

Título: Prospecção de proteínas que interagem com a glutaminase isoforma *kidney-type* pela técnica de duplo híbrido em levedura

Pesquisadora: Dra. Sandra Martha Gomes Dias

Unidade: Laboratório Nacional de Biociências – LNBio

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM

Introdução: Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células, as quais invadem tecidos e órgãos. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o câncer é uma das principais causas de morte no mundo, tendo sido responsável por 7,9 milhões de mortes em 2007 e com estimativa de 12 milhões de mortes em 2030. Atualmente existem vários focos de estudos objetivando o entendimento do processo proliferativo do câncer, sendo um de destaque dado o renovado interesse da comunidade científica: a adaptação metabólica tumoral. Células com câncer possuem suas vias glicolíticas e glutaminolíticas aumentadas em níveis compatíveis com suas necessidades bioenergéticas e biossintéticas. A glutaminase é a primeira enzima da via glutaminolítica, sendo chave para o processo canceroso. Três isoformas já foram descritas, produto de genes distintos e de *splicing* alternativo. A busca de seus parceiros de interação tem o potencial de desvendar a exata importância das 3 isoformas para o processo tumoral, assim como entender suas funções extra-enzimáticas.

Objetivos gerais: (1) Identificar as proteínas que interagem com a isoforma glutaminase *kidney-type* (KGA) utilizando a técnica de duplo-híbrido em levedura e (2) introduzir o aluno ao ambiente científico, obtendo conhecimento de técnicas laboratoriais, bem como dinâmica de laboratório e espírito científico.

Objetivos específicos: (1) clonagem das isoformas em vetores adequados ao experimento; (2) utilização da técnica de duplo-híbrido em levedura para a detecção de proteínas de interação; (3) confirmação das interações, *in vivo*, no mesmo sistema em levedura; (4) construção de um mapa de interação protéica.

Metodologia:

1. Clonagem dos transcritos: No início do projeto serão adotados procedimentos básicos de biologia molecular para a clonagem dos transcritos em vetores apropriados para o estudo. Essas técnicas são descritas com detalhes em manuais de laboratório (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1995) e incluem: PCR para amplificação dos

transcritos, purificação do produto da PCR, clonagem e subclonagem, seqüenciamento de DNA entre outras.

2. Prospecção de proteínas que interagem com a isoforma KGA através do sistema de duplo-híbrido em levedura: A técnica de duplo-híbrido em levedura é uma poderosa ferramenta desenvolvida para identificar transcritos que codificam proteínas que interagem com uma proteína alvo (proteína “isca”), *in vivo*. Além disso, pode ser usada para definir domínios ou regiões da proteína envolvidos nessa interação.

Posteriormente à identificação destes parceiros de interação, todas as interações serão confirmadas pela transformação aos pares das leveduras com vetor contendo o gene para a “isca” e vetor contendo o gene “presa” identificada. Esse processo compreende a primeira técnica de confirmação de interação. Estudos posteriores de expressão das proteínas em sistema heterólogo, purificação e *pull-down* também serão empregados.

Esta metodologia foi implementada recentemente em nosso laboratório mostrando bons resultados para a isoforma *liver-type*. Sendo assim, este trabalho complementarará um projeto já iniciado, promovendo a identificação de parceiros protéicos de interação para as demais glutaminases, além de sua contextualização no processo canceroso.