

## **5. Referências bibliográficas:**

- ADLER, R. Trophic interactions in retinal development and in retinal degenerations in vivo and in vitro studies. Em The Retina: a model for cell biology studies. Parte I. (Ed. Farber, D. e Adler, R.) Academic Press Inc. London, p. 112-143, 1986.
- AERTS, A. M.; FRANÇOIS, I. E. J. A.; BAMMENS, L.; CAMMUE, B. P. A.; SMETS, B.; WINDERICKX, J.; ACCARDO, S.; DE VOS, D. E. & THEVISSEN, K. Level of M(IP)<sub>2</sub>C sphingolipid affects plant defensin sensitivity, oxidative stress resistance and chronological life-span in yeast. FEBS Lett. v. 580, p. 1903-1907, 2006.
- ALEXANDER, D.; GOODMAN, R. M.; RELLA, M. G.; GLASCOCK, C.; WEYMANN, K.; FRIEDRICH, L.; MADDOX, D.; AHL GOY, P.; LUNTZ, T.; WARD, E. & RYALS, J. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 90, p.7327-7331, 1993.
- ALEXIADES, M. R. & CEPKO, C. L. Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during development of the rat retina. Dev. Dyn., v. 205, n. 3, p. 293-307, 1996.
- ALMEIDA, M. S.; CABRAL, K. M. S.; MEDEIROS, L. N.; VALENTE, A. P.; ALMEIDA, F. C. & KURTENBACH, E. cDNA cloning and heterologous expression of functional cysteine-rich antifungal protein *Psd1* in the yeast *Pichia pastoris*. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 395, p. 199-207, 2001.
- ALMEIDA, M. S.; CABRAL, K. M.; ZINGALI, R. B. & KURTENBACH, E. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. Arch. Biochem. Biophys., v. 378, p. 278-286, 2000.
- AROOZ, T.; YAM, C. H.; SIU, W. Y.; LAU, A.; LI, K. K. W. & POON, R.Y.C. On the concentrations of cyclins and cyclin-dependent kinases in extracts of cultured human cells. Biochemistry, v. 39, p. 9494-9501, 2000.

BAGNAT, M.; KERÄNEN, S.; SHEVCHENKO, A.; SHEVCHENKO, A. & SIMONS, K. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 97, p. 3254-3259, 2000.

BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B. & DINESH-KUMAR, S. P. Signaling in plant-microbe interactions. Science, v. 276, p. 726-733, 1997.

BANDHOLTZ, L. et al. Antimicrobial peptide LL-37 internalized by immature human dendritic cells alters their phenotype. Scandinavian Journal of Immunology, v. 63, p. 410-419, 2006.

BEAZLEY, L. D.; PERRY, V. H.; BAKER, B. & DARBY, J. E. Ann investigation into the role of ganglion cells in the regulation of division and death of other retinal cells. Dev. Brain Res. v. 33, p. 169-184, 1987.

BENCHIMOL, M. & ATTIAS, M. Métodos de Estudos da Célula. Fenorte/UENFE. 1992.

BOISSON, B.; GIGLIONE, C. & MEINNEL, T. Unexpected Protein Families Including Cell Defense Components Feature in the N-Myristoylome of a Higher Eukaryote. J. Biol. Chem., v. 278, n. 44, p. 43418-43429, 2003.

BRANDSTADTER, J.; ROSSBACH, C. & THERES, K. Expression of genes for a defensin and a proteinase inhibitor in specific areas of the shoot apex and the developing flower in tomato. Molecular Genetics, v. 252, p. 146-154, 1996.

BROEKAERT, W. F.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSEN, K.; DE SAMBLANX, G. W., & OSBORN R. W. Antimicrobial peptides from plants, Crit. Rev. Plant. Sci. v. 16, p. 297-323, 1997.

BROEKAERT, W. F.; TERRAS, F. R. G.; CAMMUE, B. P. A. & OSBORN, R. W. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system, Plant Physiology. v. 108, p. 1353-1358, 1995.

BROEKAERT, W. F.; MARIËN, W.; TERRAS, F.; DE BOLLE, M.; PROOST, P.; VAN DAMME, J.; DILLEN, L.; CLAEYS, M.; REES, S.; VANDERLEYDEN, J. & CAMMUE, B. P. A. Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. Biochemistry, v. 31, p. 4308-4314, 1992.

BROEKAERT, W. F.; VAN PARIJS, J.; LEYNS, F.; JOOS, H. & PEUMANS, W. J. A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science*, v. 245, p. 1100-1102, 1989.

BRUIX, M.; JIMENEX, M. A.; SANTORO, J.; GONZALEZ, C.; COLILLA, F. J.; MENDEZ, E. & RICO, M. Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry*, v. 32, p. 715-724, 1993.

CABRAL, K. M.; ALMEIDA, M. S.; VALENTE, A. P.; ALMEIDA, F. C. & KURTENBACH, E. Production of the active antifungal *Pisum sativum* defensin 1 (*Psd1*) in *Pichia pastoris*: overcoming the inefficiency of the STE13 protease. *Protein Expression and Purification*, v. 31, p. 115-122, 2003.

CABRAL, K.M. O envolvimento dos peptídios antimicrobianos (*Psd1* e *Psd2*) com a resposta de defesa da planta de ervilha (*Pisum sativum*) contra fungos. Tese de Doutorado do Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Bioquímica Médica, CCS, UFRJ, Rio de Janeiro, 2003.

CAMMUE, B. P. A.; DE BOLLE, M. F. C.; TERRAS, F. R. G.; PROOST, P.; REES, S.; VANDERLEYDEN, J. & BROEKAERT, W.F. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.* v. 267, p. 2228-2233, 1992.

CHANG, T. L. & KLOTMAN, M. E. Defensins: natural anti-HIV peptides, AIDS Reviews, v. 6, p. 161-168, 2004

CHUNG, W. O. & DALE, B. A., Innate Immune Response of Oral and Foreskin Keratinocytes: Utilization of different signaling pathways by various bacterial species, *Infection and Immunity*, v. 72, n. 1, p. 352-358, 2004.

CIA, E. & SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. & REZENDE, J. A. M. (Eds.) Doenças das plantas cultivadas. Manual de Fitopatologia, v. 2, n. 3, p. 33-48, 1997.

COLILLA, F. J; ROCHER, A. & MENDEZ, E. Gamma-purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm, *FEBS Lett.* v. 270, p. 191-194, 1990.

DANGL, J. L. & JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. *Nature*, v. 411, p. 826-833, 2001.

DE SAMBLANX, G. W.; GODERIS, I. J.; THEVISSEN, K.; RAEMAEKERS, M.; FANT, F.; BORREMANS, F.; ACLAND, D. P.; OSBORN, R. W.; PATEL, S. & BROEKAERT, W. F. Mutational analysis of a plant defensin from radish (*Raphanus sativus* L.) reveals two adjacent sites important for antifungal activity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p. 1171-1179, 1997.

DENHAM, S. Cell proliferation study of the neural retina in the two-day rat. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, v. 18 (1), p. 53-66, 1967.

DEPAMPHILIS, M. L. The “ORC cycle”: a novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication. *Gene*, v. 310, p. 1-15, 2003.

DOVER, R. & PATEL, K. Improved methodology for detecting bromodeoxyuridine in cultured cells and tissue sections by immunocytochemistry. *Histochem. Cell Biol.*, v. 102, p. 383-387, 1994.

DYER, M.A. & CEPKO, C. L. (2001) Regulating proliferation during retinal development. *Nature Rev. Neuroscience*, v. 2, p. 333-342.

FALQUET, L.; PAGNI, M.; BUCHER, P.; HULO, N.; SIGRIST, C. J; HOFMANN, K. & BAIROCH, A. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.*, v. 30, p. 235-238, 2002.

FARAZI, T. A.; WAKSMAN, G. & GORDON, J. I. The biology and enzymology of N-myristoylation, Minireview. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 43, p. 39501-39504, 2001.

FAURE, J. D.; GINGERICH, D. & HOWELL, S. H. An *Arabidopsis* immunophilin, AtFKBP12, binds to AtFIP37 (FKBP interacting protein) in an interaction that is disrupted by FK506 . *The Plant Journal*, v. 15, p. 783, September 1998 (Short Communication).

FEYS, B. J. & PARKER, J. E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics*, v. 16, p. 449-455, 2000.

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

FINLEY, K. R. & BERMAN, J. Microtubules in *Candida albicans* hyphae drive nuclear dynamics and connect cell cycle progression to morphogenesis. *Eukaryot. Cell*, v. 4, p. 1697-1711, 2005.

FLOR, H. H. Host-parasite interactions in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology*, v. 45, p. 680-685, 1955.

FRAGEL-MADEIRA, L. Efeito de Ativação de Plaquetas (PAF) sobre o ciclo celular na retina em desenvolvimento. Tese de Doutorado do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS, UFRJ, Rio de Janeiro, 2004.

FRAGEL-MADEIRA, L. Estudo da migração nuclear intercinética através da imunolocalização de proteínas do ciclo celular na retina em desenvolvimento. Monografia. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro, 2000.

FUGITA, S. Kinetics of cellular proliferation. *Exp. Cell Res.*, v. 28, p. 52-60, 1962.

GAO, A. G.; HAKIMI, S. M.; MITTANK, C. A.; WU, Y.; WOEMER, B. M.; STARK, D. M.; LIANG, J. & ROMMENS, G. M. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology*, v. 8, p. 1307-1310, 2000.

GARCÍA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; ALAMILLO, J. M. & RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P. Plant defense peptides. *Biopolymers*, v. 47, p. 479-491, 1998.

GARCÍA-OLMEDO, F.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P.; MOLINA, A.; ALAMILLO, J. M.; LOPEZ-SOLANILLA, E.; BERROCAL-LOBO, M. & POZA-CARRION, C. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Letters*, v. 498, p. 219-222, 2001.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Antifungals targeted to protein modification: focus on protein N-myristoyltransferase. *Expert Opinum*, v. 11, n. 8, p. 1117-1125, 2002.

GHANNOUM, M.; ABU EL-TEEN, A. K. & RADWAN, S. S. Blocking adherence of *Candida albicans* to buccal epithelial cells by yeast glycolipids, yeast wall lipids and lipids from epithelial cells. *Mykosen*, v. 30, p. 371-378, 1987.

GOULART, A. C. P. Efeito do tratamento de sementes de algodão com fungicidas no controle do tombamento de plântulas causado por *Rhizoctonia solani*. Fitopatologia Brasileira, v. 27, p. 399-402, 2002.

GOULART, A.C. P. Tratamento de sementes do algodoeiro com fungicidas. In: EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste (Dourados, MS). In: Algodão: Tecnologia de produção. Dourados; EMBRAPA-CPAO; Campina Grande, p. 140-158, 2001.

GREEN, T. R. & RYAN, C. A. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insect. Science, v. 175, p. 776-777, 1972.

HANKS, J. N.; SNYDER, A. K.; GRAHAM, M. A.; SHAH, R. K.; BLAYLOCK, L. A.; HARRISON, M. J. & SHAH, D. M. Defensin gene family in *Mendicago truncatula*: structure, expression and induction by signal molecules. Plant. Mol. Biol., v. 58, p. 385-399, 2005.

HAYES, N. L. & NOWAKOWSKI, R. S. Exploiting the dynamics of S-phase tracers in the developing brain: interkinetic nuclear migration for cells entering versus leaving the S-phase, Dev. Neurosci., v. 22, p. 44-55, 2000.

HSU, S.-M. & RAIN, L. Protein A, Avidin and Biotin in immunohistochemistry. J. Histochem. Cytochem., v. 29, n. 11, p. 1349-1353, 1981.

HUANG, X. & MILLER W. Resetting to DNA matrix. Adv. Appl. Math. v. 12, p. 373-381, 1991.

JIA, Y.; MCADAMS, S. A.; BRYAN, G. T.; HERSEY, H. P. & VALENT, B. Direct interaction of resistance gene and avirulence products confers rice blast resistance. EMBO J., v. 19, p. 4004-4014, 2000.

JIMENEZ-LUCHO, V.; GINSBURG, V. & KRIVAN, H. C. *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-1Cer), a possible adhesion receptor for yeasts. Infection Immunology, v. 58, p. 2085-2090, 1990.

KAUFFMANN, S., LEGRAND, M., GEOFFROY, P. & FRITIG, B. Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- $\beta$ -glucanase activity. EMBO J., v. 6, p. 3209-3212, 1987.

KOGA, J.; YAMAUCHI, T.; SHIMURA, M.; OGAWA, N.; OSHIMA, K.; UMEMURA, K.; KIKUCHI, M. & OGASAWARA, N. Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 31985-31991, 1998.

KONG, M.; BARNES, E. A.; OLLENDORFF, V. & DONOGHUE, D. J. Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *EMBO Journal*, v. 19, p. 1378-1388, 2000.

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

LAY, F. T.; BRUGLIERA, F. & ANDERSON, M. A. Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia, *Plant Physiol.*, v.131, p. 1283-1293, 2003.

LEE D.G.; KIM P.I.; PARK Y.; PARK S.-C.; WOO E. -R. & HAHM K.-S. Antifungal mechanism of SMAP-29 (1-18) isolated from sheep myeloid mRNA against *Trichosporon beigelii*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 295, p. 591-596, 2002.

LIU, D.; RAGHOTHAMA, K. G.; HASEGAWA, P. M. & BRESSAN, R. A. Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 91, p. 1888–1892, 1994.

MAHFOUD R.; GARMY N.; MARESCA M.; YAHI N.; PUIGSERVER A. & FANTINI, J. Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins. *J. Biol. Chem.*, v. 277, n. 13, p. 11292-6, 2002.

MALISAN, F.; RIPPO, M. R.; DEMARIA, R. & TESTI, R. Lipid and glycolipid mediators in CD95 induced apoptotic signaling. *Results Probl. Cell Differ.*, v. 23, p. 65-76, 1999.

MEDEIROS, L.N. Interação da defensina Psd1 com membranas lipídicas: Estudo de dinâmica molecular por Ressonância Magnética Nuclear e citotoxicidade. Tese de Mestrado do Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Bioquímica Médica, CCS, UFRJ, Rio de Janeiro, 2004.

MEYER, B.; HOULNE, G.; POZUETA-ROMERO, J.; SCHANTZ, M. L. & SCHANTZ, R. Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper. Upregulation during ripening and upon wounding. *Plant Physiol.*, v. 112, p. 615-622, 1996.

MORRIS, N. R. Nuclear migration: from fungi to the mammalian brain. *J. Cell Biol.*, v. 148, p. 1097-1101, 2000.

NORBURY C. & NURSE P. Animal cell cycles and their control. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 61, p. 441-470, 1992.

OHKURA, N.; OHKUBO, T.; MARUYAMA, K.; TSUKADA, T. & YAMAGUCHI, K. The orphan nuclear receptor NOR-1 interacts with the homeobox containing protein Six31. *Developmental Neuroscience*, v. 23, p.17-24A.

OSBORN, R. W.; DE SAMBLANX, G. W.; THEVISSEN, K.; GODERIS, I.; TERREKENS, S.; VAN LEUVEN, F.; ATTENBOROUGH, S.; REES, S. B. & BROEKAERT, W. F. Isolation and characterization of plant defensins from seeds of Asteraceae, Fabaceae, Hippocastanaceae and Saxifragaceae. *FEBS Letters*, v. 368, p. 257-262, 1995.

