma bacteriano tem ambiente redutor</li> </ul>
Ensaio de complementação proteica (PCA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Método barato</li> <li>▪ Pode ser automatizado</li> <li>▪ A divisão da enzima é bem estudada</li> <li>▪ Combina seleções com testes biológicos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Não se realiza em apenas um ensaio, mas numa série deles</li> </ul>

Abreviaturas: Ac, anticorpo; Ag, antígeno.

**Tabela 8.2 – Enzimas de restrição utilizadas neste trabalho**

Enzima	Sequência de restrição 5'-3'	Fonte
<i>Clal</i>	ATCGAT	New England Biolabs
<i>EcoRI</i>	G'AATTC	Fermentas
<i>KpnI</i>	GGTAC'C	Fermentas
<i>SfiI</i>	GGCCNNNN'NGGCC	Fermentas
<i>XhoI</i>	C'TCGAG	Fermentas
<i>Taq</i> DNA polimerase		ABgene
T4 DNA ligase		New England Biolabs

**Tabela 8.3 – Estirpes bacterianas e plasmídios utilizados neste trabalho**

Estirpes bacterianas e plasmídios	Descrição	Referência
<b>Estirpes bacterianas</b>		
TOP10F'	F <sup>'</sup> , mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU kalc ΔrpsL endA1nupG	Invitrogen
X90 sspB::Kan transduzida com Pró-fago λAC201	F' lacI <sup>q</sup> lac' pro' lara Δ(lac-pro) nalA argE(am) rif <sup>r</sup> thi-1	[50]
<b>Plasmídios</b>		
pCH410-SspB-SD1	Tet <sup>r</sup> Plasmídio utilizado para induzir a proteína SspB a partir do promotor P <sub>BAD</sub>	[50]
pTrc99A	Amp <sup>r</sup> Plasmídio base para a construção dos plasmídios com as proteínas a testar. As proteínas de interesse são expressas a partir do promotor P <sub>trc</sub>	[50]
pArc-Das	Plasmídio igual ao pTrc99A	[50]
pArc-Vif	Plasmídio Arc-Das sem a sequência DAS+4	Presente estudo
pArc-Vif-4BLDas	Plasmídio Arc-Das com a proteína Vif e o scFv 4BL	Presente estudo
pArc-Vif-4BL	Plasmídio Arc-Vif com o scFv 4BL	Presente estudo
pArc-Zip-ZipApobecDas	Plasmídio Arc-Das com as proteínas Zip e ZipApobec	Presente estudo
pHIV-NL4-3	Vector com a proteína Vif	NIH
pCDNA3.1-4BL	Plasmídio pCDNA3.1, com o fragmento scFv 4BL	[23]
pCDNA3.1-ZipB <sub>2</sub>	Plasmídio pCDNA3.1, com o fragmento Zip	[35]
pCDNA3.1-ZipApobecHA	Plasmídio pCDNA3.2, com o fragmento ZipApobec	Lab.URIA-CPM

**Tabela 8.4 – Primers utilizados neste trabalho**

Par de Primers	Nome	Região amplificada	Sequência 5'-3'	Enzima de restrição
1	R1-Arc-F	<b>Arc</b>	CTG TGA ATT CTG AGA TTT ATC AAC GC	<i>EcoRI</i>
	Arc-R		CAA TCA TCA CCT GCC ATC TGT TTT CGT CGT GCT GGT TCT TGT GGT G	
2	Vif-F-Fusão-Arc	<b>Vif</b>	GAA AAC AGA TGG CAG GTG ATG ATT G	<i>XhoI</i>
	Vif-Myc-xho-R		CCG CTC GAG CGG TTA TAA GTC TTC TTA AGA AAT AAG TTT TTG TTC ATC GAT GTG TCC ATT CGT TGT ATG GCT CC	
3	4BL-Das-F-xho	<b>4BLDas</b>	CCG CTC GAG CGG AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATA TGA CCG TGG CCC AGG CG	<i>XhoI</i>
	4BL-R-Das		CGG GGT ACC CCG TTA GGA AGC GTC AGC ATA GTT TTC GCT GTA GTT TTC ATC GTT AGC AGC GTC GTG CTG GTT CTT AGA AGC GTA GTC CCG AAC GTC	
4	4BL-Das-F-xho	<b>4BL</b>	CCG CTC GAG CGG AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT ATA TGA CCG TGG CCC AGG CG	<i>XhoI</i>
	4BL-R-Kpn		CGG GGT ACC CCG TTA AGA AGC GTA	
5	R1-Arc-F	<b>Arc</b>	CTG TGA ATT CTG AGA TTT ATC AAC GC	<i>EcoRI</i>
	Arc-R-Zip		GCT GTC GTG CTG GTT CTT GTG GTG	
6	Zip-Arc-F	<b>Zip</b>	CAC CAC AAG AAC CAG CAC GAC AGC GGC GGA GGC GGC CGC AAC ACT GAA GCC GCC AGG C	<i>ClaI</i>
	Zip-R-Cla		CCA TCG ATC CCG CGT TCG CCA ACT AAT TTC	
7	Zip-Sfi-F	<b>ZipApobec</b>	GAG GAG GAG GAG GAG GAG GCG GGG CCC AGG CGG CCA ACA CTG AAG CCG CCA GGC	<i>SfiI</i>
	R-Ap-Sfi		GAG GAG GAG GAG GAG GAG CTT GGC CGG CCT GGC CGT TTT CCT GAT TCT GGA GAA TGG C	

**Tabela 8.5: Anticorpos utilizados nos Western Blots**

Anticorpo	Diluição utilizada em 3% de leite	Referência
Anti-[c-myc]-peroxidase	1:5000	Roche
Anti-HA-peroxidase 3F10	1:5000	Roche