OSUSKY, M.; ZHOU, G.; OSUSKA, L.; HANCOCK, R. E.; KAY, W. W. & MISRA, S. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnology*, v. 18, p. 1162 – 1166, 2000.

PANDEY, A & MANN, M. Proteomics to study genes and genomes: Functional genomics. *Nature (London)*, v. 405, p. 837-846, 2000.

PARK, H. C.; KANG, K. H.; CHUN, H. J.; KOO, J. C.; CHEONG, Y. H.; KIM, C. Y.; KIM, M. C.; CHUNG, W. S.; KIM, J. C; YOO, J. H.; KOO, Y. D.; KOO, S. C.; LIM, C. O.; Lee, S. Y. & CHO, M. J. Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in Chinese cabbage. *Plant Mol. Biol.*, v. 50, p. 59-69, 2002.

PAZGIERA, M.; HOOVER, D. M.; YANG, D.; LU, W. & LUBKOWSKI J. Human beta-defensins. *Cell Molecular Life Science*, v. 63, p. 1294-1313, 2006.

RAPPORT, D. H. & STONE, J. The site of commencement of maturation in mammalian retina: observations in the cat Dev. Brain Res. v. 5, p. 273-279, 1982.

RAULIN, J., Human immunodeficiency virus and host cell lipids. Interesting pathways in research for a new HIV therapy. Prog Lipid Res. v. 41, n. 1, p. 27-65. Review, 2002.

REHEN, S. K.; NEVES, D. D. C.; FRAGEL-MADEIRA, L.; BRITTO, L. R. G. & LINDEN, R. Selective sensitivity of early post-mitotic retinal cells to apoptosis induced by inhibition of protein synthesis, Eur. J. Neurosci., v. 11, p. 4349-4356, 1999.

REHEN, S. K.; VARELLA, M. H.; FREITAS, F. G.; MORAES, M. O. & LINDEN, R. Contrasting effects of protein synthesis inhibition and of cyclic AMP on apoptosis in the developing retina, Development, v. 122, p. 1439-1448, 1996.

REN, T.; QU, F. & MORRIS, T. J. HRT Gene Function Requires Interaction between a NAC Protein and Viral Capsid Protein to Confer Resistance to Turnip Crinkle Virus. Plant Cell, v. 12, p. 1917–1925, 2000.

RIZZOLI, R.; BARATA, B.; MARALDI, N. M., et al. DNA synthesis progression in 3T3 synchronized fibroblasts: a high resolution approach. Histochemistry, v. 97, p. 181-187, 1992.

RODRIGUES, M. L.; TRAVASSOS, L. R.; MIRANDA, K. R.; FRANZEN, A. J.; ROZENTAL, S.; SOUZA, W. DE; ALVIANO, C. S. & BARRETO-BERGTER E. Human Antibodies against a Purified Glucosylceramide from *Cryptococcus neoformans* Inhibit Cell Budding and Fungal Growth. Infection and Immunity, v. 68, n. 12, p. 7049-7060, December 2000.

RYAN, C. A. Proteinase inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. v. 28, p. 425-449, 1990.

RYAN, C. A. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. Biochim. Biophys. Acta, v. 1477, p. 112-121, 2000.

SADLER, K.; EOM, K. D.; YANG, J.-L; DIMITROVA, Y. & TAM, J.P. Translocating proline-rich peptides from the antimicrobial peptide bactenecin 7. Biochemistry, v. 41, p. 14150-14157, 2002.

SEGURA, A.; MORENO, M.; MOLINA, A. & GARCIA-OLMEDO, F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). FEBS Letters, v. 435, p. 159-162, 1998.

SERNA, A.; MAITZ, M.; O'CONNELL T.; SANTANDREA, G; THEVISSEN, K.; TIERENS, K.; HUEROS, G.; FALERI, C.; CAI, G.; LOTTSPEICH, F. & THOMPSON, R. D. Maize endosperm secretes a novel antifungal protein into adjacent maternal tissue. Plant J., v. 25, p. 687-698, 2001.

SIDMAN, R. L. Histogenesis of mouse retina studied with thymidine-H3. In: The structure of eye (Ed. Smelser, G.K.) Academic Press, London, p. 487-506, 1961.

SORIA, J. C.; JANG, S. J.; KHURI, F. R. et al. Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. Cancer Res., v. 60, p. 4000-4004, 2000.

SSOELLICK, T. -R.; UHRING, J. F.; BUCHER, G. L.; KELLMANN, J.-W. & SCHREIER, J.-W. The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. PNAS, v. 97, n. 5, p. 2373-2378, February 29, 2000.

TAILOR, R.; ACLAND, D.; ATTENBOROUGH, S; CAMMUE, B. P. A.; EVANS, I. J.; OSBORN, R. W.; RAY, J.; REES, S. B. & BROEKAERT, W. F. A novel family of small cysteine-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. J. Biol. Chem., v. 272, p. 24480-24487, 1997.

TAKAHASHI, T.; NOWAKOWSKI, R.S. & CAVINESS, V.S. BrdU as an S-phase marker for quantitative studies of cytokinetic behavior in the murine cerebral ventricular zone. J. Neurocytology, v. 21, p. 185-197, 1992.

TAKENO, S., NOGUCHI, T., KIKUCHI, R. et al. Prognostic value of cyclin B1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Cancer, v. 94, p. 2874-2881, 2002.

TANG, X.; FREDERICK, R. D.; ZHOU, J.; HALTERMAN, D. A.; JIA, Y. & MARTIN, G. B. Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. Science, v. 274, p. 2060-2062, 1996.

TERRAS, F. R.; SCHOOFS, H. M.; DE BOLLE, M. F.; VAN LEUVEN, F.; REES, S.B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. & BROEKART, W.F. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.*, v. 267, p. 15301-15309, 1992.

TERRAS, F. R. G.; EGGERMONT, K.; KOVALEVA, V.; RAIKHEL, N. V.; TORREKENS, S.; VAN LEUVEN, F.; OSBORN, R. W.; KESTER, A.; REES, S. B.; VANDERLEYDEN, J.; CAMMUE, B. P. A. & BROEKAERT, W. F. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish. Their role in host defense. *Plant Cell*. v. 7, p. 573-588, 1995.

TETZLAFF, M. T. et al. Cyclin F disruption compromises placental development and affects normal cell cycle execution. *Mol. Cellular Biol.*, v. 24, n. 6, p. 2487-2498. 2004.

THEVISSEN, K.; OSBORN, R. W.; ACLAND, D. P. & BROEKAERT, W. F. Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Mol. Plant-Microbe Interact*, v. 13, p. 54-61, 2000a

THEVISSEN, K.; CAMMUE, B. P. A.; LEMAIRE, K.; WINDERICKX, J.; DICKSON, R. C.; LESTER, R. L.; FERKET, K. K. A.; VAN EVEN, F.; PARRET, A. H. A. & BROEKAERT, W. F. A gene encoding a sphingolipid biosynthesis enzyme determines sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 97, p. 9531-9536, 2000b.

THEVISSEN, K.; FERKET, K. K. A.; FRANÇOIS, I. E. J. A. & CAMMUE, B. P. A. Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. *Peptides*, v. 24, p. 1705-1712, 2003.

THEVISSEN, K.; FRANÇOIS, I. E. J. A.; TAKEMOTO, J. Y.; FERKET, K. K. A.; MEERT, E. M. K. & CAMMUE, B. P. A. DmAMP1, an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*), interacts with sphingolipids from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 226, p. 169-173, 2003.

THEVISSEN, K.; TERRAS, F. R. G. & BROEKAERT, W. F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 5451-5458, 1999.

THEVISSEN, K.; WARNECK, D. C.; FRANÇOIS, I. E.; LEIPELT, M.; HEINZ, E.; OTT, C.; ZAHRINGER, U.; THOMMA, B. P.; FERKET, K. K. & CAMMUE, B. P. Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *J. Biol. Chem.*, v. 279, p. 3900-3905, 2004.

THOMMA, B. P. H. J.; CAMMUE, B. P. A. & THEVISSEN, K. Plant defensins. *Planta*, v. 216, p. 193-202, 2002.

THOMMA, B. P. H. J. & BROEKAERT, W. F. Tissue-specific expression of plant defensin genes *PDF2.1* and *PDF2.2* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 36, p. 533-537, 1998.

UMEMURA, K.; OGAWA, N.; YAMAUCHI, T.; IWATA, M.; SHIMURA, M. & KOGA, J. Cerebroside elicitors found in diverse phytopathogens activate defense responses in rice plants. *Plant Cell Physiology*, v. 61, p. 676-683, 2000.

VAN CRIEKINGE, W. & BEYAERT, R. Yeast two-hybrid: State of the art. *Online. Biol. Proced.* v. 2, p. 1-38, 1999.

VAN PARIJS, J; BROEKAERT, W. F.; GOLDSTEIN, I. J. & PEUMANS, W. J. Hevein: an antifungal protein from rubber tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, v. 183, p. 258-264, 1991.

WOYKE, T.; ROBERSON, R. W.; PETTIT, G. R.; WINKELMANN, G. & PETTIT, R. K. Effect of Auristatin PHE on microtubule integrity and nuclear localization in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, p. 3802-3808, 2002.

XIANG, X.; OSMANI, A. H.; OSMANI, S. A. & MORRIS, N. R. NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration. *Mol. Biol. Cell*, v. 6, p. 297-310, 1995.

XU, Y.; CHANG, P. F. L.; LIU, D.; NARASIMHAN, M. L.; RAGHOTHAMA, K. G.; HASEGAWA, P. M. & BRESSAN, R. A. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell*, v. 6, n. 8, p. 1077-1085, 1994.

YOUNG, R. W. Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. *Dev. Brain Res.*, v. 21, p. 229-239, 1985.

YASUDA, M.; TAKESUE, F.; INUTSUKA, S. et al. Overexpression of cyclin B1 in gastric cancer and its clinicopathological significance: an immunohistological study. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v. 128, p. 412–416, 2002.

YOSHIDA, T.; TANAKA, S.; MOGI, A.; SHITARA, Y. & KUWANO, H. The clinical significance of Cyclin B1 and Wee1 expression in non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, v. 15, p. 252–256, 2004.

ZASLOFF, M. Antimicrobial Peptides in Health and Disease. *The New England Jounal of Medicine*, v. 347, p. 1199-1200, 2002a.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, v. 415, p. 389-395, 2002b.

## 6. Anexos

### 6.1. Anexo 1 – Domínios de miristoilação

Espécies de Planta	Defensina	UniProtKB/ TrEMBOL entry	Domínios de miristoilação	No de domínios de miristoilação	No de amino ácidos
<i>Urtica dioica L.</i> (urtiga)	Agglutinin isolectin I	Q9S7L1	41 GVIGNI 46 74 GVSYGH 79	2	102
<i>Triticum aestivum L.</i> (trigo)	Agglutinin isolectin I (precursor)	P10968	53 GGDYCG 58 60 GCQNGA 65 73 GSQAGG 78 96 GAEYCG 101 116 GSQAGG 121 139 GSEFCG 144 145 GGCQSG 150 163 GGRVCT 168 180 GIGPGY 185 189 GCQSGG 194	10	212
<i>Hevea brasiliensis</i> (Seringueira)	Pro-hevein (precursor)	P02877	13 GVAIAE 18 64 GVGGS 69 124 GQSSCG 129 140 GAKTTV 145	4	204
<i>Amaranthus caudatus</i>	AMP1 e 2 (precursor)	P27275	25 GVGECL 30 37 GMCCSQ 42	2	86
<i>Mirabilis jalapa</i> (Maravilha)	AMP1	P25403	30 GGRCNE 35 52 GQGYGY 57	2	61

<i>Zea mays</i> (milho)	Defensin (precursor)	Q5CC32	22GMDASA 27 41 GAIPGA 46 62 GGGFCN 67	3	107
<i>Hordeum vulgare</i> (cevada)	PRB1-2 (precursor )	P35792	74 GGPYGE 79 84 GSAGAD 89 109 GSNTCA 114 145 GVFITC 150 156 GNIVGQ 161	5	164
<i>Dahlia merckii</i>	DmAMP1	NCBI S66221	12 GNCGNT 17 29 GAAHGA 34	2	50
<i>Spinacia oleracea</i> (espinafre)	AMPD1	P81570	1GIFSSR 6	1	25
<i>Arabidopsis Thaliana</i>	Defensin-like protein	Q4VNZ1	22 GVPLCK 27 48 GAGICS 53	2	69
<i>Arabidopsis Thaliana</i>	Defensin-like protein	Q4VNZ2	22 GVPLCK 27 48 GAGICS 53	3	66
<i>Pisum sativum</i> (ervilha)	<i>Psd1</i>	P81929	12 GVCFTN 17 33 GTCHNW 38	2	46
<i>Pisum sativum</i>	<i>Psd2</i>	P81930	-	-	47
<i>Pisum sativum</i>	DRR230-c	Q8H6L2	32 GVCFTD 37 53 GTCHNF 58	2	60
<i>Mendicago sativa</i> (alfafa)	Def 1.1 1.2 1.5	Q4G347 Q4G346 Q4G341	-	-	72
<i>Lycopersicon</i> <i>esculentum Mill</i> (tomate)	(precursor)	Q7M222	55 GCTNCC 60 62 GTEGCN 67 73 GTFICE 78 107 GNKRSE 112 122 GSKGCN 127 133 GTFVCE 138	6	146

<i>Capsicum annuum</i> (pimentão)	J1-1 J1-2	Q43413 O65740	35 GNFKGL 40 59 GSCIGF 64 39 GLCFSK 44	2 1	75 74
<i>Brassica rapa</i> (nabo)	THI2	Q9SBK8	44 GASMTN 49 87 GCASSV 92 94 GALTTL 99	3	133
<i>Nicotiana alata</i> ("fumo-de-jardim")	NaD1	Q8GTM0	37 GICITK 42	1	105
<i>Solanum Tuberosum</i> (batata)	Snakin2	Q93X17	47 GGACAA 52 68 GTCCAR 73 80 GTSGNT 85	3	104
<i>Impatiens balsamina</i> (bálsamo)	IB-AMP	Q24006	5 GVVFGV 10	1	333
<i>Sorghum bicolor L</i> (sorgo)	Sb alpha-1	P21923	29 GGWTAG 34	1	47
<i>Protophormia terraenovae</i> (mosca)	formicina	P10891	62 GTGINH 67 78 GNRGGY 83 88 GVCVCR 93	3	94

Tabela 1: Domínios de miristoilação na seqüência de aminoácidos de defensinas de planta de diferentes espécies e o seu tamanho. Traço (-) refere-se a ausência do domínio. Observa-se na última linha da tabela os domínios de miristoilação da defensina de inseto *Protophormia terraenovae* para comparação com os domínios de defensina de planta.

## 6.2. Anexo 2 - Preparação de meios e reagentes

### **LB Agar** (por litro)

10 g NaCl

10 g triptona

5 g extrato de levedura

20 g agar

Ajustar pH = 7.0 com 5 N NaOH

Adicionar H<sub>2</sub>O miliq para volume final de 1L

Verificar pH = 7.0

Autoclavar

Distribuir em discos de Petri (~25 ml/100-mm)

### **LB-líquido** (por litro)

10 g NaCl

10 g triptona

5 g extrato de levedura

Ajustar pH = 7.0 com 5 N NaOH

Adicionar H<sub>2</sub>O miliq para volume final de 1L

Verificar pH = 7.0 e autoclavar

### **Tampão TE**

Tris-HCl 10 mM (pH= 7.5)

EDTA 1 mM

**NZY Agar** (por litro)

5 g NaCl

2 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

5 g extrato de levedura

10 g NZ amina ('casein hydrolysate')

15 g agar

Ajustar pH = 7.5 com 5 N NaOH

Adicionar H<sub>2</sub>O miliq para volume final de 1L

Verificar pH = 7.5

Autoclavar

Distribuir em discos de Petri (~25 ml/100-mm)

**NZY "Top Agar"** (por litro)

Para 1 L de NZY líquido (sem agar)

Adicionar 0.7% (w/v) de agarose

Autoclavar

**Tampão SM** (por litro)

5.8 g NaCl

2.0 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

50.0 ml Tris-HCl 1 M (pH 7.5)

5.0 ml gelatina 2% (w/v)

Adicionar H<sub>2</sub>O miliq para volume final de 1L

Autoclavar

**YPAD Agar (por litro)**

20 g Difco peptona

10 g extrato de levedura

15–20 g agar

Adicionar H<sub>2</sub>O miliq para volume final de 960 mL

Ajustar pH = 5.8

Adicionar 40 mg sulfato de adenina

Autoclavar

Resfriar para 55°C

Adicionar glicose 2% (v/v) filtrada e esterilizada separadamente

Distribuir em discos de Petri (~25 ml/100-mm)

**YPAD-líquido (por litro)**

20 g Difco® peptone

10 g extrato de levedura

Adicionar H<sub>2</sub>O miliq para volume final de 960 mL

Ajustar pH = 5.8

Adicionar 40 mg sulfato de adenina

Autoclavar

Resfriar para 55°C

Adicionar glicose 2% (v/v) filtrada e esterilizada separadamente

**SD Agar (por litro)**

6.7 g Difco yeast nitrogen base sem aminoácidos (Catalog #0919-15-3)

182.2 g D-sorbitol

15–20 g agar

Adicionar H<sub>2</sub>O miliq para volume final de 860 mL

Ajustar pH = 5.8

Autoclavar

Resfriar para 55°C

Adicionar 100 mL da 10X solução de aminoácidos apropriados

Adicionar glicose 2% (v/v) filtrada e esterilizada separadamente

Distribuir em discos de Petri (~25 ml/100-mm)

### **10× solução de aminoácidos apropriados**

Adicionar os aminoácidos relacionados abaixo, omitindo aqueles cuja ausência é necessária para a seleção. Depois de filtrada, a solução pode ser estocada a 4°C por 1 ano.

Concentração (mg/L) /Sigma Catalog #

L-Isoleucine 300 /I 2752

L -Valine 1500 /V 0500

L -Adenine hemisulfate salt 200 /A 9126

L -Arginine HCl 200 /A 5131

L -Histidine HCl monohydratea 200 /H 8125

L -Leucineb 1000 /L 8000

L -Lysine HCl 300 /L 5626

L -Methionine 200 /M 9625

L -Phenylalanine 500 /P 2126

L -Threonine 2000 /T 8625

L -Tryptophanc 200 /T 0254

L -Tyrosine 300 /T 3754

L -Uracil 200 /U 0750

L -Glutamic acid 1000 /G 1251

L -Aspartic acid 1000 /A 9256

L -Serine 4000 /S 4500

**10× Acetato de lítio (LiAc)**

LiAc 1 M (Sigma Catalog #L 6883)

Ajustar o pH=7.5 com ácido acético

Autoclavar

Estocar a temperatura ambiente

**PEG 3350 50% (m/v)**

50 g polietilenoglicol (PEG)

Peso molecular = 3350 (Sigma Catalog #P 3640)

Adicionar H<sub>2</sub>O miliq para volume final de 100 mL

Autoclavar

Estocar a temperatura ambiente

**Solução TE–LiAc–PEG**

(1× TE, 1× LiAc, PEG 3350 40% (w/v))

1 ml 10× TE

1 ml 10× LiAc

8 ml PEG 3350 50% (w/v)

**Solução TE–LiAc**

(1× TE e 1× LiAc)

1 ml 10× TE

1 ml 10× LiAc

8 ml H<sub>2</sub>O miliq estéril

**Tampão Z (por litro)**

16.1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

5.5 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O

0.75 g KCl

0.246 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O

Ajustar pH = 7.0

Adicionar H<sub>2</sub>O miliq para volume final de 1L

Autoclavar

Estocar a 4°C

**Tampão Z com X-gal (por 100 ml)**

98 ml tampão Z

0.27 ml β-mercaptoetanol

1.67 ml X-gal 20mg/mL

**Solução para lise da levedura**

Triton® X-100 2% (v/v)

SDS 1% (w/v)

NaCl 100 mM

Tris-HCl 10 mM (pH= 8.0)

EDTA 1 mM

Estocar a temperatura ambiente

### 6.3. Anexo 3 - Protocolo do Duplo-Híbrido em oito etapas

**Primeira etapa** - Titulação e amplificação dos fagos  $\lambda$  e “Helper” em bactéria XL1-Blue MRF’:

**1- Titular a biblioteca de fago  $\lambda$  contendo cDNA da *Neurospora crassa* em vetor HybridZAP-2.1:**

- (i) Preparação do material:

Célula: XL1-Blue MRF’  
LB-tetraciclina agar  
Parafilm ® laboratory film  
LB líquido com suplementos de sulfato de magnésio e maltose  
Erlenmeyer-250mL  
Tubos Falcon - 15mL e 50mL  
Célula: XL1-Blue MRF’ em 10mg/mL sulfato de magnésio estéril  
(OD 600nm = 0.5)  
Bibliotecas de Fago  $\lambda$  diluído em tampão SM  
Tubos Eppendorf - 0.5mL e 1.5mL  
Incubadora à 37°C com agitação a 200rpm  
NZY top agar  
NZY agar  
Placas de Petri de 10 mm de diâmetro (25 mL)  
termômetro

- (ii) Inocular uma colônia XL1-Blue MRF’ de placa de Petri LB-tetraciclina agar em 50mL de LB líquido com suplementos de sulfato de magnésio e maltose em Erlenmeyer-250mL.

- (iii) Incubar a 30°C overnight, com agitação de 200rpm (não ultrapassar a OD<sub>600nm</sub>=1.0). Crescer mais devagar a temperatura de 30°C (em vez de 37°C) diminui o número de células não viáveis, e consequentemente, melhora o título.

- (iv) Centrifugar as células 500 x g por 10 min, em tubo Falcon-15 mL (4 tubos).

- (v) Ressuspender as células gentilmente em 25mL (volume final) de sulfato de magnésio estéril 10 mmol/L. Podem-se armazenar estas células em freezer a 4°C, para uso posterior.

(vi) Diluir as células XL1-Blue MRF' em 10 mmol/L de sulfato de magnésio estéril, alcançando  $OD_{600nm} = 0.5$ , para a titulação imediata da biblioteca de Fago  $\lambda$ . OBS: Células XL1-Blue MRF' são RecA $^-$ , McrA $^-$  e Mrr $^-$  de modo que não clivam (restringem) DNA metilado. O uso de células que não sejam MRF' resultará em um título muito baixo.

(vii) Diluir a suspensão com a biblioteca de Fago  $\lambda$  obtida do FGSC em tampão SM em tubos Eppendorfs- 0.5mL (volume final de 100 $\mu$ L):

Tubo 1- Diluição  $10^{-1}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da biblioteca estoque do FGSC  
 Tubo 2- Diluição  $10^{-2}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $10^{-1}$  (tubo1)  
 Tubo 3- Diluição  $10^{-3}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $10^{-2}$  (tubo2)  
 Tubo 4- Diluição  $10^{-4}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $10^{-3}$  (tubo3)  
 Tubo 5- Diluição  $10^{-5}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $10^{-4}$  (tubo4)  
 Tubo 6- Diluição  $10^{-6}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $10^{-5}$  (tubo5)

Tubo 7- Diluição  $2 \times 10^{-3}$ - 40 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $10^{-2}$  (tubo2)  
 Tubo 8- Diluição  $2 \times 10^{-4}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $2 \times 10^{-3}$  (tubo7)

Tubo 9- Diluição  $5 \times 10^{-4}$ - 50 $\mu$ L de tampão SM + 50 $\mu$ L da diluição  $10^{-3}$  (tubo3)  
 Tubo 10- Diluição  $5 \times 10^{-5}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $5 \times 10^{-4}$  (tubo9)

(viii) Em tubos Eppendorfs- 1.5 mL, misturar os fagos com as células e incubar a 37°C por 15min., para os fagos aderirem às membranas das células:

Dez tubos, cada um com 1 $\mu$ L da biblioteca com diluição apropriada (descrita acima) + 200 $\mu$ L das células XL1-Blue MRF' em 10 mmol/L de sulfato de magnésio estéril com  $OD_{600nm} = 0.5$ . Agitação suave.

(ix) Adicionar duas medidas de tubo Eppendorf - 1.5mL de NZY top agar derretido e resfriado a 48°C na mistura de fagos e células acima (total de dez tubos) com uma pipeta Pasteur de vidro, entornando imediatamente (total=3mL por tubo), o mais rápido possível, no topo de uma placa de Petri com NZY agar (10mm de diâmetro). Deixar a placa sem mexer, por 10 min, para o top agar esfriar e endurecer.

(x) Incubar as placas (total de dez) de cabeça para baixo a 37°C por 6-8 hs.

(xi) Contar o número de pfus (“plaque forming units” = n) de cada placa correspondente ao fator de diluição=  $(diluição)^{-1}$ . Usar a fórmula abaixo para calcular o título em [pfu/mL]:

$$[n \times \text{fator de diluição} \times 1000] = [\text{pfu/mL}]$$

**2- Titular o estoque de fago Helper: (ie calcular pfu/mL onde valor esperado pela *Stratagene* é de  $10^{10}$  pfu/mL):**

- (i) Preparação do material:

Célula: uma colônia XL1-Blue MRF' em LB-tetraciclina agar  
 LB-líquido  
 Tubo Falcon-50mL  
 Tubos Falcon -15mL (1000 x g)  
 Incubadora a 37°C com agitação a 200rpm  
 Banho Maria a 65°C  
 Fago “Helper” diluído em tampão SM  
 Tubos Eppendorfs- 0.5 mL e 1.5mL  
 1µL Fago “Helper” em 200µL de células  
 NZY top agar  
 NZY agar  
 Placas de Petri de 10 mm de diâmetro (25 mL)  
 termômetro

- (ii) Inocular uma colônia XL1-Blue MRF' em 10mL de LB-líquido com suplementos de sulfato de magnésio e maltose em tubo Falcon-50mL (cônico).

- (iii) Incubar o tubo cônico a 37°C, com agitação a 200rpm, até alcançar OD<sub>600nm</sub> = 1.0.

- (iv) Diluir o estoque de fago “Helper” em tampão SM em tubos Eppendorfs- 0.5 mL:

Tubo 1- Diluição 10<sup>-1</sup>- 90µL de SM buffer + 10µL do estoque de fago Helper da *Stratagene*.

Tubo 2- Diluição 10<sup>-2</sup>- 90µL de tampão SM + 10µL da diluição 10<sup>-1</sup> (tubo1)

Tubo 3- Diluição 10<sup>-3</sup>- 90µL de tampão SM + 10µL da diluição 10<sup>-2</sup> (tubo2)

Tubo 4- Diluição 10<sup>-4</sup>- 90µL de tampão SM + 10µL da diluição 10<sup>-3</sup> (tubo3)

Tubo 5- Diluição 10<sup>-5</sup>- 90µL de tampão SM + 10µL da diluição 10<sup>-4</sup> (tubo4)

Tubo 6- Diluição 10<sup>-6</sup>- 90µL de tampão SM + 10µL da diluição 10<sup>-5</sup> (tubo5)

Tubo 7- Diluição 2 X 10<sup>-4</sup>- 40µL de tampão SM + 10µL da diluição 10<sup>-3</sup> (tubo3)

Tubo 8- Diluição 2 X 10<sup>-5</sup>- 90µL de tampão SM + 10µL da diluição 2 X 10<sup>-4</sup> (tubo7)

Tubo 9- Diluição 2 X 10<sup>-6</sup>- 90µL de tampão SM + 10µL da diluição 2 X 10<sup>-5</sup> (tubo8)

Tubo 10- Diluição 5 X 10<sup>-5</sup>- 50µL de tampão SM + 50µL da diluição 10<sup>-4</sup> (tubo4)

Tubo 11- Diluição 5 X 10<sup>-6</sup>- 90µL de tampão SM + 10µL da diluição 5 X 10<sup>-5</sup> (tubo10)

Tubo 12- Diluição 5 X 10<sup>-7</sup>- 90µL de tampão SM + 10µL da diluição 5 X 10<sup>-6</sup> (tubo11)

- (v) Em tubos Eppendorf - 1.5 mL, misturar os fagos com as células (usando os tubos de 3 a 12 do item anterior) e incubar a 37°C por 15min., para os fagos aderirem às membranas das células:

Dez tubos, cada um com 1 $\mu$ L do fago “Helper” com diluição apropriada (tubos de 3 a 12) + 200 $\mu$ L das células XL1-Blue MRF’ OD<sub>600nm</sub> = 1.0 do item (ii). Agitar gentilmente.

- (vi) Adicionar duas medidas de tubo Eppendorf - 1.5mL de NZY top agar derretido e resfriado a 48°C na mistura de fagos e células acima (total de dez tubos) com uma pipeta pasteur de vidro, entornando imediatamente (total=3mL por tubo), o mais rápido possível, no topo de uma placa de Petri com NZY Agar (10mm de diâmetro). Deixar a placa sem mexer, por 10min, para o top agar esfriar e endurecer.
- (vii) Incubar as placas com NZY Agar (total de dez) de cabeça para baixo a 37°C “overnight”.

- (viii) Contar o número de pfus (**n**) de cada placa correspondente ao **fator de diluição**= (diluição)<sup>-1</sup>.  
Usar a fórmula abaixo para calcular o título:  
[n x fator de diluição x 1000] = [pfu / mL]

### **3- Amplificar o estoque de fago “Helper” alcançando um título de 10 a 100 vezes maior do que o estoque fornecido pela Stratagene:**

- (i) Preparação do material:

Célula: uma colônia XL1-Blue MRF’ em LB-tetraciclina agar  
LB-líquido  
Fago “Helper” moi=20:1 fago “Helper” / célula  
Falcon tube-15mL e 50mL  
(1000 x g)  
Incubadora a 37°C com agitação a 200rpm  
Banho Maria a 65°C  
Termômetro  
Eppendorfs- 0.5mL e 1.5 mL  
NZY top agar  
NZY agar  
Placas de Petri de 10 mm de diâmetro (25 mL)  
DMSO- 7%  
Freezer –80°C

- (ii) Inocular uma colônia XL1-Blue MRF' de estoque em LB-tetraciclina agar em 10mL de LB-líquido com suplementos de sulfato de magnésio e maltose em tubo Falcon-50mL (cônico).
- (iii) Incubar o tubo cônico a 37°C, com agitação a 200rpm, até alcançar OD<sub>600nm</sub> = 0.3, correspondendo a aproximadamente 2.5 x 10<sup>8</sup> células / mL.
- (iv) Adicionar o fago “Helper”, titulado acima, com moi (multiplicity of infection) de 20:1 (fago por célula).

Exemplo:

Seja o título do estoque 10<sup>10</sup> pfu/mL, então:

$$(\text{10}^{10} \text{ pfu/mL} \times \text{volume de fago}) / (2.5 \times 10^8 \text{ células/mL} \times 10\text{mL}) = 20$$

**volume de fago**~ 8μl

- (v) Incubar o tubo cônico a 37°C por 15 min., com agitação, para os fagos aderirem às membranas das células.
- (vi) Incubar o tubo cônico a 37°C por 8 horas, com agitação.
- (vii) Colocar em banho-maria a 65°C por 15 min, para a lise celular.
- (viii) Centrifugar, abaixando os debríis celulares, a 1000 x g por 10 min. e transferir o sobrenadante (volume ~10mL) para um novo tubo cônico (Falcon -15 mL).
- (ix) Aliquotar o sobrenadante 10 X 930μL em tubos Eppendorfs -1.5mL.
- (x) Adicionar dimetilsulfóxido (DMSO) para a concentração final de 7% (v/v). Isto é, 70μL de DMSO em 930μL do sobrenadante. Armazenar em Freezer -80°C.

**4- Titular o estoque de fago Helper amplificado: (ie calcular pfu/mL esperado entre  $7.5 \times 10^{10}$  e  $1.0 \times 10^{12}$  pfu/mL):**

- (i) Preparação do material para titular o sobrenadante do estoque de fago Helper amplificado como descrito acima.
- (ii) Inocular uma colônia XL1-Blue MRF' do estoque em LB-tetraciclina agar em 10mL de LB-líquido com suplementos de sulfato de magnésio e maltose em tubo Falcon-50mL (cônico).
- (iii) Incubar o tubo cônicos a 37°C, com agitação a 200rpm, até alcançar OD<sub>600nm</sub> = 1.0.
- (iv) Diluir o estoque de fago “Helper” amplificado em tampão SM em tubos Eppendorfs- 0.5mL (volumes finais de 100µL):

Tubo 1- Diluição  $10^{-1}$ - 90µL de tampão SM + 10µL do estoque de fago Helper amplificado.

Tubo 2- Diluição  $10^{-2}$ - 90µL de tampão SM + 10µL da diluição  $10^{-1}$  (tubo1)

Tubo 3- Diluição  $10^{-3}$ - 90µL de tampão SM + 10µL da diluição  $10^{-2}$  (tubo2)

Tubo 4- Diluição  $10^{-4}$ - 90µL de tampão SM + 10µL da diluição  $10^{-3}$  (tubo3)

Tubo 5- Diluição  $10^{-5}$ - 90µL de tampão SM + 10µL da diluição  $10^{-4}$  (tubo4)

Tubo 6- Diluição  $10^{-6}$ - 90µL de tampão SM + 10µL da diluição  $10^{-5}$  (tubo5)

Tubo 7- Diluição  $10^{-7}$ - 90µL de tampão SM + 10µL da diluição  $10^{-6}$  (tubo6)

Tubo 8- Diluição  $10^{-8}$ - 90µL de tampão SM + 10µL da diluição  $10^{-7}$  (tubo7)

Tubo 9- Diluição  $2 \times 10^{-6}$ - 40µL de tampão SM + 10µL da diluição  $10^{-5}$  (tubo5)

Tubo 10- Diluição  $2 \times 10^{-7}$ - 90µL de tampão SM + 10µL da diluição  $2 \times 10^{-6}$  (tubo9)

Tubo 11- Diluição  $2 \times 10^{-8}$ - 90µL de tampão SM + 10µL da diluição  $2 \times 10^{-7}$  (tubo10)

Tubo 12- Diluição  $5 \times 10^{-6}$ - 50µL de tampão SM + 50µL da diluição  $10^{-5}$  (tubo5)

Tubo 13- Diluição  $5 \times 10^{-7}$ - 90µL de tampão SM + 10µL da diluição  $5 \times 10^{-6}$  (tubo12)

Tubo 14- Diluição  $5 \times 10^{-8}$ - 90µL de tampão SM + 10µL da diluição  $5 \times 10^{-7}$  (tubo13)

- (v) Em tubos Eppendorf - 1.5 mL, misturar os fagos com as células (usando os tubos de 5 a 14 do item anterior) e incubar a 37°C por 15min., para os fagos aderirem às membranas das células:

Dez tubos, cada um com 1µL do fago Helper com diluição apropriada (tubos de 5 a 14) + 200µL das células XL1-Blue MRF' OD<sub>600nm</sub> = 1.0 (do item (ii)). Agitar gentilmente.

- (vi) Adicionar duas medidas de tubo Eppendorf - 1.5mL de NZY top agar derretido e resfriado a 48°C na mistura de fagos e células acima (total de dez tubos) com uma pipeta de vidro, entornando imediatamente (total=3mL por tubo), o mais rápido possível, no topo de uma placa de Petri com NZY Agar (10mm de diâmetro). Deixar a placa sem mexer, por 10 min, para o top agar esfriar e endurecer.
- (vii) Incubar as placas com NZY Agar (total de dez) de cabeça para baixo a 37°C overnight.
- (viii) Contar o número de pfus (**n**) de cada placa correspondente ao **fator de diluição**=  $(\text{diluição})^{-1}$ .  
 Usar a fórmula abaixo para calcular o título:  

$$[n \times \text{fator de diluição} \times 1000] = [\text{pfu / mL}]$$

**Segunda etapa** - Conversão da **biblioteca de fago  $\lambda$**  em vetor HybridZAP-2.1 recombinante para uma biblioteca de fagos de plasmídeos pAD GAL4-2.1 recombinantes, denominada de **biblioteca de “fagemídeo”**.

**1- Co-infectar a bactéria XL1-Blue MRF’ simultaneamente com a biblioteca  $\lambda$  em vetor HybridZAP-2.1 (moi de 1:10) e o fago “Helper” (moi=10:1) contendo as proteínas necessárias para a excisão e empacotamento do plasmídeo pAD-GAL4-2.1 recombinante no próprio fago “helper”:**

- (i) Preparação do material:

Célula: XL1-Blue MRF’  
 LB-broth com suplementos de sulfato de magnésio e maltose  
 Erlenmeyer-250mL  
 Tubos Falcon -15mL e 50mL (1000 x g)  
 Incubadoras a 30°C e a 37°C com agitação a 200rpm  
 Banho Maria a 65°C  
 Termômetro  
 Geladeira a 4°C  
 Células ressuspensas em 10mg/mL sulfato de magnésio estéril-  
 OD 600nm = 1.0

A biblioteca  $\lambda$  em vetor HybridZAP-2.1 titulada - moi=1:10 Fago  $\lambda$ /célula

Fago “Helper” titulado - moi= 10:1 fago “Helper” / célula

- (ii) Inocular uma colônia XL1-Blue MRF' em 50mL de LB-líquido com suplementos de sulfato de magnésio e maltose em Erlenmeyer-250mL. Crescer overnight a 30°C, shaking at 200rpm (não ultrapassar a OD<sub>600nm</sub>=1.0).
- (iii) Centrifugar as células 1000 x g por 10min, em tubo Falcon-15mL (4 tubos).
- (iv) Ressuspender as células gentilmente em 25mL (volume final) de sulfato de magnésio estéril 10 m mol L<sup>-1</sup>.
- (v) Ajustar para OD<sub>600nm</sub>=1.0 com sulfato de magnésio estéril 10 m mol L<sup>-1</sup>.
- (vi) Centrifugar a Biblioteca de Fago λ para garantir que no caso de algum resíduo de clorofórmio, este esteja completamente separado antes de retirar uma alíquota.
- (vii) Combinar em tubo cônico Falcon-50mL:
- $$10^7 \text{ pfu Fago } \lambda + 10^8 \text{ células XL1-Blue MRF'} + 10^9 \text{ pfu fago "Helper"}$$
- Então, a combinação obtida foi:  
 100μL de Biblioteca de Fago λ em tampão SM (com sulfato de magnésio) se o título for de 10<sup>8</sup> pfu/mL  
 125μL de XL1-Blue MRF' em 10 mmol/L de sulfato de magnésio  
 OD<sub>600nm</sub> = 1.0  
 Note que a OD<sub>600nm</sub> = 1.0 correspondem a 8 X 10<sup>8</sup> células/mL.  
 13.3μL de fago "Helper" amplificado, ie, se o título for de 7.5 x 10<sup>10</sup>pfu/mL
- (viii) Incubar o tubo cônico Falcon-50mL a 37°C por 15 min, para os fagos aderirem às membranas das células. Agitar gentilmente.
- (ix) Adicionar 20mL de LB-líquido com suplementos de sulfato de magnésio e maltose previamente aquecido a 37°C ao tubo cônico Falcon-50mL e incubar a 37°C por aproximadamente de 2.5 a 3 horas. Agitação suave. Incubação por mais de 3 horas pode alterar a representação clonal.

**2- Estoque de partículas “fagemídeos” de pAD-GAL4-2.1 recombinante:**

- (i) Aquecer entre 65 a 70 °C por 20 minutos, destrói-se o envoltório do fago  $\lambda$  e lisa-se as bactérias. Note que o fagemídeo não é afetado pelo tratamento térmico.
- (ii) Centrifugar a 1000 x g por 10 min para abaixar os debris celulares, obtendo no sobrenadante as partículas de “fagemídeos” de pAD-GAL4-2.1 recombinante. Recolher sobrenadante = “fagemídeos” de pAD-GAL4-2.1 recombinante
- (iii) Transferir o sobrenadante (volume~20mL) para um novo tubo Falcon-50mL estéril. Aliquotar em 2 x 10mL em tubos cônicos-15mL, separar uma ou duas alíquota de aproximadamente 10  $\mu$ L para a titulação. Armazenar a 4°C por 1 a 2 meses.

**3- Titular o sobrenadante, ie estoque de “fagemídeos”, em bactéria XLOLR, ie calcular cfu/mL resgatadas - (cfu = “colony forming unit”):**

- (i) Preparação do material:

Células: uma colônia XLOLR do estoque em LB-tetraciclina agar LB-líquido com suplementos de sulfato de magnésio e maltose Erlenmeyer-250mL  
Tubos Falcon-15mL e 50mL (1000 x g)  
Incubadora a 37°C com agitação a 200rpm  
Banho Maria a 65°C  
Termômetro  
10mg/mL sulfato de magnésio estéril- 100mL  
Tubos Eppendorf- 0.5mL e 1.5 mL  
Placas de Petri com LB-ampicilina (100 $\mu$ g/mL) agar (25mL/10mm) (plaquear várias diluições a fim de obter colônias isoladas)

- (ii) Inocular uma colônia XLOLR em 50mL de meio LB-líquido com suplementos de sulfato de magnésio e maltose em Erlenmayer-250mL. Crescer overnight a 30°C, com agitação a 200rpm.
- (iii) Recomeçar o crescimento e não ultrapassar a OD<sub>600nm</sub>=1.0.

- (iv) Diluir de  $10^{-2}$  o estoque de fagemídeos em tampão SM em tubo Eppendorf 1.5mL: ie, 990 $\mu$ L de SM buffer + 10 $\mu$ L do sobrenadante de “fagemídeos”

Em tubos Eppendorfs de 0.5mL:

Tubo 2- Diluição  $10^{-2}$ - separar 100 $\mu$ L da diluição  $10^{-2}$  acima (tubo2)

Tubo 3- Diluição  $10^{-3}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $10^{-2}$  (tubo2)

Tubo 4- Diluição  $10^{-4}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $10^{-3}$  (tubo3)

Tubo 5- Diluição  $10^{-5}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $10^{-4}$  (tubo4)

Tubo 6- Diluição  $10^{-6}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $10^{-5}$  (tubo5)

Tubo 7- Diluição  $2 \times 10^{-4}$ - 40 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $10^{-3}$  (tubo3)

Tubo 8- Diluição  $2 \times 10^{-5}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $2 \times 10^{-4}$  (tubo7)

Tubo 9- Diluição  $2 \times 10^{-6}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $2 \times 10^{-5}$  (tubo8)

Tubo 10- Diluição  $5 \times 10^{-5}$ - 50 $\mu$ L de tampão SM + 50 $\mu$ L da diluição  $10^{-4}$  (tubo4)

Tubo 11- Diluição  $5 \times 10^{-6}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $5 \times 10^{-5}$  (tubo10)

Tubo 12- Diluição  $5 \times 10^{-7}$ - 90 $\mu$ L de tampão SM + 10 $\mu$ L da diluição  $5 \times 10^{-6}$  (tubo11)

- (v) Misturar os “fagemídeos” com as células em tubos Eppendorf - 1.5 mL:

Onze tubos: 1 $\mu$ L do “fagemídeo” com diluição apropriada (do tubo 2 ao 12) + 200 $\mu$ L das células XLOLR, OD<sub>600nm</sub> = 1.0 (do item (i) anterior).

- (vi) Incubar a 37°C por 15 min, para os “fagemídeos” aderirem às membranas das células.

- (vii) Plaquear 100 $\mu$ L das misturas das células XLOLR com os “fagemídeos” (total de onze) em placas de Petri com LB-ampicilina (100 $\mu$ g/mL) agar (25mL/100mm de diâmetro). Somente as células que tiverem incorporado o plasmídeo pAD-GAL4-2.1 recombinante é que terão resistência a ampicilina.

Pode ser preciso fazer várias diluições das misturas de células XLOLR com os “fagemídeos” (total de onze tubos do item (iii)), a fim de obter-se colônias isoladas de células XLOLR contendo o plasmídeo pAD-GAL4-2.1 recombinante.

- (viii) Incubar as placas a 37°C “overnight”.

**4- As colônias XLOLR que aparecerem na placa de Agar com LB-ampicilina contêm o plasmídeo pAD-GAL4-2.1 recombinante. O fago Helper não pode crescer em bactéria XLOLR ( $Su^+$ ) e não tem o gene de resistência a ampicilina. As Células XLOLR são resistentes à infecção por fago  $\lambda$ , garantindo que não haja lise por algum fago  $\lambda$  residual:**

- (i) Contar o número de **cfus (n)** de cada placa correspondendo a uma determinada diluição.

$$\text{fator de diluição} = (\text{diluição})^{-1}$$

Usar a fórmula abaixo para calcular o título:

$$[100\mu\text{L} / 200\mu\text{L}] [n \times \text{fator de diluição} \times 1000] = [\text{pfu / mL}]$$

- (ii) Determinar a eficiência da excisão pela fração entre colônias resgatadas e input de fago  $\lambda$ . Se o título for baixo, repetir o protocolo acima com um número maior de fago  $\lambda$  e cultura de células XL1-Blue MRF' fresca.

**5- As colônias resgatadas são selecionadas por minipreps. de plasmídeos, prosseguindo análise do DNA plasmidial:**

- (i) Análise dos plasmídeos pAD-GAL4-2.1 recombinantes (presas) isolados com enzimas de restrição. pAD-GAL4-2.1- tratado com as com enzimas de restrição: EcoR I, Xho I, Pst I e Bgl II (sítios únicos)
- (ii) Gel de agarose para análise dos fragmentos de DNA plasmidial com padrão de DNA de 100bp - 8kbp

**Terceira etapa** - Amplificação da biblioteca de “fagemídeos” em bactéria XLOLR em LB-líquido com ampicilina, a fim de produzir uma biblioteca estável de plasmídeos de pAD-GAL4-2.1 recombinante:

(i) Preparação do material:

Células: XLOLR

LB-líquido com suplementos de sulfato de magnésio e maltose

Erlenmeyer-250mL

Tubos Falcon-15mL e 50mL (1000 x g)

Incubadoras a 30°C e a 37°C com agitação a 200rpm

Banho Maria a 65°C

10mg/mL sulfato de magnésio estéril- 100mL

Erlenmeyer de capacidade para 2 L

500mL LB-líquido com 100µg/µL de ampicilina

(ii) Crescer a 30°C pela noite cultura de bactéria XLOLR em 50mL LB-líquido com suplementos de sulfato de magnésio e maltose em um Erlenmeyer -250mL.

(iii) Recolocar crescimento a 37°C para OD<sub>600nm</sub> de 0.3-0.4 (mid-log phase): 0.25mL da cultura anterior + 50mL LB-líquido com suplementos de sulfato de magnésio e maltose em um Erlenmayer -250mL.

(iv) Centrifugar as células XLOLR em tubo Falcon-15mL (1000 x g por 10 min.) e ressuspender em sulfato de magnésio estéril 10mmol/mL, ajustando a OD<sub>600nm</sub> para 1.0 (=8 X 10<sup>8</sup> células /mL).

(v) Combinar bactéria XLOLR com o sobrenadante obtido na segunda etapa (“Mass Excision Protocol”, item 2) com um mínimo de moi de 1:10 fagemídeo por célula. Em Erlenmeyer de capacidade para 2L, combinar: 1.6 x 10<sup>9</sup> “fagemídeos” + 20mL de XLOLR 8 x 10<sup>8</sup> células/mL (OD<sub>600nm</sub> = 1.0).

(vi) Incubar a 37°C por 15 min, para os “fagemídeos” aderirem às membranas das células.

(vii) Adicionar 500mL LB-líquido contendo 100µg/µL de ampicilina.

(viii) Incubar a 37°C até alcançar OD<sub>600nm</sub> de 0.3-0.4 (mid-log phase). Não incubar overnight.

(ix) Centrifugar os 500mL de células em 500 x g por 10 min., descartar o sobrenadante.

(x) Isolar o DNA plasmidial dos pellets de células com um protocolo em massa de lise alcalina.

**Quarta etapa** - Construção do plasmídeo “isca” pBD-*Psd1*:

(i) Preparação do material:

Primers 5' e 3'- terminal das proteínas iscas *Psd1*:

**5'-terminal *Psd1* primer**

5'- ATGAAGACTTGTGAACACTTAGCTGACACC-3'

Tamanho= 30 aa

Tm= 66.9°C

GC% = 43.3

ΔG= -50.5 Kcal/mol

Atividade= 31.5 µg/OD

Degenerescência = 1 (Dímero ΔG = -6.3 Kcal/mol)

**3'-terminal *Psd1* primer:**

5'- GACACAGTTTGAGTACAGAAACACTCCA -3'

Tamanho = 30 aa

Tm= 65.7°C

GC% = 40.0

ΔG= -49.5 Kcal/mol

Atividade= 30.8 µg/OD

Degenerescência = 1 (Dímero ΔG = -5.2 Kcal/mol)

EcoR I- 10,000U- #:500480 *Stratagene*

Sal I- 2,000U- #:500930 *Stratagene* ou 2,000U- #:R6051 Promega

Tubos Eppendorf- 0.5mL e 1.5mL

Fenol

Clorofórmio

Acetato de amônia- 4mM

Etanol 100% (v/v)

Tampão TE

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) – Estoque de 1,000U

- (ii) Digestão do plasmídeo recombinante contendo o cDNA “isca” *Psd1* com as enzimas de restrição *EcoRI* e *SalI*, a fim de transferí-lo para o vetor pBD-GAL4 Cam.
- (iii) Purificação do cDNA da *Psd1* com extremidades 5’EcoR I e 3’Sal I para inserção no plasmídeo pBD-GAL4 Cam. Gel de DNA para análise dos produtos DNA com padrão para ~150 bp.
- (iv) Digestão do vetor pBD-GAL4 Cam com EcoR I e Sal I: 5 $\mu$ g do vetor com *EcoRI*- estoque de 10,000U e *SalI*- estoque de 2,000U em volume final de 50 $\mu$ L.
- (v) Extração com o mesmo volume (50 $\mu$ L) de fenol-clorofórmio até obter uma interface clara e limpa. Repetir a extração com igual volume de clorofórmio puro e precipitar, adicionando à fase aquosa mesmo volume (50 $\mu$ L) de acetato de amônia 4mol/L.
- (vi) Adicionar 2.5 volumes (250 $\mu$ L) de etanol 100% (v/v) equilibrado a temperatura ambiente.
- (vii) Centrifugar em Eppendorf-1.5mL para precipitar o vetor DNA. Lavar o pellet com etanol 70% (v/v).
- (viii) Ressuspender o pellet em tampão TE em volume final de 50 $\mu$ L, para que a concentração do vetor DNA seja de aproximadamente 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L.
- (ix) 5 $\mu$ g pBD-GAL4 Cam vetor (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L) em volume final de 50 $\mu$ L tratar com 1U/ $\mu$ L de CIAP
- (x) Defosforilação com CIAP do vetor pBD-GAL4 Cam digerido com *EcoRI* e *SalI*.
- (xi) Ligação dos cDNA- *Psd1* com extremidades 5’**EcoR I** e 3’**Sal I** (inserto) com pBD-GAL4 Cam digeridos com **EcoR I** e **Sal I** (vetor), utilizando as reações abaixo:

Reações de ligação:	1	2	3	4	5
---------------------	---	---	---	---	---

0.1µg/µL do vetor DNA	1.0 µL	1.0 µL	1.0 µL	1.0 µL	0 µL
0.1µg/µL do <i>Psd1</i> DNA	X µL	2X µL	0 µL	0 µL	1.0 µL
rATP (pH=7.0) -10mM	1.0 µL				
10xtampão de ligação	1.0 µL				
4U/µL T4 DNA ligase	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0 µL	0.5 µL
Água milliq estéril	Y <sub>1</sub> µL	Y <sub>2</sub> µL	Y <sub>3</sub> µL	Y <sub>4</sub> µL	Y <sub>5</sub> µL
P/ volume total de 10 µL					

AMOSTRAS com o plasmídeo recombinante contendo *Psd1* cDNA:

Reações 1 e 2 variam a razão de cDNA inserto para vetor. A eficiência da reação é medida por cfu/µg.

CONTROLES: Reações 3, 4 e 5.

Controle 3: teste efetivo da digestão e tratamento com CIAP do vetor pBD-GAL4 Cam.

Controle 4: teste para certificar se há algum vetor residual ou se o residual não digerido permanece.

Controle 5: teste para certificar se a solução com o inserto de cDNA *Psd1* está contaminada com algum vetor DNA.

(xi) Incubar overnight a 4°C.

(xii) Transformação das bactérias XL1-Blue MRF' competentes com 1-5µL da mistura da reação de ligação.

(xiii) Plaquear em placa de Petri (25mL/10mm)com LB-clorafenicol (30µg/mL) agar.

(xiv) Seleção de colônias isoladas para análise por minipreparação de DNA.

- (xv) Determinação da seqüência de nucleotídeos do cDNA da *Psd 1* no plasmídeo pBD-GAL4 Cam recombinante, a fim de certificar-se de que não há mutações no cDNA inserido.
- (xvi) Expressão da proteína *Psd1* pode ser verificada pelo perfil protéico obtido por espectrometria de massa.
- (xvii) Verificar se o nível de expressão pode ser tóxico para levedura comparando-se as curvas de crescimento: da levedura YRG-2 transformada com o plasmídeo recombinante (*Psd1*-isca) e da levedura YRG-2 transformada com o plasmídeo pBD-WT (“wild-type”) (sem a proteína isca).

**Quinta etapa** - Transformação da Levedura com o Duplo-Híbrido: Inserto de cDNA da *Psd1* em plasmídeo pBD-GAL4 Cam recombinante (“isca”) e biblioteca de cDNA da Neurospora crassa em pAD-GAL4-2.1 recombinante (“presas”):

### **1- Preparação das células de Levedura competentes:**

- (i) Material:

2 a 4 colônias da levedura YRG-2 de 2-3 mm de diâmetro com no máximo uma semana.  
Meio YPAD líquido  
Tubos Eppendorf- 1.5 mL  
Vortex  
Erlenmeyers- 250 mL e 2L  
Incubadora a 30°C com agitação 200-250 rpm  
Centrifuga para 3,000 x g de volume de células de 50mL  
Água deionizada miliq estéril  
DNA de esperma de salmão  
Meio TE-LiAc  
DMSO  
Banho-Maria a 42°C  
Gelo

- (ii) Colocar 2 mL de meio YPAD líquido em tubo cônico-50 mL e inocular este meio com 2 a 4 colônias de levedura YRG-2 de 2-3mm de diâmetro. É aconselhável dissolver as colônias em vortex vigorosamente até não se observar mais grumos de células com pequeno volume de meio líquido antes de inocular um volume maior. Incubar “overnight” a 30°C.
- (iii) Adicionar os 2 mL de cultura do item anterior a 100mL de meio YPAD líquido em Erlenmeyer de 500 mL e incubar esta cultura diluída em incubadora a 30°C com agitador a 200rpm por 18-24 horas, onde a OD 600nm deve alcançar um valor maior do que 1,2.
- (iv) Adicionar os 100 mL da cultura do item anterior a 300mL de meio YPAD líquido em Erlenmeyer de 2 L e incubar esta cultura diluída em incubadora a 30°C com agitação a 200rpm por 3 hs.
- (v) Coletar as células por centrifugação a 3000xg por 5 min. a temperatura ambiente e desprezar o sobrenadante.

- (vi) Ressuspender as células com ponteira cortada em aprox. 50 mL de água deionizada estéril em um único frasco.
- (vii) Coletar as células por centrifugação a 3000xg por 2 min. a temperatura ambiente e desprezar o sobrenadante.
- (viii) Ressuspender as células vagarosamente com ponteira cortada em 700 µL de solução TE-LiAc estéril (o volume final deve ser aprox. 750 µL)

**2- Transformação das células de Levedura competentes com o DNA circular plasmídial “isca” pBD-Psd1 para certificar-se de que pBD-Psd1 não é capaz de auto-ativar o sistema Duplo-Híbrido.**

- (i) Aliquotar 100 µL das células de levedura competentes por transformação em tubo de microcentrífuga- 1,5 mL. (total de 5 tubos). Alíquotas podem ser guardadas a -80°C ou usadas imediatamente.
- (ii) Adicionar 600 µL da solução TE-LiAc-PEG por alíquota de células competentes misturando o conteúdo com um vortex.

(iii) Adicionar 100 µg por tubo de DNA carreador (ss-DNA de esperma de Salmão) previamente fervido por 5 min. e resfriado em gelo.

(iv) Adicionar 1 µg do DNA plasmidial por tubo.

Transformações:

1º) **pGAL4 Wild-type:** contém o GAL4 completo, Genótipo: *LEU2*, Ampr *LacZ* Controle positivo. Colônias cresceram azuis em SD-sem Leu.

2º) **pBD-WT:** vetor tipo-selvagem pBD-GAL4 Cam, Genótipo: *TRP1*, Camr *LacZ*. Controle negativo. Colônias cresceram brancas ou rosas em SD-sem Trp.

3º) **pAD-WT:** Wild-type pAD-GAL4-2.1 , Genótipo: *LEU2*, Amp. Controle de interação. Colônias cresceram brancas ou rosas em SD-sem Leu.

4º) **pLamin C:** Human lamin C (aa 67–230) in pBD-GAL4, Genótipo: *TRP1*, Ampr *Lac Z*. Controle negativo. Colônias cresceram brancas ou rosas em SD-sem Trp

5º) **pBD-Psd1** (isca-*Psd 1*) Genótipo: *TRP1*, Cam. Controle de interação. Colônias cresceram brancas ou rosas em SD-sem Trp

(v) Incubar as amostras a 30°C por 30 min. misturando-as a cada 10 min. invertendo o tubo.

(vi) Adicionar 70 µL de DMSO por tubo e misturar gentilmente.

(vii) Submeter as amostras ao choque-térmico por 22 min. em banho-maria a 42°C. E misturar a cada 10 min. invertendo o tubo.

(viii) Deixar os tubos em gelo por 10 min. Centrifugar as amostras a 3000xg por 5 min. e desprezar o sobrenadante. Remover qualquer sobrenadante residual por nova centrifugação.

(ix) Ressuspender as células muito gentilmente com ponteiras com as pontas cortadas em 500 µL de 1x tampão TE ou água deionizada estéril.

- (x) Com ponteiras com as pontas cortadas, plaquear 150 µL das células transformadas em meio SD-agar sem o aminoácido apropriado para a seleção.
- (xi) Incubar as placas a 30°C de 3-7 dias até as colônias alcançarem 1-2mm de diâmetro.
- (xii) Proceder com o ensaio da atividade da  $\beta$ -galactosidase por papel de filtro, a fim de verificar a expressão do gene repórter *LacZ*.

### **3- Ensaio da atividade da $\beta$ -galactosidase em papel de filtro:**

- (i) Adicionar 2 mL de tampão Z com X-gal (preparado “fresco”, ie, no momento de uso) no fundo de uma placa de vidro de 100 mm de diâmetro.
- (ii) Embeber no tampão acima uma membrana de nitrocelulose ou papel de filtro circular. O papel de filtro circular deve estar completamente umedecido de tampão Z com X-gal. O excesso de tampão deve ser removido.
- (iii) Marcar uma nova membrana de nitrocelulose ou papel de filtro seco com as orientações dos pontos cardinais (N S L O) e fazer exatamente as mesmas marcas na placa de Petri do item anterior, onde as marcas serão coincidentes.
- (iv) Segure a extremidade S (sul) do papel de filtro circular, seco e devidamente marcado, com uma pinça. Deite primeiramente a extremidade N (norte) sobre as colônias de células transformadas. Permita o contato vagarosamente até a extremidade S (sul), espere aprox.. 1 min e passe o espalhador. Certifique-se de que a placa de papel de filtro ou nitrocelulose entre em contato com todas as colônias.
- (v) Usando a pinça, por uma das extremidades do papel de filtro circular, levante-o com cuidado, certificando-se de que as colônias foram transferidas para o papel.
- (vi) Segurando o papel de filtro circular com a pinça, agora o coloque com o lado da transferência para cima, boiando em nitrogênio líquido por 10 s. Retire o papel do nitrogênio líquido e deixe-o descongelar com o lado das colônias transferidas para cima.

- (vii) Repetir a etapa acima com cada papel de filtro por 3 vezes, isto permeabilizará a membrana plasmática das células.
- (viii) Coloque vagarosamente o papel descongelado com as colônias transferidas para cima sobre o outro papel de filtro embebido com tampão Z com X-gal preparado anteriormente. Remova quaisquer bolhas que estiverem presas entre as membranas.
- (ix) Incubar a temperatura ambiente. Durante a incubação, as colônias contendo o controle pGal4 ou contendo a interação proteína-proteína ficarão azuis.

#### **4- Transformação seqüencial:**

Anteriormente, fez-se uma transformação em pequena escala das células de Levedura competentes com o plasmídeo isca pBD-Psd1 recombinante. Em seguida, foi realizada uma transformação em larga escala com a biblioteca de presas pAD-Yi.

- (i) Preparação das células competentes de Levedura contendo o plasmídeo “isca” pBD-Psd1(PARA DUAS TRANSFORMAÇÕES):
- Colocar 2 mL de meio SD-sem Trp líquido em tubo cônico-50 mL e inocular este meio com 2 colônias de levedura YRG-2 contendo o plasmídeo pBD-Psd1 com 2-3mm de diâmetro e não mais do que com uma semana de repique. Dissolver as colônias em vortex vigorosamente até não se observar mais grumos de células. Incubar a 30°C, overnight.
  - Adicionar os 2 mL de cultura do item anterior a 100mL de meio de meio SD sem Trp líquido em Erlenmeyer de 500 mL e incubar esta cultura diluída em incubadora a 30°C com agitador a 200 rpm por 18-24 hs, onde a OD 600nm deve alcançar um valor maior do que 1,2.
  - Adicionar os 100 mL da cultura de levedura do item anterior contendo o plasmídeo isca pBD-Psd1 recombinante a 300mL de meio SD sem Trp líquido em Erlenmeyer de 2 L e incubar esta cultura diluída em incubadora a 30°C com agitador a 250 rpm até a OD 600nm deve alcançar um valor 0,5 (por aprox. 3 hs).
  - Coletar as células por centrifugação a 3000xg por 5 min. a temperatura ambiente e desprezar o sobrenadante.
  - Ressuspender as células em aprox. 50 mL de água deionizada estéril em um único frasco.

- f. Coletar as células por centrifugação a 3000xg por 2 min. a temperatura ambiente e desprezar o sobrenadante.
- g. Ressuspender as células vagarosamente com ponteira cortada em 1 mL de solução TE-LiAc estéril (o volume final deve ser aprox. 2 mL)
  
- (ii) Transformação das células de Levedura competentes com os cDNAs circulares plasmidial “presas” dados pela biblioteca de cDNA de Neurospora crassa conidial
  - a. Aliquotar 1 mL das células de levedura competentes para cada transformação em tubo cônico - 50 mL. Aliquotas podem ser guardadas a -80°C ou usadas imediatamente.
  - b. Adicionar por alíquota de células competentes PEG- LiAc-TE nesta ordem, sem misturar o conteúdo:
 

4,8 mL PEG 50%  
0,6 mL solução de LiAc 10x  
0,6 mL solução de TE 10x
  - c. Adicionar 1 mg por tubo de DNA carreador (ss-DNA de esperma de Salmão) previamente fervido por 5 min. e resfriado em gelo.
  - d. Adicionar 40 µg do pool de cDNA plasmidial pAD-Yi biblioteca conidial.
  - e. Agitar vigorosamente (em vortex e invertendo o tubo).
  - f. Incubar as amostras a 30°C por 30 min.com agitação. E misturar a cada 10 min. invertendo o tubo.
  - g. Adicionar 700 µL de DMSO por tubo e misturar gentilmente.
  - h. Aliquotar o conteúdo em tubos de microcentrífuga de 1 mL (10 tubos).
  - i. Submeter as amostras ao choque-térmico por 22 min em BANHO-MARIA a 42°C e misturar a cada 10 min, invertendo o tubo.
  - j. Deixar os tubos em gelo por 10 min.
  - k. Centrifugar as amostras a 1000xg por 5 min. e desprezar o sobrenadante. Remover qualquer sobrenadante residual por nova centrifugação.
  - l. Ressuspender as células muito gentilmente com ponteiras com a ponta cortada em 5 mL de 1x tampão TE ou água deionizada estéril.

- m. Com ponteiras com a ponta cortada, plaquear 100 µL e 200 µL das células transformadas em meio SD agar sem Leu e sem Trp. Plaquear 50 µL em meio SD Agar sem Leu e 50 µL em SD Agar sem Trp.
- n. Plaquear o restante em alíquotas de 250 µL de células em SD sem Trp e sem Leu.
- o. Incubar as placas a 30°C de 3-7 dias até as colônias alcançarem 1-2mm de diâmetro.
- p. Proceder com o ensaio da atividade da β-galactosidase por papel de filtro, a fim de verificar a expressão do gene repórter *LacZ* (item 3 da Quinta etapa).

## **5. Co-Transformações:**

- (i) Aliquotar 1 mL das células de levedura competentes (item 1 desta quinta etapa) para cada transformação em tubo cônicoo - 50 mL.
- (ii) Adicionar por alíquota de células competentes PEG- LiAc-TE nesta ordem, sem misturar o conteúdo:  
4,8 mL PEG 50%  
0,6 mL solução de LiAc 10x  
0,6 mL solução de TE 10x
- (iii) Adicionar 1 mg por tubo de DNA carreador (ss-DNA de esperma de Salmão) previamente fervido por 5 min. e resfriado em gelo.
- (iv) Adicionar 2µg do pool de cDNA plasmidial pAD-Yi (biblioteca conidial) e 2µg do plasmídeo “isca” pBD-Psd1.
- (v) Agitar vigorosamente (em vortex e invertendo o tubo).
- (vi) Incubar as amostras a 30°C por 30 min com agitação a 200rpm. E misturar a cada 10 min. invertendo o tubo.
- (vii) Adicionar 70 µL de DMSO por tubo e misturar gentilmente.
- (viii) Aliquotar o conteúdo em tubos de microcentrífuga de 1 mL (10 tubos).

(ix) Submeter as amostras ao choque-térmico por 22 min. em banho-maria a 42°C e misturar a cada 10 min, invertendo o tubo.

(x) Deixar os tubos em gelo por 10 min.

(xi) Centrifugar as amostras a 1000xg por 5 min. e desprezar o sobrenadante. Remover qualquer sobrenadante residual por nova centrifugação.

(xii) Ressuspender as células muito gentilmente com ponteiras com a ponta cortada em 5 mL de 1x tampão TE ou água deionizada estéril.

(xiii) Com ponteiras com a ponta cortada, plaquear 100 µL e 200 µL das células transformadas em meio SD agar sem Leu e sem Trp. Plaquear 50 µL em meio SD Agar sem Leu e 50 µL em SD Agar sem Trp.

Placas de Petri (25mL/10mm) com agar:

SD-sem Leu (meio para seleção de plasmídeos de vetores pAD e pGAL4)

SD-sem Trp (meio para seleção de plasmídeos de vetores pBD e pLaminC)

SD-sem Leu e sem Trp (meio para a seleção dos plasmídeos de vetores pAD e pBD)

(xvi) Plaquear o restante em alíquotas de 250 µL de células em SD sem Trp e sem Leu.

(xvii) Incubar as placas a 30°C de 3-7 dias até as colônias alcançarem 1-2mm de diâmetro.

(xviii) Proceder com o ensaio da atividade da β-galactosidase por papel de filtro (item 3 acima), a fim de verificar a expressão do gene repórter *LacZ*, como primeiro critério de seleção do Duplo-Híbrido. A expressão do gene repórter *LacZ* seleciona expressões devido a interações específicas. Colônias que produzem β-galactosidase tornam-se azuis.

**Sexta etapa** - Confirmação da interação proteína-proteína através do gene repórter HIS3:

### **Detecção das interações em placas com ausência de His, Trp e Leu**

Placas de Petri (25mL/10mm) com agar:

SD-sem Leu e sem Trp (meio para a seleção dos plasmídeos de vetores pAD e pBD)

SD-sem Leu, sem Trp e sem His (meio para seleção da expressão do gene repórter HIS3) e em seguida, suplementar com 3-AT devido a falso positivos resultantes do vazamento da expressão do gene HIS3.

Expressão dos genes repórteres *LacZ* e HIS3:

1°) pBD-WT and pAD-WT: Controle de interação positiva. Colônias cresceram azuis em SD- sem Leu e sem Trp e cresceram ativamente em meio seletivo para o gene repórter HIS3 (SD- sem Leu, sem Trp e sem His).

2°) pLamin C and pAD-WT: Controle de interação negativa. Colônias cresceram brancas ou rosas em SD- sem Leu e sem Trp e não cresceram em meio seletivo para o gene repórter HIS3.

3°) pBD-*Psd1* “isca” e biblioteca pAD-Yi conidial

### **Sétima etapa** - Verificação da Interação **isca-presa**:

#### **Detecção dos plasmídeos Cam<sup>r</sup> e Amp<sup>r</sup>:**

- (i) Isolar os plasmídeos DNA e cromossomos fragmentados da levedura por lise celular com solução Triton X-10: SDS (2:1). Isolar os plasmídeos contidos na levedura.
- (ii) Transformar as bactérias XL1-Blue MRF' supercompetentes com a suspensão de DNA plasmidial isolado, contendo ambos plasmídeos BD e AD
- (iii) Selecionar as colônias de bactérias contendo os plasmídeos:  
**isca (BD)** em meio LB-clorafenicol e **presa (AD)** em LB-ampicilina.
- (iv) Isolar os plasmídeos das colônias Amp<sup>r</sup> por minipreps de DNA e confirmar a presença de *Psd1* nas colônias Cam<sup>r</sup>.

- (v) Sequenciamento e análise por PCR dos plasmídeos pAD-Yi “presas” isolados, utilizando primers com 5’ e 3’- AD específicos (sequência dada no manual da Stratagene). O plasmídeo pAD-WT é o controle positivo nesta reação, resultando em um produto PCR de 0.5 kb.

AD Primers:

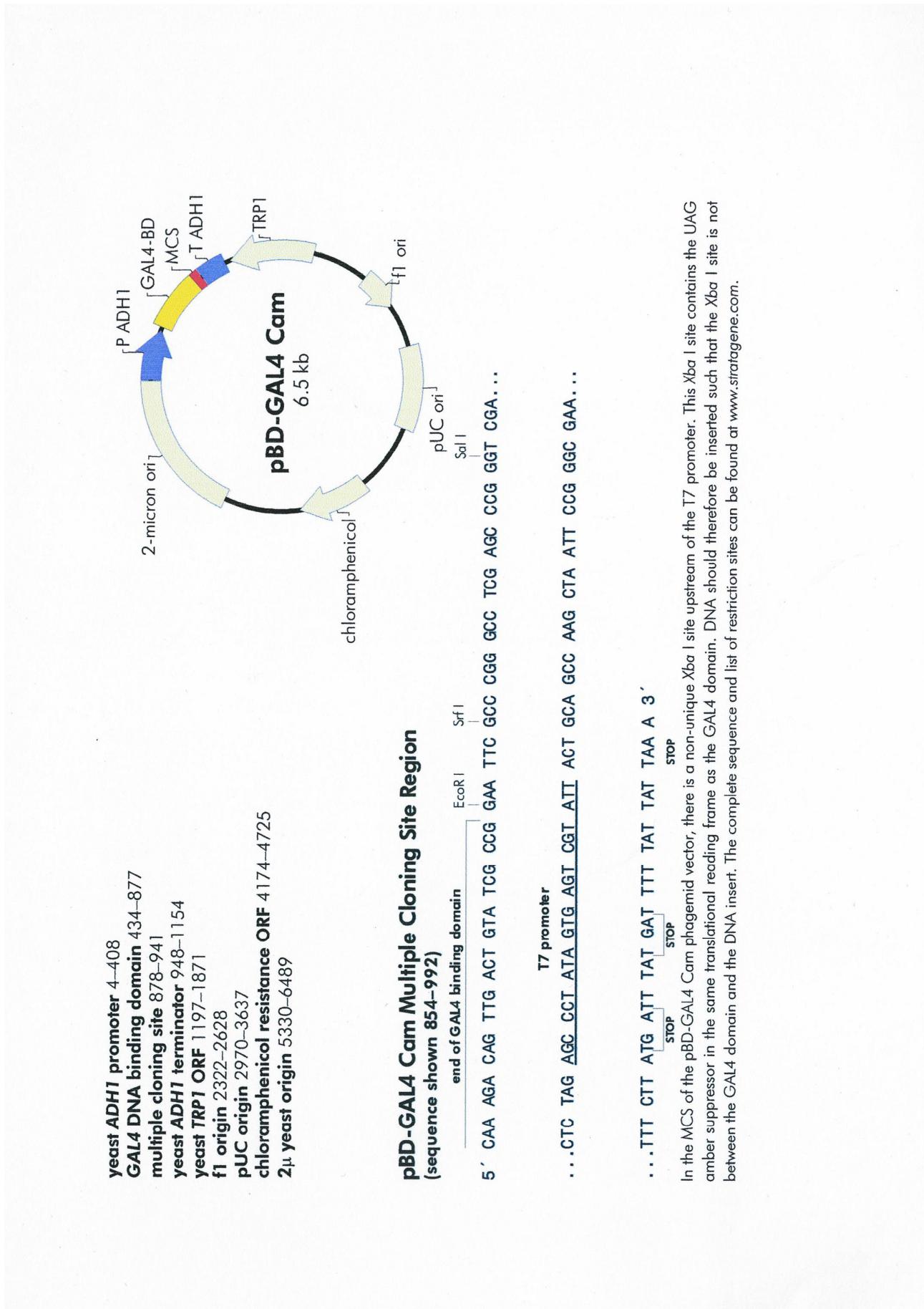
5’-AD primer: 5’-AGGGATGTTAACCACTAC-3’  
 3’-AD primer: 5’-GCACAGTTGAAGTGAACTTGC-3’

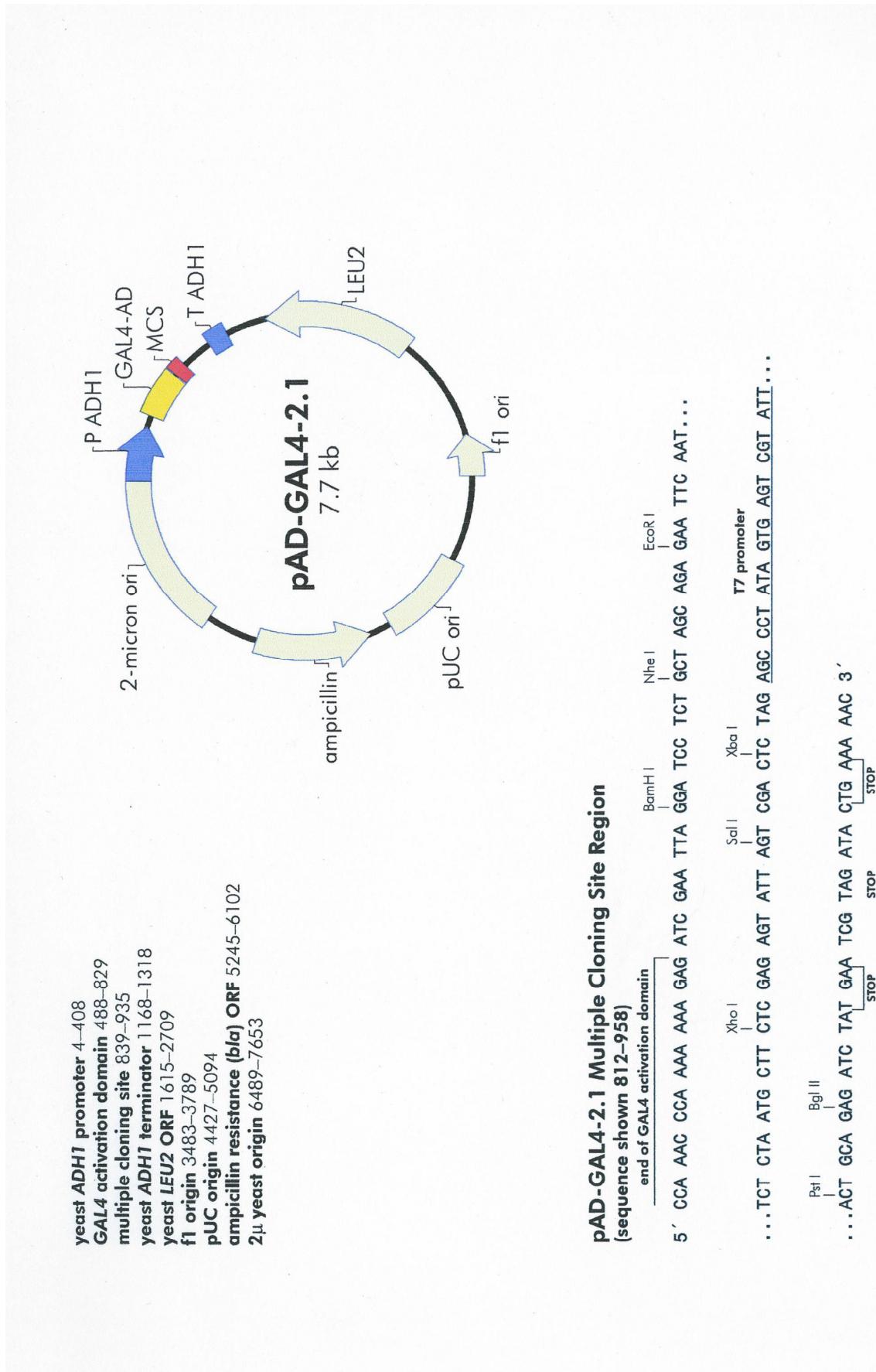
- (vi) Repetir o Duplo-Híbrido com os pares pBD-Psd1 e pAD-Yi selecionados e isolados separadamente nas etapas anteriores. Detecção dos insertos de cDNA da biblioteca de pAD-Yi (“presas”)
- (vii) Tratar os plasmídeos pAD-Yi recombinantes (presas) isolados pelo sistema Duplo-Híbrido, com EcoRI e XhoI e analisá-los em gel com marcadores padrão de DNA.
- (viii) Extrair do gel as bandas de interesse, correspondendo aos insertos de cDNA das “presas”.

**Oitava etapa** - Expressão e purificação da proteína “presa”:

- (i) Transferir o cDNA codificando a proteína presa do vetor pAD-GAL4-2.1 para o vetor de expressão e purificação pGEX-4T-1 com 5’-EcoRI e 3’-XhoI.
- (ii) Expressão em bactéria BL21 (DE3) pLysS por indução com IPTG.
- (iii) Purificação através da resina “Gluthatione-Sepharose 4B” (material estratégico) e a análise por gel de eletroforese da proteína nativa.
- (iv) Análise por espectrometria de massa e verificação de homologia de seqüências em banco de dados da *Neurospora crassa*.

#### **6.4. Anexo 4 – Mapas dos vetores utilizados neste trabalho**





**pGEX-1λT (27-4805-01)**

Thrombin

[Leu Val Pro Arg <sup>-</sup> Gly Ser]	Pro	Glu Phe Ile Val Thr Asp
CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GAA ATT ATC GTG ACT GAC TGA CGA		
BamH I	EcoR I	Stop codons

**pGEX-2T (27-4801-01)**

Thrombin

[Leu Val Pro Arg <sup>-</sup> Gly Ser]	Pro	Gly Ile His Arg Asp
CTG GTT CCG CGT GGA TCC CCG GGA ATT CAT CGT GAC TGA CTG ACG		
BamH I	Sma I	EcoR I

**pGEX-2TK (27-4587-01)**

Thrombin Kinase

[Leu Val Pro Arg <sup>-</sup> Gly Ser]	Arg Arg Ala Ser Val	
CTG GTT CCC CGT GGA TCT CGT CGT GCA TCT GTT GGA TCC CCG GGA ATT CAT CGT GAC TGA		
BamH I	Sma I	EcoR I

**pGEX-4T-1 (27-4580-01)**

Thrombin

[Leu Val Pro Arg <sup>-</sup> Gly Ser]	Pro	Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His Arg Asp									
CTG GTT CCC CGT GGA TCC CCG GAA ATT TTC CGT CGA CTC GAG CGG CCG CAT CGT GAC TGA											
BamH I	EcoR I	Sma I			Sal I			Xho I			Not I
		Sal I									
		Xho I									
		Not I									

**pGEX-4T-2 (27-4581-01)**

Thrombin

[Leu Val Pro Arg <sup>-</sup> Gly Ser]	Pro	Gly Ile Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ala Ser									
CTG GTT CCC CGT GGA TCC CCA GGA ATT CCC GGG TCG ACT CGA CGC GCC GCA TCG TGA											
BamH I	EcoR I	Sma I			Sal I			Xho I			Not I
		Sal I									
		Xho I									
		Not I									

**pGEX-4T-3 (27-4583-01)**

Thrombin

[Leu Val Pro Arg <sup>-</sup> Gly Ser]	Pro	Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp									
CTG GTT CCC CGT GGA TCC CCG AAT TCC CCG GTC GAC TCG AGC GGC CGC ATC GTG ACT GAC TGA											
BamH I	EcoR I	Sma I			Sal I			Xho I			Not I
		Sal I									
		Xho I									
		Not I									

**pGEX-3X (27-4803-01)**

Factor Xa

[Ile Glu Gly Arg <sup>-</sup> Gly]	Ile	Pro Gly Asn Ser Ser
ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC GGG AAT TCA TCG TGA CTG ACT GAC		
BamH I	Sma I	EcoR I

**pGEX-5X-1 (27-4584-01)**

Factor Xa

[Ile Glu Gly Arg <sup>-</sup> Gly]	Ile	Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His Arg Asp									
ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC GAA ATT TCC CCG GGT CGA CTC GAG CGG CCG CAT CGT GAC TGA											
BamH I	EcoR I	Sma I			Sal I			Xho I			Not I
		Sal I									
		Xho I									
		Not I									

**pGEX-5X-2 (27-4585-01)**

Factor Xa

[Ile Glu Gly Arg <sup>-</sup> Gly]	Ile	Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ala Ser									
ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC GGA ATT CCC GGG TCG ACT CGA CGC GCC GCA TCG TGA											
BamH I	EcoR I	Sma I			Sal I			Xho I			Not I
		Sal I									
		Xho I									
		Not I									

**pGEX-5X-3 (27-4586-01)**

Factor Xa

[Ile Glu Gly Arg <sup>-</sup> Gly]	Ile	Pro Arg Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg Ile Val Thr Asp									
ATC GAA GGT CGT GGG ATC CCC AGG AAT TCC CCG GTC GAC TCG AGC GGC CGC ATC GTG ACT GAC TGA											
BamH I	EcoR I	Sma I			Sal I			Xho I			Not I
		Sal I									
		Xho I									
		Not I									

**pGEX-6P-1 (27-4597-01)**

PreScission™ Protease

[Leu Glu Val Leu Phe Gln <sup>-</sup> Gly Pro]	Leu	Gly Ser Pro Glu Phe Pro Gly Arg Leu Glu Arg Pro His									
CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG GAA ATT CCC GGG TCG ACT CGA CTC GAG CGG CCG CAT											
BamH I	EcoR I	Sma I			Sal I			Xho I			Not I
		Sal I									
		Xho I									
		Not I									

**pGEX-6P-2 (27-4598-01)**

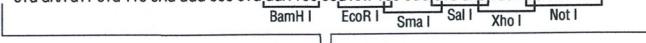
PreScission™ Protease

[Leu Glu Val Leu Phe Gln <sup>-</sup> Gly Pro]	Leu	Gly Ser Pro Gly Ile Pro Gly Ser Thr Arg Ala Ala Ala Ser									
CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCA GGA ATT CCC GGG TCG ACT CGA CGC GCC GCA TCG											
BamH I	EcoR I	Sma I			Sal I			Xho I			Not I
		Sal I									
		Xho I									
		Not I									

**pGEX-6P-3 (27-4599-01)**

PreScission™ Protease

[Leu Glu Val Leu Phe Gln <sup>-</sup> Gly Pro]	Leu	Gly Ser Pro Asn Ser Arg Val Asp Ser Ser Gly Arg									
CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC CTG GGA TCC CCG AAT TCC CCG GTC GAC TCG AGC GGC CGC											
BamH I	EcoR I	Sma I			Sal I			Xho I			Not I
		Sal I									
		Xho I									
		Not I									





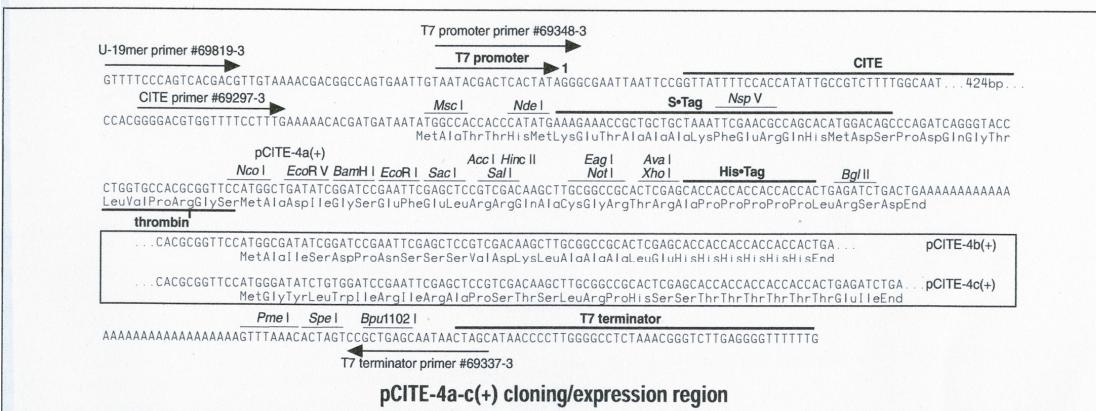
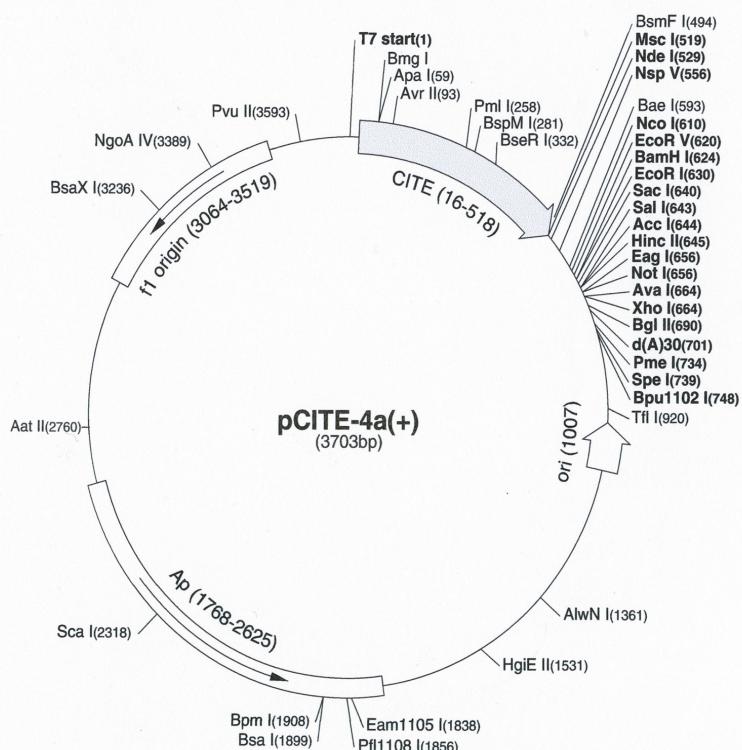
## pCITE-4a-c(+) Vectors

TB096 12/98

The pCITE®-4-a-c(+) vectors are designed for dramatic enhancement of the efficiency of *in vitro* translation of cloned sequences. Unique sites are shown on the circle map below. The maps for pCITE-4b(+) (Cat. No. 69914-3) and pCITE-4c(+) (Cat. No. 69915-3) are the same as pCITE-4a(+) (Cat. No. 69913-3) (shown) with the following exceptions: pCITE-4b(+) is a 3702 bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Nco*I at 610. pCITE-4c(+) is a 3704bp plasmid; *Eco*R V cuts at 618. Add 1bp to each site beyond *Eco*R V (e.g. *Bam*H I cuts at 625). The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the T7 RNA polymerase coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

### pCITE-4a(+) sequence landmarks

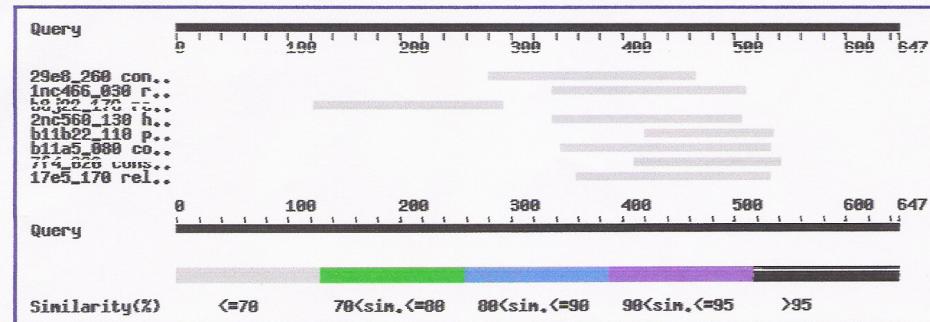
T7 promoter	3687-3703
T7 transcription start	1
CITE region	16-518
S-Tag coding sequence	534-578
Multiple cloning sites ( <i>Nco</i> I - <i>Xba</i> I)	610-669
His <sup>+</sup> Tag coding sequence	670-687
poly(A) coding sequence	701-730
T7 terminator	759-806
pUC origin	1007
<i>bla</i> coding sequence	1768-2625
f1 origin	3064-3519



## **6.5. Anexo 5 – Candidato Y3 do Duplo-Híbrido**

**Candidato Y3 do Duplo-Híbrido**

Página 1 de 4

**BLASTX sequence query of A3**

BLASTX 2.0MP-WashU [09-Sep-2002] [decunix4.0-ev56-I32LPF64 2002-09-09T17:45:09]

Copyright (C) 1996-2002 Washington University, Saint Louis, Missouri USA.  
All Rights Reserved.

Reference: Gish, W. (1996-2002) <http://blast.wustl.edu>  
Gish, Warren and David J. States (1993). Identification of protein coding regions by database similarity search. Nat. Genet. 3:266-72.

Notice: statistical significance is estimated under the assumption that the equivalent of one entire reading frame in the query sequence codes for protein and that significant alignments will involve only coding reading frames.

Query= A3  
(647 letters)

Translating both strands of query sequence in all 6 reading frames

Database: Ncrassa.prot  
9356 sequences; 4,819,102 total letters.  
Searching....10....20....30....40....50....60....70....80....90....100% done

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum Probability	
		P(N)	N
29e8_260 conserved hypothetical protein	79	0.61	1
lnc466_030 related to proline-rich protein verprolin	73	0.85	1
b8j22_170 related to protein transport protein SEC9	67	0.9996	1
2nc560_130 hypothetical protein	68	0.9997	1
b11b22_110 putative protein	51	0.9998	1
b11a5_080 conserved hypothetical protein	70	0.9998	1
7f4_020 conserved hypothetical protein	69	0.9999	1
17e5_170 related to acid phosphatase	69	0.99994	1

>29e8\_260 conserved hypothetical protein  
Length = 948

Plus Strand HSPs:

Score = 79 (32.9 bits), Expect = 0.95, P = 0.61

[http://mips.gsf.de/cgi-bin/tools/common\\_blast.pl](http://mips.gsf.de/cgi-bin/tools/common_blast.pl)

19/08/05

BLASTX sequence query of A3

Página 2 de 4

Identities = 23/63 (36%), Positives = 33/63 (52%), Frame = +1

Query: 280 KNLTRINSVECVSVRKVP-RLPSRQKYAKHASSVSQQPGVEKSPAPQQAKVCKACISI 456  
 K +R SV VS V P RLPSR KYA + + P E +PAP A+ + +S+  
 Sbjct: 655 KTSSRKGSVAVVSHPVPAQPVRLPSRPKYADAGTQTN--PDTEANPAPSPARPKRRLVSV 712

Query: 457 SQQ 465  
 + +  
 Sbjct: 713 TMR 715

>1nc466\_030 related to proline-rich protein verprolin  
 Length = 452

Plus Strand HSPs:

Score = 73 (30.8 bits), Expect = 1.9, P = 0.85  
 Identities = 25/63 (39%), Positives = 32/63 (50%), Frame = +1

Query: 337 PRLPSRQKYAKHASSVSQQPGV-EKSPAPQQAKVCKACISISQQP\*SAP----YFANPAP 501  
 P +P+ +K A ASS P V +K P P ++ A I S P SAP FA P P  
 Sbjct: 196 PSMPNLKKTANGASSKPPPPVGKKPPPPGSRKPSAAIHSSAPP-SAPPSSFAFAPP 254

Query: 502 NSA 510  
 +SA  
 Sbjct: 255 SSA 257

>b8j22\_170 related to protein transport protein SEC9  
 Length = 388

Minus Strand HSPs:

Score = 67 (28.6 bits), Expect = 7.7, P = 0.9996  
 Identities = 22/59 (37%), Positives = 37/59 (62%), Frame = -1

Query: 293 RVKFL--LNQLIF\*PIGRNRQNPL\*IKRIDRDRVECSSLEQUESTIKERGLQRQRAKNR 123  
 RVK L +N+ +F P+G +++ + R+DRDR++ + LE E I+E+ R+ KNR  
 Sbjct: 241 RVKELERVNRSRSMFLPVGHSKKT--LDRMDRDRLQ--AELE-EKEIREQNA-RELYKNR 292

>2nc560\_130 hypothetical protein  
 Length = 507

Plus Strand HSPs:

Score = 68 (29.0 bits), Expect = 8.1, P = 0.9997  
 Identities = 21/60 (35%), Positives = 28/60 (46%), Frame = +1

Query: 337 PRLP--SRQKY-AKHASSVSQQPGVEKSPAPQQAKVCKACISISQQP\*SAPYFANPAPNS 507  
 P LP RQ++ A+H S+S P P+ C AC P S P+ +P P S  
 Sbjct: 324 PLLPRKERQEWVAQHRPSLSSLSP-CSSEPPPESPCPCACTGHYHYPSSKPH-GHPHMS 381

>b11b22\_110 putative protein  
 Length = 75

Plus Strand HSPs:

Score = 51 (23.0 bits), Expect = 8.4, P = 0.9998

[http://mips.gsf.de/cgi-bin/tools/common\\_blast.pl](http://mips.gsf.de/cgi-bin/tools/common_blast.pl)

19/08/05

## Candidato Y3 do Duplo-Híbrido

Página 1 de 3

DNA VIEWER

PROTEIN VIEWER

Report help

- Report ● ProtSeq ● DnaSeq ● AIn ● BLOCKS ● PROSITE ● PFAM ● INTERPRO
- 3D ● SCOP ● AUTOFUNCAT ● COGs ● BLASTP ● INTERGENOME COMPARISON
- INTRAGENOME COMPARISON ● est
  
- Compare genomes starting from this gene

Title: 29e8\_260 conserved hypothetical protein

### General properties

Length [aa]	948
Molecular weight [Da]	102503.0
Isoelectric point	9.4
Manually edited	yes
Classification	similarity to unknown protein
Contig name	LGIV;9a30
Position	[73961] 73961-71115 [71115]
GC content [%]	53.9
TargetP	-
Classification_Blast_Hit	<a href="#">protein YKR029c homolog YJL105w, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, PIR:S53382</a>
PSORT_Localisation	nuclear
Whitehead_code	<a href="#">NCU04389.1</a>

### Protein function

Closest homologue (BLASTP)	<a href="#">TRCDSEMLNEW:BC001296_1</a> gene: "MLL5"; product: "MLL5 protein"; Homo sapiens myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 5 (trithorax homolog, <i>Drosophila</i> ), mRNA (cDNA clone IMAGE:3454696), partial cds. 3e-22
Functional categories	99 UNCLASSIFIED PROTEINS
PFAM domains	<a href="#">PF00628</a> PHD-finger 6.3e-08 <a href="#">PF00856</a> SET domain 5e-05
BLOCKS	<a href="#">IPB001214</a> SET-domain of transcriptional regulators (TRX, EZ, ASH1 etc)
INTERPRO domains	<a href="#">IPR001214</a> Nuclear protein SET (3) <a href="#">IPR001965</a> Zn-finger-like, PHD finger (2)

[http://pedant.gsf.de/cgi-bin/wwwdbp.pl?Db=Ncrassa\\_annotations&Alias=Ncrassa\\_anno...](http://pedant.gsf.de/cgi-bin/wwwdbp.pl?Db=Ncrassa_annotations&Alias=Ncrassa_anno...) 20/08/05

## Protein structure

Structural class All\_Beta

Low complexity 18.6%

[http://pedant.gsf.de/cgi-bin/wwwdbp.pl?Db=Ncrassa\\_annotations&Alias=Ncrassa\\_anno...](http://pedant.gsf.de/cgi-bin/wwwdbp.pl?Db=Ncrassa_annotations&Alias=Ncrassa_anno...) 20/08/05

## Ncrassa annotations

Página 3 de 3

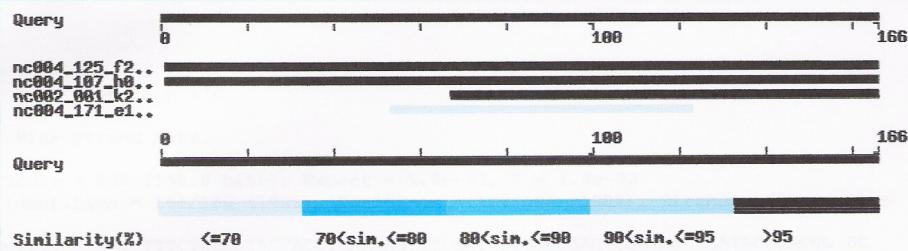
## Export

Export this entry in  format for

## **6.6. Anexo 6 – Candidato Y9 do Duplo-Híbrido**

**Candidato Y9 do Duplo-Híbrido**

Página 1 de 3

**BLASTN sequence query of A9**

BLASTN 2.0MP-WashU [09-Sep-2002] [decunix4.0-ev56-I32LPF64 2002-09-09T17:45:09]

Copyright (C) 1996-2002 Washington University, Saint Louis, Missouri USA.  
All Rights Reserved.Reference: Gish, W. (1996-2002) <http://blast.wustl.edu>

Notice: this program and its default parameter settings are optimized to find nearly identical sequences rapidly. To identify weak similarities encoded in nucleic acid, use BLASTX, TBLASTN or TBLASTX.

Query= A9  
(166 letters)Database: ncrassa\_shotgun  
108,189 sequences; 57,986,636 total letters.  
Searching....10....20....30....40....50....60....70....80....90....100% done

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum Probability	
		P(N)	N
nc004_125_f22.plca.exp	830	1.1e-32	1
nc004_107_h01 qlcb.exp	830	1.6e-32	1
nc002_001_k22 qlca 1..540	500	1.1e-17	1
nc004_171_e17.plca.exp	144	0.50	1

```
>
Length = 709
Minus Strand HSPs:
Score = 830 (130.6 bits), Expect = 1.1e-32, P = 1.1e-32
Identities = 166/166 (100%), Positives = 166/166 (100%), Strand = Minus / Plus
Query: 166 GGTGGAAGAAAGCCAGTTGATACCCGCCACGCCACGGCAGTAGTAGTGCAGAAGAAGAA 107
Sbjct: 386 GGTGGAAGAAAGCCAGTTGATACCCGCCACGCCACGGCAGTAGTAGTGCAGAAGAAGAA 445
Query: 106 ACAGGACGATGACCCCACGCCATGATGTCATCGCGCTAGTCACCCGTGGGTATCAGC 47
Sbjct: 446 ACAGGACGATGACCCCACGCCATGATGTCATCGCGCTAGTCACCCGTGGGTATCAGC 505
```

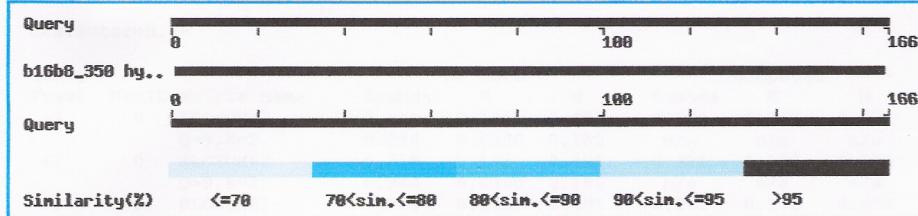
[http://mips.gsf.de/cgi-bin/tools/common\\_blast.pl](http://mips.gsf.de/cgi-bin/tools/common_blast.pl)

08/10/05

## Candidato Y9 do Duplo-Híbrido

Página 1 de 2

### BLASTX sequence query of A9



BLASTX 2.0MP-WashU [09-Sep-2002] [decunix4.0-ev56-I32LPF64 2002-09-09T17:45:09]

Copyright (C) 1996-2002 Washington University, Saint Louis, Missouri USA.  
All Rights Reserved.

Reference: Gish, W. (1996-2002) <http://blast.wustl.edu>  
Gish, Warren and David J. States (1993). Identification of protein coding  
regions by database similarity search. Nat. Genet. 3:266-72.

Notice: statistical significance is estimated under the assumption that the  
equivalent of one entire reading frame in the query sequence codes for protein  
and that significant alignments will involve only coding reading frames.

Query= A9  
(166 letters)

Translating both strands of query sequence in all 6 reading frames

Database: Ncrassa.prot  
9356 sequences; 4,819,102 total letters.  
Searching....10....20....30....40....50....60....70....80....90....100% done

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Smallest	Probability			
	Sum		Score	P(N)	N
b16b8_350 hypothetical protein	271	1.4e-23	1		

>b16b8\_350 hypothetical protein  
Length = 587

Minus Strand HSPs:

Score = 271 (100.5 bits), Expect = 1.4e-23, P = 1.4e-23  
Identities = 55/55 (100%), Positives = 55/55 (100%), Frame = -2

Query: 165 VEESQLIPAHATAVVVQKKKQDDDPNAMMSSRLVNPWVSAADSAKIATFEVVVEK 1  
VEESQLIPAHATAVVVQKKKQDDDPNAMMSSRLVNPWVSAADSAKIATFEVVVEK  
Sbjct: 409 VEESQLIPAHATAVVVQKKKQDDDPNAMMSSRLVNPWVSAADSAKIATFEVVVEK 463

Parameters:  
cpus=1  
putenv="WUBLASTFILTER=/home/app/bio/wublast/filter"  
E=1e-3

[http://mips.gsf.de/cgi-bin/tools/common\\_blast.pl](http://mips.gsf.de/cgi-bin/tools/common_blast.pl)

08/10/05

## Candidato Y9 do Duplo-Híbrido

Página 1 de 2

DNA VIEWER

PROTEIN VIEWER

AMOSTRA 9

Report help

- Report  ProtSeq  DnaSeq  Aln  BLOCKS  PROSITE  PFAM  INTERPRO
- 3D  SCOP  AUTOFUNCAT  COGs  BLASTP  INTERGENOME COMPARISON
- INTRAGENOME COMPARISON  est

- Compare genomes starting from this gene

Title: b16b8\_350 hypothetical protein

### General properties

Length [aa]	587
Molecular weight [Da]	65125.7
Isoelectric point	5.8
Manually edited	yes
Classification	no similarity
Contig name	LGI:9a79
Position	[135754] 135754-137517 [137517]
GC content [%]	52.5
TargetP	-
PSORT_Localisation nuclear	
Whitehead_code	<a href="#">NCU02686.1</a>

### Protein function

Functional categories	99 UNCLASSIFIED PROTEINS
-----------------------	--------------------------

### Protein structure

Structural class	All_Alpha
Low complexity	16.9%
Sequence	MDSFRETLEAVQKVLQPYTRPREEAAHIRRLTLHLSSGLKDGTLPPLSTESS
Structure	...hhhhhhhhhh.....hhhhhhhhhhhh.....
Low complexity	.....
Non-globular	.....

[http://pedant.gsf.de/cgi-bin/wwwdbp.pl?Db=Ncrassa\\_annotations&Name=dynrep&Strin...](http://pedant.gsf.de/cgi-bin/wwwdbp.pl?Db=Ncrassa_annotations&Name=dynrep&Strin...) 08/10/05

## Export

Export this entry in **Text/FASTA** format for **Unix** Go

[http://pedant.gsf.de/cgi-bin/wwwdbp.pl?Db=Ncrassa\\_annotations&Name=dynrep&Strin...](http://pedant.gsf.de/cgi-bin/wwwdbp.pl?Db=Ncrassa_annotations&Name=dynrep&Strin...) 08/10/05

## **6.7. Anexo 7 – Candidato Y8 do Duplo-Híbrido**

**Candidato Y8 do Duplo-Híbrido**

Página 1 de 2

DNA VIEWER

PROTEIN VIEWER

Report help

Report • ProtSeq • DnaSeq • Aln • BLOCKS • PROSITE • PFAM • INTERPRO  
 • 3D • SCOP • AUTOFUNCAT • COGs • BLASTP • INTERGENOME COMPARISON  
 • INTRAGENOME COMPARISON • est

Compare genomes starting from this gene *A8*

Title: 1nc400\_220 conserved hypothetical protein

**General properties**

Length [aa]	369
Molecular weight [Da]	41740.6
Isoelectric point	9.6
Manually edited	yes
Classification	similarity to unknown protein
Contig name	LGI:1nc400
Position	[89845] 89845-89823, 89755-88690, 88619-88599 [88599]
GC content [%]	50.4
TargetP	-
Classification_Blast_Hit	<a href="#">hypothetical protein YGR280c, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, PIR:S64615</a>
PSORT_Localisation	nuclear
Whitehead_code	<a href="#">NCU02528.1</a>

**Protein function**

Closest homologue (BLASTP)	<a href="#">TRCDSEMBL:AF432905_1</a> product: "PinX1"; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PinX1 mRNA, complete cds. 8e-15
Functional categories	99 UNCLASSIFIED PROTEINS
PFAM domains	<a href="#">PF01585</a> G-patch domain 0.00034
BLOCKS	<a href="#">IPB001422</a> Neuromodulin (GAP-43)
INTERPRO domains	<a href="#">IPR000467</a> D111/G-patch domain (3)  <a href="#">SWISSPROT:PII1_MOUSE</a> anti-oncogene 1e-06 <a href="#">SWISSPROT:PII1_MOUSE</a> nuclear protein 1e-06 <a href="#">SWISSPROT:PII1_MOUSE</a> chromosomal protein 1e-06 <a href="#">SWISSPROT:PII1_MOUSE</a> telomere 1e-06

[http://pedant.gsf.de/cgi-bin/wwwdbp.pl?Db=Ncrassa\\_annotations&Alias=Ncrassa\\_anno...](http://pedant.gsf.de/cgi-bin/wwwdbp.pl?Db=Ncrassa_annotations&Alias=Ncrassa_anno...) 09/10/05